

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11116

研究課題名(和文)メカノバイオロジーを基盤とする新規卵巣刺激法の開発

研究課題名(英文)Development of new method for ovarian stimulation based in mechanobiology

研究代表者

河村 七美 (Kawamura, Nanami)

国際医療福祉大学・医学部・研究員

研究者番号：70323152

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)：我々は卵巣を断片化し物理的刺激を与えることで2次卵胞が発育することを明らかにした。本研究では、卵巣への物理的刺激による2次卵胞発育誘導を基盤に新たな不妊治療法の開発を行うため、1) 動物モデルによる卵巣Hippoシグナル抑制に必要な物理刺激負荷量の確定、2) 卵巣への低侵襲な物理刺激を可能とするデバイスの開発、3) 卵巣への物理的刺激による2次卵胞発育誘導効果を用いた卵巣刺激法の臨床試験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、メカノバイオロジーの卵巣における役割を解明しつつ、2次卵胞発育誘導に必要な至適物理的刺激量を決定し臨床応用へ導くことで、新しい医療技術の創出につながる。また、一連の物理刺激に対する生理学的応答が明らかになることで、卵巣皮膜が肥厚し卵胞発育が停止する多嚢胞性卵巣症候群において物理刺激応答機構の破綻による病態的応答が明らかとなり、新規分子標的治療の開発の糸口となることが期待される。さらに、研究成果により特殊デバイスを用いて経膈超音波下の卵巣への針刺入による物理的刺激法が開発されれば、IVF-ETと同程度に低侵襲で、かつ自然妊娠が期待でき、より安価な治療法が開発できる。

研究成果の概要(英文)：We identified that physical stimulation to the ovary by fragmentation led growth of secondary follicles. In this study, we conducted following studies to develop a new infertility study based on induction of secondary follicle growth by physical stimulation to the ovary: 1) determination of physical stimulation load required for Hippo signal disruption in ovaries using animal models, 2) development of a device enables to make a low invasive physical stimulation to ovaries and 3) a clinical study to address the method for ovarian stimulation based on induction of secondary follicle growth by physical stimulation to the ovary.

研究分野：生殖医療

キーワード：メカノバイオロジー 卵巣刺激 卵胞発育

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体を構成する細胞は様々な物理的刺激に晒されており、それを自らの成長、分化、増殖、死などに利用していることが明らかになってきている。物理的刺激は細胞で感知され、細胞内でシグナルに変換されて生理的・病態的応答が生じる。最近申請者は、卵巣を断片化し物理的刺激を与えることで卵巣内の顆粒膜細胞の細胞骨格であるアクチンの重合化がおり、細胞内の Hippo シグナルが抑制され、エフェクター蛋白である YAP (Yes-associated protein) が核内移行し、核内転写因子である TEAD と共役して CCN 成長因子などを産生して細胞増殖がおこることを見出した。その結果、2 次卵胞の細胞が増殖して卵胞が発育することを明らかにした (Kawamura et al. PNAS 2013, Hsueh, Kawamura et al. Endocr Rev 2015)。さらに申請者は、腹腔鏡下に卵巣を摘出し断片化して物理的刺激を与え 2 次卵胞を発育させ、PI3K 活性化剤を用いて卵巣組織培養を行い、休眠原始卵胞の活性化を誘導する方法を考案した (Li, Kawamura et al. PNAS 2010)。病的に残存卵胞が激減することで卵胞発育が停止して閉経となる早発閉経患者に対し、本法の臨床応用を実施した。体外培養後に卵巣断片を腹腔鏡下に卵管漿膜下に移植して卵胞を発育させ、採卵を行って体外受精胚移植 (IVF-ET) をすることで、平均 7 年間無月経であった患者の妊娠分娩に成功している (Kawamura et al. PNAS 2013, Kawamura et al. Hum Reprod 2015)。

