

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月9日現在

機関番号：15501
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2009～2011
課題番号：21592099
研究課題名（和文） 排卵過程においてメラトニンは卵胞内で活性酸素種から卵や顆粒膜細胞を保護する
研究課題名（英文） Melatonin protects oocyte and granulosa cells from reactive oxygen species during ovulation process within the follicle.
研究代表者 田村 博史（TAMURA HIROSHI） 山口大学・医学部附属病院・准教授 研究者番号：50379947

研究成果の概要（和文）：

松果体ホルモンのメラトニンは抗酸化作用を併せ持ち、卵胞内にも高濃度に存在している。卵胞内でメラトニンが卵や顆粒膜細胞の保護作用を有しているかどうかを検討した。マウスの卵を用いた培養実験、ヒト顆粒膜細胞を用いた培養実験において過酸化水素で誘導される細胞障害をメラトニンは軽減した。また不妊症患者へメラトニンを投与すると受精率、妊娠率が向上し卵の質の改善効果を認め、顆粒膜細胞の保護作用により黄体機能も改善した。

研究成果の概要（英文）：

Reactive oxygen species (ROS) are produced within the follicle especially during the ovulatory process. We examined whether melatonin acts as an anti-oxidant within follicles and protects oocytes and granulosa cells from oxidative stress. Melatonin, secreted by the pineal gland, is taken up into the follicular fluid from the blood. ROS produced within the follicles, especially during the ovulation process, were scavenged by melatonin, and reduced oxidative stress may be involved in oocyte maturation, embryo development and luteinization of granulosa cells. Our clinical study demonstrated that melatonin treatment for infertile women increases intra-follicular melatonin concentrations, reduces intra-follicular oxidative damage and elevates fertilization and pregnancy rates. Melatonin treatment also improves progesterone production by corpus luteum in infertile women with luteal phase defect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：メラトニン、活性酸素、卵子、顆粒膜細胞、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

松果体ホルモンであるメラトニンは、明暗刺激で分泌が調節されている中枢神経系ホルモンであり、夜間に多く分泌される日内リズムをもつ。睡眠覚醒、体温、種々のホルモン分泌といった生体内リズムの調節の他に、脂質代謝、糖代謝、発癌抑制や免疫調節など多様な作用も有する。メラトニンの作用は、内分泌作用 (receptor を介した作用) のみならず、活性酸素を消去する抗酸化作用 (receptor を介さない直接作用) を有することが証明され、酸化ストレスを抑制することで細胞を保護し、多様な生理機能や種々の疾患の発症、老化や加齢といった現象への関与も明らかとなり注目されている。

排卵現象は炎症類似の現象と捉えられている。排卵過程においては卵胞内で多量の活性酸素種が発生する。一方、その防御機構として、卵胞内には種々の抗酸化物質が存在し酸化ストレスから卵や顆粒膜細胞を防御している。しかし、このバランスが崩れれば、卵や顆粒膜細胞は容易に酸化ストレスを受け、これが卵の質の低下や顆粒膜細胞の黄体化を障害し、受精障害や黄体機能不全など不妊の原因となる可能性が指摘されている。

これまでに、卵巣においてもメラトニンが日内変動を示すこと、排卵前の卵巣で高値を示すことや、卵胞液中にメラトニンが高濃度に存在し、卵胞の発育に比例して増加することを、ヒトおよび動物実験で明らかにした。すなわち、卵胞内でメラトニンが酸化ストレスを抑制している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

卵胞内におけるメラトニンの抗酸化作用に注目し、排卵過程にある卵胞内で酸化ストレスが卵や顆粒膜細胞の質の低下に関与するかどうかを検討するとともに、メラトニンが酸化ストレスを抑制し、卵や顆粒膜細胞の保護に働き、卵の成熟過程や顆粒膜の黄体化に関与するかどうかを検討した。また、メラトニン投与が、卵の質の向上や黄体機能の改善につながるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

卵についての解析

(1) 卵胞内環境とメラトニン

体外受精胚移植を施行した56症例56周期において、採卵時に卵胞液を採取した。卵胞の大きさによって、小卵胞 (10-12mm)、中卵胞 (15-16mm)、大卵胞 (≥ 18 mm) に分類し、卵胞液中の抗酸化酵素であるCu, Zn-superoxide

dismutase (Cu, Zn-SOD)、グルタチオン、またDNA 損傷マーカーとして8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) をELISA法にて、メラトニン濃度をRIA法にて測定した。

