

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18172

研究課題名（和文）胚の老化誘導因子CXCL5の抑制による高齢不妊患者の治療法と老化の診断方法の開発

研究課題名（英文）Development of a treatment for advanced aging infertile patients by suppressing CXCL5 and establish a diagnostic method for embryo aging

研究代表者

川越 雄太（Kawagoe, Yuta）

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：10609077

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本邦の体外受精の治療周期数の約60%は高齢不妊患者である。高齢不妊の原因は、卵子および着床前期胚の質の低下であるが、その分子機構は全てが解明されていない。申請者は、高齢患者の胚盤胞で炎症性サイトカインのCXCL5が高発現することを確認しており、本研究ではCXCL5を標的とした新規老化バイオマーカーの確立と、CXCL5の抑制による高齢患者の妊娠率改善の臨床試験を目的として研究を行った。高齢患者の卵丘細胞を採取しCXCL5を測定したところ年齢と相関関係にあることが確認された。しかし、胚の形態学的評価とは相関しなかった。本研究期間中にヒト化抗CXCL5抗体を作製し、現在は臨床試験の準備段階である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、今までは不可能であった高齢不妊患者の胚の老化の程度を測定できる新規バイオマーカーを確立できる可能性を確認した。今後の継続した観察によって、卵丘細胞でのCXCL5と胚移植後の妊娠率、流産率などに相関関係が見られれば高齢不妊患者の治療がさらに効率的に行える可能性がある。また、本研究期間中に作製したヒト化抗CXCL5抗体は市販されている動物由来の抗体より抗原に対する結合力が高い高性能な抗体であり、今後の臨床試験に期待が持てる。またヒト化抗体のため、安全性に関しても問題なく使用できると考えられ、妊娠率改善効果が見られればこれまでにない新たな治療法になることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：In Japan, advanced aging infertile patients account for approximately 60% of all IVF cycles. The cause of aging infertility is a decline of the quality of oocytes and preimplantation embryos. However, the mechanisms of quality decline is not fully understood. We have confirmed that the inflammatory cytokine CXCL5 is highly expressed in blastocysts from aging patients. Therefore, we tried to establish a novel aging biomarker that targeting CXCL5. We also tried to conduct a clinical trial to improve pregnancy rates in aging patients by suppressing CXCL5 secreted from embryos. Cumulus cells were collected from aging patients and CXCL5 was measured. It was confirmed that expression levels of CXCL5 in cumulus cells were correlated with patients age. However, it did not correlate with morphologically grade of embryos. A humanized anti-CXCL5 antibody was produced during this study and is currently in the preparation stage for clinical trials.

研究分野：生殖医学

キーワード：CXCL5 老化 卵子老化 老化胚

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦の最も多い不妊原因は高齢不妊であり、体外受精の治療周期数の約 60%は母体年齢が 40 歳以上の高齢不妊患者である。高齢不妊の主たる原因は、卵子および着床前期胚の質の低下であるが、その分子機構は全てが解明されておらず、また未だに効果的な治療法は確立されていない。高齢不妊患者の妊娠率は、形態的に良好と判別される胚でも若齢患者の胚と比較して遥かに低い。その要因として染色体の異数性が考えられるが、ヒトと比べて染色体異数性の発生頻度が低いマウスにおいても、形態学的に良好な高齢個体由来胚では妊娠率が低いこと、他の要因の関与が考えられる。妊娠率の低さの主な原因としては、染色体の異数性が考えられている。しかし、染色体異数性の割合が低いマウスでも、高齢個体由来良好胚の妊娠率が低いことから、妊娠率の低下には他の要因の関与が考えられている。要因の一つとして卵子・胚の細胞老化が考えられるが、現在のところこの老化の程度を診断できるバイオマーカーは確立されていない。

2. 研究の目的

臨床的な胚の質の評価法は、胚自体を破壊しないで行える非侵襲的な方法でなければならない。そのためこれまでは胚の質の評価法として、形態学的表現型を指標として評価する方法が用いられている。しかし、老化した胚の形態学的評価と胚の質は必ずしも合致しないため、高齢不妊患者では形態学的に良好な胚でも妊娠率は低い。このため、形態学的評価と別に老化の程度を診断する方法が求められている。しかし、胚の老化の程度を測定する方法は確立されていない。申請者は、形態学的に良好な若齢患者と高齢患者の胚盤胞期胚の遺伝子発現を網羅的に比較し、炎症性サイトカインの CXCL5 が高齢患者胚で高発現すること、高齢マウスの卵子・胚でも CXCL5 の発現が増加し、胚の体外培養中の CXCL5 シグナル抑制が高齢マウス胚の着床率を改善することを明らかにしてきた。