早発閉経の他に、排卵障害を呈する多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) では、2 次卵胞の段階で卵胞発育が途中で停止し、排卵障害による不妊となる。これまで PCOS 患者に対して、卵巣楔状切除や卵巣多孔術などの外科手術により卵巣に物理的刺激を与えると、卵胞が発育を再開し排卵することが知られていた。この分子機構は諸説あるが、申請者は物理的刺激が Hippo シグナルを抑制して 2 次卵胞の発育誘導がおこることで卵胞発育が再開すると考えた。実際過去の自験例として、卵巣多孔術を予定していた PCOS 患者の腹腔鏡手術の際に、卵巣と腸管の強度の癒着によりパワーソースを用いた多孔術が困難で、卵巣皮質に切開を入れるのみの術式 (卵巣切開術) で多孔術と同様の卵胞発育効果が得られた症例がある (未発表データ)。PCOS の不妊治療として、現行の外科的療法は IVF-ET と同等の臨床成績であり、自然妊娠も可能であるが、侵襲度が高いことが課題である。

2. 研究の目的

本研究では、Hippo シグナル抑制による 2 次卵胞発育誘導に必要な物理的刺激の負荷量を明らかにし、2 次卵胞発育誘導の臨床試験を行った。さらに、より低侵襲に卵巣に対し必要十分な物理的刺激を与えることが可能なデバイスの開発も行い、PCOS に対する新たな不妊治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

申請者が新たに解明した Hippo シグナル抑制による 2 次卵胞の発育誘導を基盤とする、メカノバイオロジーに着目した卵巣への物理的刺激による PCOS 患者の新規卵巣刺激法を開発するため、本研究計画では以下の研究項目を実施した。

ウサギ卵巣に対し卵巣切開術を行い、Hippo シグナル抑制による 2 次卵胞発育誘導に必要な物理刺激の負荷量を確定する。

経腔的に卵巣への物理刺激を可能とする、卵巣出血を最小限に抑える針デバイスを開発し、そのデバイスを用いた低侵襲な 2 次卵胞発育の誘導法のプロトコルを確定する。

薬物療法抵抗性の PCOS 患者に対し、卵巣切開術による卵巣刺激法による不妊治療の臨床試験を行い、その有効性、安全性を評価する。

(1) 動物モデルによる卵巣 Hippo シグナル抑制に必要な物理刺激負荷量の確定

本研究では、卵巣顆粒膜細胞における Hippo シグナルを抑制するために必要な物理刺激負荷量を、動物モデルを用いて決定した。ウサギの卵巣は比較的大きく、予備実験にて一定の長さの線状切開を複数箇所行うことが可能であり、研究結果のヒトへ外挿が容易である。さらに、ウサギは IVF-ET の技術が確立されており、本法で得られた卵子の質的評価が可能であることから、一連の研究にウサギを用いることとした。

ウサギ卵巣への線状切開による Hippo シグナル抑制に必要な物理刺激負荷量の決定

麻酔下にウサギ背部から卵巣を体外へと導出し、スケールを使いながらメスで幅 2mm の切開を 1~20 カ所の範囲で行った。卵巣を体内に戻し、経時的に卵巣を摘出して卵巣の定量的 RT-PCR による CCN 成長因子の増加を非切開群と比較することで、CCN 成長因子の発現量がピークとなる線状切開の回数を確認した。さらに、F-アクチン/G-アクチン比の測定による卵巣組織のアクチン重合の増加、免疫染色による顆粒膜細胞における YAP の核移行、ウェスタンブロットによる核内局在型である非リン酸化 YAP と細胞質内局在型であるリン酸化 YAP の発現量比の増加により、Hippo シグナルの抑制の証明を試みた。また、線状切開後 72 時間で卵巣を摘出し、組織学的に各発育段階の卵胞数を測定して 2 次卵胞の発育誘導の有無を調べた。最終的に、線状切開後に妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG 80IU) を注射し、72 時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG 60IU) を投与し、14 時間後に卵管より排卵卵子を回収して排卵卵子数を計測し、正常成熟卵子数が最大となる線状切開回数を決定し、2 次卵胞発育誘導のための

