

令和元年6月7日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11091

研究課題名(和文)メラトニンは卵胞閉鎖を抑制して発育卵胞数、排卵数を増加させる

研究課題名(英文) Melatonin suppresses ovarian follicle atresia and increases the number of growing follicles.

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

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)：メラトニンが卵胞閉鎖を抑制して、発育卵胞数・排卵数を増加させることができるかどうかを検討した。メラトニンを投与したマウスではコントロールに比べて、卵巣内の卵胞数(2次卵胞)の増加を認めた。排卵数には変化を認めなかったが、受精卵数や胚盤胞率はメラトニン投与群で高かった。マイクロアレイによるゲノムワイドな遺伝子発現変化の解析では、原卵胞から一次卵胞へのリクルート、卵胞の発育や卵子の成熟に関与する遺伝子群が促進されていた。メラトニンは直接的な抗酸化作用に加えて、これらのパスウェイを調節することによって、卵胞閉鎖の抑制や卵子の成熟、胚発育を調節している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊症治療で行う体外受精胚移植では、排卵誘発剤を使用しても十分な数の卵胞発育、卵子が得られない高齢婦人症例が増加している。メラトニンを体外受精時に併用することで閉鎖卵胞を減らすことができれば、FSHやHMGに反応できる卵胞数が増えて成熟卵胞や卵子数の増加、体外受精胚移植の成績の向上が期待できる。本研究は、この不妊治療におけるメラトニンの臨床応用の有用性を検証するための基礎的な裏付けとなるものである。

研究成果の概要(英文)：The present study was undertaken to examine whether melatonin treatment suppresses ovarian follicle atresia and increases the number of growing follicles. Female ICR mice (10 weeks old) were supplemented with melatonin for 4 weeks. Their oocytes were recovered from the oviduct, and in vitro fertilization was performed. The ovaries were used for a histological and transcriptome analysis. The number of secondary follicles in ovary was increased in melatonin group compared with control group. The fertilization rate and blastocyst rate were higher in melatonin group. The genes relevant to activation of primordial follicles and follicle growth were extracted in melatonin group by genome wide gene analysis using microarray. Melatonin may reduce follicle atresia and accelerate follicle growth by its multiple actions.

研究分野：産婦人科

キーワード：メラトニン 卵胞閉鎖 体外受精胚移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の晩婚化や女性の社会進出に伴い妊娠・育児を希望する年齢が上昇しているため、高齢婦人の不妊症が増加している。卵巣の加齢は卵子の質の低下のみならず、卵子数の減少が伴う。卵巣内の原始卵胞は思春期に約 20 万個あるが、加齢と共にその数は減少する。原始卵胞は一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞へと発育をはじめると数ヶ月で成熟卵胞となって排卵に至る。しかし、生涯で排卵できる卵胞は約 500 個程度であり、ほとんどすべての卵胞 (99%以上) は排卵できずに種々の発育段階で閉鎖卵胞となって消失するが、卵胞閉鎖の詳細なメカニズムは十分には解明されていない。

(2) 不妊症治療で行う体外受精胚移植では、follicle stimulating hormone(FSH)製剤、human menopausal gonadotropin(HMG)製剤による過排卵刺激で多数の卵胞発育を促し、多数の卵子を採取して、体外受精胚移植を行う。しかし、排卵誘発剤を使用しても十分な数の卵胞発育、卵子が得られない高齢婦人症例が増加しており、閉鎖卵胞を減らすことができれば、FSH や HMG に反応できる卵胞数が増えて成熟卵胞や卵子数の増加、体外受精胚移植の成績の向上が期待できる。

### 2. 研究の目的

卵胞閉鎖の詳細なメカニズムは十分には解明されておらず、卵胞閉鎖を防ぐ有効な方法も見つかっていない。発育過程で卵胞閉鎖を防ぐことができれば、発育卵胞数・排卵数の増加、体外受精等の生殖補助医療 (ART) の成績の向上にもつながる。我々は、卵胞液中に存在する松果体ホルモンのメラトニンが抗酸化作用をもち、卵子を保護することを解明してきた。卵胞内に存在するメラトニンは、卵胞発育に伴い卵胞液内の濃度が上昇するため、卵胞発育や卵胞閉鎖に重要な役割を担っている可能性が高い。本研究では、**メラトニンが卵胞閉鎖を抑制して、発育卵胞数・排卵数を増加させることができるかどうか、また、メラトニンの卵胞閉鎖抑制の詳細なメカニズムを解明することを目的とした。**

