

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09748

研究課題名(和文)「小卵胞内卵子成熟」理論に基づく難治性PCOSの新治療開発

研究課題名(英文) Retrieval of mature oocytes from non-dominant follicles: a new therapy for PCOS

研究代表者

生水 真紀夫 (Shozu, Makio)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：30226302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小卵胞卵子の不妊治療への応用を目指して本研究を実施した。その結果、以下の3点が明らかになった。(1)小卵胞内卵子の成熟機序には大卵胞と同様にLHサーージ依存性にLhCGRを介して進行する機序と、顆粒膜機能不全により成熟抑制機序が解除されて進行する機序とがある。(2)PCOSでは小卵胞穿刺により多くの成熟卵子を回収でき、妊娠率も非PCOS群由来小卵胞卵子のそれより高い。(3)小卵胞卵子はIVF-ET反復不成功例の妊娠率を向上させる可能性がある。本研究は、主席(大)卵胞でのみ卵子が成熟するという既成概念に基づく現在の体外受精からのパラダイムシフトをもたらすものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体外受精胚移植によっても妊娠に至らない難治性不妊症の治療は困難である。難治性不妊症の原因としては、卵胞数の多い多嚢胞性卵巣症候群と逆に卵胞数が少ない卵巣予備能低下とがある。本研究では、両型の難治性不妊症に対して小卵胞採卵による新たな体外受精が有効な治療法となり得ることを示した。小卵胞卵子の概念を応用した治療法ではゴナドトロピン投与量を大幅に削減、かつ妊娠率を向上させることができる。投与薬量の削減により、費用の低減・卵巣過剰刺激症候群のリスク回避というメリットも得られる。小卵胞卵子の概念は、「大」卵胞発育を目指してきた現在の体外受精からのパラダイムシフトをもたらすものである。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted for the clinical application of oocyte retrieval from small follicles (ORSF). The results are as follows: (1) maturation of oocytes achieved by ORSF progresses via two different mechanisms: LH surge-dependent activation that occurs in a dominant follicle and decrease of maturation inhibitory signals due to granulosa cell dysfunction. (2) In PCOS, ORSF allows more mature oocytes to be achieved, and ORSF-derived good-quality blastocyst showed a higher pregnancy rate than the non-PCOS group. (3) ORSF may improve the pregnancy rate of patients with repeated IVF-ET failures. This study represents a paradigm shift from the current IVF practice based on the established concept that oocytes mature only in the primary (large) follicle.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：小卵胞 体外受精・胚移植 難治性不妊症

## 1. 研究開始当初の背景

高度生殖補助技術 ART でも妊娠に至らない難治性不妊症の治療は困難である。難治性不妊症の原因には、卵胞数が多い多嚢胞性卵巣(PCOS)やその逆に卵胞数の減少した病態がある。PCOS では卵巣に多数の小卵胞が存在するが、FSH などの投与によっても卵胞は増大せず、ART 治療が困難である。後者では、FSH の投与によっても卵胞が育たず卵子が採取できない。

われわれは、これまでに、自然周期における体外受精の観察から、主席卵胞だけでなく、小型の非主席卵胞内(小卵胞)でも卵子が成熟し得ること、小卵胞から採取した卵子(以下小卵胞卵子)による体外受精胚移植(IVF-ET)により正常な児が得られることを報告した(Fertil. Steril. 2016)。この発見は、卵胞径の増大がなくても卵子は成熟できることを意味する。現状の ART では、PCOS や卵巣予備能の低下した状態で卵胞が増大しない(育たない)ために採卵の実施がキャンセルされている。しかし、小卵胞採卵の概念によれば、「育たない」卵胞からの採卵も実施できることになる。そこで、われわれはこの「小卵胞卵子」が難治性不妊症治療のブレイクスルーになるのではないかと考えた。

これまでの ART では、「大型卵胞でのみ良質の卵子が成熟する」というドグマのもとで卵胞増大を卵子成熟の指標として、ゴナドトロピン投与が行われてきた。これにより、PCOS ではしばしばゴナドトロピンの過量投与となり卵巣過剰刺激症候群などの深刻な副作用を惹起してきた。われわれの「小卵胞内成熟卵子」の発見は、PCOS でも小型卵胞のなかで卵子を成熟させることが出来ることを示唆している(図1)。すなわち、「大型卵胞でのみ卵子が成熟する」というセントラルドグマのもと卵胞増大を目標に FSH を(過量)投与してきた治療から、小型卵胞のまま卵子を成熟させ採卵する治療へと、ART にパラダイムシフトをもたらす可能性がある。

