

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03819

研究課題名（和文）新規自己抗体標的抗原に着目した自己免疫関連生殖機能障害の病態解明と早期診断法確立

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenesis and establishment of early diagnosis of autoimmune-related reproductive dysfunction by focusing on novel autoantibody-target antigens

研究代表者

岩瀬 明（Akira, Iwase）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20362246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：我々は甲状腺自己抗体陽性卵巣機能不全患者血清中に卵巣顆粒膜細胞に反応する自己抗体を見出し、その標的タンパクPOTEFを同定した。

POTEFがヒト卵巣顆粒膜細胞および卵母細胞で発現し、卵胞発育により発現が変化し細胞増殖を抑制することを実験的に証明した。精製POTEFタンパクを使用したヒト血清中の抗POTEF抗体アッセイ系の基盤を確立し、卵巣機能不全患者血清中の抗POTEF抗体価が正常卵巣機能女性より有意に高いという結果を得た。

POTEFのプロモーター領域に卵巣分化に重要な転写因子FOXL2の結合部位があることを見出し、排卵障害を主症状とするPCOS女性でFOXL2高値の傾向をみとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在日本では少子化が問題となっているが、これには晩産化をともなっている。一方で40歳未満で卵巣機能が停止する早発閉経の頻度は増加し、約100人に1人を超えられている。近年、卵巣機能維持の指標である卵巣予備能検査が注目され普及しつつある。しかしながら、早発閉経の病態に即した卵巣機能の予測方法は存在せず、拳児希望時点で治療困難な卵巣機能不全を呈する女性が一定数存在する。本研究成果は、卵巣機能不全に対するリスク因子の検査手法の開発であり、卵巣予備能検査と組み合わせることで女性のライフプランニングに役立つ可能性があるだけでなく、卵巣機能不全に対する新規治療標的を提案するものである。

研究成果の概要（英文）：We found autoantibodies that react with ovarian granulosa cells in the serum of thyroid autoantibody-positive ovarian insufficiency patients and identified their target protein, POTEF.

We demonstrated that POTEF is expressed in human ovarian granulosa cells and oocytes, and that its expression is altered by follicle development and suppresses cell proliferation. We established the basis for an anti-POTEF antibody assay system in human serum using purified POTEF protein and found that anti-POTEF antibody titers in sera from patients with ovarian insufficiency were significantly higher than those from women with normal ovarian function.

We found a binding site for FOXL2, a transcription factor important for ovarian differentiation, in the promoter region of POTEF, and found a trend toward higher FOXL2 levels in women with PCOS, whose main symptom is ovulatory failure.

研究分野：生殖医学

キーワード：卵巣機能不全 自己免疫 自己抗体 POTE FOXL2 PCOS

1. 研究開始当初の背景

不妊治療、とりわけ生殖補助医療の進歩により多くの不妊症が治療可能となった。特に排卵障害に対する排卵誘発法、精子および受精の問題に対する体外受精・顕微授精が大きく貢献した。しかしながら、今なお治療困難な不妊症が少なからず存在している。卵巢機能不全は、40歳以下の約1%、30歳以下の約0.1%に発症すると見込まれているが、発症後の治療は困難である。生殖補助医療において卵巢の反応性が不良な集団は poor responder と呼ばれ、成績不良である。また生殖補助医療による介入は、配偶子の取得から受精、胚盤胞までの培養と胚の選別にしか及ばず、胚移植後の問題（着床不全、反復流産等）に対する有効な手段とならない。これらの問題を克服するためには、より包括的に病因・病態へ新しい視点から切り込み、根本的な解決法すなわち早期診断法や治療法を見出していく必要がある。これは不妊症カップルの頻度が約5.5組に1組と言われており、生殖補助医療治療総周期数が年間約45万周期に及ぶものの生産周期が約5.5万周期にとどまる我が国の生殖医療・医学において喫緊の課題と言える。

