

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04984

研究課題名(和文) 時空的観察による卵胞発育制御機構の解明と卵胞発育因子の同定

研究課題名(英文) Elucidation of folliculogenesis by spatio-temporal investigation

研究代表者

岩瀬 明 (Iwase, Akira)

名古屋大学・医学部附属病院・病院教授

研究者番号：20362246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では初期卵胞発育制御機構とその関連要因を解明し、新たな治療法開発や卵巣の体外培養系の確立につなげることを目的とした。マウス卵巣組織培養の継時的観察系を確立し、GDF-9, bFGF, IGF-1を卵巣体外培養系での初期卵胞発育促進因子として、AMHを抑制因子として同定し、その作用機序についても詳細に解析した。さらに新規ペプチド卵胞発育促進因子としてkisspeptin, phonexinを見出した。上記薬剤によりマウス卵巣組織培養において効果的な成熟卵の産出に成功したが、ヒト卵巣を用いた検討では有意な促進を認めなかった。これは卵巣の大きさ、卵胞発育サイクルの違いが原因と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our project was to analyze the mechanism of early follicle development and consequently develop new drugs for ovarian stimulation and ex vivo ovarian tissue culture system. We established visualized murine ovarian tissue culture system and identified GDF-9, bFGF and IGF-1 as a stimulating factor and AMH as an inhibiting factor for follicle development. We also identified kisspeptin and phonexin as a novel peptide factor inducing follicle development. We demonstrated that the factors mentioned above induced follicle development in ex vivo murine ovarian tissue culture and efficiently produced matured oocytes. However, the investigation using human ovarian tissues revealed that ex vivo-induction of follicle development was not feasible because of the differences in ovarian sizes and follicle growth cycles.

研究分野：産婦人科学

キーワード：生殖医学 卵巣 卵胞発育 体外培養

## 1. 研究開始当初の背景

体外受精は不妊症患者の大きな福音となるとともに、ヒトの受精現象と受精卵(胚)発育を可視化せしめ、受精率や胚発育の向上につながる多大なる知見を与えた。さらに、顕微授精の発展により、現在の不妊症診療においては、poor responder と呼ばれる成熟卵獲得が困難な症例、卵の質の低下による妊娠率低下・流産率上昇といった卵巣/卵に起因する問題が大きくなっている。

排卵誘発剤(ゴナドトロピン)に反応するのは発育の最終段階にある卵胞のみであり、この時期をゴナドトロピン依存性発育と呼ぶが、その前にゴナドトロピン非依存性の初期発育段階があり、この発育段階において卵胞構成成分である顆粒膜細胞のアポトーシス等により、多くの卵胞に卵胞閉鎖や卵の質の低下がもたらされることが知られている。すなわち上述した現在の不妊症診療の問題点は、初期卵胞発育の段階で存在していると言える。ゴナドトロピン非依存性発育段階は、ゴナドトロピン依存性発育に比べ期間が長いこと、その過程の大部分が卵巣組織内では再現できないことより、経時的な観察すら容易ではなく初期卵胞発育機序に関しては、研究が十分に進んでいない状況にあるといえる。

我々は世界に先駆け、ヒト胚発育の観察に顕微鏡内蔵型インキュベーターを臨床応用し、その安全性・有用性を報告した(Nakahara T, Iwase A et al. J Assist Reprod Genet 2010; 27: 93-96)。その技術を応用し卵巣薄切標本を用い初期卵胞発育を経時的に観察し評価する系を確立した。また顆粒膜細胞増殖・分化制御に関わる細胞内シグナルについての解析も行ってきたが(Iwase A, Goto M et al. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94: 2184-2191, Goto M, Iwase A et al. Reproduction 2009; 137: 835-842)、さらに研究をすすめるため、ヒトの場合検体採取が困難である排卵前の非黄体化顆粒膜細胞の不活化細胞株を樹立した(Bayasula, Iwase A et al. Endocrinology 2012; 153: 2851-2860)。これらにより卵巣組織内での初期卵胞発育の可視化と卵胞発育に関する *in vitro* の詳細な検討が可能となり、本研究の総合的な解析計画につながった。