さらに本研究では卵子・胚の質の低下に深く関与していると考えられる CXCL5 を標的として、胚の老化を診断する簡便で迅速、かつ再現性の高い診断方法の開発を目的に研究を行なった。また、高齢マウス胚の体外培養中の CXCL5 シグナル抑制が胚移植後の有意な妊娠率の改善を導くことから、ヒトでも同様の改善効果が期待される。そこで、高齢患者の体外受精時の凍結余剰胚を用いて、*in vitro* 試験によりヒト胚の CXCL5 シグナル抑制が、胚移植後の妊娠率改善に寄与するかの検証を行う。また、*in vitro* 試験により妊娠率を改善する可能性が認められた場合は、高齢患者の胚を、CXCL5 中和抗体を添加した培養液で培養し胚移植後の妊娠率の改善を試みる臨床試験の実施を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト卵胞構成細胞の CXCL5 の発現量と体外受精成績との相関関係

予備試験にて、高齢マウス胚の培養上清を用いて CXCL5 の測定を行ったが、通常の ELISA では検出感度以下であった。しかし、Real-time RT-qPCR 法にて高齢マウス由来の卵胞構成細胞である顆粒膜細胞、卵丘細胞、莢膜細胞で CXCL5 の発現量が増加することを確認している。一方、体外受精治療の採卵の際、その後の治療に影響を与えない検体として、顆粒膜細胞、卵丘細胞が非侵襲的に採取可能である。そこで、個々の卵胞から得られたこれらの細胞の CXCL5 mRNA の発現量を RT-qPCR 法で測定し、患者年齢との相関を確認する。その後、それぞれの卵胞由来の成熟卵子の体外受精の臨床成績(受精率、胚発生率、着床率、流産率、臨床妊娠率)を前方視的に解析し、CXCL5 mRNA の発現量との関連を調べる。さらに解析結果から、ヒト胚の質が低下する CXCL5 の発現量の閾値を決定する。

(2) 高齢患者の凍結余剰胚を用いた CXCL5 抑制による胚の質の改善の *in vitro* 試験

高齢マウス胚での CXCL5 シグナル抑制による妊娠率改善効果のヒトでの有効性について、凍結余剰胚を用いた *in vitro* 試験を行い評価する。胚から分泌された CXCL5 はオートクライン作用により胚に作用するため、CXCL5 の中和抗体を培養液に添加しその効果を確認する。日本産婦人科学会の承認と患者の同意のもと、若齢および高齢不妊患者由来の凍結余剰初期胚を融解して胚盤胞まで培養し、胚盤胞到達率、胚盤胞細胞数(内細胞塊、外胚葉栄養層)、アポトーシス発生率(TUNEL assay)を調べ、胚発育能への影響を調べる。

また、同様に CXCL5 を抑制して培養した胚盤胞を 3%FBS 添加培養液に移し替え、経時的に胚のディッシュへの接着を観察する。また、トロホプラストの細胞数および進展した面積を測定し、着床能の評価を行う。さらに、細胞外基質がコートされた培養プレートを用いて細胞浸潤試験を行い、擬似的な子宮内膜への胚の浸潤能力の評価試験を行う。

(3) CXCL5 シグナル抑制による高齢患者胚の質の改善に対する無作為ランダム化比較対象試験

上記 *in vitro* 試験により、CXCL5 シグナル抑制培養液の妊娠率の改善の可能性が認められた場合、実際の高齢不妊患者を対象とした無作為ランダム化比較対象試験を行う。38 歳以上の高齢女性不妊患者を対象とし、2 個以上の受精卵が得られた患者の胚の体外培養時に CXCL5 中和抗体を含む培養液を用いて CXCL5 シグナルの抑制を試みる。高齢以外の不妊の要因を有する患者は

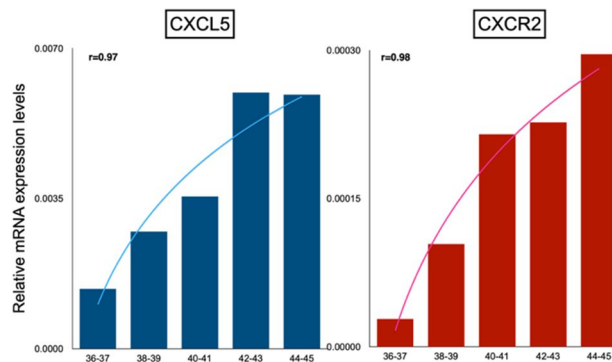
対象外とする。1人の患者から得られた2個以上の前核期胚を、CXCL5 中和抗体を含む培養液と非含有培養液の2群の培養液に無作為に割り付け胚盤胞まで培養する。胚の形態学的評価を行い、両群のうちグレードが最も良好な胚を1個選択して子宮へ移植する。主要評価項目として、着床率を比較する。受精後5日目の胚盤胞到達率、流産率、胚盤胞の形態学的評価を副次的評価項目とする。

