

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462476

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答の、卵胞発育過程における血管新生調節作用の検討

研究課題名(英文)A role of endoplasmic reticulum stress in ovarian angiogenesis

研究代表者

原田 美由紀 (Harada, Miyuki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70451812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣における血管新生調節に重要な血管内皮増殖因子(VEGFA)の過剰産生は卵巣過剰刺激症候群(OHSS)の原因となる。本研究において、OHSS患者の卵巣顆粒細胞で活性化している小胞体ストレスがhCG誘導性のVEGFA産生を亢進することによりOHSSの病態形成に寄与することを示した。そして、小胞体ストレス阻害剤投与によりOHSSラットの病状が改善することも示した。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) is crucial for ovarian angiogenesis, but its excess production induces ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). The aim of this study was to determine whether endoplasmic reticulum (ER) stress regulates VEGFA expression in granulosa cells, and whether its activation is involved in OHSS development. The expression of the spliced form of X-box-binding protein 1 [XBP1(S)], induced by ER stress, in cumulus cells from OHSS patients was higher than non-OHSS patients. The ER stress inducer tunicamycin increased hCG-induced VEGFA production in human granulosa cells through the induction of XBP1(S), and pretreatment with the ER stress inhibitor tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) abrogated the effect of tunicamycin. In OHSS model rats, TUDCA administration prevented the OHSS development. Our findings suggest ER stress upregulates hCG-induced VEGFA production in granulosa cells, indicating that ER stress might be involved in OHSS development.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：卵巣 血管新生 小胞体ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

晩婚化・晩産化の昨今、ますます不妊症治療の需要が高まっている。体外受精、顕微授精等の技術の目覚ましい進歩は、高度な卵管因子、男性因子に起因する不妊症に対する治療を可能とした。しかし、高齢不妊症や多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)、子宮内膜症患者のような、良好な卵子を得ることの困難な患者においては、いまだ治療が困難である。この理由としては卵胞発育の機序が十分に明らかにされていないことが最大の問題である。よって、妊娠率の向上のためには卵胞発育機構の解明が喫緊の課題である。

卵胞発育は内分泌因子ならびに各種局所因子による調節のもと、時間的、空間的に厳密に制御されたダイナミックな変化であり、そこでは血管新生が重要な役割を果たしている。

一方、異常な折りたたみ構造のタンパク質が小胞体内に蓄積した状態を小胞体ストレスと呼び、小胞体ストレスに対して細胞では小胞体ストレス応答という細胞内情報伝達経路が活性化される。最近、この反応が多種多様な臓器の生理、病理に広く関わることに注目されている。卵巣は、局所におけるダイナミックな変化が周期的に起こっている臓器であり小胞体ストレスに晒されていることが想定されるが、卵胞発育における意義はいまだ不明である。我々は、本研究開始までに、小胞体ストレス応答が発育過程の卵胞において惹起されており、その発現は卵胞発育過程依存性、すなわち小二次卵胞以前の卵胞においては発現を認めず、大二次卵胞以降の発育段階にある卵胞においてのみ、小胞体ストレス応答が活性化していることを示してきた。

2. 研究の目的

上述のように我々はこれまで、後期の二次卵胞以降の顆粒膜細胞において、小胞体ストレス応答が惹起されていることを明らかにした。この小胞体ストレスが惹起される時期は、まさに卵胞が周囲に血管網を発達させていく時期と一致する。また、多種の他臓器由来の cell line において、小胞体ストレスは血管新生因子を直接的、間接的に誘導することが報告されている。

本研究においては、小胞体ストレス応答が血管新生調節を介して卵胞発育の制御において重要な役割を担うのではないかと、という仮説を検証し、小胞体ストレスを調節することにより血管新生調節異常に起因する不妊症治療の最大の合併症である卵巣過剰刺激症候の病態改善につなげられるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

顕微授精治療患者より採卵時に得られた卵子卵丘細胞複合体より、顕微授精治療時に卵子を分離した残りの卵丘細胞(卵子周囲の

顆粒膜細胞)を回収し、卵丘細胞における小胞体ストレス応答因子 spliced form of X-box-binding protein 1 [XBP1(S)]mRNA、血管新生因子 Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA)mRNA 発現を qPCR 法にて解析した。