## 2. 研究の目的

我々の研究は、いまだ十分解明されていない初期発育段階の卵胞発育制御機構を、顆粒膜細胞の増殖制御・ステロイド産生能獲得の観点と、卵胞発育の Stop and Go 制御機構の観点から総合的に解明しようとするものであるが、この機構に関わる諸因子の同定は、卵巣組織内での原始卵胞のリクルートメントと初期卵胞発育の誘導、卵巣 卵胞培養での効果的な卵胞発育系の開発に役立つと考えられる。具体的には以下の項目について解析を行うことを本研究の目的とした。

(1) 経時的観察による卵胞発育のダイナミクス

## △および Stop and Go 解析

まずマウス卵巣組織培養を行い顕微鏡内蔵型インキュベーターで観察し、卵巣組織内での卵胞発育のダイナミクス解析を行う。発育スピード、卵胞の組織内での位置と発育・退行について時空間的な解析を行い、発育卵胞と発育停止卵胞とを免疫組織染色、網羅的遺伝子発現解析などにより比較し、卵巣組織内での卵胞発育の Stop and Go を制御している因子の同定を行う。同様の系で、手術摘出検体のヒト卵巣を用いてヒトの初期卵胞発育を卵巣組織内で観察・解析し制御因子の同定を行う。

(2) 顆粒膜細胞増殖・ステロイド産生能制御の *in vitro* 解析

初期卵胞発育においては顆粒膜細胞の増殖、ステロイド産生能獲得といった一連の変化が必要であり、これらの解析に我々の不活化細胞株が役立つ。すでに我々は初期卵胞発育に重要な因子である Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )スーパーファミリー添加により遺伝子発現を網羅的に解析し、発現増加遺伝子が卵胞発育に重要な役割を果たしていることを報告している(Nakamura T, Iwase A et al. Reprod Sci 2015; 22: 377-384)。今回の研究では、それらをさらに推し進めるとともに(1)で同定された因子についても、*in vitro* での詳細な解析を行い、顆粒膜細胞制御機構の完全解明をめざす。近年、成人型顆粒膜細胞腫の責任遺伝子として転写因子である FOXL2 が同定されたが(N Eng J Med 2009; 25: 2719-2729)、FOXL2 は顆粒膜細胞の増殖・分化やステロイド産生にも関わっている可能性が示唆されており、FOXL2 についても同様に検討する。

(3) 卵巣組織・卵胞培養系の確立と評価

上記(1)、(2)で得られた知見をもとに卵巣組織—卵胞培養系を確立し、体外での原始卵胞からの成熟卵獲得をめざす。まずマウス卵巣において実験を行い、ヒト卵巣へ応用する。完全体外培養系の確立をめざすが、マウス腎被膜下移植系などの *in vivo* モデルについても検討し評価を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 経時的観察による卵胞発育のダイナミクス △および Stop and Go 解析

予備実験としてマウス薄切卵巣組織を用いた長期培養と卵胞径を指標とした発育解析に成功している。この系を用いて以下の点について詳細な検討を行い卵胞発育の時空間的な解析を行った。

発育卵胞の発育スピード・卵胞腔形成・排卵現象の解析

卵胞ごとに卵胞径・面積を経時的に計測し卵胞発育曲線を作成した。その過程において卵胞腔形成、排卵現象の有無とその時期についても検討した。本実験および以下の実験の卵巣培養については、ICR マウス 4-8 週齢を用い、各卵巣をから 4-6 切片に薄切して培養を