2. 研究の目的

甲状腺自己抗体を有する卵巢機能不全患者複数名の血清中に、ヒト卵巢顆粒膜細胞に対する抗体が存在することを見出した。LC-MS/MSにより本抗体の抗原として Prostate, ovary, testis, ankyrin domain family member F (POTEF) タンパクを同定した。正常組織においてはその名の通り、前立腺、卵巢、精巣に加え胎盤に強発現することが報告されているが、その機能はほぼ不明である。その特異的発現パターンから POTEF は男女とも生殖機能に重要な役割を果たしていることが推測される。本研究では、卵巢機能における POTEF の機能を解析するとともに、抗 POTEF 抗体による女性の生殖機能障害の病態を解明すること、抗 POTEF 抗体のアッセイ系を確立し卵巢機能不全のリスク予測因子と成り得るかどうかについて検討することを目的とする。

また上記と関連し、卵巢機能不全女性に残存する数少ない原始卵胞を活用するための介入方法の開発も本研究の目的に含む。

3. 研究の方法

ヒト卵巢組織検体を用い POTEF 発現を免疫組織染色にて評価した。また我々が樹立した不死化ヒト顆粒膜細胞株 HGrC において siRNA による POTEF のノックダウンと POTEF-FLAG 融合タンパク過剰発現株 (Cumate 発現誘導性) を作製した。これら細胞を用い増殖能、アポトーシスを測定した。また POTEF と結合する分子を探索するため、POTE-FLAGF 融合タンパクと結合するタンパクを免疫沈降で取得・精製し、LC/MS/MS で同定した。同定された TCP-1 についても同様の細胞を用いノックダウンの系を作製し機能解析をおこなうとともに、免疫蛍光法にて POTEF との共有解析をおこなった。また POTEF の作用機序解析のためオートファジー関連タンパクの発現についても評価を行った。

さらに POTEF 発現を調節する因子として、データベース解析により見出した FOXL2 と POTEF 発現の関係について免疫蛍光法 (HGrC)、卵巢組織を用いた免疫組織染色、臨床検体 (体外受精採卵時に得られたヒト顆粒膜細胞) を用い検討した。

POTEF 全長を発現する融合タンパクを作製し、精製抗原をマイクロプレートに固相化し、血清中の抗 POTEF 抗体を一次抗体として定量する ELISA 測定系を開発した。卵巢機能不全女性と正常卵巢機能女性の血清抗 POTEF 抗体価を比較検討した。

原始卵胞のリクルートメントを高める実験としてマウスにタモキシフェンを投与する系を用い、マウス性周期と卵巢内卵胞の発育を組織学的に検討した。

4. 研究成果

まずヒト卵巢組織の免疫組織染色において POTEF が卵母細胞の細胞質と原始卵胞および一次卵胞の顆粒膜細胞に主に存在すること、顆粒膜細胞での発現は二次卵胞以降の発育段階ではいったん減弱するものの、排卵直前の成熟卵胞顆粒膜細胞では発現が再度増強することを見出した。この2相性の発現変化は、POTEF 発現がゴナドトロピン依存性卵胞発育と関連し、卵胞発育を制御している可能性を示唆するものであった。

Cumate 誘導性 POTEF 発現ヒト顆粒膜細胞株では、POTEF 発現により増殖が抑制されることを見出した。この機序を探索するため POTEF と結合するタンパクとして TCP-1 を同定した。免疫蛍光法では、POTEF と TCP-1 は共有を示した。POTEF と TCP-1 の結合の詳細を解析するため、POTEF からアクチンドメインを欠失した変異体を作製し、免疫沈降をおこなったところ、TCP-1 との結合は失われた。以上より、TCP-1 は POTEF のアクチンドメインを結合し、細胞内で共有していることが示された。さらに TCP-1 発現をノックダウンしたところ、細胞増殖が抑制されることを見出した。この結果より、POTEF による顆粒膜細胞増殖抑制効果発現に TCP-1 が関与することが示唆された。

続いて POTEF- TCP-1 系による作用の詳細を解析するためオートファジーに着目した。Cumate

誘導 POTEF 発現と TCP-1 のノックダウンの双方で、オートファジー関連タンパクである LC3, Atg5, Atg7, Atg16L の発現低下をみとめた。以上より、POTEF- TCP-1 システムがオートファジーを制御することにより、原始卵胞から一次卵胞へのリクルートメントを調節している機序の存在が示唆された。(Kasahara Y, Osuka S, Takasaki N, Bayasula, Koya Y, Nakanishi N, Murase T, Nakamura T, Goto M, Iwase A, Kajiyama H. Cell Death Discov. 2021 Jul 20;7(1):186.)

