2版

様　式　C－１９、F－１９、Z－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月 ２８ 日現在

機関番号：３４４０１

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：２６８６１３４７

研究課題名（和文）卵巣凍結融解は胚のゲノムインプリンティング異常の原因となりうるか？

研究課題名（英文）Can ovarian tissue cryopresrvation be a cause of the embryonic genome inprinting abnormality?

研究代表者

林　篤史（Hayashi, Atsushi）

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：８０４１１３３８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　1,800,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣組織凍結および融解移植を行うに当たり、テストステロンの卵巣保護作用について検討した。不妊症患者において、血清テストステロン値は体外受精における採卵数と有意な正の相関関係を示し、血清テストステロン値が卵巣予備能の指標となることが示唆された。不死化顆粒膜細胞を用いた検討では、膜型アンドロゲン受容体を刺激することによりPI3K/Akt-Fox03aシグナル経路を介してBimELの発現が抑制され、PARP、Caspase 3の活性が抑制されたことから、テストステロンには顆粒膜細胞に対する抗アポトーシス作用があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined whether the low levels of serum testosterone are associated with the apoptosis of granulosa cells. The mean serum testosterone concentration in the patients with endometriosis was significantly lower than that observed in the patients without endometriosis. Furthermore, high expression of a pro-apoptotic Bcl-2 member, BimEL, in the follicles was found to be associated with a low serum testosterone level. The in vitro examination demonstrated that testosterone inhibited apoptosis induced by sex steroids depletion via the PI3K/Akt-Fox03a pathway in the COV434 cells (human immortalized granulosa cells derived from a primary human granulosa cell tumor). In conclusion, we elucidated the mechanism underlying the anti-apoptotic effects of testosterone on granulosa cells.

研究分野：生殖医学

キーワード：テストステロン　卵巣予備能　癌生殖医療

１．研究開始当初の背景

体外受精治療を含めた生殖補助医療技術の進歩は目覚ましく、本邦においても治療件数は上昇の一途を辿っている。一方近年、これらの治療の普及により、これまで非常に稀であったゲノムインプリンティング（遺伝子刷り込み）異常症の発生頻度の増加が世界各国で指摘されている。生殖医療とゲノムインプリンティング異常は明らかな関連があると考えられるが、中でも卵巣凍結とゲノムインプリンティング異常との関連については不明な点が多い。本邦でも今後普及が進むであろう卵巣凍結技術について、そのリスクを明らかにすることは非常に重要である。我々は雌雄始原生殖細胞の包括的な DNA メチル化マップ(DNA メチローム)を作製し、卵巣凍結による生殖細胞形成過程の DNA メチロームへの影響について詳細なプロファイリングを行うことを計画した。まず、卵巣組織保護作用を持つ物質を検討する中で、テストステロンに注目し、検討することとした。テストステロンは男性における重要なホルモンであり、長らく女性生殖機能に対しては抑制的に働くと考えられてきた。しかし、近年の報告では卵胞発育を含めた種々の卵巣機能に重要な役割を持つことが報告されている。

２．研究の目的

卵巣組織凍結および融解移植を行うに当たり、テストステロンの卵巣保護作用について以下の検討を行う。

（1）生殖医療における血清テストステロン値測定の有用性を明らかにする。

（2）テストステロンの卵巣保護作用機序を解明する。

（3）抗癌剤治療に対して、テストステロン投与が卵巣機能保護に有用であるか検討する。

３．研究の方法

（1）不妊症患者の血清テストステロン値を測定し、採卵数との相関や子宮内膜症の有無による差異を検討した。

（2）良性卵巣腫瘍の診断で卵巣摘出術を施行した症例から正常卵巣組織を採取し、アポトーシス誘因蛋白である BimEL 発現の検討を行った。

（3）不死化顆粒膜細胞（COV434）を用いて、テストステロンの顆粒膜細胞に対する直接作用を検討した。

（4）マウスにシクロフォスファミドを腹腔内投与することで抗がん剤治療モデルを作成し、テストステロン投与による卵巣毒性の軽減について、血清 AMH 値、摘出卵巣における卵胞数、顆粒膜細胞のアポトーシスを比較検討した。