行った。

初期卵胞発育関連増殖因子・細胞内シグナル因子の添加による発育の変化  
初期卵胞発育に關与する TGF- $\beta$  スーパーファミリーを中心に、Growth differentiation factor-9 (GDF-9), Bone morphogenetic proteins (BMP), anti-Müllerian hormone (AMH), Kit ligand, Basic fibroblast growth factor (bFGF), Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)を添加し、卵胞発育曲線を作成した。この段階で卵巣内初期卵胞発育を制御する因子について絞り込みと同定を行った。またある程度発育した卵胞ではゴナドトロピンの反応性を獲得してくるものと推測されるため、上記刺激後シケンシャルに Follicle-stimulating hormone (FSH)添加を行い、発育の変化を解析しゴナドトロピン反応性獲得時期について検討した。

卵巣組織免疫組織染色と BrdU パルスチェイスによる顆粒膜細胞増殖開始起点の解析

卵巣組織培養において顆粒膜細胞を中心に増殖、viability, アポトーシスについて評価を行い健全な卵胞発育が継続しているかどうか検証した。各発育段階での Stop and Go の評価を行うため、BrdU パルスチェイスによる顆粒膜細胞増殖の評価を行った。無刺激および上記2と同様の刺激を行い、24時間 BrdU 含有培地で卵巣組織を培養し DNA 複製中の細胞への BrdU 取り込みを評価した。

(2) 顆粒膜細胞増殖・ステロイド産生能制御の in vitro 解析  
転写因子 FOXL2

転写因子 FOXL2 は顆粒膜細胞増殖とステロイド産生制御に關与している可能性がある。Wild-type FOXL2 を有する HGrC(我々が独自に樹立したヒト顆粒膜細胞株 Bayasula, Iwase A et al. Endocrinology 2012; 153: 2851-2860) において FOXL2 siRNA によるノックダウン時の増殖能、アロマターゼ活性等を1と同様の方法で、FSH レセプター遺伝子発現をウェスタンブロット法、定量的 RT-PCR にて検討する。さらに Wild-type FOXL2 または変異 FOXL2 (成人型顆粒膜細胞腫由来細胞株 KGN より cDNA を取得) を HGrC に強制発現させた場合の変化についても解析した。

新規ペプチド卵胞発育促進因子

近年、神経ペプチドが卵巣にも発現し、卵胞発育を制御している可能性が報告している。我々は、卵巣での検討がされていない kisspeptin, TPP3, phonexin のペプチドに着目し、HGrC を用いてステロイド産生能、ステロイド産生酵素発現、細胞増殖能、アポトーシスについて解析を行った。

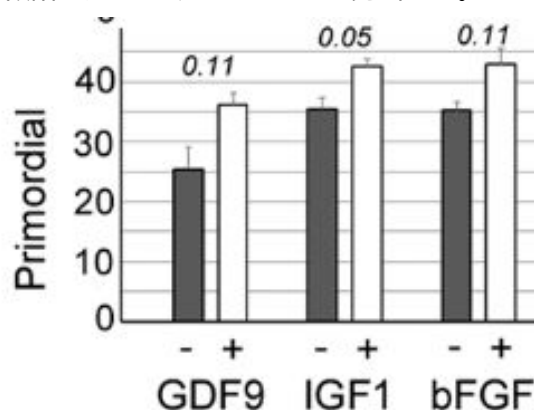
(3) ヒト卵巣組織の経時的観察による卵胞発育のダイナミズムおよび Stop and Go 解析

マウス卵巣と同様に、手術によって摘出され

たヒト卵巣の皮質を薄切し観察を行った。ヒト卵巣においては、幼弱マウスに比べ卵胞の密集度が低く、顕微鏡内蔵インキュベーターによる経時的な観察が困難な場合が予想されたため、いくつかの卵巣組織切片を作成し、異なる培養期間で回収した検体中の卵胞数を、原始、一次、二次(前胞状、胞状)、グラフ卵胞といった発育段階ごとにカウントし卵胞発育の指標とした。BrdU パルスチェイスについても同様に行い、ヒト卵巣内における卵胞発育開始機転の探索を行った。

#### 4. 研究成果

マウス卵巣培養における BrdU パルスチェイスによる顆粒膜細胞増殖の評価では GDF-9, IGF-1, bFGF で BrdU 陽性卵胞の増加をみとめ(図1)また因子ごとに作用する卵胞の発育段階に違いがみられることを見出した。

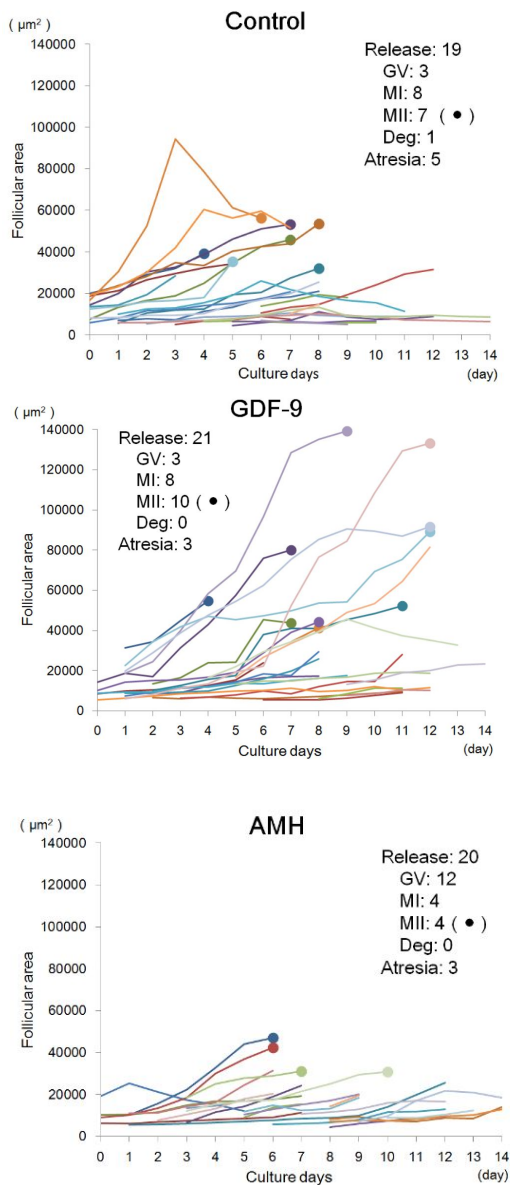


(図1. 各因子の添加で BrdU 陽性原始卵胞数が増加した。黒：対照群、白：添加群、p 値をグラフ上に示した)

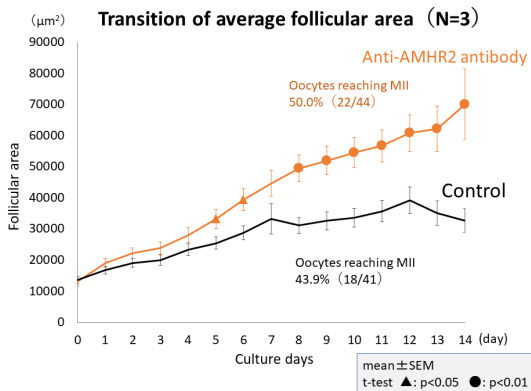
上記因子の顆粒膜細胞増殖機序の一端を解明するため不死化ヒト顆粒膜細胞株に添加実験を行い細胞内シグナルの活性化状況を確認した。おもに PI3K-Akt 経路、Smad、ERK1/2 経路の亢進をみとめたが、因子ごとに主要な経路は異なっていた。

卵巣組織内での卵胞発育の詳細を明らかにするため、卵巣組織培養の経時的観察を行った。GDF-9, IGF-1, bFGF による卵胞発育促進作用、AMH による抑制作用を見出した(図2)。AMH による抑制作用を解除すると卵胞発育が促進するかどうか検証するため、抗 AMH 受容体抗体を添加して同様の実験をおこなったところ、卵胞発育の促進をみとめた(図3)。これは BrdU パルスチェイス法による顆粒膜細胞増殖機転と一致する結果であった。

