

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09785

研究課題名（和文）CNPを用いた卵胞発育能のアンチエイジング

研究課題名（英文）Antiaging for ovarian follicle development using CNP

研究代表者

河村 七美（Kawamura, Nanami）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・非常勤講師

研究者番号：70323152

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）：本研究は、CNPによる効率的な卵胞発育誘導法を開発し、高齢不妊女性の新規不妊治療法の創出を目指すことを目的とした。本研究において、マウスにおける卵胞発育誘導のためのCNPの至適投与量ならびにプロトコルを確定し、CNPによるマウスの卵胞発育誘導にSrc-STAT経路が関与していること明らかにした。また、CNPは高齢マウス卵胞でおこりやすい早期黄体化を防止する作用があることも明らかにした。さらに、高齢マウスへのCNP投与による卵胞発育誘導の妊娠に対する安全性を確認し、CNPは卵胞発育能のアンチエイジングに有用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで困難であった高齢女性の卵胞発育誘導に対する新しい治療法の基盤となるばかりでなく、CNPシグナルが卵胞発育に重要な働きをすることを初めて明らかにした。本邦のみならず、世界中の多くの国々で高齢不妊女性が不妊患者に占める割合が高くなっており、卵巣機能に対するアンチエイジングは生殖医療における最も重要な課題の一つである。本研究は、その解決の糸口となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop an efficient method of inducing follicular growth using CNP and create a new infertility treatment for elderly infertile women. In this study, we determined the optimal dosage and protocol of CNP for the induction of follicle development in mice and clarified that the Src-STAT pathway is involved in the induction of mouse follicle development by CNP. We also clarified that CNP has the effect of preventing premature luteinization, which tends to occur in aged mouse follicles. Furthermore, we confirmed the safety of follicle growth induction by CNP administration to aging mice, and showed that CNP is useful for anti-aging of follicle development ability.

研究分野：生殖医学

キーワード：CNP 高齢不妊 卵胞発育

1. 研究開始当初の背景

本邦の不妊原因の多くは高齢不妊であり、少子高齢化社会において「産みたいのに産めない」患者の急増は大きな社会問題となっている。卵子提供により妊娠する患者もいるが、倫理的問題や免疫不適合による妊娠合併症の増加、高額な治療費が必要となることから優れた治療法とは言い難い。

高齢不妊の原因である卵巣機能不全は残存卵胞数の減少と卵胞発育能の低下からなる。高齢女性では、卵子の染色体異常の確率が高く、妊娠のためにはより多くの卵子を要する。複数の卵子を得るためには FSH 製剤による卵巣刺激が必要となるが、高齢女性では FSH 刺激に反応する残存卵胞数が少ない。さらに高齢女性では卵胞の FSH 受容体の発現低下により、FSH 製剤による卵胞の発育促進効果が低く、卵巣刺激後の獲得卵子数が減少する。

我々は残存卵胞数の減少の問題を解決するため、卵胞活性化療法(IVA: *in vitro activation*)を開発してきた(Kawamura et al. PNAS 2013)。IVA は休眠状態の未熟卵胞を活性化して卵胞発育を開始させる方法で、若い卵巣機能不全患者には有効である。しかし高齢の場合、IVA により発育卵胞数が増加しても、FSH による卵胞発育促進効果は不十分であるため、獲得卵子数の増加は限定的となる。従って、高齢女性に有効な不妊治療法の確立のためには、FSH 製剤による卵巣刺激への低反応性の問題を回避可能な卵胞発育誘導法の開発が必要であり、その方法の確立は高齢女性の自らの卵子での妊娠に大きく貢献すると期待される。

2. 研究の目的

CNP はナトリウム利尿ペプチドファミリーの一つで、特異的受容体である NPRB (B-type natriuretic receptor) に結合する。CNP はナトリウム利尿作用がなく、我々は独自に CNP が卵子成熟を調節する作用(Kawamura et al. Hum Reprod 2011)、マウス 2 次卵胞の発育促進作用(Sato, Kawamura et al. Mol Endocrinol 2012) を有し、生殖生理学的に重要な因子であることを報告してきた。しかし、これまで CNP と高齢による卵胞発育障害に関する研究は皆無である。

高齢女性の卵胞発育能の低下に対し高用量の FSH 製剤を用いた卵巣刺激が行われてきたが、その有効性は低い。現在はむしろ高齢女性に対して卵巣低刺激や自然周期など、高価な FSH 製剤を用いない安価な方法で卵胞発育誘導が行われている。また卵巣機能不全に至ると、卵巣の線維化と萎縮が進み、卵胞の血流が低下する。これまで様々なサプリメントや薬物を用いた血流改善による卵胞発育能の回復が試みられてきたが、その効果については議論が分かれている。そこで本研究では、FSH シグナルの下流で卵胞発育を促進する CNP に着目し、FSH 低反応性の高齢女性の卵胞発育誘導法を開発し、CNP を用いた新規高齢不妊治療法の確立を目指す。CNP は内因性のペプチドホルモンであり、他のナトリウム利尿ペプチドファミリーである ANP、BNP は既に心不全の治療薬として広く臨床応用されていることから、比較的安全性は高いと考えられ、速やかな臨床応用が期待出来る。

3. 研究の方法

1) CNP による高齢マウスの卵胞発育誘導法の至適化

我々は幼若マウスを用いた先行研究において、卵胞の顆粒膜細胞で産生された CNP が NPRB を発現している顆粒膜細胞にオートクライン経路で作用し、2 次卵胞の発育を促進すること、顆粒膜細胞における CNP の産生は FSH 刺激によって亢進することを明らかにした。また、*in vivo* 試験では、CNP は FSH の非投与下に hCG (human chorionic gonadotropin) による排卵刺激後の排卵数を増加させた。

そこで本試験では、予備試験において FSH 受容体の発現の低下と NPRB の発現が保たれることを確認した 48-50 週齢の高齢マウスに CNP または FSH を腹腔内投与し、2 日後に hCG を投与して排卵させ、卵管内の排卵卵子数を計測して比較した。また同時に卵巣を採取し、組織学的に排卵卵胞数および各発育段階の卵胞の割合を調べ、CNP の至適投与量至適投与量を決定した。

高齢マウスでは、FSH に対する反応性が低下し、CNP のみでは期待する卵胞発育誘導効果が得られない可能性があるが、我々は予備試験において、CNP が高齢マウスの顆粒膜細胞の FSH 受容体の発現を増加させることを見出した。そこで高齢マウスに CNP を前投与して FSH 受容体の発現を高めた後、FSH を投与して卵胞発育を誘導する試験も行った。

2) CNP による高齢マウスの卵胞発育誘導効果の分子基盤の解明

CNP は卵巣以外の組織でも産生されるが、CNP の血中濃度は 1pM 程度であり、CNP は nM レベルで卵胞発育作用を示すことから、卵巣局所因子として機能すると考えられる。我々は先行研究において、FSH により発現誘導された CNP が cGMP の産生を介して卵胞発育を促進することを明らかにしている。本研究では、CNP の卵胞発育誘導効果の分子基盤をさらに解明する

ため、顆粒膜細胞の増殖と転写活性を高めることが知られているシグナル経路の関与について調べた。また上述の如く、CNP は高齢マウスで低下した顆粒膜細胞の FSH 受容体の発現を回復する一方、高齢マウスでは LH(luteinizing hormone)受容体の発現が上昇しており、早期黄体化による卵胞発育停止をきたしやすい。そこで、高齢マウスにおける CNP の LH 受容体の発現調節作用を確認し、CNP の卵胞発育に対する追加効果を調べた。

3) 高齢マウスへの CNP 投与による卵胞発育誘導の妊娠に対する安全性の確認

先行研究では、CNP を投与した幼若マウスから得られた卵子を体外受精胚移植し、生仔を得ているが、CNP 投与による高齢女性の卵胞発育誘導の臨床応用を目標に、その安全性について検証した。CNP の高齢マウス個体への影響を調べる為に、高齢マウスの卵胞発育誘導のために至適化したプロトコールに従って CNP を投与し、体重異常、外表・形態異常、行動異常の有無を確認した。また、CNP の主要臓器への影響を調べるため、摘出臓器を固定して組織標本とし、組織変化を検証した。CNP 投与群、非投与群のマウス由来の卵子を用いて体外受精・胚培養を行い、受精率、胚盤胞到達率を調べる。その後、胚盤胞を偽妊娠マウスの子宮に移植し、体外受精 19 日目に帝王切開して着床率、流産率、産仔獲得率を比較した。