4. 研究成果

(1) ヒト卵胞構成細胞のCXCL5の発現量と体外受精成績との相関関係

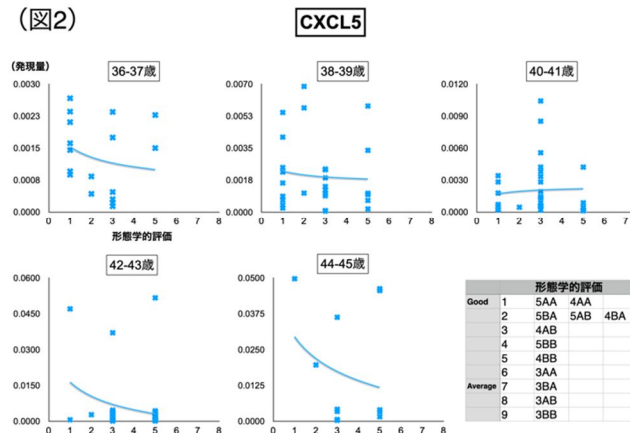
本研究では同意が得られた不妊患者の治療を行う際に、卵丘細胞を採取してCXCL5の発現量を測定した。当初の予定では顆粒膜細胞も同様に採取してCXCL5の発現量を測定する予定であったが、採卵の手技の都合上、一つの卵

胞ごとの顆粒膜細胞の採取が難しくなったため、個々の卵子との紐付けが困難であると考え、卵丘細胞のみをサンプルとして測定を行った。(図1)

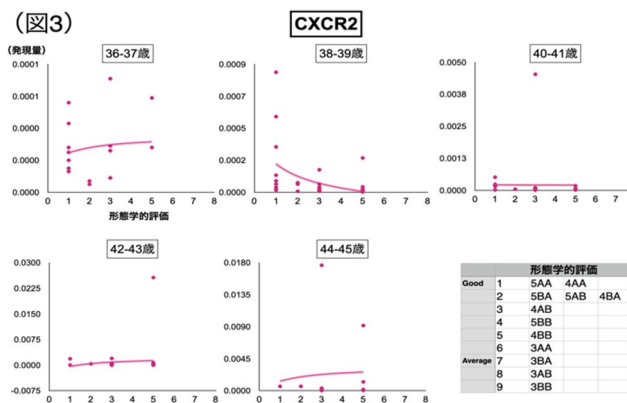


また、老化した細胞ではCXCL5のレセプターであるCXCR2の発現量が増加するとの報告があったため(Acosta et al. Cell 2008)、CXCL5とともにCXCR2の発現量の測定も行った。測定の結果、CXCL5の発現量は患者年齢と相関関係が見られた(図1)。また、CXCR2の発現量も患者の年齢に比例して増加した(図1)。しかし、胚の形態学的評価との相関関係は見られなかった(図2,3)。本研究期間中では、111人の患者(300サンプル)から同意を得た。しかし、その中で研究期間中に胚移植をおこなった患者は22名のみであり、卵丘細胞でのCXCL5およびCXCR2の発現量と妊娠率との相関関係はまだ確認に至っていない。胚移植は患者の治療状況も関わってくるため、調査を継続中である。また、現在も卵丘細胞のサンプリングは継続中である。

(図2)



(図3)



(2) 高齢患者の凍結余剰胚を用いたCXCL5抑制による胚の質の改善のin vitro試験

本研究では当初、高齢患者の凍結余剰胚を用いてCXCL5を抑制し胚の質の改善効果を調査する予定であった。しかし、市販されているCXCL5中和抗体が動物由来であること、また、CXCL5に対する特異性を調査した結果、CXCL5への吸着度が低かったことから将来的な臨床応用に用いるには適当ではないと考えられた。そこで、将来的な臨床応用への利用を念頭に置き、in vitro試験を行う前にヒトのCXCL5に対する中和抗体の作製を試みた。まず、抗マウスCXCL5抗体の作製を試み、高性能な抗体が得られた場合、その抗体のヒト化抗体を作製する計画を立てた。作製した数種類の抗マウスCXCL5中和抗体の中和活性を評価するため、ヒトの間葉系幹細胞株を用いて、細胞増殖試験を行った。CXCL5は細胞老化随伴分泌現象(SASP)により分泌される因子(SASP因子)であり、SASP因子は細胞増殖を抑制することが知られている。そこでCXCL5の抑制により、細胞増殖能の低下を改善することができる。この系を用いて、分裂老化による細胞増殖の低下をどの程度抑制できるかを評価した。作製した数種類の抗体の中から、最も細胞増

殖能抑制効果が見られたものをヒト化抗体の候補とした。現在はヒト化抗体が完成し、高齢患者から凍結余剰胚の使用の同意を得て in vitro 試験を行う準備段階である。それらの一連の実験により臨床試験に用いる抗体の至適添加濃度を決定する。

(3) CXCL5 シグナル抑制による高齢患者胚の質の改善に対する無作為ランダム化比較対象試験
上記の in vitro 試験を行い、申請者らが作製したヒト化抗 CXCL5 中和抗体に胚の質改善効果が見られた場合は、実際に高齢不妊患者を対象とした臨床試験を行い CXCL5 に抑制による高齢不妊患者の妊娠率質改善効果の評価を行う予定である。

引用文献

Acosta J.C. et al. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 133(6), 1006-1018.

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------