至適な物理刺激負荷を確定した。

線状切開による Hippo シグナルの抑制によって得られた卵子の質の評価
卵巣は生理的に排卵の度に卵巣表面の卵胞壁が破れるため、線状切開による物理的刺激は卵子の質に影響を与えず、本法の生殖医療としての安全性は高いと考えられるが、ヒトへの臨床応用に向けた安全性の確認のため、得られた成熟卵子に対して IVF-ET を行い、その成績を非切開群と比較した。成熟卵子に対して、人工腔を用いて回収した射出精子で媒精を行い、受精率およびその後の胚盤胞到達率を測定した。さらに、2細胞期胚を移植し、着床率、産仔数、流産率を測定した。また、成熟卵子に対してインプリント遺伝子(母性: Igfr2, Lit1, 父性: H19)の DMR 内の CpG サイトのメチル化の程度を測定し、エピジェネティックな変化について非切開群と比較した。

(2) 卵巣への低侵襲な物理刺激を可能とするデバイスの開発

臨床応用の場面では、腹腔鏡下に卵巣皮質をパワースourceによる凝固止血を極力行わずに線状に至適回数(至適深度)切開し、Hippo シグナルを抑制することを想定しているが、全身麻酔下での手術が必要となり、侵襲度が高い。低侵襲に卵巣へ物理的刺激を与える方法として、経腔超音波ガイド下に卵巣に針を複数回刺す方法が想定される。この場合も、Hippo シグナルを抑制するために必要な物理刺激負荷量=針の刺入回数(深度)を決定する必要があるが、針刺入回数の増加につれ卵巣からの出血リスクが増大する。そこで、卵巣に刺さった部分のみが加熱される熱凝固による止血が可能な針を開発し、デバイスを用いた2次卵胞発育の誘導法のプロトコル確定を試みた。

卵巣刺入用の針デバイスの開発

組織の熱凝固が広範囲に伝播すると、死滅する卵胞の増加や、隣接臓器の熱傷を誘発する可能性があるため、加熱部位が限局され熱凝固の伝播が最小限となるようなデバイスが必要である。海外の共同研究者と作製したプロトタイプからウサギに使用可能なサイズのものを作製し、ウサギ卵巣に刺入し、止血効果を肉眼で確認しつつ、組織学的に熱凝固による組織壊死の範囲を特定して熱凝固の伝播が最小限となるよう改良を行った。

卵巣刺入用の針デバイスを用いた2次卵胞発育の誘導法のプロトコルを確定

針デバイスのモデルが確定した際には、針デバイスをウサギ卵巣に1~10回刺入し、Hippo シグナルの抑制効果をみながら至適刺入回数を決定し、卵子の質を低下させる影響がないことを確認して2次卵胞発育誘導のプロトコルの確定を試みた。

(3) 卵巣への物理的刺激による2次卵胞発育誘導効果を用いた卵巣刺激法の臨床試験

非臨床試験により、卵巣切開術が2次卵胞発育誘導に有用であると判断され、以下の不妊患者を対象とした比較対照試験を行った。

対象患者

日本産婦人科学会の PCOS の診断基準を満たす無月経患者で、クロミフェン療法や FSH 療法が奏功せず、ステップアップした不妊治療が必要となる患者を対象とした。除外基準は、卵管因子、男性因子により IVF-ET が必須の患者、未婚患者、同意を得られない患者とした。目標症例数は、先行研究が無いため中程度の効果量(0.5)を選択し、 $\alpha = 0.05$ 、 $\beta = 0.8$ として各群 64 人と算出した。

試験の方法

卵巣多孔術を対照とする無作為二重盲検化比較対照試験を行った。非臨床試験の結果をヒトに外挿し、至適な線状切開(切開創の長さ、深さ、数)を確定した。線状切開群では、腹腔鏡下にパワースourceによる凝固止血を極力行わずに、両側卵巣皮質に対して線状切開を行った。創部は癒着を防止するため、酸化再生セルロースシートを貼付した。対照群は標準治療である卵巣多孔術を施行した。術後は最大6ヶ月間、卵胞発育・排卵を経腔超音波検査およびホルモン検査にて定期的にモニターし、排卵となる際には、タイミング療法を行い、妊娠の有無および流産の有無に関して記録した。症例登録、割付方法は中央割付、置換ブロック法を用いる。割付・コード化担当者を研究協力者(千葉大学大学院医学研究院・先進加齢医学 清水孝彦准教授)に依頼した。

