

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592400

研究課題名(和文) アクチビン制御による早発卵巢不全および卵巢予備能低下者に対する治療法開発

研究課題名(英文) The development of fertility treatment for patients with premature ovarian failure or diminished ovarian reserve by regulating activin action.

研究代表者

木村 文則 (Kimura, Fuminori)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：90322148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：出生後5.5日に摘出した卵巢にプロゲステンを添加し48時間培養すると、卵巢内のActivin AおよびActivin B共に半分程度に抑制された。16週齢のメスICRマウスに5mgのディナゲスト(DNG)を4日毎の皮下注射を16回行った後、交配させると生涯総分娩仔数はDNG群の方が非投与群より多かった。最終分娩週齢もDNG投与マウスで高かった。卵巢内のアクチビンを抑制し、原子卵胞維持に働いた可能性がある。晩婚化が進む本邦において卵巢機能温存し、高齢でも妊孕性を維持する方法になりうると思われる。

研究成果の概要(英文)：Mouse neonatal ovaries of day 5.5 were cultured with or without progestin for 48 hours. We found the Activin beta A and beta B mRNA expression was decreased to half. Based on the fact we researched the effect of continuous progestin exposure to mouse ovarian function. Five mg of dienogest dissolved in corn oil or corn oil was given by intraperitoneal injection to sixteen week old mice every four days. After sixteen times injection the mice were housed with male mice. The total numbers of pups born from a mouse were compared. It was greater in dienogest group ($P < 0.03$). The last delivery age was also higher in dienogest group. We speculate that dienogest suppressed primordial follicle activation and maintained the primordial follicle pool through the suppression of activin action. This result would be applicable for the maintenance of ovarian reserve and fertility in the developed country including Japan, where women get married in older age. Now we investigate this progestin effect.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：早発卵巢不全 原始卵胞活性化 アクチビン

1. 研究開始当初の背景

早発卵巣不全 (premature ovarian failure : POF) は、40 歳未満に卵子枯渇および卵巣ホルモン分泌が停止した状態と考えられ、成人女性の 1% に存在する。また、その段階には至らなくとも排卵刺激において反応性の低下しているいわゆる卵巣予備能低下症例は、早発卵巣不全の前段階と考えられ、35 歳で 15%、39 歳で約 30% 存在していると報告されている (辰巳ら 日産婦誌 2006 年)。早発卵巣不全や卵巣予備能低下症例は、難治性の不妊症の原因となり特に晩婚化、少子化が進む本邦にとっては、その原因究明や治療方法の開発が必要と考えられる。

POF は、北欧で発見された FSH 受容体の遺伝子異常に代表される卵胞発育障害などまれな症例もあるが、そのほとんどが原始卵胞貯蔵量の早期減少によると考えられる。これは遺伝子異常、染色体異常、医原性、自己免疫異常、感染、毒性物質などへの暴露などが原因とされているが、一部の染色体異常の症例においては原因を特定できても治療自体が絶対的に困難な症例もある。その一方で第 1 子をもうけた後に POF にいたる症例の認められることから、原因は特定できなくとも早期診断や治療方法の確立により拳児可能な症例も多いと考えられる。POF と診断された症例においても原始卵胞が卵巣内に確認される症例は認められ、少なくとも卵巣予備能低下症例において原始卵胞は存在している。この減少した原始卵胞をいかに効率的に活性化し卵胞発育へと導くかが治療方法開発の一つの鍵になると考えられる。

我々はこれまでに activin antagonist である follistatin (FST) 遺伝子改変マウスを作製し、そのマウスが POF となり高齢では原始卵胞が枯渇し不妊となること (Kimura F, et al Endocrinology 151:1310-1319, 2010) を見出した。General FST knockout マウスは、肺形成不全のため新生児期に死亡してしまう。そのため成人期の FST の働きを調べることは困難であった。そこで FST には、3 つの Isozyme (FST315, FST303, FST288) が存在することに着目し、そのうち 2 つの Isozyme を有さないマウスの作製を試みた。fst は 6Exon からなるが FST315 はすべての exon から転写翻訳される。fst の Intron5 には alternative splicing site が存在し、exon5 までのスプライシングを受けると翻訳後 FST288 となる。FST303 は、FST315 の N-terminal end が切断されたものである。以上より Intron5 に stop codon を挿入し、FST288 のみを有する (FST288-only) マウスを作製した。FST288-only マウスは成人期まで生存し、このマウスにより成人期における FST の働きを調べることが可能となった。

