

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2013～2016

課題番号：25462579

研究課題名（和文）新規初期卵胞発育制御因子の同定とその臨床応用

研究課題名（英文）Identification of novel growth factors for early follicle growth and their clinical application

研究代表者

河村 七美（Kawamura, Nanami）

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：70323152

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、初期卵胞の発育に重要な卵巣内の局所因子を同定し、その作用について分子レベルで明らかにすることで、新たな卵胞発育促進法を開発することを目的とした。DNAマイクロアレイによる網羅的解析により、初期卵胞で発現しているリガンド/受容体の候補を決定し、その作用についてマウスを用いた *in vitro* および *in vivo* 試験に依り検証した。候補因子の中から、2次卵胞以降の発育を促進する新たな因子としてC-type natriuretic peptideおよびCCN growth factorを見出した。また、1次卵胞以降の発育を促進する新たな因子としてR-spondin2を同定した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we sought to develop novel methods for ovarian follicle stimulation by identifying local factors important for early follicle growth and subsequent analyses of its molecular mechanisms. Based on comprehensive DNA microarray analyses, we determined the candidates of ligand/receptor pairs expressing in early stage of ovarian follicles and addressed their roles in follicle growth using murine *in vitro* and *in vivo* experiments. Among the candidates, we found C-type natriuretic peptide and CCN growth factor as factors for growth of secondary follicles onward, whereas R-spondin2 as a factor for growth of primary follicles onward.

研究分野：生殖医学

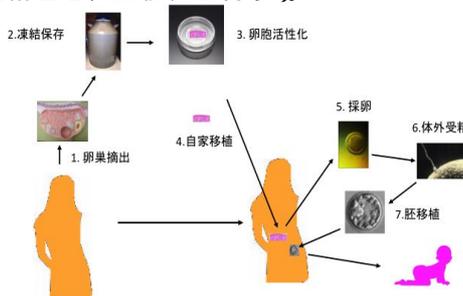
キーワード：早発卵巣不全 卵胞発育

1. 研究開始当初の背景

早発卵巣不全は40歳未満の女性で1年以上の無月経を呈する場合に診断される。卵巣内に発育した卵胞が認められず排卵がおこらないため絶対的な不妊となる。一方、卵巣機能は加齢と共に低下し、卵巣内の卵胞数の減少がおこるため、多くの高齢(43-48歳)の女性是不妊であり、排卵誘発のための治療を行っても無反応で、卵胞発育が認められず排卵がおこらないことが多い。従って、早発卵巣不全や高齢の不妊患者では、自らの卵子を用いた妊娠は非常に困難であり、若年健康女性から卵子の提供(ドナー卵子)を受け体外受精胚移植(IVF-ET)を行う以外に確実な治療法はない。しかし、本邦では最近ドナー卵子による治療が許可されたが全く普及しておらず、早発卵巣不全や高齢の不妊患者が自らの卵子を得て妊娠できるような新たな治療法の開発が急務となってきている。

卵巣には原始卵胞が多数存在する。この原始卵胞のほとんどは休眠状態にあり、そのうちのごく僅かが月経毎に活性化されて初期卵胞となる。初期卵胞発育の分子基盤は未だ不明であるが、発育を続け2次卵胞に到達すると、ゴナドトロピンの作用により発育が促進され、最終的に卵子が排卵される。最近我々は、マウスおよびヒトの原始卵胞において、PTEN (phosphatase and TENsin homolog) 阻害剤とPI3K (phosphatidylinositol-3 kinase)活性化剤を用いた休眠原始卵胞の人為的活性化(IVA: In Vitro Activation)に成功した(Li and Kawamura et al. PNAS 2010)。

早発卵巣不全や高齢の不妊患者の卵巣内には、わずかに原始卵胞が残存していることから、本法の臨床応用は、これまで不可能であったこれらの患者が自らの卵子で妊娠が可能となる技術的break throughになると期待される。我々はこの技術を早発卵巣不全患者に臨床応用し、患者自らの卵子による不妊治療を、倫理委員会の承認と患者の同意の下に世界に先駆けて行い、治療に成功している(下図:治療概要:卵巣を摘出し断片化したのち、IVAによる原始卵胞活性化処理を行い、卵巣断片を自家移植する。移植後に卵胞発育が認められた場合は、採卵を行い顕微授精により受精させ、胚移植を行う)。



早発卵巣不全や高齢の不妊患者の原始卵胞数は非常に少ない上に、活性化された原始卵

胞の多くは排卵前卵胞まで発育しないため、本法で採卵できる卵子数は少ない。従って、成績を向上させるためには、活性化後の原始卵胞発育を促進する方法の開発が必要である。2次卵胞以降の発育はゴナドトロピンにより制御できるため、本研究では2次卵胞までの初期卵胞発育に焦点をおく。

2. 研究の目的

初期卵胞(原始卵胞~2次卵胞)は周囲の血管網の発達が乏しく、2次卵胞以降の後期卵胞発育のような下垂体由来のゴナドトロピンによる内分泌経路による支配を受けておらず、初期卵胞発育には卵巣内の局所因子が重要な働きをしていると考えられる。本研究では初期卵胞発育を制御する局所因子に関して、研究期間内に以下のことを明らかにする。

(1) DNAマイクロアレイを用いてマウス初期卵胞の発育に重要な細胞シグナル(リガンド/受容体)の候補を網羅的に同定する。

(2) 候補因子を添加して卵巣組織培養を行い、活性化後の原始卵胞の発育を制御する因子を同定する。初期卵胞発育の制御作用が認められた因子に関して、動物実験により生体内での効果を判定する。初期卵胞発育制御因子による人為的活性化後の原始卵胞の発育を促進する方法を開発する。

3. 研究の方法

極少数の限られた原始卵胞しか残存していない早発卵巣不全や高齢の不妊患者において、人為的活性化技術により活性化された原始卵胞を効率よく発育させて採卵数を増やし、本治療法の成績を向上させるために以下の研究を行った。

(1) マウス初期卵胞の発育に重要な細胞シグナル(リガンド/受容体)の候補の網羅的同定

周囲の血管網が乏しい初期卵胞の発育を制御する因子は卵巣における局所因子が想定される。本研究では、マウスの初期卵胞発育を制御する因子を、DNAマイクロアレイを応用して網羅的に同定を試みた。

各発育段階のマウス初期卵胞(原始卵胞、1次卵胞、2次卵胞)をレーザーマイクロディセクションにて採取した。検体をDNAマイクロアレイに供し、各発育段階の卵胞に発現している分泌シグナルをもつリガンドとそれらの受容体の発現量および発現変化を比較定量した。得られたデータは定量的real-time RT-PCRにより検証し、初期卵胞で高発現しているリガンドまたは受容体を同定して候補因子とした。また、候補因子の経時的な発現変化を測定することで、どの発育段階の卵胞に必要な因子なのかを推測した。

データ解析には我々が開発し、インターネット上で公開しているツールを用いた (http://bdi.stanford.edu/EDI/init/init_A.asp)。得られた候補因子をさらに絞り込むため、分子系統樹を作製して種間保存性の高い候補因子を抽出した。

(2) 初期卵胞発育促進法の開発

本研究では、候補因子の中から初期卵胞発育制御作用を示すものを同定し、生体内での効果を判定した。

マウス卵巣組織培養への候補因子の添加実験により、組織学的に各発育段階の卵胞の存在比率を計測することで初期卵胞発育への効果を判定した。候補因子のアゴニストやアンタゴニスト、受容体の抑制剤などを使用して、卵胞発育への作用を組織学的に検証し、最終的に初期卵胞発育制御因子を決定した。さらに同定した因子による卵胞発育制御機構を解明するため、リガンド-受容体の卵胞内局在と受容体下流域の細胞内シグナルを明らかにした。