### 3. 研究の方法

卵胞発育過程においてメラトニンが卵胞閉鎖を減少させ発育卵胞数・排卵数を増加させることができるかどうか、また、メラトニン作用のメカニズムを詳細に解明するため、マウス実験モデルを用いて検討した。10 週齢 ICR 雌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、13 週齢まで 4 週間飼育した。メラトニン投与群はメラトニン水 (100  $\mu$ l/ml) を飲水させ、コントロール群は水を飲水させた。

#### (1) 組織学的検討

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し、ヘマキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下に原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞などの各発育段階の卵胞数を計測した。

#### (2) 体外受精の成績

pregnant mare serum gonadotropin(PMSG)による過排卵刺激によって卵胞発育を促進し、human chorionic gonadotropin (hCG)により排卵を誘発した。卵管より卵子を回収し、雄マウスより採取した精子を媒精 ( $10 \times 10^4$  個/ml) し、精子と体外培養を行った。48 時間後に受精卵 (2cell embryo) の数を計測し受精率を検討した。さらに 96 時間培養後に胚盤胞数を計測し胚発育を検討した。

#### (3) 遺伝子発現の変化

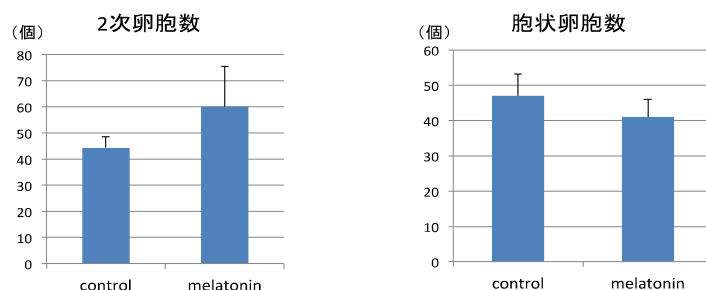
pregnant mare serum gonadotropin(PMSG)による過排卵刺激後に顆粒膜細胞を回収し、抽出した RNA を用いてマイクロアレイ法でトランスクリプトーム解析を行い、メラトニン投与による遺伝子発現の変化を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 組織学的検討

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  $\mu$ m 毎の連続切片に対して原始卵胞および一次卵胞は 25  $\mu$ m 毎、二次卵胞は 100  $\mu$ m 毎、胞状卵胞は 200  $\mu$ m 毎に計測し、合計を卵巣当りの卵胞数とした。2 次卵胞数 (平均: コントロール群  $44 \pm 4$  個、メラトニン群  $60 \pm 15$  個)、胞状卵胞数 (平均: コントロール群  $47 \pm 6$  個、メラトニン群  $41 \pm 5$  個) であり、メラトニン群で 2 次卵胞が多かった。

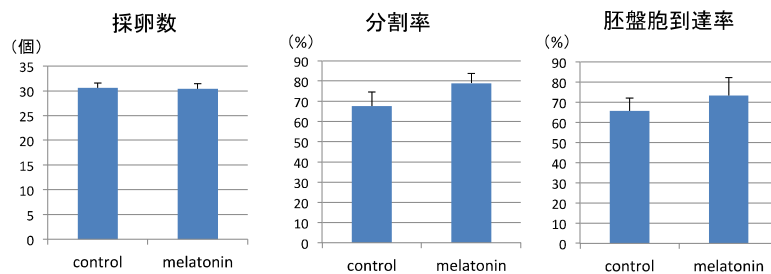
メラトニンを10週齢から1か月間投与後の卵胞数(卵巣内)



## (2)体外受精の成績

採卵数(平均:コントロール群 30.6 個、メラトニン群 30.4 個)は両群間で変化なかったが、分割率(平均:コントロール群 68%、メラトニン群 79%)および胚盤胞到達率(平均:コントロール群 66%、メラトニン群 73%)はメラトニン群で高かった。

メラトニンを10週齢から1か月間投与後の体外受精の成績



## (3)遺伝子発現の変化

メラトニン群で 1192 遺伝子の発現がコントロールマウスに比べて上昇しており、これらの遺伝子を IPA 解析すると、PI3K-AKT シグナル、Ras シグナル、cAMP シグナル、DNA replication 経路といった、卵胞の発育や卵子の成熟に関するパスウェイが抽出された。また、ネットワーク解析では *FIGLA* 遺伝子が制御する遺伝子群が上位で抽出され、これは原始卵胞から 1 次卵胞へのリクルートに関与する遺伝子であり、加齢マウスでは、若齢マウスに比べ *FIGLA* 遺伝子の発現が減少していることが報告されている。