抗マウス FST 抗体を作製し、FST の局在を調べてみると FST は、顆粒膜細胞、卵、卵巣表皮細胞および一部の間質細胞に存在することが分かった。FST288-only マウスにおいて

も局在は変わらなかったが分泌量は低下し、染色は弱くなっていた。また、Western blotting においても wild type マウスと比べるとタンパク量の減少していることが確認された。さらに、activin の subunit である

A と B、activin の他の antagonist である inhibin () と FSTL3、さらに second messenger である Smad 2 および 3 の定量的 RT-PCR を行うと卵巣においてこれらの発現量はいずれも wild type マウスと差を認めないことが分かった。これらのことから FST が減少しても、他の activin 制御のための遺伝子発現量には影響を与えず、FST288-only マウスにおいて activin signal が、活性化されていることが推察された。

次に Wild type と FST288-only マウスにおける原始卵胞 : primordial follicle およびその活性化が始まった段階と考えられる早期 1 次卵胞 : primordial to primary transitional follicle の数を日齢 8.5 から 400 までカウントした。性成熟期にあたる日齢 42 -250 において FST288-only マウスでは wild type マウスと比べ原始卵胞数は同等か減少しているが、早期 1 次卵胞数は増加しているか同等であることが分かった。早期 1 次卵胞数 / 原始卵胞数 (比) を日齢別に比較すると FST288-only マウスは wild type マウスに比べ 1.5~2 倍程度で推移していることが分かった。(data not shown)。これらのことより activin signal が活性化された状態では、原始卵胞の活性化が誘導されていると考えられた。

以上の研究結果をもとにアクチビンおよびその関連物質の修飾により原始卵胞の活性化を誘導し、POF および卵巣予備能低下症例の治療への応用が可能ではないかとの着想にいたった。

2. 研究の目的

マウスを用いた実験系においてアクチビンおよびフォリスタチンなどアクチビン関連物質の制御により原始卵胞の活性化を誘導するとともにその機構を明らかとし、ヒト早発卵巣不全患者および卵巣予備能低下者の治療法開発を本研究の最終的な目的としている。

3. 研究の方法

概要 :

新生児マウス卵巣培養系を用いアクチビン関連物質と原始卵胞の活性化誘導との関連性、そのメカニズムを明らかにする。

具体的方法 :

原始卵胞活性化についての解析を免疫染色法や遺伝子発現などの手法も用いておこなった。まず、FST 改変マウスの卵胞活性化のメカニズムを探るべく、日齢 42 のマウス卵巣における P-Smad2/3 の免疫染色をおこなった。次に FST 改変マウスと wild type の卵巣における P-Smad2/3 を preGrC に発現して

いる原始卵胞数の全原始卵胞数に対する割合を算出した。

FST 改変マウスにおいて早期 1 次卵胞数 / 原始卵胞数の比が高いことを考えあわせ、Smad2/3 のリン酸化は原始卵胞の活性化と関連していると推察されたので、日齢 5.5 マウス卵巣を用い増殖マーカー Ki67 と P-Smad2/3 の蛍光二重免疫染色を行った。

次に、Germ cell nest breakdown がほぼ終了する出生後 5.5 日に卵巣を摘出する。Culture insert 内で DMEM/F-12 を用い培養した。Activin A 0-500nM の濃度を設定した。培養後の卵巣の切片作製は、過去の方法で行う。卵胞を種類別にカウントし、原始、早期 1 次、1 次、2 次、胞状卵胞に分類し、それぞれの合計を卵巣毎に算出する。アクチビン関連物質投与群、コントロール群におけるそれらの絶対数と早期 1 次卵胞数 / 原始卵胞数比を算出し比較する。各群 8 個の卵巣を供する。