評価項目

主要評価項目として排卵率を対照群と比較した。統計学的解析には t 検定を用いた。副次的評価項目として、妊娠率、流産率、生児出生率、卵巣予備能(血中抗ミュラー管ホルモン値)を対照群と比較し、同様の統計学的解析を行った。これらの項目は2次卵胞発育以外の因子の影響が及ぶため、副次的評価項目とした。安全性評価項目として、卵巣切開術にて出生した児の予後を評価するため、全ての出生児を登録し、乳幼児健診のデータを収集し、異常の有無を検証することとした。また、手術に関連する有害事象の発生について調べた。

4. 研究成果

(1) 動物モデルによる卵巣 Hippo シグナル抑制に必要な物理刺激負荷量の確定

先行研究で用いたマウス卵巣の半切または 1/3 に切離したモデルにおいて、Hippo シグナル抑制による 2 次卵胞発育誘導効果を確認したものの、マウス卵巣は小さすぎて物理的刺激的負荷量を細かく変化させながら Hippo シグナルの抑制を判定することは困難であった。そこで、比較的大きいウサギの卵巣を用いて、一連の試験を行う予定をしたが、安価なラット卵巣への針を用いた刺入刺激でも Hippo シグナルが抑制されることを見出し、ラット卵巣を用いて試験を行うこととした。その結果、2 次卵胞発育誘導のための至適穿刺回数を決定することができた。この至適穿刺回数はウシおよびヒト卵巣（同程度の大きさ）に外挿すると、卵巣サイズの個人差を考慮すると、30-50 回の穿刺回数となった。さらに、卵巣への物理的刺激によって得られた卵子の質を評価するため、穿刺後の個体に過排卵刺激を行って採卵し、体外受精胚移植を行ったが、卵巣への物理的刺激を行わなかった群と比較して、妊娠率、流産率、出生児の体重、胎盤重量、出生児の行動および妊孕性に特に差を認めなかった。

(2) 卵巣への低侵襲な物理刺激を可能とするデバイスの開発

臨床応用の場面を想定し、多数回の卵巣への針穿刺による出血を予防するための針デバイスの開発を行った。卵巣に刺入した針デバイスが血流の豊富な髄質部位に到達すると出血がおこるため、針デバイスの先端の 1mm 程度の部位が瞬時に熱せられて凝固止血がおこり、その後すぐに温度が低下して周囲の卵胞を含む皮質組織への悪影響が最小限にすむものをデザインし、プロトタイプを完成させた。そのプロトタイプデバイスの 2 次卵胞発育誘導効果と体内で使用際の安全性について生体内での効果を調べるため、ウシ卵巣を用いた *in vivo* 試験を行い、有効性と安全性の双方を確認した。本デバイスにより、ウシにおいて 2 次卵胞の発育が誘導された。また、デバイスが卵子の質におよぼす影響についてはまだ確認中であるが、卵巣周囲臓器へのデバイスのもたらす悪影響はないことが確認でき、特許申請を行った。

