

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462559

研究課題名(和文) 加齢に伴う卵子の数および質の低下はメラトニンで予防できるか。

研究課題名(英文) Long-term melatonin treatment for the prevention of ovarian aging.

研究代表者

田村 博史 (TAMURA, Hiroshi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50379947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：卵胞数の減少や卵の質の低下に起因する卵巣の加齢は、不妊領域最大の課題であるが有効な対処法はない。抗酸化作用をもつ松果体ホルモンのメラトニンで卵巣の加齢を予防できるかどうかを検討した。10週齢マウスを43週までメラトニンを投与した。卵巣内の各発育段階の卵胞数、排卵数、体外受精の受精率、胚盤胞到達率、いずれも非投与群と比較して高値を示した。メラトニンの長期投与によって卵胞の減少や卵子の質の低下を軽減できたことから、メラトニンは卵巣加齢を予防できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ovarian aging is dominated by a gradual decreasing numbers of follicles, coinciding with diminished quality of oocytes. The present study was undertaken to examine whether long-term melatonin treatment prevents ovarian aging in mice. Female ICR mice (10 weeks old) were randomly divided into two groups: half were fed with water as a control (C) and the other half water supplemented with melatonin (M) until 43 weeks. The numbers of oocytes recovered from the oviduct were greater in the Melatonin group compared with the Control group. The fertilization rate and blastocyst rate of in vitro fertilization were higher in the M group compared with the C group. The number of primordial, primary, secondary and antral follicle in ovary were higher in the Melatonin group compared with the Control group. Long-term melatonin treatment increased the number of ovulated oocytes and fertilization rates. The present results indicate that melatonin prevents ovarian aging in mice.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：メラトニン 卵巣 卵子 加齢 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

(1)女性の年齢は生殖機能に与える最も大きな因子である。加齢に伴う妊孕能の低下は、卵子の数の減少と卵子の質の低下に起因する。高齢婦人では、卵子が枯渇するため排卵誘発剤を使用しても十分な数の発育卵胞が得られない場合が多く、また、得られた卵子の質の低下による受精、着床障害や、妊娠が成立しても流産の頻度が上昇する。このような加齢に伴う卵子の数および質の低下は、長年に渡って卵子に加わる慢性的な損傷(ストレス)、例えば、活性酸素種などによって引き起こされる酸化ストレスが重要な因子と考えられている。

(2)我々は、排卵過程で発生する活性酸素が急性な酸化ストレスとして卵の質を低下させること、卵胞液中に存在する松果体ホルモンであるメラトニンが抗酸化作用を発揮し酸化ストレスを抑制することで、卵子を保護していることを解明した。

2. 研究の目的

本研究では、メラトニンが卵子に対する慢性的酸化ストレスを抑制し、加齢に伴う卵子数の減少や卵子の質の低下を軽減することができるかどうかを明らかにしたい。

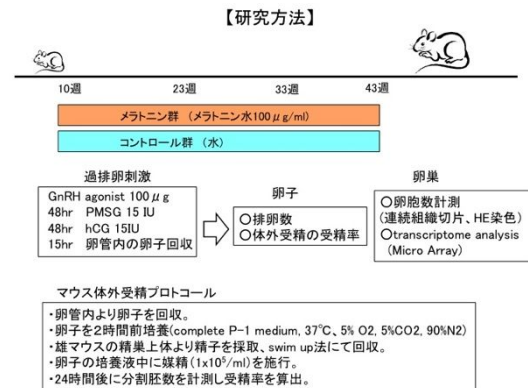
(1)加齢に伴う卵子数の変化および卵子の老化(質の低下)のメカニズム解明加齢に伴って卵巣内の卵子数がどのように変化するかを調べると共に、老化した卵子が形態的、機能的にどのように変化するかを検討する。

(2)卵子数の減少および卵子の老化(質の低下)の予防法メラトニンの長期投与によって加齢に伴う卵子数の減少を軽減できるか、また、卵子の質の低下を予防できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

10 週齢雌ICR マウスをメラトニン投与群とコントロール群の 2 群に分け、43 週齢まで飼

育する。メラトニン投与群はメラトニン水 (100 μ l/ml) を飲水させる。



(1)卵巣内の卵胞数の検討。

13 週齢(若年)、33 週齢および43 週齢(加齢)のICR 雌マウスから卵巣を摘出する。卵巣を4%パラホルムアルデヒドにて固定、パラフィン包埋、薄切し、連続組織切片を作製する。ヘマキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下に卵子と1層の扁平な顆粒膜細胞からなる原始卵胞を観察し卵巣内の数を計測する。