メラトニン投与で上昇する1192 遺伝子 (Fold change > 1.5) のパスウェイ (KEGG)

Pathway	PValue	Genes
Focal adhesion	0.002731	HRAS, PIK3CB, ITGA1, MYL9, ITGA10, ITGB3, BIRC3, VAV2, FLN4, LAMA3, ITGB8, VEGFA, COL1A2, PIK3CA, MAPK9, ZYX, MLK, PAR6B
Thyroid hormone signaling pathway	0.004225	HRAS, NOTCH1, PLOE1, WNT4, PIK3CB, MED27, FOXO1, PIK3CA, ATP1A2, ITGB3, RCAN2, PLCB2
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0.005322	SCN1B, PIK3CB, CREB1, PPP2R3C, CACNB1, CACNB2, ATP1A2, CACNB4, RPS3KAS, AGTR2, AGTR1A, PIK3CA, PPP2R2E, PLCB2
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	0.005882	ITGB8, DMD, ITGA1, CACNB1, ITGA10, CACNB2, CACNB4, ITGB3, CTNNA2
Sphingolipid signaling pathway	0.008453	PIK3CZ, HRAS, PLEK1, SPTLC1, PIK3CB, PPP2R3C, PIK3CA, MAPK9, PPP2R2E, NSDAP, PLCB2, ASAH2
Pathways in cancer	0.010988	FGFR, HRAS, GNG13, FOSL1, LRRK2, KIT, ZBTB18, WNT4, PIK3CA, RARB, FGFR2, PLCB2, ARHGAP1, PIK3CB, RUXN1T1, CDK6, BIRC3, RALGDS, CTNNA2, LAMA3, AGTR1A, VEGFA, MAPK9, ABL1, PTC1, PTC2, ABL1
Central carbon metabolism in cancer	0.011429	HRAS, PIK3CB, GLS, PPP1, HK1, PIK3CA, SIRT6, KIT
Alcoholism	0.01175	HRAS, HIST4H, GNAO1, HIST1H4C, CREB1, GNG13, GRIN2B, HIST2H4, HDAC4, HIST2H4B, GRIN2C, HIST1H4C, HIST1H4D, HIST1H4E, HIST1H4J, HDAC9
PI3K-Akt signaling pathway	0.017253	HRAS, PIK3CB, CREB1, PPP2R3C, GNG13, ITGA1, ITGA10, LPAR2, CDK6, ITGB3, KIT, PKCZ, LAMA3, ITGB8, VEGFA, COL1A2, PIK3CA, FNNA4, PPP2R2E, EPOR, FGFR2, IL1RA
Viral carcinogenesis	0.017495	HRAS, HIST4H, HIST1H4C, PIK3CB, CREB1, RBL1, GTF2I3, GTF2A1L, CDK6, HIST2H4, HDAC4, HEH11, PIK3CA, HIST1H4C, HIST1H4D, HDAC9, HIST1H4J
Inositol phosphate metabolism	0.018139	PLCE1, PIK3K1, PIK3CG, PIK3CB, PIK3CA, PIK3K1A, PLCB2
Regulation of actin cytoskeleton	0.019058	FGFR, HRAS, ARHGAP1, PIK3CB, ARHGAP7, ITGA1, MYL9, ITGA10, PIPK1A, ITGB3, VAV2, CHRM1, ITGB8, PIK3CA, FGFR2, MYLK
Ras signaling pathway	0.032551	PLEK1, HRAS, FGFR, PIK3CB, GNG13, KIT, RALGDS, RASA1, PLOE1, VEGFA, PLA2G1B, PIK3CA, MAPK9, ABL1, FGFR2, PLA2G5
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	0.032769	ITGB8, DMD, ITGA1, CACNB1, ITGA10, CACNB2, CACNB4, ITGB3
Dilated cardiomyopathy	0.041258	ITGB8, DMD, ITGA1, CACNB1, ITGA10, CACNB2, CACNB4, ITGB3
Choline metabolism in cancer	0.041599	HRAS, PLD1, DGKB, PIK3CB, PIK3CA, MAPK9, PCYT1B, PIPK1A, RALGDS
cAMP signaling pathway	0.042098	PLD1, PIK3CB, CREB1, NRP1, GRIN2B, ATP1A2, SOX3, VAV2, PLCB1, GRIN2C, PDE4B, PIK3CA, PTC1, MAPK9
Oxytocin signaling pathway	0.042643	MEF2C, HRAS, GNAO1, RGS2, PIK3CB, CACNB1, CACNB2, NRP1, PIK3CA, CACNB4, PLCB2, MYLK
Hematopoietic cell lineage	0.043583	GP1BB, ITGA1, MS4A1, EPOR, IL13RA, KIT, ITGB3, IL13RA
Renin-angiotensin system	0.044966	ILK1B21, AGTR1, AGTR1A, THOP1, PRCP
DNA replication	0.044966	PRIM1, SSBP1, PRIM2, POLE, RNASEH2A
GABAergic synapse	0.051062	GABARAPL2, GABRA2, GNAO1, GLS, GABRA5, GNG13, ABAT, GABARAP
Valine, leucine and isoleucine degradation	0.060713	DNCT2B, ACAD3B, ABAT, HSCB, AC3FA, ALDH2
mmu05221:Acute myeloid leukemia	0.064654	HRAS, PIK3CB, RUXN1T1, PIK3CA, ZBTB18, KIT
Platelet activation	0.067396	PIK3CZ, ARHGAP1, GP1BB, PIK3CB, COL1A2, TEXA2R, PIK3CA, ITGB3, PLCB2, MYLK
Rap1 signaling pathway	0.072654	PIK3CZ, FGFR, HRAS, PLOE1, GNAO1, PIK3CB, VEGFA, PIK3CA, LPAR2, KIT, ITGB3, PLCB2, FGFR2, RALGDS

本研究では、メラトニンが卵胞閉鎖を抑制して、発育卵胞数・排卵数を増加させることができるかどうか、また、メラトニンの卵胞閉鎖抑制の詳細なメカニズムを解明することを目的とした。本研究の結果からは、メラトニンを投与したマウスではメラトニン無投与のコントロールマウスに比べて、卵巣内の卵胞数(2次卵胞)の増加を認めた。過排卵刺激による排卵数には変化を認めなかったが、受精卵数(受精率)や胚発育(胚盤胞率)はメラトニン投与群で高く、メラトニンが卵胞数の減少を軽減し、卵子の質や胚発育を向上させる可能性も考えられた。これらの機序については、メラトニンの直接的な抗酸化作用によって卵胞や卵子に加わる活性酸素による酸化ストレスを軽減することで卵胞閉鎖を防ぐとともに、卵子のダメージを少なくしている可能性が考えられる。一方で、マイクロアレイによるゲノムワイドな遺伝子発現変化の解析から、メラトニンを投与すると原始卵胞から一次卵胞へのリクルートに関与する遺伝子群や、卵胞の発育や卵子の成熟に関するパスウェイが促進されることが明らかになり、これらの機序を介して、メラトニンは卵胞閉鎖の抑制や卵子の成熟、胚発育を調節している可能性がある。

不妊症治療で行う体外受精胚移植では、排卵誘発剤を使用しても十分な数の卵胞発育、卵子が得られない高齢婦人症例が増加している。メラトニンを体外受精時に併用することで閉鎖卵胞を減らすことができれば、FSHやHMGに反応できる卵胞数が増えて成熟卵胞や卵子数の増加、体外受精胚移植の成績の向上が期待できる。本研究は、この不妊治療におけるメラトニンの臨床応用の有用性を検証するための基礎的な裏付けとなるものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

田村博史、メラトニンと性機能、産科婦人科臨床シリーズ 1 生殖生理、査読無、1 巻、2019、93-98、<https://www.nakayamashoten.jp/>

田村博史、【産婦人科関連ホルモンの基礎を学びなおす】メラトニン・メラトニン受容体(解説/特集)、産科と婦人科、査読無、85 巻、2018、817-825、<http://www.shindan.co.jp/>

〔学会発表〕(計 4 件)

田村博史、城崎 舞、杉野法広、メラトニンの卵巣加齢に対する予防効果および投与開始時期の検討、第18回日本抗加齢医学会学術総会、2018

田村博史、城崎 舞、高木遥香、白蓋雄一郎、三原由実子、品川征大、田村 功、竹谷俊明、杉野法広、メラトニンの卵巣加齢に対する予防効果および投与開始時期の検討 第59回日本卵子学会学術集会、2018

田村博史、メラトニン-最新研究から未来へ 2 抗酸化-卵巣加齢、生殖医療への応用、第10回抗加齢内分泌研究会、2018

田村博史、松本真紀、杉野法広、メラトニンの卵巣加齢に対する予防効果および投与開始時期の検討、第33回日本女性医学学会学術集会、2018

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：竹谷 俊明

ローマ字氏名：TAKETANI, Toshiaki

所属研究機関名：山口大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 70464328

### (2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。