

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18198

研究課題名（和文）高齢不妊患者に対する新規卵巣刺激法開発の試み

研究課題名（英文）Attempts to develop new ovarian stimulation methods for aging infertile patients.

研究代表者

岡本 直樹（Okamoto, Naoki）

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：80714360

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまでの研究から、FSHによる卵巣刺激に対して抵抗性を示す高齢マウスの卵巣刺激をCNPに置き換えて実施した結果、排卵数が増加するデータが確認できた。これにより、FSHでの卵巣刺激がうまくいかない高齢マウスに対して、CNPによる卵巣刺激が有効である可能性が確認できた。加えて、CNPがどのようなメカニズムで卵胞発育に関与するのか、その一端を明らかにした。本研究によって、CNPを用いた新たな卵巣刺激法の確立に有用なデータが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で卵巣におけるCNPの働きの一部を明らかにできたことは、学術的に意義のあることと考える。また、CNPを用いた新規卵巣刺激法の開発に向けて、有用なデータを得ることができた。この新規卵巣刺激法が確立できれば、FSHの刺激に対して抵抗性を示す不妊患者に対し有効な治療手段となることが期待でき、社会的意義のあるものとする。

研究成果の概要（英文）：Previous studies have confirmed the data that ovarian stimulation of aging mice resistant to ovarian stimulation with FSH was replaced by CNP, resulting in an increase in the number of ovulations. This confirms the possibility that CNP ovarian stimulation may be effective for aged mice in which ovarian stimulation with FSH is unsuccessful. In addition, we have clarified one aspect of the mechanism by which CNP are involved in follicle growth. This study has provided useful data for establishing a new ovarian stimulation method using CNP.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：新規卵巣刺激法 FSH抵抗性 不妊治療

1. 研究開始当初の背景

近年増加傾向にある高齢不妊患者は、高用量の FSH による卵巣刺激を行っても極少数の卵胞発育しか得られない。その原因として、(1)顆粒膜細胞の FSHR の発現が加齢により減少し、FSH 刺激に対して反応性が低下していること、(2)加齢による卵胞減少により卵巣内に FSH に反応する発育卵胞が非常に少なくなっていること、の2つが考えられる。これまで申請者が属する研究室では(2)の原因に対する新たな治療法として卵胞活性化療法を開発し、成果を出している (Kawamura et al. PNAS 2013, Hum Reprod 2015, RMB online 2019)。しかし(1)の問題に関しては、現在有効な方法はない。従って、今後さらに増加すると予測される高齢不妊患者の卵胞発育促進には、FSH 刺激に依存しない新たな卵巣刺激法の確立が求められている。

我々は FSH 刺激によりマウス顆粒膜細胞で産生される C-type natriuretic peptide (CNP) が CNP 受容体 (NPR2) に作用し、cGMP の産生を介して 2 次卵胞以降の卵胞発育を促進することを見出した。これらの知見から、FSH による卵巣刺激に抵抗性を示す高齢不妊患者でも、FSHR の下流で働く CNP を用いることで卵胞発育を誘導できると考えた。そこで本研究計画では、CNP を用いた新たな卵巣刺激法の確立を目標に、FSH 刺激に抵抗性を示す高齢マウスに対し、CNP による卵胞発育誘導とその分子基盤の解明、CNP 投与の安全性、得られた卵子の妊孕性および正常性の検証を行った。

2. 研究の目的

本研究では、FSH 刺激に抵抗性的高齢不妊患者に対する CNP を用いた新たな卵巣刺激法の確立を目標に、CNP による高齢マウスの卵胞発育誘導のプロトコールを至適化し、その分子基盤を明らかにしつつ、CNP 刺激によって発育した卵胞由来の卵子の妊孕性と正常性について確認する。

3. 研究の方法

1) CNP による卵巣刺激の有効性についての評価

CNP 投与により排卵させた各群のマウスの卵管膨大部より卵子卵丘細胞複合体(COCs)を回収し、実体顕微鏡下で排卵数を測定した。同時に両側の卵巣を採取し、一方の卵巣を用いて cGMP 濃度を ELISA 法にて測定し、CNP の作用による濃度増加を確認した。対側の卵巣はブアン液にて固定し、組織標本を作成して各ステージの卵胞数を測定することで CNP の卵胞発育誘導効果について評価した。