また、上記と同様の方法により新生児卵巣培養系における activin 関連物質による Smad2/3 のリン酸化 (活性化) についての検討を行った。

出生後 5.5 日に摘出した卵巣にプロゲステロン 100ng/ml を添加し 48 時間培養すると、卵巣内の Activin A および Activin B 共に半分程度に抑制した (data not shown)。以上よりプロゲステロンにより卵巣内のアクチビンを抑制し、その効果を調べる方針とした。以上を踏まえプロゲステロンの一種であるジエノゲスト (DNG) 5 mg を 16 週齢のメス ICR マウスに皮下注射、合計 16 回の投与を行った。対照群として DNG 溶解用のコーンオイルのみの投与を同様におこなった。投与終了後の同週例のオス ICR マウスと交配させ、生涯の総仔数、最終分娩週齢を対照群と比較した。

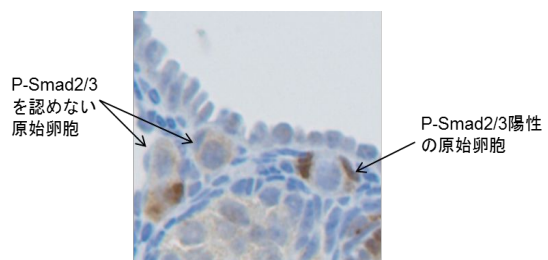
4. 研究成果

原始卵胞活性化についての解析を免疫染色法や遺伝子発現などの手法も用いておこなった。日齢 42 の FST288 改変マウス卵巣における P-Smad2/3 の免疫染色を図 1 に示した。P-Smad2/3 の染色は、卵には認められず、一部の granulosa cell (GrC) および pregranulosa cell (preGrC) に認められた。そこで FST 改変マウスと wild type の卵巣における P-Smad2/3 を preGrC に発現している原始卵胞数の全原始卵胞数に対する割合を算出した (図 2)。その結果、Wild type (W42) に比し FST 改変マウス (F42) において P-Smad2/3 を発現している原始卵胞数の割合が高かった。FST 改変マウスにおいて早期 1 次卵胞数 / 原始卵胞数の比が高いことを考えあわせ、Smad2/3 のリン酸化は原始卵胞の活性化と関連していると推察される。日齢 5.5 マウス卵巣を用い増殖マーカー Ki67 と P-Smad2/3 の蛍光二重免疫染色を行ったが、二重に染色される preGrC は認めなかった (図 3) (本研究内容の一部を 2011 年に報告した)。

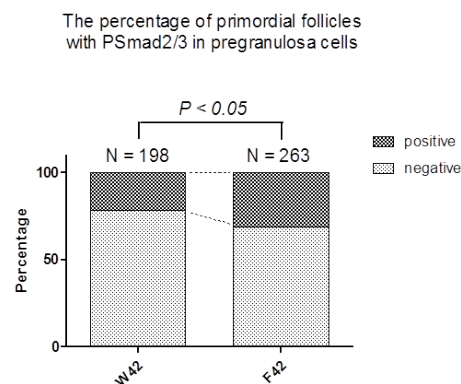
多くの preGrC が同時にアポトーシスを起こすとは考えにくく、また、P-Smad2/3 を発現している PreGrC は形態学的に扁平なものではなく肥大化していることから、Smad2/3 のリン酸化つまり activin signaling の活性化は、preGrC の分化すなわち原始卵胞の活性化に関わると考えられた。

次に Germ cell nest breakdown が、ほぼ終了する日齢 5.5 日に卵巣を摘出し、Culture insert 内で DMEM/F-12 を用い培養した。Activin A を 0 または 500 nM の濃度を設定し 3 日間培養し (日齢 8.5 日相当) 卵巣内の卵胞数を比較したところ、Activin A を加えても、卵胞数に変化はなく、また P-Smad2/3 陽性の原始卵胞数の比率も全く差を認めなかった。(図 4.5) これらより Activin A を in vitro で投与しても卵巣内には輸送されない。あるいはアンタゴニスト出現により Activin A の効果が相殺されると考えられた。siRNA 等により感作させる方法もあるが、組織における遺伝子誘導率は、低いため本実験方法はここで中断した。