(3) 卵巣への物理的刺激による 2 次卵胞発育誘導効果を用いた卵巣刺激法の臨床試験

ウシ卵巣用に開発した卵巣への低侵襲な物理刺激を可能とするデバイスを用いた臨床試験を実施した。ウシ用針デバイスのプロトタイプをヒト卵巣に最適化するため、針の長さや直径をウシ卵巣とヒト卵巣のサイズの違いを考慮して設定した。本試験期間内に統計解析に必要とされる全ての患者を登録して解析を終了することはできなかったが、中間解析では 2 次卵胞発育誘導効果が確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 河村和弘・河村七美	4. 巻 67
2. 論文標題 早発卵巣不全 卵胞活性化療法 - 腹腔鏡下卵巣組織移植術 -	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 産婦人科の実際	6. 最初と最後の頁 405-409
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 河村和弘・河村七美	4. 巻 3
2. 論文標題 VI女性性機能 性腺機能低下症 卵巣機能低下症	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 別冊 日本臨牀 領域別症候群シリーズNo.3 内分泌症候群（第3版）	6. 最初と最後の頁 135-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 河村 和弘, 河村 七美	4. 巻 67
2. 論文標題 早発卵巣不全 卵胞活性化療法 : 腹腔鏡下卵巣組織移植術 (特集 エキスパートの内視鏡手術 : コツと ビットフォール(2))	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 産婦人科の実際	6. 最初と最後の頁 405-409
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Yorino Sato, Nanami Kawamura, Kazuhiro Kawamura	4. 巻 7
2. 論文標題 Infertility Treatment in Primary Ovarian Insufficiency: Fertility Preservation and?In Vitro?Activation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Gynecology and Womens Health	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.19080/JGWH.2017.07.555704	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 河村和弘、河村七美	4. 巻 66
2. 論文標題 POIの治療、薬物療法とIVAは?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 産婦人科の実際	6. 最初と最後の頁 1537-1543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 河村和弘、河村七美	4. 巻 63
2. 論文標題 卵巣性無月経の診断と対応	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ホルモンと臨床	6. 最初と最後の頁 463-467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kawamura K, Kawamura N, Hsueh AJ	4. 巻 28
2. 論文標題 Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure?	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Curr Opin Obstet Gynecol	6. 最初と最後の頁 217-222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/GCO.0000000000000268	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 該当する

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤 可野, 中村 智子, 岩瀬 明, 岡本 直樹, 川越 雄太, 河村 七美, 河村 和弘
2. 発表標題 Resistant ovary syndrome(ROS)患者の新たな卵胞発育誘導法の開発 C-type natriuretic peptide(CNP)によるヒト顆粒膜細胞株の細胞増殖とE2産生誘導
3. 学会等名 第59回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川越 雄太, 川島 一公, 佐藤 可野, 岡本 直樹, 河村 七美, 石塚 文平, 河村 和弘
2. 発表標題 CXCL5-CXCR2シグナル抑制による高齢患者の胚質改善の試み
3. 学会等名 第59回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計7件

1. 著者名 河村和弘・河村七美	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実践 臨床生殖免疫学	

1. 著者名 河村和弘・河村七美	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 4
3. 書名 別冊 日本臨牀 領域別症候群シリーズNo.3 内分泌症候群 (第3版)	

1. 著者名 河村和弘、河村七美	4. 発行年 2017年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 3
3. 書名 女性内分泌クニカルクエスチョン90, Q37 卵巣機能不全に影響する抗がん剤はどのようなものがある？	

1. 著者名 河村和弘、河村七美	4. 発行年 2017年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 3
3. 書名 女性内分泌クリニカルクエスチョン90, Q38 P01に対する排卵誘発法を成功させるには	

1. 著者名 河村和弘、河村七美	4. 発行年 2016年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 90-91
3. 書名 女性内分泌クリニカルクエスチョン90, Q37 卵巣機能不全に影響する抗がん剤はどのようなものがある？	

1. 著者名 河村和弘、河村七美	4. 発行年 2016年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 92-93
3. 書名 女性内分泌クリニカルクエスチョン90, Q38 P01に対する排卵誘発法を成功させるには？	

1. 著者名 河村和弘、河村七美	4. 発行年 2016年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 94-95
3. 書名 女性内分泌クリニカルクエスチョン90, Q39 P01に対するホルモン療法はどのように行う？	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 卵胞発育誘導装置	発明者 河村 和弘, 高橋 一 哲, 廣井 和正	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-109008	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 卵胞発育誘導装置	発明者 河村 和弘, 高橋 一 哲, 廣井 和正	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/22319	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分担 者	河村 和弘 (kazuhiko kawamura) (10344756)	国際医療福祉大学・医学部・教授 (32206)	