2) CNP による FSHR 発現制御と卵胞発育誘導のシグナル解析

高齢マウスを用いた予備試験では、CNP 投与後の性周期においてマウスの FSH に対する反応性の回復が認められ、CNP による FSHR の発現制御の可能性が示唆された。そこで、CNP 投与前および CNP 投与後の高齢マウス顆粒膜細胞を採取し、real-time RT-PCR による FSHR の発現定量を行い、FSH 反応性回復の分子基盤を探索した。加えて、CNP による卵胞発育誘導の分子基盤をさらに解

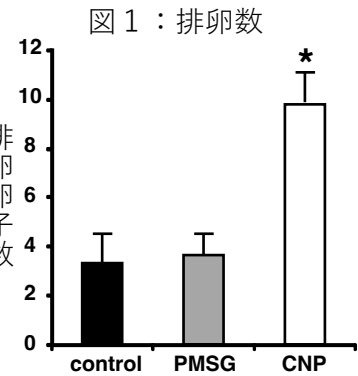
明するため、マウス卵胞の細胞増殖に重要な細胞内シグナルと転写因子の活性化について、Western blot および免疫染色にて解析した。

3) CNP 投与による母体及び次世代への影響、安全性の確認

CNP を用いた高齢不妊患者の卵巣刺激方法の確立に向け、投与される母体及び次世代への影響と安全性を明らかにするため、CNP の全身投与によるマウス個体への有害事象の発生の有無を調べ、本法で得られた卵子の妊孕性および胚着床時の子宮内膜環境への影響を調べた。

4. 研究成果

本研究の結果から、FSH による卵巣刺激に対して抵抗性を示す高齢マウスの卵巣刺激を CNP に置き換えて実施した結果、排卵数が増加するデータが確認できた (図 1)。これにより、FSH での卵巣刺激がうまくいかない高齢マウスに対して、CNP による卵巣刺激が有効である可能性が確認できた。また、CNP による卵巣刺激で、高齢マウスの妊孕性 (自然交配による妊娠率と産仔獲得数) が回復する結果が得られた (表 1)。加えて、CNP が卵胞を構成する顆粒膜細胞において、Src タンパクのリン酸化を促進し細胞増殖を促す可能性を確認した (図 2)。これは CNP が調節する卵胞発育のメカニズムの一端であると考えられる。本研究によって、CNP を用いた新たな卵巣刺激法の確立に有用なデータが得られた。この新規卵巣刺激法が確立できれば、FSH の刺激に対して抵抗性を示す不妊患者に対し有効な治療手段となることが期待できる。



これは CNP が調節する卵胞発育のメカニズムの一端であると考えられる。本研究によって、CNP を用いた新たな卵巣刺激法の確立に有用なデータが得られた。この新規卵巣刺激法が確立できれば、FSH の刺激に対して抵抗性を示す不妊患者に対し有効な治療手段となることが期待できる。

図 2 : CNP の顆粒膜細胞における Src タンパク発現調節

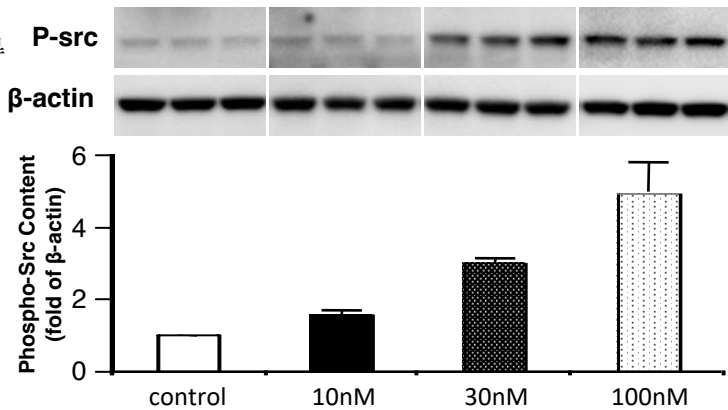


表 1 : 妊娠率と産仔獲得数

mice	No. of mice examined	No. of mice with vaginal plug (%)	No. of mice bearing pups (%)	No. of new born pups (Mean number \pm standard error)
Control	14	8 (57.1)	3 (37.5)	2.7 \pm 1.2
CNP	11	6 (54.5)	4 (66.7) *	11.25 \pm 1.7 *

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本直樹
2. 発表標題 サプリメントを用いた卵子の質向上への挑戦
3. 学会等名 日本生殖医学会（招待講演）
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------