同定した初期卵胞発育制御因子をマウスに投与し、生体内での初期卵胞発育への効果について卵巣の組織学的検査を行い評価した。生体内で早期に分解されるリガンドの場合には、イムノグロブリンの Fc ドメインとの融合タンパク質を作製し、半減期の長いキメラタンパク質を使用した。投与経路としては腹腔内投与、または、貴重なリガンドの場合には投与量を最小限にするため卵巣被膜内投与を行った。その後ゴナドトロピンによる排卵刺激をおこない、排卵数を測定した。さらにこれらの卵子の受精・胚発育能、ゲノムインプリンティングの正常性を確かめ、胚移植後の出生仔の異常の有無を確認した。初期卵胞発育制御因子を投与したマウスにおいて、体重測定、各臓器の組織学的検査、行動異常の有無について調べ、副作用の発生を探索した。

4. 研究成果

(1) マウス初期卵胞の発育に重要な細胞シグナル(リガンド/受容体)の候補の網羅的同定

マウス初期卵胞として原始卵胞、1次卵胞、2次卵胞をレーザーマイクロダイセクションにて採取し、tRNAを抽出してDNAマイクロアレイ解析を行った。我々が開発したツールを用いてデータマイニングを行い、初期卵胞で高発現を示す遺伝子を選択し、そのうち分泌シグナルを持つ遺伝子および受容体を抽出し候補遺伝子とした。抽出した候補因子について、得られたデータの信憑性について残余検体を用いた定量的 real-time RT-PCR により確認し、再現性のあるもののみを候補とし

て残した。その中で、初期卵胞発育を制御する作用があることが既に報告されているものを除いて最終候補因子を決定した。最終候補因子については、卵胞発育過程における経時的な発現変化を調べ、その発現パターンから、どの発育段階の卵胞に必要な因子なのかを推測した。

複数の最終候補因子が同定されたが、本研究期間にはその発現様式から最も初期卵胞での機能が期待できる、C-type natriuretic peptide (CNP), R-spondin2 (Rspo2), CCN growth factor について研究を進めた。

(2) CNP

CNP はナトリウム利尿ペプチドの1つであり、NPPC (Natriuretic Peptide Precursor C) 遺伝子にコードされている。その受容体は natriuretic peptide receptor B (NPRB) である。本研究の結果、NPPC および NPRB は2次卵胞以降の卵胞に発現しており、卵胞を構成する細胞種としては顆粒膜細胞が主たる発現細胞であった。NPPC および NPRB の発現量は卵胞径が増すほど高くなった。

さらに、マウス顆粒膜細胞の培養系を用いて、CNP が濃度依存性に cGMP の産生を促進するが cAMP の産生には影響を与えないことを明らかにした。マウス卵巣より単離した前胞状卵胞を CNP または 8-bromo-cGMP を添加した培養液中で体外培養を行うと、卵胞の発育がともに促進された。これらの結果から、CNP は cGMP の産生を介して卵胞発育を促進することが示された。

卵巣組織培養系においては、CNP 添加培養により、卵巣重量が増加した。組織検査によって1次卵胞、初期2次卵胞の減少が認められ、一方で後期2次卵胞の増加が認められた。従って、CNP は1次卵胞以降の発育を促進することが明らかとなった。2次卵胞の発育を促進する既知のホルモンとして卵胞刺激ホルモン (FSH) があるが、卵巣組織培養系において、FSH は NPRB の発現を変化させなかったが、NPPC の発現を増加させため、CNP は FSH の下流で卵胞発育に参与している可能性が示唆された。

マウスに CNP の腹腔内投与を行ったところ、前胞状卵胞の発育が促進され、卵巣重量と排卵数の増加が認められた。CNP 投与後に得られた卵子に対し、体外受精を施行したところ、CNP 非投与群に比較して受精率、胚発育率に有意な変化は認められなかった。また、CNP 投与後に hCG を投与して排卵誘発したマウスを交配したところ、正常に妊娠し、正常な児を分娩した。

(3) Rspo2

R-spondin は LGR4, 5, 6 および Frizzled (FZD) 受容体に結合し、Wnt シグナルを活性化

することで生物学的作用を示す。本研究の結果、R-spondin2 はマウス卵巣の1次卵胞から胞状卵胞で発現が認められ、その発現は卵子に局在していた。一方、受容体である LGR4, 5, 6, FZD1~9 は卵子にはほとんど発現しておらず、卵胞細胞に高発現していた。