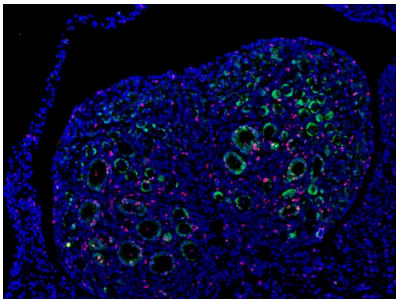
16 週齢のメス ICR マウスに 5 mg の DNG を 4 日毎に皮下注射し、合計 16 回の投与を行ったところ図 6 のように、投与終了後の生涯総分娩仔数は DNG 群の方が有意に多かった。DNG が卵巣内のアクチビンを抑制し、原子卵胞維持に働いた可能性がある。また、最終分娩週齢も DNG 投与マウスで高かった (Data not shown)。この事象は、晩婚化が進む本邦において卵巣機能温存し、高齢でも妊孕性を維持する方法になりうると考えられる。現在、本事象を解析中である。



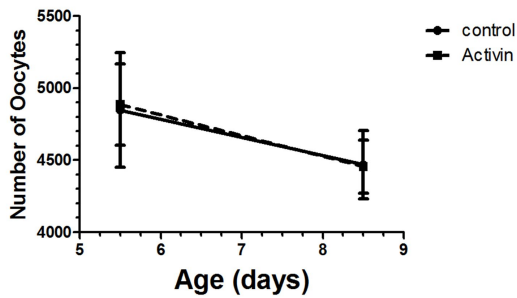
(図 1 P-Smad 2/3 陽性顆粒膜細胞)



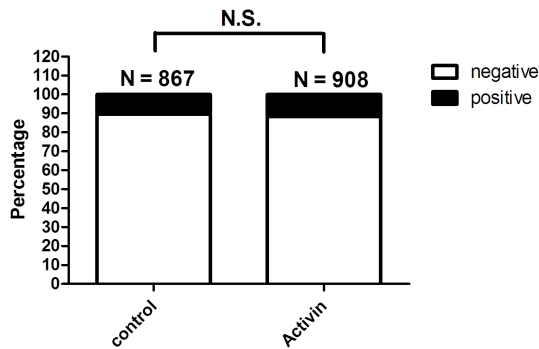
(図 2 P-Smad2/3 陽性原始卵胞数の割合)



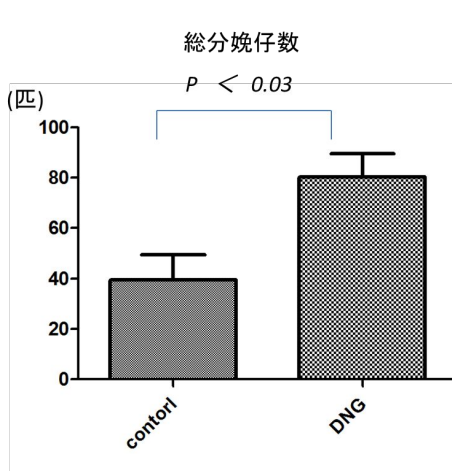
P-Smad2/3 緑 Ki67 赤
(図3 P-Smad2/3 の役割)



(図4 Activin A 投与による卵子数の変化)



(図5 Activin A 投与3日後の P-Smad2/3 陽性顆粒膜細胞数の割合)



(図6 DNG 投与後の総分娩仔数)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kimura F, Bonomi LM, Schneyer AL
Follistatin regulates germ cell nest breakdown and primordial follicle formation.
Endocrinology. 査読有 152 巻、2011 年 697-706 ページ

〔学会発表〕(計 2 件)

木村文則、山中章義、高橋顕雅、竹林明枝、清水良彦、喜多伸幸、高橋健太郎、村上 節
ジエノゲスト長期投与後マウスの妊孕性
第 34 回日本エンドメトリオーシス学会
2013 年 1 月 18-19 日 宇都宮

木村文則、清水良彦、高島明子、竹林明枝、喜多伸幸、高橋健太郎、村上 節、Lara Bonomi、Alan L Schneyer
フォリスタチンによるマウス Germ Cell Nest Breakdown の制御
第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会
2012 年 4 月 13-15 日 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
木村 文則 (FUMINORI Kimura)
滋賀医科大学 医学部 講師

研究者番号 : 90322148

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし