

令和元年6月6日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20217

研究課題名(和文)薬剤によるHippoシグナル抑制剤による低侵襲性原始卵胞活性化法の開発

研究課題名(英文)Development of minimally invasive primordial follicle activation method by Hippo signal inhibitor by drug

研究代表者

佐藤 可野 (Sato, Yorino)

国際医療福祉大学・医学部・助教

研究者番号：00511073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：通常エフェクタータンパクであるYAPはHippoシグナルにより核移行が抑制されている。アクチンの重合化によりHippoシグナルを抑制すると、YAPが核内へ移行しCCN成長因子などの産生を促すことで卵胞発育が促進される。YAPの核移行を促進するという報告のあるリゾホスファチジン酸(LPA)やトロンビンのHippoシグナル抑制の証明と卵胞発育促進効果の有無について評価した。ヒト顆粒膜細胞株にLPAとトロンビンを添加したリアルタイムPCRにおいてHippoシグナルの下流マーカーであるCCN成長因子の発現が増加することを確認した。また、YAPの核内移行についても確認することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者等の開発したIVAは、これらの患者が自らの卵子で妊娠可能な画期的な方法であるが、2回の腹腔鏡下手術を行うため侵襲度が高く、最終的にIVF-ETが必要で自然妊娠はできない。本研究により、薬剤を用いたHippoシグナルの抑制が可能となれば、低侵襲な卵胞発育の誘導法が開発可能で、自然妊娠すらも可能となる。本法の確立で身体的にも経済的にも患者への負担が非常に軽減され、提供卵子以外の有効な治療法がないこれらの患者の大きな福音となり、生殖医学を大きく発展させると期待される。少子化対策、医療費削減など社会的にも非常に意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The nuclear translocation of YAP, which is usually an effector protein, is suppressed by Hippo signal. When Hippo signal is suppressed by actin polymerization, follicular development is promoted by YAP translocating into the nucleus and promoting the production of CCN growth factor and the like. We demonstrated that Hippo signal suppression of lysophosphatidic acid (LPA) and thrombin has been reported to promote nuclear translocation of YAP and whether or not the follicular growth promoting effect is present. We confirmed that the expression of CCN growth factor, which is a downstream marker of Hippo signal, is increased in culture real-time PCR in which LPA and thrombin were added to a human granulosa cell line. We also confirmed the nuclear translocation of YAP.

研究分野：生殖工学

キーワード：卵胞発育 IVA Hippoシグナル

1. 研究開始当初の背景

早発卵巢不全は40歳未満の女性で1年以上の無月経を呈する場合に診断される。卵巢内に発育した卵胞が認められずに不妊を呈する。また一方で、卵巢機能は加齢とともに低下し、卵巢内の残存卵胞が減少することで、閉経前後の女性是不妊であり排卵誘発剤による治療に対して反応せずに卵胞発育が認められないことが多い。

従って早発卵巢不全や閉経前後の不妊患者では自らの卵子を用いた妊娠は非常に困難で、最も確実な治療法は若年女性からの卵子提供(ドナー卵子)による体外受精胚移植(IVF-ET)である。最近申請者らは、卵巢組織の小断片化により卵胞のHippoシグナルが抑制され、その下流のCCN成長因子が産生され、卵胞発育が誘導されることを見出した(Kawamura, Sato et al., PNAS, 2013)。さらに、断片化による物理的刺激により、顆粒膜細胞のアクチン重合が起こりHippoシグナルが抑制されることも明らかにしている(図1)。

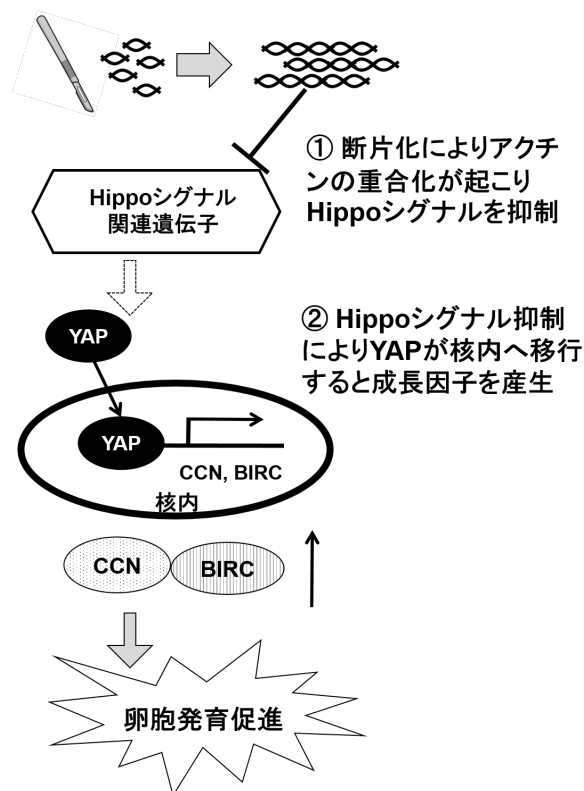


図1 本研究の基礎概念

一方、共同研究者らはAktシグナル活性化剤を用いて原始卵胞内のAktシグナルを活性化することで、原始卵胞を人為的に活性化することを見出した(Li and Kawamura et al., PNAS, 2010)。