マウス卵胞細胞の培養系の TCF-ルシフェラーゼアッセイにおいて、R-spondin2 は Wnt3a を介して活性を示し、その活性は Wnt シグナルアンタゴニストである DKK1 で抑制された。さらに卵巣組織培養系において R-spondin2 は濃度依存性に卵巣重量を増加させ、DKK1 および R-spondin2 の中和抗体は内因性の R-spondin2 シグナルを抑制することで卵巣重量を減少させた。さらに組織学的検査にて、R-spondin2 は原始卵胞および変性卵胞の割合は変化させないが、1次卵胞数を減少させ、2次卵胞数を増加させた。

R-spondin1-3 は等効果で Wnt シグナルを活性化することから、R-spondin1-Fc キメラを作製して、*in vitro* アッセイにて R-spondin2 と同等の活性を持つことを確認し、後の *in vivo* 試験に使用した。マウスに R-spondin1-Fc キメラの腹腔内投与を行ったところ、1次卵胞が減少し、胞状卵胞が増加した。さらに、卵巣重量と排卵数の増加が認められた。R-spondin1-Fc キメラ投与後に得られた卵子に対し、体外受精を施行したところ、CNP 非投与群に比較して受精率、胚発育率に有意な変化は認められなかった。また、R-spondin1-Fc キメラ投与後に hCG を投与して排卵誘発したマウスを交配したところ、正常に妊娠し、正常な児を分娩した。

(3) CCN growth factor

卵巣への物理的刺激またはアクチン重合の促進により、Hippo シグナル関連因子の YAP が核移行し、その結果 CCN growth factor 2, 3, 5, 6 の発現が増加することを示した。

卵巣組織培養系および *in vivo* 試験において、卵巣への物理的刺激またはアクチン重合の促進により、2次卵胞の発育が促進された。さらに、卵巣組織培養系で CCN2, 3, 5, または 6 の添加培養により卵巣重量が増加した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Kawamura K, Kawamura N, Hsueh AJ, Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure?, *Curr Opin Obstet Gynecol*, 査読有, 28, 2016, 217-22, DOI: 10.1097/GCO.0000000000000268

Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BC, *ntrovarian control of early*

folliculogenesis, *Endocr Rev*, 査読有, 36, 2014, 1-24, DOI: 10.1210/er.2014-1020

Nishijima C, Kawamura K, Okamoto N, Sato Y, Kawamura N, Ishizuka B, Tanaka M, Suzuki N, Regulation of preimplantation embryo development in mice by FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, *J Mammal Ova Res*, 査読有, 31, 2014, 45-51, DOI: 10.1274/jmor.31.45

Kawamura N, Kawamura K, Okamoto N, Manabe M, Cancer Med, 査読有, 2, 2013, 849-861, DOI:10.1002/cam4

Cheng Y, Kawamura K, Takae S, Deguchi M, Yang Q, Kuo C, Hsueh AJ, Oocyte-derived R-spondin2 promotes ovarian follicle development, *FASEB J*, 査読有, 27, 2013, 2175-84, DOI: 10.1096/fj.12-223412

Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho CH, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, Sugishita Y, Morimoto Y, Hosoi Y, Yoshioka N, Ishizuka B, Hsueh AJ, Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment, *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, 110, 2013, 17474-9, DOI: 10.1073/pnas.1312830110

Okamoto N, Kawamura K, Kawamura N, Nishijima C, Ishizuka B, Suzuki N, Hirata N, Effects of maternal aging on expression of sirtuin genes in ovulated oocyte and cumulus cells, *J Mammal Ova Res*, 査読有, 30, 2013, 24-29, DOI: 10.1274/jmor.30.24

[学会発表](計 1 件)

河村和弘, 河村七美, 佐藤可野, 石塚文平, 田中守, 鈴木直, 新規卵巣由来因子 R-spondin2 による初期卵胞発育誘導, 第 18 回日本生殖内分泌学会学術集会、2013 年 12 月 8 日、東京

[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

<http://www.ivafertility.com/IVA/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

河村 七美

(KAWAMURA, Nanami)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術
員
研究者番号：70323152

(2)研究分担者

河村 和弘 (KAWAMURA, Kazuhiro)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10344756