これまでの諸家の報告から原始卵胞のリクルートメントの異常は、早期卵胞枯渇すなわち卵巣機能不全のリスクとなり得ることが実験的に示されている。血清中の抗 POTEF 結合抗体の意義、作用、産生因子の詳細については不明ではあるものの、血清中の抗 POTEF 抗体が卵巣機能不全の評価指標となる可能性がある。血清 FSH、エストラジオール値を指標に、卵巣機能不全女性と正常卵巣機能女性を区別し、それぞれ血清中の抗 POTEF 抗体を POTEF 抗原固相化 ELISA にて比色定量した。抗 POTEF 抗体価は卵巣機能不全女性において有意に高い結果であった(図1)。

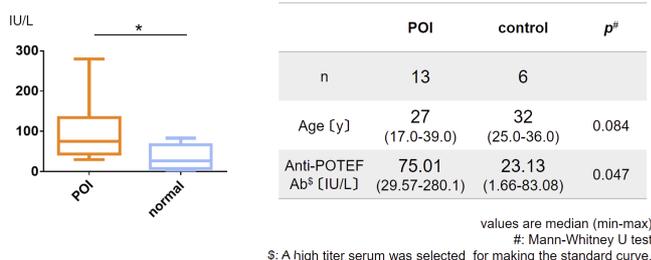
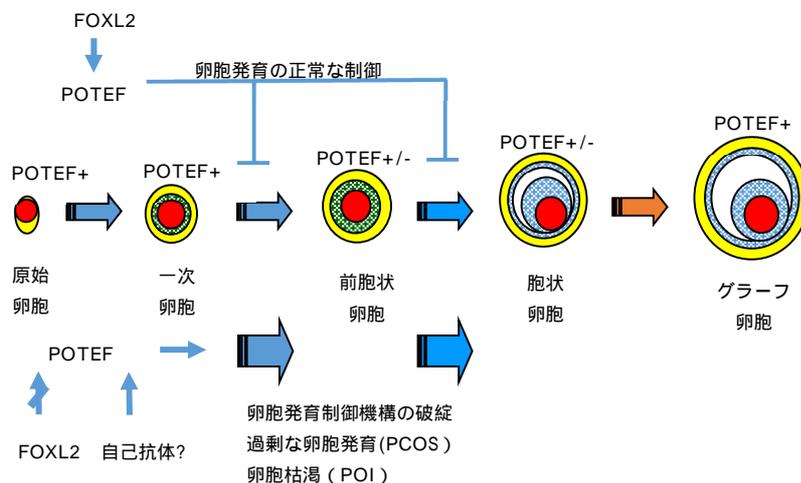


図1(未発表データ)

一方、POTEF そのものの発現調節については不明なままであった。我々は、POTEF 遺伝子プロモーター領域に FOXL2 結合部位があることを見出した。HGrC において FOXL2 と POTEF の発現をみとめた。FLAG-FOXL2 を HGrC に発現させたところ、POTEF 発現が増加することを見出した。ヒト顆粒膜細胞を用いた解析では、定量的 RT-PCR により FOXL2 と POTEF の発現が相関することを見出した。さらに卵巣組織を用いた検討では、正常卵巣において FOXL2 の核内移行像と POTEF 発現をみとめたのに対し、多嚢胞性卵巣症候群卵巣組織においては FOXL2 核内移行の阻害と POTEF 発現の低下をみとめた。(論文未発表データ)