４．研究成果

（1）不妊症患者において、血清テストステロン値は他の卵巣予備能の指標(血清 AMH 値、血清 FSH 基礎値、年齢）と同様に、体外受精における採卵数と有意な正の相関関係を示した。このことから、血清テストステロン値が卵巣予備能の指標となることが示唆された（図 1)。体外受精治療における卵巣刺激への低反応を予測する血清テストステロンの cut off 値としては、0.17 ng/ ml と算出された（図 2)。また、子宮内膜症を有する患者では、内膜症を有さない患者と比較し、血清テストステロン値が有意に低下していた（0.19±0.14 ng/ ml vs. 0.43±0.22 ng/ ml)。

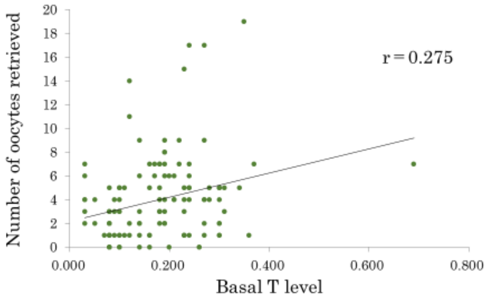

図1　採卵数と血清テストステロン値の相関関係

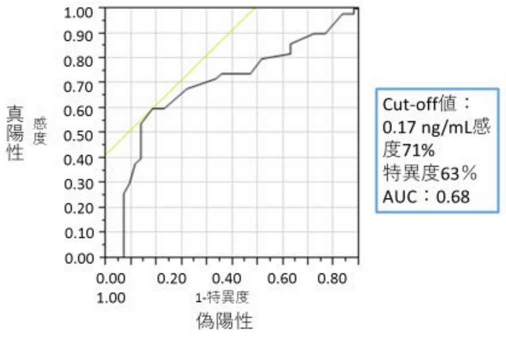

図2　血清テストステロンのCut-off値

（2）卵巣組織における BimEL（アポトーシス誘因蛋白）の発現を免疫染色にて検討したところ、BimEL 発現量は内膜症のある患者において内膜症のない患者と比較して有意に上昇していた。これらの結果より、テストステロンは抗アポトーシス作用により卵巣を保護している可能性が示唆された。

（3）不死化顆粒膜細胞を用いた検討では、膜型アンドロゲン受容体を刺激することにより PI3K/Akt-Fox03a シグナル経路を介して BimEL の発現が抑制され、PARP、Caspase 3 の活性が抑制された。このことからも、テストステロンには顆粒膜細胞に対する抗アポトーシス作用があることが示唆された（図 3、