GDF-9 と bFGF は、不死化顆粒膜細胞株を用いた実験では異なる細胞内シグナルを経由しているため、同時添加もしくはシケンシャル添加による相加相乗効果を期待したが、卵巣組織培養における卵胞発育は、単独投与时よりも抑制される結果となった。



(図2: GDF-9で発育の促進と、AMHで発育の抑制をみとめた。卵胞から放出された時点の卵の成熟度は各グラフ内に明示した。)



(図3: AMH中和抗体はAMHの作用をブロックすることにより卵胞発育を促進することが示唆された。)

さらに不死化顆粒膜細胞を用いた *in vitro* の実験により kisspeptin, TPP3, phonexin とい

った増殖促進因子を同定した。kisspeptin には抗アポトーシス作用、phonexin にはステロイド産生酵素群の発現促進作用もみとめた。これらの因子についても上記と同様のマウス卵巣培養にて卵胞発育の亢進をみとめた。

卵胞発育の主要な構成因子である顆粒膜細胞増殖とステロイド産生を *in vitro* で評価するため HGrC を用いた解析を行った。その結果、FOXL2C134W の変異では、wild-type に比べ、アロマチン添加時のアロマターゼ発現および顆粒膜細胞の増殖が亢進していることを見出した。アロマターゼはアンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素であり、エストロゲンが卵胞発育を促進することを考えると、FOXL2 とその上流・下流のシグナル因子を制御することにより、効率的な卵胞発育の誘導が可能になると考えられたため、FOXL2 に対する siRNA を用い *in vitro* で HGrC のアロマターゼ発現と増殖能を評価したが、単純な FOXL2 の発現抑制では、FOXL2C134W 変異で認められた変化は再現できなかった。

さらにヒト卵巣を用いた卵巣組織培養の検討を行った。ヒト卵巣組織培養を 1-5 週間行い 1 週ごとに評価を行った。過数が進むにすれ、Ki67 染色で評価できる増殖能のある顆粒膜細胞は減少し、5 週ではほとんど Ki67 陽性顆粒膜細胞はみとめなかった。さらに卵胞の形態的評価でも、健全な卵胞はほぼ消失していた。一方、BrdU 取り込み能の評価では、3 週までは顆粒膜細胞での取り込みをみとめた。マウス卵巣組織培養で効果のあった GDF-9, bFGF, AMH 中和抗体を添加し、ヒト卵胞の発育促進効果を検証したが、各発育段階の卵胞数の計測では明らかな発育誘導効果はみとめられなかった。

本研究により可視化マウス卵巣組織培養系において卵胞発育促進因子および抑制因子の検証が可能なること、その裏付けとして同培養系における BrdU の顆粒膜細胞への取り込みが同様の傾向を示すこと、各物質の分子作用機序についてはヒト不死化顆粒膜細胞株 HGrC が使用可能なことが様々な角度から検証された。これまでマウスの場合は、卵巣組織培養に用いる卵巣は出生直後マウス由来のものであり、成熟卵獲得は卵巣組織培養単独ではなく、卵巣培養 - 卵胞培養系によるものであり、我々の研究でより生体内に近い卵胞発育の再現、成熟卵の獲得が可能になることが示された。加えて、いくつかの卵胞発育促進因子ならびに抑制因子が同定・検証でき、今後の *in vivo* の検討を経て新規排卵誘発剤や排卵抑制剤として応用できる可能性が示唆された。一方、ヒト卵巣においては、卵巣そのものが大きい、卵胞発育のサイクルがマウスに比べて長いという問題点があり、*in vitro* において効果的に卵胞発育を促進できる系の開発には至らなかったが、3 週程度までは顆粒膜細胞の増殖と卵胞発育が期待できることが示唆された。より長期の培養が可

