

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16808

研究課題名（和文）細胞老化に注目して多嚢胞性卵巣症候群の病態解明と新規治療薬の開発をする

研究課題名（英文）To elucidate the pathogenesis of polycystic ovary syndrome and develop new therapeutic agents by focusing on cellular senescence.

研究代表者

浦田 陽子 (Urata, Yoko)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20572598

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)の病態を解明するために、ヒト卵巣、ヒト胞状卵胞顆粒膜細胞(GC)、PCOSモデルマウスを用いて検討した。

1. ヒトPCOS患者およびPCOSモデルマウスの卵巣のGCにおいて、老化細胞が増えていることを示した。2. ヒト顆粒膜細胞において、in vitroテストステロン刺激で老化細胞が増えることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PCOSの卵胞発育不全について、老化細胞作用薬といったホルモン作動薬以外の薬の可能性が示された。

現状では、PCOSの卵胞発育障害の治療には一般的な排卵誘発剤を用いるが、PCOSは排卵誘発によって、血栓症といった重篤な症状を含む卵巣過剰刺激症候群になるリスクが高く、排卵誘発剤の使用は注意を要する。本研究によって、細胞老化を排除するsenolytic薬やSASP因子を阻害するsenomorphic薬といった、ホルモン非依存的なPCOS新規治療薬の有効性が示唆され、PCOS特異的な、より安全な不妊治療の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the pathogenesis of polycystic ovary syndrome using human ovaries, human follicular granulosa cells, and polycystic ovary syndrome model mice using dehydroepiandrosterone.

We showed that: 1. senescent cells increased in granulosa cells of ovaries from human polycystic ovary syndrome patients and polycystic ovary syndrome model mice; 2. testosterone stimulation in vitro increased senescent cells in human granulosa cells.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：老化細胞 多嚢胞性卵巣症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 多嚢胞性卵巣症候群とは

多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) は生殖年齢女性の 6-10% に認め、女性でもっとも多いホルモン疾患で、無排卵性不妊女性の 80% を占めている。PCOS は、多嚢胞性卵巣や血中男性ホルモン高値といったホルモン値異常を呈し、顆粒膜細胞の増殖能低下やアポトーシスによる卵胞発育障害や卵巣間質部線維化によって排卵障害を呈すると考えられているが、その病態はまだ十分には解明されていない。

(2) 細胞老化とは

細胞老化とは不可逆的に細胞分裂を停止している状態であり、老化細胞は p53/p21WAF1 あるいは p16INK4/Rb が活性化し、G1/S 細胞周期で停止し、アポトーシス抵抗性である。老化細胞は、炎症性サイトカインや成長因子といった senescent-associated secretory phenotype (SASP) 因子を産生することで、近隣の細胞に作用して、慢性炎症、線維化、アポトーシスなどを誘導する。細胞老化は 2 型糖尿病や動脈硬化といった様々な病態に関与しているが、卵巣での細胞老化についてはほとんどわかってない。また、老化細胞に作用する薬剤として、老化細胞を除去する senolytic 薬と、SASP 因子を阻害する senomorphic 薬とがあり、既に臨床治療薬として用いられているものもある。

(3) PCOS と細胞老化

PCOS における卵巣での細胞老化についての報告はまだない。

2. 研究の目的

(1) PCOS の卵巣における細胞老化の有無とその SASP 因子について解明する

(2) 高アンドロゲン状態が顆粒膜細胞を細胞老化への誘導するのとその SASP 因子を開らかにすることで、細胞老化が PCOS の病態にどのように関与しているのかを理解する

(3) 細胞老化作用薬の PCOS への有効性を明らかにする

3. 研究の方法

本研究では、ヒト顆粒膜細胞 (hGC) をヒト卵胞液より分離培養し、ヒト卵巣標本は婦人科手術で摘出した卵巣を用いて行う。PCOS モデルマウスは、幼若マウスにデヒドロエピアンドロステロンを毎日皮下注射して作成する。培養 hGC の細胞老化は、senescence-associated beta-galactosidase (SA-gal) 活性、細胞周期の変化をフローサイトメトリー、細胞増殖能を MTT アッセイ、遺伝子発現 (p16 INK4, p21, p53, retinoblastoma (Rb)) を qPCR、蛋白発現 (p16 INK4, p21, p53, Rb) をウェスタンブロットで確認し、検討する。

(1) PCOS 卵巣での細胞老化と、その SASP 因子を検討する。

[1-1] ヒト卵巣と PCOS モデルマウスの卵巣を用いて、p21, p53, Rb を免疫染色し、PCOS の有無で比較する。

[1-2] hGC における p16 INK4, p21, p53, Rb の発現を qPCR およびウェスタンブロットで確認し、SA-gal 活性の程度を PCOS の有無で比較する。

[1-3]ヒト卵巣と PCOS モデルマウスの卵巣を用いて、p16 INK4 (あるいは p21, p53, Rb) と IL6・IL8・TGF・CCL5 の蛍光染色し、共発現を確認する。