(2) マウス卵を用いた検討

① 3週齢雌 ICR マウスに pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) 10 IU を投与し、48時間後に卵巣を摘出し、denuded oocyte を分離採取した。酸化ストレスとして、H2O2 を培養液中に添加して卵培養を行った。卵の成熟過程では第一減数分裂が再開し、第一極体の放出がみられるため、12時間培養後の卵の第一極体放出の割合を観察した。

② H2O2 と同時にメラトニンを添加し卵培養を行い、12時間後における第一極体放出の割合を観察した。

③ 活性酸素と反応し蛍光発色する色素 dichlorofluorescein (DCF-DA) を添加して卵培養を行い、蛍光顕微鏡にて卵細胞内の発色を観察した。

(3) メラトニン投与と卵胞内の酸化ストレス
メラトニンの投与により、卵胞内の酸化ストレスが低下するかどうかを検討した。体外受精胚移植患者に採卵前周期の月経5日目より採卵日の前日まで連日メラトニン錠 (3 mg/日、22:00 服用) を内服していただき、卵胞液中のメラトニン、DNA 損傷マーカーとして8-OHdG、脂質損傷マーカーとしてHexanoyl-lysine adduct (HEL) 濃度を測定した。

(4) メラトニン投与の臨床成績

メラトニンの投与によって酸化ストレスを抑制すれば卵の質が改善され、妊娠率の向上に繋がるかどうかを検討した。前回の体外受精胚移植が不成功に終わり、受精率が50%未満であった115症例を対象とし、56症例に対して、採卵前周期の月経5日目より採卵日の前日まで連日メラトニン錠 (3 mg/日) を内服していただき体外受精を施行し、受精率、妊娠率について前回の体外受精周期と比較しメラトニンの効果を検討した。また、対照として59症例に対し、メラトニン投与を行わずに次回の体外受精胚移植を施行した。

黄体化顆粒膜細胞についての解析

(1) 卵胞内メラトニンと性ステロイド、酸化ストレスの関係

体外受精胚移植を施行した86症例86周期に

において、採卵時に採取した成熟卵胞の卵胞液中の性ステロイド濃度（プロゲステロン、テストステロン、エストラジオール）、メラトニン濃度をRIA法にて、酸化ストレスマーカーとして8-OHdG濃度をELISA法にて測定し、メラトニンと性ステロイドホルモンや酸化ストレスの関係を検討した。

(2) ヒト顆粒膜細胞を用いた検討

顆粒膜細胞に対する酸化ストレスやメラトニンの作用を検討するため、採卵時に採取した黄体化顆粒膜細胞をメラトニン単独、H2O2単独、H2O2とメラトニンを同時添加し、12時間の培養を行い、培養液中のプロゲステロン濃度をRIA法にて測定した。

(3) 黄体機能の改善にメラトニン投与が有効かどうかを検討した。黄体機能不全症例で、黄体血流異常を認めない25例を2群に分け、無治療のコントロールとメラトニン投与群でプロゲステロン値を測定した。

4. 研究成果

卵についての解析

(1) 卵胞内環境とメラトニン

卵胞液中のCu, Zn-SOD、グルタチオン濃度は、ともに卵胞発育に伴った変化は認めなかったが、メラトニンは卵胞発育に伴い卵胞内の濃度が上昇した。さらに成熟卵胞において酸化DNAマーカーの8-OHdGとの相関をみると、Cu, Zn-SOD、グルタチオンとも有意な相関は認めなかったが、メラトニンと8-OHdGには、有意な負の相関を認めた。すなわち、メラトニンが卵胞内で酸化ストレスを抑制している可能性が考えられた。

(2) マウス卵を用いた検討

① H2O2を添加しなかったコントロールでは、第一極体を放出した卵は92.9%であったのに対し、H2O2添加では200μM以上の濃度で第一極体の放出が抑制された（図1）。

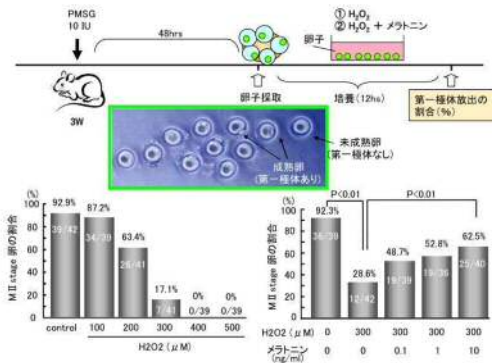


図1. マウス卵成熟に及ぼす酸化ストレスおよびメラトニンの影響

② H2O2で抑制された第一極体の放出は、メラトニンにより有意に改善した（図1）。すなわち、酸化ストレスにより卵の成熟が障害

され、これをメラトニンは防御することが明らかとなった。

③ H2O2添加して培養した卵にDCF-DA処理を行うと、活性酸素と反応し緑色に蛍光発色するが、H2O2非添加群の卵では発色を認めなかった。H2O2添加での発色強度は、メラトニンを同時添加すると有意に抑制された（図2）。したがって、メラトニンは卵細胞内においても抗酸化作用を発揮していると考えられた。

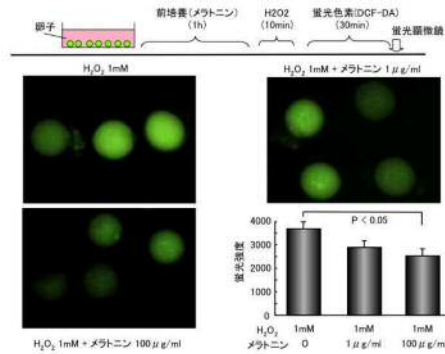


図2. メラトニンによる卵細胞内の活性酸素消去作用

(3) メラトニン投与と卵胞内の酸化ストレス
メラトニン投与により卵胞液中のメラトニン濃度はメラトニン非投与周期に比較し有意に増加した。メラトニン非投与周期とメラトニン投与周期における卵胞液中の8-OHdG濃度とHEL濃度から、メラトニン投与は、卵胞液中のメラトニン濃度を上げ、酸化ストレスを抑制することが明らかとなった。

(4) メラトニン投与の臨床成績

前回の体外受精周期の受精率は約20%であったが、メラトニン投与周期では受精率は約50%と有意に改善した。また56周期中11周期（19.6%）に妊娠が成立した。一方、前回の体外受精で受精率が不良であったがメラトニン投与を行わなかった59症例では、受精率は改善を認めず、妊娠成立も59周期中6周期（10.2%）であった。すなわち、メラトニン投与により卵の質と受精率の改善を認め、妊娠率の向上に繋がった。

黄体化顆粒膜細胞についての解析

(1) 卵胞内メラトニンと性ステロイド、酸化ストレスの関係

成熟卵胞液中の性ステロイド濃度とメラトニン濃度との関係では、テストステロン、エストラジオールとは相関を認めなかったが、プロゲステロンとメラトニンには有意の正の相関を認めたことから、卵胞内でメラトニンがプロゲステロン産生に関与している可能性が考えられた。また、メラトニン濃度と8-OHdG濃度との間、progesterone濃度と8-OHdG濃度との間には負の相関を認めた。し

たがって、排卵前に卵胞内で上昇するメラトニンは顆粒膜細胞の酸化ストレスを抑制し、プロゲステロン産生に貢献している可能性が考えられた。

(2) ヒト顆粒膜細胞を用いた検討

メラトニン単独添加では、プロゲステロン産生に明らかな変化を認めなかったが、H2O2 添加では、濃度依存性にプロゲステロン産生の抑制を認めた (図3)。H2O2 とメラトニンの同時添加培養では、H2O2 により抑制されたプロゲステロン産生は、メラトニン添加により有意に改善を認めた (図3)。同様の実験を10症例に行い、9例において同様の傾向を認めた。酸化ストレスにより顆粒膜細胞の黄体化が抑制されるが、これをメラトニンは防御することが明らかとなった。

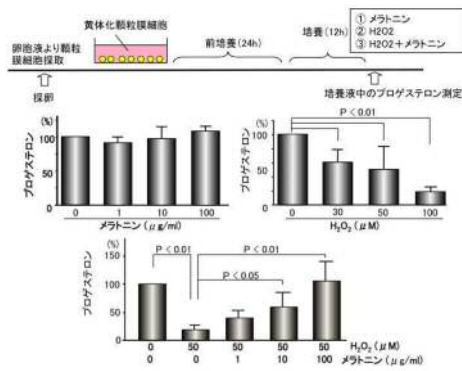


図3. 黄体化顆粒膜細胞のプロゲステロン産生に及ぼす影響

(3) メラトニン投与でプロゲステロンは有意に上昇し、無治療群では11例中2例とほとんど改善がみられなかったが、メラトニン投与では14例中9例 (64.3%) で黄体機能不全から改善を認め、メラトニン投与は黄体機能を改善することが示された。

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10件)

- ① The role of melatonin as an antioxidant in the follicle Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Sugino N. J Ov Res. 査読有 2012 (in press).
- ② Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells. Taketani T, Tamura H, Takasaki A, Lee L, Kizuka F, Tamura I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Shimamura K, Reiter RJ, Sugino N. J Pineal Res. 査読有 2011;51:207-13.

- ③ Differential effects of progesterone on COX-2 and Mn-SOD expressions are associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells. Tamura I, Taketani T, Lee L, Kizuka F, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Tamura H, Sugino N. J Clin Endocrinol Metab. 査読有 2011;96:E1073-82.
- ④ Luteal blood flow in patients undergoing GnRH agonist long protocol. Takasaki A, Tamura I, Kizuka F, Lee L, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Tamura H, Shimamura K, Morioka H, Sugino N. J Ovarian Res. 査読有 2011;4:2.
- ⑤ 生殖機能調節の新しい視点 10. メラトニンの卵巣機能調節 田村博史, 杉野法広 産科と婦人科 査読無 2010年第77巻3号 p310-316.
- ⑥ Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) stimulates PTGS2 expression and PGF_{2α} synthesis through NFκB activation via reactive oxygen species in the corpus luteum of pseudopregnant rats. Taniguchi K, Matsuoka A, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Tamura H, Sugino N. Reproduction. 査読有 2010;140(6):885-892.
- ⑦ Progesterone increases manganese superoxide dismutase expression via a cAMP-dependent signaling mediated by noncanonical Wnt5a pathway in human endometrial stromal cells. Matsuoka A, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Taniguchi K, Asada H, Taketani T, Tamura H, Sugino N. J Clin Endocrinol Metab. 査読有 2010;95:E291-299.
- ⑧ 卵過程におけるメラトニンの防御的役割ーメラトニンは卵胞内で卵と顆粒膜細胞を酸化ストレスから護るー 田村博史 日本産科婦人科学会誌 査読無 2009年第61巻第10号 p1925-1934.
- ⑨ Melatonin and the ovary; physiological and pathophysiological implications. [Review article] Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Norihiro S, Reiter RJ. Fertil Steril 査読有 2009; 92:328-343.
- ⑩ Combination of melatonin and a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist induces apoptosis in a breast cancer cell line. Korkmaz A, Tamura H, Manchester LC, Ogden GB, Tan DX, Reiter RJ. J Pineal Res 査読有 2009;46:115-116.

[学会発表] (計7件)

- ① 田村博史 —メラトニン研究の最近の進歩と医療への応用—パネルディスカッション 『私のメラトニン使用経験から』 第3回抗加齢内分泌研究会学術集会 2011年9月4日 横浜市 鶴見大学会館
- ② 田村博史 松果体ホルモンであるメラトニンは卵胞内で卵や顆粒膜細胞を護る シンポジウム9 「生殖機能の中樞性調節：最近の知見」 第84回日本内分泌学会学術総会 平成2011年4月23日 神戸市 神戸国際会議場
- ③ Hiroshi Tamura, Toshiaki Taketani, Akihisa Takasaki, Norihiro Sugino
Influence of oxidative stress on oocyte quality and protective role of melatonin as an antioxidant
IFFS 2010 20th World Congress on Fertility and Sterility 2010 September 12-16, Munich, Germany
- ④ Hiroshi Tamura, Toshiaki Taketani, Norihiro Sugino.
Melatonin protects oocyte and granulosa cells from reactive oxygen species (ROS) during the ovulatory process
XI Congress of the European Biological Rhythms Society 2009 August 22-28, Strasbourg, France.
- ⑤ 田村博史 松果体ホルモンメラトニンと生殖
第27回内分泌代謝学サマーセミナー 2009年7月16日 福井県 三国観光ホテル
- ⑥ 田村博史 松果体ホルモンメラトニンと生殖
第82回日本内分泌学会 研究奨励賞受賞講演
平成2009年4月25日 前橋市 群馬県民会館
- ⑦ 田村博史 排卵過程におけるメラトニンの防御的役割—メラトニンは卵胞内で卵と顆粒膜細胞を酸化ストレスから護る—
第61回日本産科婦人科学会学術講演会 シンポジウム2 『中枢神経関連生理活性物質の生殖機能へのかかわり』 2009年4月4日 京都市 国立京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 博史 (TAMURA HIROSHI)
山口大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：50379947

(2) 研究分担者

竹谷 俊明 (TAKETANI TOSHIAKI)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70464328