能になる系の開発、飛躍的にヒト卵胞発育に要するサイクルを短縮する方法の開発が今後の克服課題であることを見出した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

1. The regulation of ovarian follicular growth by anti-Müllerian hormone. Nakamura T, Murase T, Osuka S, Goto M, Iwase A. Journal of mammalian ova research 2018: in press 査読有
2. FOXL2C134W-induced CYP19 expression via cooperation with SMAD3 in HGrC1 cells. Belli M, Iwata N, Nakamura T, Iwase A, Stupack D, Shimasaki S. Endocrinology 2018; 159: 1690-1703 査読有
3. Follicle dynamics: visualization and analysis of follicle growth and maturation using murine ovarian tissue culture. Murase T, Iwase A, Komatsu K, Nakamura T, Osuka S, Takikawa S, Goto M, Kotani T, Kikkawa F. Journal of assisted reproduction and genetics 2018; 35: 339-343 査読有

[学会発表](計 4件)

1. Directive Action of Neuropeptide Phoenixin and Its Receptor GPR173 during Folliculogenesis. Phuoc Xuan Nguyen, Akira Iwase, Tomohiko Murase, Umida Ganieva, Ying Qin, Bayasula, Ken Shimizu, Satoko Osuka, Tomoko Nakamura, Maki Goto, Fumitaka Kikkawa 65th Society for Reproductive Investigation Annual Scientific Meeting(国際学会)2018.3.7-10 San Diego (USA)
2. Exogenous GDF-9 Treatment Induces Follicular Development Through Downregulation of Anti-Mullerian Hormone Receptor as Visualized in the Sliced Ovarian Tissue Culture System. Tomohiko Murase, Akira Iwase, Kouji Komatsu, Wei Wei, Umida Ganieva, Bayasula, Ying Qin, Phuoc Xuan Nguyen, Sayako Yoshita, Ayako Muraoka, Shotaro Hayashi, Yukiyo Kasahara, Natsuki Nakanishi, Takashi Nagai, Ken Shimizu, Chiharu Ishida, Tomoko Nakamura, Satoko Osuka, Maki Goto, Fumitaka Kikkawa 65th Society for Reproductive Investigation Annual Scientific Meeting (国際学会) 2018.3.7-10 San Diego (USA)
3. マウス卵巣組織培養による卵胞、卵母細胞の発育解析と顆粒膜細胞増殖の評価 邨瀬智彦、岩瀬明、仲西菜月、笠原幸代、

永井孝、清水顕、石田千晴、加藤奈緒、大須賀智子、滝川幸子、後藤真紀、吉川史隆 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会 2017.4.13-16 広島グリーンアリーナ(広島県広島市)

4. Growth differentiation factor 9 induces granulosa cell proliferation via inhibition of the expression of AMH type II receptor. Akira Iwase, Satoko Osuka, Bayasula, Sachiko Takikawa, Tomohiko Murase, Tomoko Nakamura, Maki Goto, Fumitaka Kikkawa 64th Society for Reproductive Investigation Annual Scientific Meeting (国際学会) 2017.3.15-18 Orlando (USA)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/>

(名古屋大学医学部産婦人科)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

岩瀬 明 (IWASE, Akira)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院教授  
研究者番号: 20362246

##### (2)研究分担者

後藤 真紀 (GOTO, Maki)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号: 90378125

滝川 幸子 (TAKIKAWA, Sachiko)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号: 70456664

中原 辰夫 (NAKAHARA, Tatsuo)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 50534830

中村 智子 (NAKAMURA, Tomoko)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 40732681

##### (3)連携研究者

邨瀬 智彦 (MURASE, Tomohiko)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 90803114

##### (4)研究協力者

魏 威 (WEI, wei)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院生

Phuoc Xuan Nguyen (NGUYEN, Phuoc Xuan)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院生

小松 紘司 (KOMATSU, Kouji)  
愛知医科大学・生理学 I 講座・講師