(2)加齢に伴う排卵卵子数、および体外受精時の受精率、胚盤胞到達率を検討。

13、33、43 週齢のICR 雌マウスにpregnant mare serum gonadotropin(PMSG)による過排卵刺激を行い、48 時間後にhuman chorionic gonadotropin(HCG)を投与、15 時間後に卵巣、卵管を採取する。

卵管内より卵子を回収し、排卵卵子数を計測する。

採取した卵子を培養液中で2 時間前培養した後、雄マウスより採取した精子を媒精(10x10⁴ 個/ml)する。48 時間後に2cellの数を計測し受精率を検討する。さらに96 時間後に胚盤胞到達率を計測する。

(3)卵巣トランスクリプトーム解析

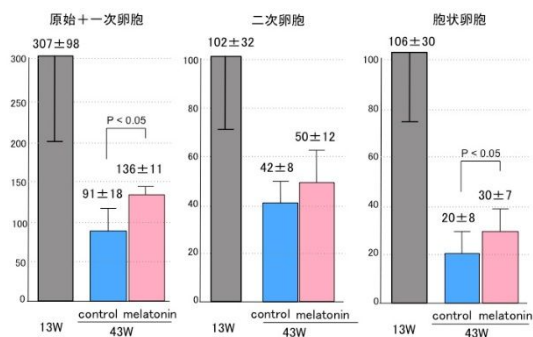
13 週齢(若年)、33 週齢および43 週齢(加齢)のICR 雌マウスの卵巣から抽出したRNAを用いてマイクロアレイ法で卵巣のトランスクリプトーム解析を施行し、加齢に伴う遺伝子発現の変化を検討する。ネットワーク解析、

パスウェイ解析を行い、加齢に伴い変化するもの、メラトニン投与で変化するものを抽出する。

4. 研究成果

(1) 卵巣内の卵胞数の検討。

卵巣連続組織切片中の各発育段階の卵胞数を光学顕微鏡下に計測した。5 μm毎の連続切片に対して原始卵胞および一次卵胞は25 μm毎、二次卵胞は100 μm毎、胞状卵胞は200 μm毎に計測し、合計を卵巣当りの卵胞数とした。原始卵胞 + 一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞いずれも、若年マウス(13W)に比較して、加齢マウス(43W)では卵胞数の減少を認めた。しかし、メラトニン投与加齢マウスでは、すべての発育段階の卵胞数はコントロール(メラトニン非投与加齢マウス)に比較して高値であった。

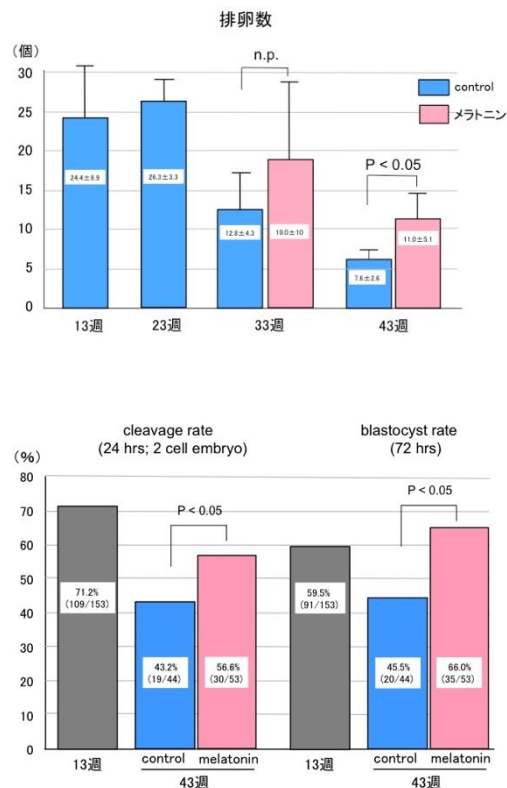


(2) 加齢に伴う排卵卵子数、および体外受精時の受精率、胚盤胞到達率を検討。

過排卵刺激による排卵数は、33週、43週と加齢に伴い減少することが明らかとなった。メラトニン投与マウスでは、メラトニン非投与マウスに比較して卵胞数の減少が軽減されていた。

加齢マウスから採取した卵子を用いた体外受精では、受精率は若年マウスに比較して低下していたが、メラトニン投与加齢マウスでは受精率はコントロール(メラトニン非投与加齢マウス)に比較して高値であった。胚盤胞到達率も加齢マウスから採取した卵子を用

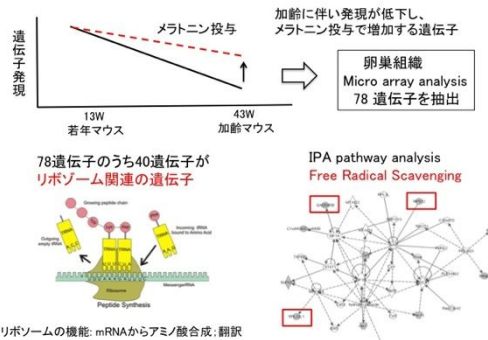
いた体外受精では、若年マウスに比較して低下していたが、メラトニン投与加齢マウスでは胚盤胞到達率はコントロール(メラトニン非投与加齢マウス)に比較して高値であった。



(3) 卵巣トランスクリプトーム解析

卵巣組織より抽出したRNAを用いて、マイクロアレイ法でトランスクリプトーム解析を行い発現遺伝子の変化を検討した。若年マウスに比較して加齢マウスで低下する遺伝子群で、メラトニン投与マウスでその低下が軽減される遺伝子群を抽出した。78 遺伝子が抽出され、そのうち 40 遺伝子がリボソーム関連の遺伝子であった。ネットワーク解析では、free radical scavenging system が抽出された。

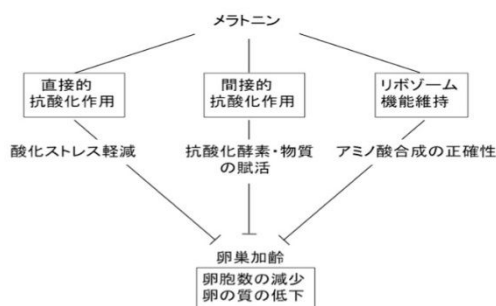
マウス加齢モデル(メラトニン長期投与)のトランスクリプトーム解析



メラトニンの長期投与によって加齢に伴うマウスの卵胞数の減少、排卵数の減少や受精率の低下が軽減された。

メラトニンは、直接的な抗酸化作用を有しており、活性酸素を消去することで酸化ストレスを軽減することでアンチエイジング作用を発揮すると考えられている。本研究において、抗酸化酵素などの抗酸化作用を賦活する間接的作用やリボゾーム機能を介したタンパク合成の正確性などの機序も明らかとなり、本来の直接的抗酸化作用と合わせて卵胞数の減少や卵子の質の低下といった卵巣加齢を予防する作用があることが明らかとなった。

卵巣の加齢に対するメラトニン長期投与の効果



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 5 件)

すべて査読あり

Tanabe M, Tamura H, Taketani T, Okada M, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Sugino N. Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. *J Reprod Dev.* 2015;61:35-41. doi: 10.1262/jrd.2014-105.

Tamura H, Takasaki A, Nakamura Y, Numa F, Sugino N. A pilot study to search possible mechanisms of ultralong gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in IVF-ET patients with endometriosis. *J Ovarian Res.* 2014 Oct

21;7:100. doi: 10.1186/s13048-014-0100-8.

Reiter RJ, Tamura H, Tan DX, Xu XY. Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. *Fertil Steril* 2014 Aug;102:321-8.

Reiter RJ, Tan DX, Tamura H, Cruz MH, Fuentes-Broto L. Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology: a review. *Gynecol Endocrinol.* 2014 Feb;30:83-9.

Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Sugino N. Melatonin and female reproduction. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014 Jan;40:1-11. doi: 10.1111/jog.12177.

〔学会発表〕(計 4 件)

第 33 回日本受精着床学会学術総会 (2015/11/26 東京都江東区 TFT ホール) メラトニン長期投与によるマウス卵巣加齢の予防効果 田村博史

第 15 回日本抗加齢医学会学術総会 (2015/5/29 福岡県福岡市 福岡国際会議場) メラトニン長期投与によるマウス卵巣加齢の予防効果 田村博史

第 15 回日本内分泌学会中国支部学術集会 JES WE Can 企画講演 (2014/8/30 山口県山口市 山口グランドホテル) 女性の生殖機能におけるメラトニンの多様な作用 田村博史

第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2014/4/18 東京都千代田区 東京国際フォーラム) メラトニン長期投与によるマウス卵巣加齢の予防効果 田村博史

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 博史 (TAMURA, Hiroshi)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：50379947

(2) 研究分担者

浅田 裕美 (ASADA, Hiromi)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90526906

(3) 連携研究者

()

研究者番号：