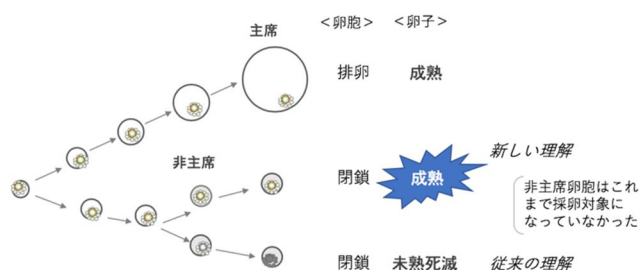


図1. 非主席卵胞： 卵胞径は増大しないが、卵子は成熟する

副副作用を惹起してきた。われわれの「小卵胞内成熟卵子」の発見は、PCOS でも小型卵胞のなかで卵子を成熟させることが出来ることを示唆している(図1)。すなわち、「大型卵胞でのみ卵子が成熟する」というセントラルドグマのもと卵胞増大を目標に FSH を(過量)投与してきた治療から、小型卵胞のまま卵子を成熟させ採卵する治療へと、ART にパラダイムシフトをもたらす可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、「小卵胞内成熟卵子」を PCOS などの難治性不妊症治療に応用し、治療成績の向上を目指す。そこで、(1)小卵胞内での卵子成熟機序を明らかにする、(2)PCOS においても小卵胞内から成熟卵子が回収できることを示す、(3)小卵胞卵子を用いた体外受精により難治性不妊症の治療成績が向上することを実証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト体外受精時に、大型主席卵胞(≥10mm)に加え、小型卵胞(<9mm)からも卵子を回収し、成熟度の確認と卵丘細胞の形態観察を行った。その後、成熟卵子(MII 卵子)を定法にしたがって顕微授精に供した。良好胚盤胞に達した胚を、ホルモン補充または自

然排卵周期で子宮内に単一胚移植した。採卵時に回収した卵胞液、患者血清を用いてホルモン濃度を EIA 法により、プロスタグランジン を ELISA 法で測定した。卵丘細胞を回収し、RT-PCR 法により LHRH 受容体 mRNA 発現量を測定、TUNEL 法によりアポトーシスを半定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 小卵胞における卵子成熟機序

小卵胞における卵丘細胞形態と卵子成熟度および胚発生能との関連を検討した。その結果、成熟卵子には、(a) 成熟型卵丘細胞を有する小型卵胞と、(b) 未熟型卵丘細胞を有する小型卵胞の 2 つの異なる卵胞が存在することが示された(図 2)。

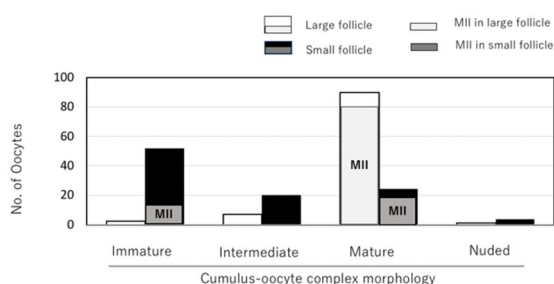


Fig. 2 Relationship between morphology of cumulus-oocytes complex and maturity of oocyte in small and large follicles

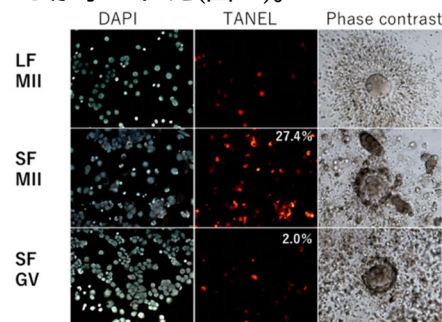


Fig. 3 TUNEL stain of cumulus cells.