4) CNP による卵胞発育誘導法のヒトへの有効性の検証

CNP 投与による卵胞発育誘導のヒトへの有効性に関する非臨床 POC の取得のため、岩瀬らが樹立したヒト非黄体化顆粒膜細胞株(HGrC cell, Iwase et al. *Endocrinology* 2012)を用いた *in vitro* 試験を行った。我々は予備試験により、HGrC cell が CNP および NPRB を発現していることを確認していた。そこで、HGrC cell の培養系において、CNP 添加による細胞増殖、エストロゲン産生能、cGMP 産生能について調べ、CNP のヒトへの有効性を検証した。

4. 研究成果

1) CNP による高齢マウスの卵胞発育誘導法の至適化

48-50 週齢の高齢マウスに CNP または FSH を腹腔内投与し、2 日後に hCG を投与して排卵させ、卵管内の排卵卵子数を計測して比較し、同時に卵巣を採取し、組織学的に排卵卵胞数および各発育段階の卵胞の割合を調べたところ、CNP の至適投与量(X ug/kg)を見出すことができた。また高齢マウスでは、FSH に対する反応性が低下し、CNP のみでは卵胞発育誘導効果が弱く、予備試験で得られた、CNP が高齢マウスの顆粒膜細胞の FSH 受容体の発現を増加させる知見を応用し、CNP を前投与して FSH 受容体の発現を高めた後 FSH を投与したところ、排卵卵子数の増加を認めた。

2) CNP による高齢マウスの卵胞発育誘導効果の分子基盤の解明

CNP による高齢マウスの卵胞発育誘導効果の分子基盤の解明を行い、顆粒膜細胞の増殖と転写活性を高めることが知られている Src-STAT 経路が関与していることを示した。さらに、CNP は高齢マウスの顆粒膜細胞の LH 受容体の制御を行うことで、高齢マウス卵胞でおこりやすい早期黄体化を防止する作用があることを明らかにした。

3) 高齢マウスへの CNP 投与による卵胞発育誘導の妊娠に対する安全性の確認

高齢マウスの卵胞発育誘導のために至適化したプロトコールに従って CNP を投与し、体重異常、外表・形態異常、行動異常の有無を確認したが、特に異常を認めず、また、主要臓器を摘出して組織標本とし、組織変化を調べたが、特に変化は認めなかった。さらに、CNP 投与群、非投与群のマウス由来の卵子を用いて体外受精・胚培養を行い、受精率、胚盤胞到達率を調べたが、CNP 非投与群との間に有意な差はなかった。その後、胚盤胞を偽妊娠マウスの子宮に移植し、体外受精 19 日目に帝王切開して着床率、流産率、産仔獲得率を比較したが、こちらも有意な差を認めなかった。

4) CNP による卵胞発育誘導法のヒトへの有効性の検証

ヒト非黄体化顆粒膜細胞株 HGrC cell の培養系において、CNP は細胞増殖、エストロゲン産生、cGMP 産生を亢進した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 河村和弘、河村七美	4. 巻 26
2. 論文標題 卵胞の活性化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hormone Frontier in Gynecology	6. 最初と最後の頁 41-45
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計2件

1. 著者名 河村和弘、河村七美	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 エキスパートによる生殖領域の外科的手法 生殖内視鏡と不妊治療のコツ Chapter D Topics: 今後の普及や臨床応用に向けて b 休眠卵胞活性化	

1. 著者名 河村七美、河村和弘	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 VI女性性機能 性腺機能低下症 卵巣機能低下症 河村和弘 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）	

〔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	佐藤 可野 (Sato Yorino) (00511073)	国際医療福祉大学・医学部・助教 (32206)	

6. 研究組織（つづき）

	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 (Kawamura Kazuhiro) (10344756)	国際医療福祉大学・医学部・教授 (32206)	

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