4)。

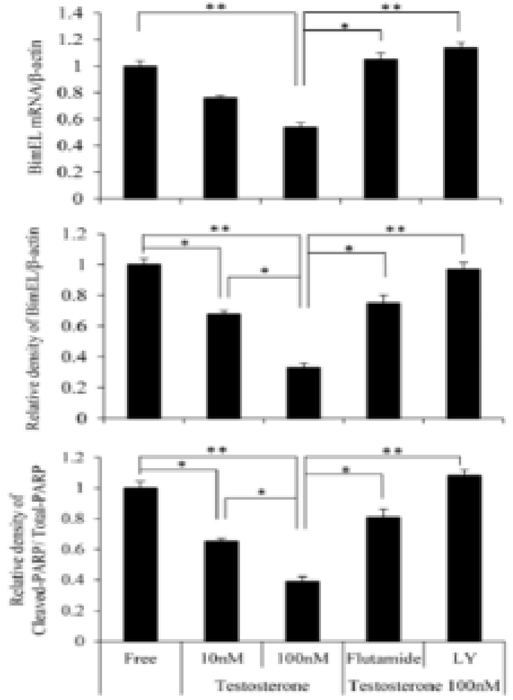

図3　不死化顆粒膜細胞における
アポトーシスマーカー発現①

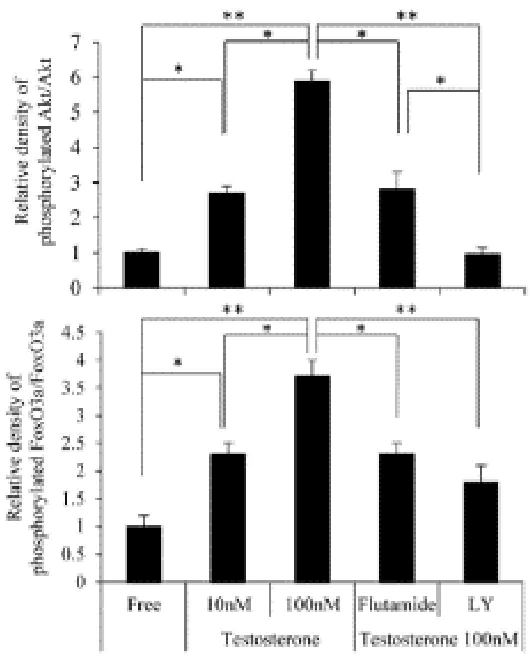

図4　不死化顆粒膜細胞における
アポトーシスマーカー発現②

（4）シクロフォスファミド投与マウスにおいては、原子卵胞の減少、閉鎖卵胞数の増加、Cleaved Caspase 3 陽性細胞率の増加がみられたが（図 5）、テストステロン投与によりいずれも改善された。また、卵巣予備能の指標である血清 AMH の低下を有意に抑制した（図 6)。テストステロンは抗がん剤投与による卵巣毒性に対しても、抗アポトーシス作用により卵巣保護効果を示すことが示唆された。

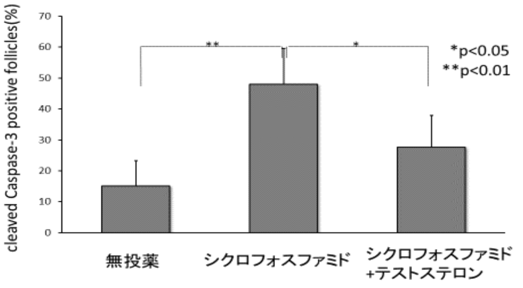

図5　Cleaved Caspase-3陽性細胞率

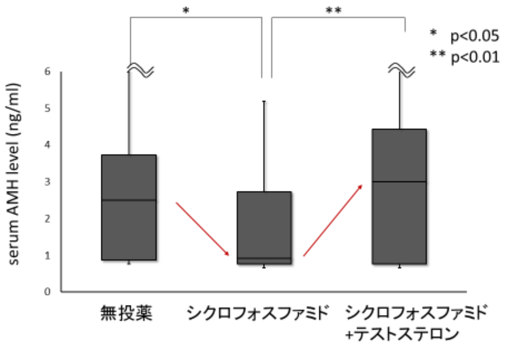

図6　血清AMH値

＜引用文献＞

Lazaraviciute G, et al. A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously. Human Reproduction Update. vol 6, 2014, 340-352

Gill A, et al. Androgens promote maturation and signaling in mouse oocytes independent of transcription: a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis. Molecular Endocrinology. vol 18, 2004, 97-104.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　１件）

Yoshihiro Ono, Akiko Tanabe, Yoko Nakamura, Hikaru Yamamoto, Atsushi Hayashi, Tomohito Tanaka, Hiroshi Sasaki, Masami Hayashi, Yoshito Terai, Masahide Ohmichi. A low-testosterone state associated with endometrioma leads to the apoptosis of granulosa cells. PLoS One. 査読あり, vol 9, 2014, e115618.

〔学会発表〕（計　4 件）

①小野 賀大、林 篤史、大道 正英、他
子宮内膜症における低テストステロン環境の顆粒膜細胞に対する影響の検討
第 67 回日本産婦人科学会学術講演会
平成 27 年 4 月 12 日

パシフィコ横浜

②劉 昌恵、林 篤史、大道 正英、他
テストステロンの抗癌剤からの卵巣保護作用の検討
第 67 回日本産婦人科学会学術講演会
平成 27 年 4 月 12 日
パシフィコ横浜

③林 篤史、寺井 義人、大道 正英、他
血清テストステロン値は卵巣予備能の指標として有用性である
第 67 回日本産婦人科学会学術講演会
平成 27 年 4 月 12 日
パシフィコ横浜

④田吹 邦雄、林 篤史、大道 正英、他
子宮内膜症における低テストステロン環境の顆粒膜細胞に対する影響の検討
第 59 回日本生殖医学会学術講演会
平成 26 年 12 月 4 日
京王プラザホテル

６．研究組織
(1)研究代表者
林　篤史（Atsushi Hayashi）
大阪医科大学・産婦人科・講師
研究者番号：80411338