このうち(a) は顆粒膜細胞が LhCGR 陽性で膨化を示し、放射冠細胞に遊離が見られたのに対し、b) は顆粒膜細胞が LhCGR 陰性で膨化を示さないが高頻度 にアポトーシスを示した(図 3)。したがって、(a) は、主席卵胞と同様に LH-LhCGR シグナルを介して還元分裂の再開が生じたもの(type A)、(b) は顆粒膜細胞の機能不全により還元分裂再開抑制シグナルに低下を来して還元分裂が再開したもの (type B) と推定された(図 4)。この機能不全の原因としては、卵胞内での卵丘細胞と壁顆粒膜細胞の解離が考えられた。

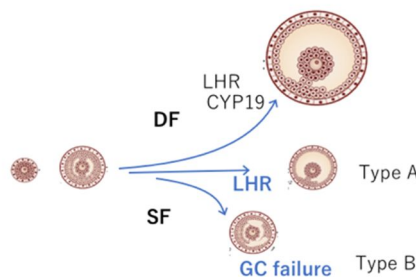


Fig.4 Two types of oocyte maturation mechanism in small follicle

この機能不全の原因としては、卵胞内での卵丘細胞と壁顆粒膜細胞の解離が考えられた。

##### (2) PCOS における小卵胞卵子を用いた IVF-ET

不妊症患者 (n=2402) の体外受精胚移植成績を PCOS の有無で 2 群に分けて小卵胞卵子が成績向上に寄与しているか検討した。PCOS 群では対象群の約 3 倍の数の卵子が小卵胞から回収された(表 1)。さらに、これらの卵子から得られた良好胚盤胞の移植により、対象群より妊娠率がおよそ 2 倍に高まった (p<0.05)。周期当たりの妊娠率は、PCOS 群の小卵胞で対象群のおよそ 3 倍の高率となっていた (p<0.001)(表 2)。傾向スコアマッチングにより年齢を調整した場合でも PCOS における小卵胞の妊娠率は有意に高いことが示された。

	PCOS	non-PCOS
No Pt.	325	2077
Age	35.3±3.7	38.5±3.9
OR Cycle	673	6554
No. oocyte retrieved from		
Small	12791	40848
Large	1185	9850
oocyte per OR cycle		
Small	19.01	6.23

Follicle size	PCOS		non-PCOS	
	Large	Small	Large	Small
Preg+	125	124	671	232
Preg-	84	74	554	212
Preg/ET	58%	63%	53%	48%
Preg/cycle	14%	18%	8%	6%
Preg/Pt	30%	38%	26%	19%

### (3) 難治性不妊における小卵胞採卵の応用

難治性不妊症患者( 反復 IVF-ET 不成功症例, n=52 )を対象にその有効性を検討した。Day 10-12 に FSH 製剤を 37.5-75IU を 1 ないし 2 日筋注投与し、小卵胞採卵を併用して IVF-ET を実施した。この投与量では、主席卵胞数と小卵胞数との回収数総数には変化が見られなかった。しかしながら、FSH 併用投与周期では良好胚盤胞発生率が 5.1 倍 ( 図 5 ) に上昇した。その結果、小卵胞由来胚 10 個の移植により 4 名の生児が、大卵胞由来胚 15 個の移植により 6 名の生児が得られ、小卵胞・大卵胞ともに 40% の生児獲得率となった。対象とした難治性不妊症患者はそれ以前の 5 周期の IVF-ET で生児が得られなかった患者であることから、少量 FSH 併用による小卵胞卵子による治療は妊娠成績を向上させる可能性が確認された。

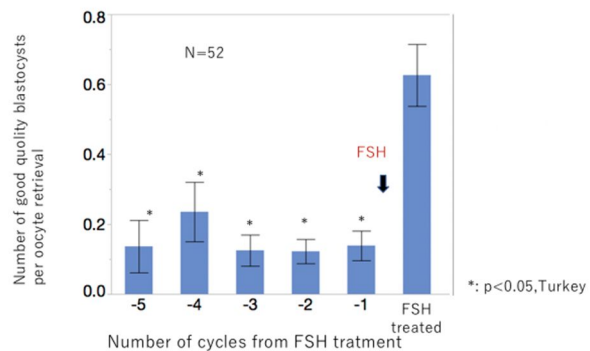


Fig.5 Delayed FSH increased blastocysts in both the treatment the following cycles