体外受精治療患者の採卵時に採取された卵胞液より顆粒膜細胞を分離、培養した。これに小胞体ストレス刺激剤である tunicamycin (Tm)を添加し、VEGFA mRNA 発現、VEGFA タンパク質分泌に与える影響を qPCR 法、ELISA 法にて解析した。また、小胞体ストレス阻害剤 TUDCA の前投与、siXBP1 (S)により XMP1(S)をノックダウンした際の影響を同様に解析した。

未熟ラットに PMSG4 回 + hCG1 回投与することにより、OHSS モデルラットを作成した。OHSS ラットに Tm 投与し OHSS の病態改善効果を血管透過性を解析することにより評価した。併せて卵巣における VEGFA, XBP1(S)mRNA 発現を qPCR 法にて評価した。

4. 研究成果

OHSS 患者の卵丘細胞において、VEGF, XBP1(S)mRNA 発現は、非 OHSS 患者に比し、高レベルで発現していた。また、VEGF と XBP1(S) 発現には正の相関が認められた。

Tm 投与により、顆粒膜細胞における VEGFA 発現は亢進した。また、hCG は VEGFA の発現促進因子であるが、Tm はこの hCG による VEGFA 発現、分泌促進を増幅した。TUDCA の前投与により、Tm による増幅効果は相殺された。また XBP1(S)をノックダウンした細胞においては、Tm による増幅効果は減弱した。

TUDCA 投与により OHSS の主たる病態である血管透過性の亢進は改善を認めた。TUDCA 投与により OHSS ラット卵巣における VEGFA, XBP1(S)発現は減少し、TUDCA が卵巣局所における小胞体ストレスを抑制し、卵巣における hCG 反応性 VEGFA 産生を抑制したことにより病態改善に寄与したと考えられた。

以上より、小胞体ストレスは卵巣顆粒膜細胞における hCG 誘導性の VEGFA 産生を亢進し、OHSS の病態形成に関わっていることが示された。

小胞体ストレス応答が血管新生調節を介して卵胞発育に関わっているという概念は、未だ未解明な点の多い卵巣の生理、病理に新たな視座を提供するものであり、小胞体機能をターゲットとした独創的な視点に立った不妊治療の可能性を開くこととなる。

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 14 件)

1. Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Zhao L, Azhary JM, Yoshino O, Izumi G, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga

- Y.
A Potential Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Progesterone Deficiency in Obese Women. *Endocrinology*. 2017;158(1):84-97. 査読有
2. Fujii T, Wada-Hiraike O, Nagamatsu T, Harada M, Hirata T, Koga K, Fujii T, Osuga Y
Assisted reproductive technology pregnancy complications are significantly associated with endometriosis severity before conception: a retrospective cohort study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016;14(1):73. 査読有
3. Haraguchi H, Koga K, Takamura M, Makabe T, Sue F, Miyashita M, Urata Y, Izumi G, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Oda K, Kawana K, Fujii T, Osuga Y.
Development of ovarian cancer after excision of endometrioma. *Fertil Steril*. 2016;106(6):1432-1437 査読有
4. Takahashi N, Yoshino O, Maeda E, Naganawa S, Harada M, Koga K, Hiraike O, Nakamura M, Tabuchi T, Hori M, Saito S, Fujii T, Osuga Y.
Usefulness of T2 star-weighted imaging in ovarian cysts and tumors. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016;42(10):1336-1342. 査読有
5. Harada M, Osuga Y. Where are oncofertility and fertility preservation treatments heading in 2016? *Future Oncol*. 2016;12(20):2313-21 査読有
6. Hirano M, Wada-Hiraike O, Fu H, Akino N, Isono W, Sakurabashi A, Fukuda T, Morita Y, Tanikawa M, Miyamoto Y, Nishi Y, Yanase T, Harada M, Oishi H, Yano T, Koga K, Oda K, Kawana K, Fujii T, Osuga Y.
The Emerging Role of FOXL2 in Regulating the Transcriptional Activation Function of Estrogen Receptor : An Insight Into Ovarian Folliculogenesis. *Reprod Sci*. 2016 Jun 1. pii: 1933719116651150. [Epub ahead of print] 査読有
7. Miyashita M, Koga K, Izumi G, Sue F, Makabe T, Taguchi A, Nagai M, Urata Y, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y.
Effects of 1,25-Dihydroxy Vitamin D3 on Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(6):2371-9. 査読有
8. Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Zhao L, Yoshino O, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y.
A potential role of endoplasmic reticulum stress in development of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;428:161-9. 査読有
9. Sato M, Harada M, Oishi H, Wada-Hiraike O, Hirata T, Nagasaka K, Koga K, Fujii T, Osuga Y.
Vaginal Stenosis After Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Therapy During Treatment for Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Low Genit Tract Dis*. 2016;20(2):e11-3. 査読有
10. Fujimoto A, Morishima K, Harada M, Hirata T, Osuga Y, Fujii T
Elective single-embryo transfer improves cumulative pregnancy outcome in young patients but not in women of advanced reproductive age. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(12):1773-9. 査読有
11. Harada M, Nose E, Takahashi N, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Koga K, Fujii T, Osuga Y.
Evidence of the activation of unfolded protein response in granulosa and cumulus cells during follicular growth and maturation. *Gynecol Endocrinol*. 2015;31(10):783-7. 査読有
12. Harada M, Takahashi N, Hirata T, Koga K, Fujii T, Osuga Y.
Laparoscopic excision of ovarian endometrioma does not exert a qualitative effect on ovarian function: insights from in vitro fertilization and single embryo transfer cycles. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(5):685-9. 査読有
13. Fujimoto A, Ichinose M, Harada M, Hirata T, Osuga Y, Fujii T
The outcome of infertility treatment in patients undergoing assisted reproductive technology after conservative therapy for endometrial cancer. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31:1189-94. 査読有
14. Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Takamura M, Harada M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Fujii T, Saito S, Kozuma S.
The role of bone morphogenetic protein 6 in accumulation and regulation of neutrophils in the human ovary. *Reprod Sci*. 2014;21(6):772-7 査読有
〔学会発表〕(計 7 件)
1. Harada M, Oi N, Hirata T, Koga K, Fujii T, Osuga Y.
Laparoscopic excision of ovarian endometrioma may exert quantitative but not qualitative effects on affected ovaries in IVF settings