(2) 高アンドロゲンによりhGCの細胞老化が誘導されるのかと、そのSASP因子を解明する。

[2-1] hGC をテストステロンで刺激し、hGC の細胞老化を刺激の有無で比較する。

[2-2]p16 INK4(あるいは p21)をノックダウンした hGC をテストステロンで刺激し、IL6・IL8・TGF・CCL5 の遺伝子発現を qPCR で、培養液中の IL6・IL8・TGF・CCL5 を ELISA 法で測定する。

[2-3]テストステロン刺激した hGC を用いて、p16 INK4(あるいは p21)と IL6・IL8・TGF・CCL5 を蛍光染色し、共発現を確認する。

(3) 細胞老化作用薬は、PCOS病態改善に寄与するかを解明する。

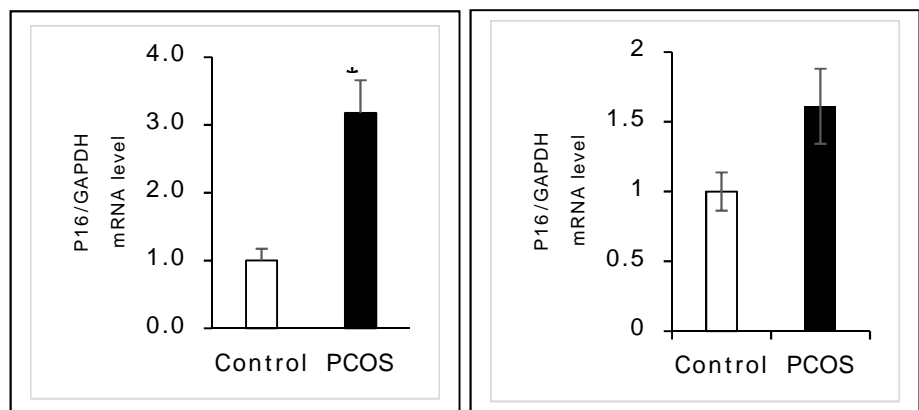
[3-1]hGC において、サチニブ(senolytic 薬)あるいはメトホルミン(senomorphing 薬)で刺激したのちに、テストステロンで刺激し、(a)ダサチニブが老化細胞を減少させるかを SA-gal 活性で、(b)メトホルミンが IL6・IL8・TGF・CCL5 発現を低下させるかを、遺伝子発現は qPCR で、培養液中蛋白は ELISA 法で測定して検討する。

[3-2]PCOS モデルマウスを、コントロール群、ダサチニブ投与群、メトホルミン投与群、両薬剤投与群の 4 群にわけ、性周期を膣細胞診、卵巣切片における卵胞個数を HE 染色、線維化をマッソントリクローム染色、アポトーシスを TUNEL、ステロイド合成を steroidogenic acute regulatory protein の免疫染色で評価する。

[3-3]PCOS 女性をコントロール群、ダサチニブ投与群、メトホルミン投与群、両薬剤投与群の 4 群にわけて、ホルモン基礎値、基礎体温、自然排卵率の変化を検討する。

4. 研究成果

(1) PCOS 女性の顆粒膜細胞で、老化細胞マーカーである p16 が強く発現している。(左図)



(2) デヒドロエピアンドロステロンを投与して作成した

PCOS モデルマウスの卵巣顆粒膜細胞で、老化細胞マーカーである p16 が強く発現している。(右図)

以上より、卵巣顆粒膜細胞において、細胞老化が PCOS の病態に関与していることが示唆された。

現在、マウスモデルを用いて老化細胞除去薬が PCOS の病態を改善に寄与するか、研究を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akari Kusamoto, Miyuki Harada, Jerilee M K Azhary, Chisato Kunitomi, Emi Nose, Hiroshi Koike, Zixin Xu, Yoko Urata, Tetsuaki Kaku, Nozomi Takahashi, Osamu Wada-Hiraike, Yasushi Hirota, Kaori Koga, Tomoyuki Fujii, Yutaka Osuga	4. 巻 35
2. 論文標題 Temporal relationship between alterations in the gut microbiome and the development of polycystic ovary syndrome-like phenotypes in prenatally androgenized female mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB J .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101051R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Koike, Miyuki Harada, Akari Kusamoto, Zixin Xu, Tsurugi Tanaka, Nanoka Sakaguchi, Chisato Kunitomi, Jerilee M. K. Azhary, Nozomi Takahashi, Yoko Urata, Yutaka Osuga	4. 巻 14
2. 論文標題 Roles of endoplasmic reticulum stress in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Endocrinol (Lausanne)	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2023.1124405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Koike, Miyuki Harada,* Akari Kusamoto, Chisato Kunitomi, Zixin Xu, Tsurugi Tanaka, Yoko Urata, Emi Nose, Nozomi Takahashi, Osamu Wada-Hiraike, Yasushi Hirota, Kaori Koga, and Yutaka Osuga	4. 巻 12
2. 論文標題 Notch Signaling Induced by Endoplasmic Reticulum Stress Regulates Cumulus-Oocyte Complex Expansion in Polycystic Ovary Syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules.	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom12081037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------	---------