これらの研究成果をもとに、申請者らは卵巢機能不全患者が自らの卵子で妊娠可能な新たな不妊治療法を考案し(IVA: In vitro Activation) 早発卵巢不全患者に対して倫理委員会の承認と患者の同意の下にIVAの臨床応用を行った。患者から腹腔鏡下において卵巢を摘出し、小断片化した卵巢組織をAktシグナル活性化剤を含む培養液で培養することで、卵胞発育の誘導と原始卵胞の活性化を行い、再度腹腔鏡下にて卵巢組織を卵管漿膜下に移植した。移植後に卵胞発育を認め、体外受精胚移植(IVF-ET)によりで世界で初めて健児を得た(Kawamura, Sato et al., PNAS, 2013)。

しかし現行のIVAでは、2度の手術を必要とするため、患者への侵襲性が高く妊娠にはIVA-ETを必要とする。卵巢を小断片化することなく、Hippoシグナル抑制剤を直接用いてHippoシグナルを抑制して卵胞発育を誘導できれば、低侵襲で自然妊娠も可能な方法が開発できる。そこで本研究では、外科的手術を必要としない薬剤を用いたHippoシグナル抑制による卵胞発育誘導を基盤とする低侵襲的なIVAの確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、Hippoシグナルを抑制する薬剤を用いた外科的手術を必要としない低侵襲的なIVA法の確立を最終目的として、本研究期間内に以下の事を明らかにする。

in vitro, *in vivo*におけるマウス卵巢での各種のHippoシグナル抑制剤によるHippoシグナル抑制の証明とその卵胞発育の誘導効果の有無を評価する。

Hippo シグナル抑制剤を用いて発育誘導した卵胞より得られたマウス卵子の質とその正常性について評価する。

Hippo シグナル抑制剤を用いた IVA の臨床応用にむけ、トランスレーショナルリサーチとしてヒト組織を用いて各種の Hippo シグナル抑制剤による Hippo シグナル抑制の証明とその卵胞発育の誘導効果の有無を評価する。

3. 研究の方法

通常エフェクタータンパクである YAP は Hippo シグナルにより核移行が抑制されている。アクチンの重合化により Hippo シグナルを抑制すると、YAP が核内へ移行し CCN 成長因子などの産生を促すことで卵胞発育が促進される。本年度は最も有用な Hippo シグナル抑制剤の探索を目的として、申請者らがすでに *in vitro* において Hippo シグナル抑制による卵胞発育促進作用を報告した JASP と S1P (Yuan, Sato et al., FASEBJ. 2015) のほかに、YAP の核移行を促進するという報告のあるリゾホスファチジン酸 (LPA) やトロンピン (TMB) の Hippo シグナル抑制の証明と卵胞発育促進効果の有無について評価した。

(1) LPA とトロンピンによる卵巣における Hippo シグナル抑制効果

ヒト顆粒膜細胞株および 10 日齢マウス卵巣を LPA とトロンピンを添加した培養液で卵巣組織培養したのち、Hippo シグナルが抑制されるかについて分子生物学的に証明する。薬剤処理後の卵巣を経時的に回収し、リアルタイム PCR 法を用いて CCN 成長因子の発現変化、免疫染色による YAP の核内移行、ウェスタンブロッティングにより YAP/pYAP の発現比を比べて発現変動について調べた。コントロールは非処理群とした。

(2) LPA とトロンピンによる *in vitro* 卵胞発育促進効果

LPA とトロンピンを用いて、10 日齢マウスの卵巣を体外組織培養し、ブアン固定したのち培養後の卵巣重量の変化を非処理群と比較した。また、薄切後に HE 染色を行い既報の方法に従って (Sato et al.

Mol. Endo., 2012) 組織学的に各発育段階の卵胞数を計測した。卵巣重量同様に非処理群と比較することで LPA とトロンピンの卵胞発育促進効果の有無を確認した。

4. 研究成果

ヒト顆粒膜細胞株および 10 日齢マウス卵巣を LPA とトロンピンを添加した培養液で卵巣組織培養したのち、Hippo シグナルが抑制されるかについてリアルタイム PCR 法を用いて CCN2 成長因子の発現変化について調べた。するとヒト顆粒膜細胞株およびマウス卵巣において LPA の添加により CCN2 遺伝子発現が増加することを明らかにした。しかしながら TMB については顆粒膜細胞株においては CCN2 遺伝子発現が増加したが、マウス卵巣においては増加しなかった。

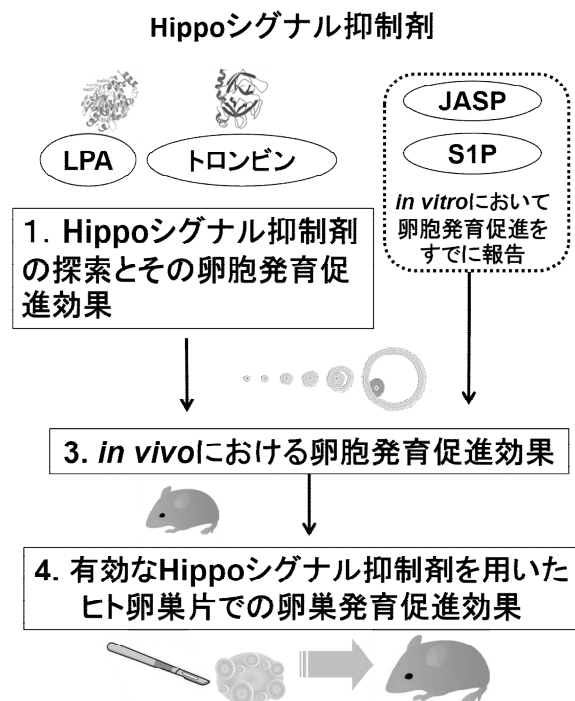


図2 本実験計画の概要

免疫染色による YAP の核内移行については LPA および TMB 添加群で核内移行が認められた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。