96th The Endocrine Society's Annual Meeting. 2014. Jun. Chicago, IL, USA
 2. 大井なぎさ、原田美由紀、増沢菜美、徳永幸雄、松澤篤史、浦田陽子、泉玄太郎、高村将司、平田哲也、桃澤健二、大須賀穰、藤井知行
 新規ガラス化保存デバイス (KVS デバイス) のヒト胚凍結・融解における有用性
 第33回受精着床学会 2015年11月 TFTホール (東京都江東区)
 3. Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Yoshino O, Hiraike O, Fujii T, Osuga Y
 Endoplasmic reticulum stress induces vascular endothelial growth factor production in granulosa cells: implications for a novel therapeutic approach for ovarian hyperstimulation syndrome
 98th The Endocrine Society's Annual Meeting. 2016. Apr. Boston, MA, USA
 4. Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Yoshino O, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y.
 Endoplasmic reticulum (ER) stress induces vascular endothelial growth factor (VEGF) production in granulosa cells: implications for a novel therapeutic approach for OHSS
 68th Annual congress of Japan Society of Obstetrics and Gynecology. 2016. Apr. 東京国際フォーラム (東京都千代田区).
 5. 高橋 望、原田 美由紀、廣田 泰、平池 修、泉 玄太郎、高村 将司、平田 哲也、甲賀 かをり、大須賀 穰、藤井 知行
 卵巣過剰刺激症候群における小胞体ストレス応答の役割と小胞体ストレス抑制剤の予防的効果
 第61回日本生殖医学学会 2016年11月 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 6. 田邊良介、原田美由紀、大井なぎさ、平田哲也、泉玄太郎、高橋望、金谷真由子、山本直子、堤亮、廣田泰、甲賀かをり、平池修、大須賀穰、藤井知行
 高齢不妊症患者に対する治療戦略としてのARTと子宮筋腫核出術とのコンビネーション療法：卵巣加齢の影響を最小限にするための戦略
 第61回日本生殖医学学会 2016年11月 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 7. 私はこうする：ART診療実践講座 7 当科におけるラボ管理とリスク対策—よりよい妊娠率と合併症の減少を目指して—
 大井なぎさ、原田美由紀、平田哲也、中澤明里、平野茉来、秋山育美、金谷真由子、山本直子、泉玄太郎、堤亮、大須賀穰、藤井知行
 第61回日本生殖医学学会 2016年11月 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 [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
 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
 原田 美由紀 (HARADA MIYUKI)
 東京大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：70451812

(2) 研究分担者
 なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者
 なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者
 なし ()