#### まとめ

(1) 小卵胞内卵子の成熟機構には、主席卵胞同様に LhCGR の発現を伴い大卵胞とほぼ同様に LH サージ依存性に成熟が進行するものと、LhCGR の発現を伴わず顆粒膜細胞のアポトーシスを伴う機序とが存在する。

(2) PCOS において、小卵胞穿刺により成熟卵子を回収することができ、妊娠率は非 PCOS 群の小卵胞由来卵子より高い可能性がある。

(3) 難治性不妊症に対しても小卵胞からの回収を目指す卵胞管理により妊娠率が向上する可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Osada H, Teramoto S, Kaijima H, Segawa T, Miyauchi O, Nagaishi M, Shozu M, Kato K, Gomei V.	4. 巻 26
2. 論文標題 A Novel Treatment for Cervical and Cesarean Section Scar Pregnancies by Transvaginal Injection of Absolute Ethanol to Trophoblasts: Efficacy in 19 Cases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Minim Invasive Gynecol.	6. 最初と最後の頁 129-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmig.2018.04.021	査読の有無 有
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 Usui H, Sato A, Shozu M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Parental contribution to trisomy in heterozygous androgenetic complete moles.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74375-4	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 Kobayashi T, Ishikawa H, Ishii K, Sato A, Nakamura N, Saito Y, Hasegawa H, Fujita M, Mitsuhashi A, Shozu M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Time-lapse monitoring of fertilized human oocytes focused on the incidence of OPN embryos in conventional in vitro fertilization cycles.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98312-1	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 Usui H, Shozu M.	4. 巻 384
2. 論文標題 Spermatogonium-Derived Complete Hydatidiform Mole.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 N Engl J Med.	6. 最初と最後の頁 936-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1056/NEJMoa2005756	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 生水真紀夫, 寺元章吉	4. 巻 25
2. 論文標題 ヒトの卵胞発育と排卵 IVF-ETの臨床から.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本生殖内分泌学会雑誌	6. 最初と最後の頁 9-16
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 生水真紀夫, 石川博士.	4. 巻 88
2. 論文標題 【少子化時代における就労女性の不妊治療】排卵誘発薬の特徴と投与法の工夫.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 産科と婦人科	6. 最初と最後の頁 1427-32
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 Osada H, Teramoto S, Kaijima H, Segawa T, Nagaishi M, Shozu M, Kato K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Managing Ectopic Pregnancies by Targeting Chorionic Villi with a Transvaginal Injection of Ethanol into the Lacunar Space.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 E202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8070202	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 Teramoto Shokichi, Osada Hisao, Sato Yasunori, Shozu Makio	4. 巻 111
2. 論文標題 Pregnancy and neonatal outcomes of small follicle-derived blastocyst transfer in modified natural cycle in vitro fertilization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fertility and Sterility	6. 最初と最後の頁 747 ~ 752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fertnstert.2018.11.038	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 Teramoto S, Osada H, Shozu M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Prematurely ruptured dominant follicles often retain competent oocytes in infertile women	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51551-9	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 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 生水真紀夫
2. 発表標題 ヒトの卵胞発育と排卵 -IVF-ETの臨床から理解する-
3. 学会等名 第24回日本生殖内分泌学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井久美子、大久保毅、上野剛、小林達也、青野文仁、寺本章吉、生水真紀夫
2. 発表標題 排卵前ジクロフェナク投与は主席卵胞液のエストラジオールを低下させる
3. 学会等名 第24回日本生殖内分泌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林達也、石川博士、石井久美子、佐藤明日香、中村名律子、齊藤佳子、藤田真紀、生水真紀夫
2. 発表標題 タイムラプスモニタリングによる前核確認ではOPN由来胚の発生頻度が減少する
3. 学会等名 第65回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 曾根原弘樹、小林達也、中山順樹、石川聖華、石川博士、碓井宏和、生水真紀夫
2. 発表標題 胚培養液中Cell Free DNAを用いたPGT-Aの可能性
3. 学会等名 第65回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	小林 達也 (Kobayashi Tatsuya)  (00645640)	千葉大学・医学部附属病院・技術職員  (12501)	
研究分担者	石川 博士 (Ishikawa Hiroshi)  (70553973)	千葉大学・大学院医学研究院・講師  (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------