卵巣機能不全女性においては、病態解明、早期診断が重要であるが、実際には卵巣機能不全状態に陥ってから診断されることが少なくない。卵巣機能不全と診断された状態であっても、卵巣内に少数の原始卵胞が残存している症例は少なくないため、この原始卵胞から成熟卵を誘導する手法の開発は治療手段になりうる。従来、実臨床において卵巣機能不全女性にエストロゲンを補充しつつ、卵胞発育を待つという治療が行われている。これはエストロゲン投与により過剰となった FSH を抑制し、ゴナドトロピンへの反応性を回復させることがその機序であるが、実験的にはエストロゲンそのものは卵巣局所での原始卵胞リクルートメントを抑制することが示されており、実際に本治療の臨床的な効果が制限される一因と推測されている。そこで我々はエストロゲンアンタゴニストの作用に着目した。タモキシフェンをマウスに投与し卵巣を評価すると、原始卵胞の FOXO3a の核内移行が亢進していることを見出した。本結果は、従来行われているエストロゲン補充にエストロゲンアンタゴニストを併用する方法が、原始卵胞活性化治療のバリエーションとなる可能性を示唆している。(Wei W, Komatsu K, Osuka S, Murase T, Bayasula B, Nakanishi N, Nakamura T, Goto M, Iwase A, Masubuchi S, Kajiyama H. Reprod Sci. 2022 Dec;29(12):3404-3412.)

上記検討により、POTEF は卵胞発育において FOXL2 依存性に主に顆粒膜細胞の増殖を制御していることが示された。その作用の破綻は、卵巣機能不全のみならず排卵障害の代表的疾患である多嚢胞性卵巣症候群の病態にも関与することが示唆された。一方、POTEF を抗原とする自己抗体については、その血中濃度が卵巣機能不全診断・予測因子として有用である可能性が示されたが、自己抗体発現機序と自己抗体-POTEF 抗原が直接的にどのように卵巣機能不全発症と関係するかについては、今後の検討課題として残されている。現状で推測される FOXL2-POTEF 系の卵胞発育と卵巣機能不全および多嚢胞性卵巣症候群の病態との関係性を図2に示す。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wei Wei, Kouji Komatsu, Satoko Osuka, Tomohiko Murase, Bayasula Bayasula, Natsuki Nakanishi, Tomoko Nakamura, Maki Goto, Akira Iwase, Satoru Masubuchi, Hiroaki Kajiyama	4. 巻 29
2. 論文標題 Tamoxifen Activates Dormant Primordial Follicles in Mouse Ovaries	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Sciences	6. 最初と最後の頁 3404-3412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43032-022-00896-0	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 Kasahara Y, Osuka S, Takasaki N, Bayasula, Koya Y, Nakanishi N, Murase T, Nakamura T, Goto M, Iwase A, Kajiyama H	4. 巻 7
2. 論文標題 Primate-specific POTE-actin gene could play a role in human folliculogenesis by controlling the proliferation of granulosa cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discov	6. 最初と最後の頁 186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-021-00566-1.	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 Hasegawa Y, Kitahara Y, Osuka S, Tsukui Y, Kobayashi M, Iwase A.	4. 巻 21
2. 論文標題 Effect of hypothyroidism and thyroid autoimmunity on the ovarian reserve: A systematic review and meta-analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol	6. 最初と最後の頁 e12427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12427.	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長谷川祐子、北原慈和、津久井優美子、小林未央、岩瀬明
2. 発表標題 多嚢胞性卵巣症候群におけるFOXL2解析
3. 学会等名 日本生殖内分泌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川祐子、岩瀬 明
2. 発表標題 転写因子FOXL2による多嚢胞性卵巣症候群の病態検討
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hasegawa Y, Nakamura O, Inoue N, Iwase A
2. 発表標題 FOXL2 expression in the ovary of women with PCOS
3. 学会等名 IFFS World Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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	北原 慈和 (Kitahara Yoshikazu) (20714728)	群馬大学・医学部附属病院・講師 (12301)	
研究分担者	大須賀 智子 (Osuka Satoko) (30778296)	名古屋大学・医学部附属病院・准教授 (13901)	
研究分担者	小松 紘司 (Komatsu Kouji) (40456893)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	

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	小谷 友美 (Kotani Tomomi) (70359751)	名古屋大学・医学部附属病院・病院教授 (13901)	

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