

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670726

研究課題名(和文)メラトニンは卵巣の加齢を食い止めることができるか

研究課題名(英文)Anti-aging effects of melatonin on ovarian aging

研究代表者

杉野 法広 (SUGINO, Norihiro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10263782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：卵胞数の減少や卵の質の低下に起因する卵巣の加齢は、不妊領域最大の課題であるが有効な対処法はない。松果体ホルモンのメラトニンは卵胞液中に存在し、その抗酸化作用で卵子を保護している。今回はメラトニンの長期投与で卵巣の加齢を予防できるかを検討した。ICR雌マウスを用い、10週齢から43週齢までの間、メラトニン水(100 μ g/ml)を、コントロール群には水道水を飲水投与した。メラトニンの長期投与によって、加齢に伴う卵胞数と排卵数の減少、受精および胚発育の低下が防止できた。メラトニンは卵巣の加齢を軽減でき、その機序はリボソーム機能維持や抗酸化機構の賦活が関与している。

研究成果の概要(英文)：Ovarian aging occurs as a result of a decrease in the number and quality of oocytes in ovarian cortex follicles. Oxidative stress is thought to be major cause of ovarian aging. However, there are no established treatments to prevent ovarian aging. Melatonin is a hormone secreted by a pineal gland, and is known as a powerful antioxidant. This study investigated whether long-term melatonin treatment can prevent ovarian aging in mice. Female ICR mice (10 weeks old) were divided into two groups: half were fed with water as a control and the other half were supplemented with 100 μ g/ml melatonin water until 43 weeks. The long-term melatonin treatment prevented the age-related decreases in the number of ovulated oocytes and follicles in the ovarian tissue, fertilization rates, and embryo development. The present results indicated that melatonin prevents ovarian aging by activating both expression of ribosome-related genes and free radical scavenging network.

研究分野：医歯薬学

キーワード：メラトニン 卵巣 加齢 酸化ストレス 卵

1. 研究開始当初の背景

高年齢女性では、卵巢刺激を行っても発育する卵胞数が少ない、受精率が低い、胚発育が悪い、妊娠しても流産率が高い。これら加齢に伴う妊孕能の低下は、卵巢の加齢である卵子の数の減少と卵子の質の低下に起因するものであるが、これに対しては打つ手が無いのが現状である。その一方で、対応策として、第三者による卵子提供、未受精卵の卵子凍結、胚の着床前診断などの生殖医療が進み、社会的問題が生じている。

卵子の絶対数は出生時にすでに決まっており、加齢とともに減少する。特に35歳以降は急速にその数が減少し、ついには枯渇して閉経を迎える。この原子卵胞の数の減少のメカニズムは未だ解明されていないが、加齢に伴う慢性的な酸化ストレスによってアポトーシスに陥ることが考えられている。

加齢による卵子の質の低下に関するメカニズムについても、十分解明されていない。卵巢内の原始卵胞は、第一減数分裂前期で休止した状態にあり、その後LHサージによって減数分裂が再開されるまでの数十年にわたり卵巢内の環境に暴露される。この間、酸化的ストレスなどによってミトコンドリアや染色体にダメージを受けることが、卵子の質の低下につながると推測されている。このように、加齢にともない重大な変化が卵子に生じているが、その打開策として効果的な方法は報告されておらず、卵巢の加齢に対する根本的な対策が望まれている。

松果体ホルモンであるメラトニンは、活性酸素などに対し、強力な抗酸化作用を発揮する。近年、メラトニンの長期投与がアルツハイマー病の予防や寿命延長に効果があることが報告され、アンチエイジングホルモンとして注目されている。我々はこれまでに、ヒト卵胞液中にはメラトニンが高濃度に存在し、排卵過程で発生する活性酸素種を消去し卵を防御していること、ヒト顆粒膜細胞の酸化ストレスを抑制しプロゲステロン産生を促進させること、実際に不妊症患者にメラトニンを投与すると卵胞内の酸化ストレスが抑制され受精率が上昇すること、黄体機能不全患者にメラトニンを投与することで黄体機能が改善することを報告してきた。そこで、我々は、抗酸化物質としてのメラトニンの長期投与が卵巢の加齢を予防できるという可能性を考えた。

2. 研究の目的

メラトニンの長期投与によって、加齢に伴う卵子数の減少を軽減できるか、卵子の質の低下を予防できるか、という卵巢の加齢に対する根本的な対策を目的とした基礎的実験を行った。

3. 研究の方法

マウスを用い、思春期に相当する8週齢から更年期に相当する42週齢までの8か月間に

わたりメラトニンを飲水投与する。このメラトニンの長期投与が、抗酸化作用を介して、加齢に伴う原子卵胞数の減少を軽減できるか、また、卵子の質の低下を予防できるかを検討した。

10週齢雌ICRマウスをメラトニン投与群とコントロール群の2群に分け、43週までメラトニン水(100 µg/ml)または水道水(コントロール)を飲水させ飼育した。12週齢、22週齢、32週齢、42週齢のそれぞれの週齢において、pregnant mare serum gonadotropin (PMSG)による過排卵刺激を行い、48時間後にhuman chorionic gonadotropin (HCG)を投与、15時間後に卵巢、卵管を採取し、以下の実験を行った。卵管内の卵子を回収し排卵数を計測。

回収した卵子を培養液中で2時間前培養した後、雄マウスより採取した精子を媒精(10x10⁴個/ml)する。48時間後に4 cell or 8 cellの数を計測し受精率を検討する。さらに96時間後に胚盤胞到達率を計測する。回収した卵子のミトコンドリア活性、ATP産生能を測定する。卵巢組織の連続切片を作成し、各種発育段階の卵胞数を計測する。メラトニンの作用機序を探るため、卵巢の網羅的遺伝子発現をマイクロアレイ法にて解析した。

4. 研究成果

(1) 排卵数

排卵数は、33週が平均12.8個、43週が7.6個と13週の24.4個に比べ有意に低値を示し、加齢により排卵数が減少した。メラトニンの長期投与により43週で排卵数は11.0個とコントロール群に比し有意に増加していた。メラトニンの長期投与により加齢による排卵数の減少が軽減された(表1)。

(2) 受精率と胚盤胞到達率

体外受精の受精率、胚盤胞到達率は、それぞれ13週の71.2%、59.5%に比し、43週では43.2%、45.5%と有意に低値を示し、加齢により受精能と胚発育が低下した。メラトニンの長期投与により43週では、受精率、胚盤胞到達率は、それぞれ56.6%、66.6%とコントロール群に比べ有意に高値を示した。メラトニンの長期投与により加齢による受精能と胚発育の低下が軽減された(表1)。

(3) 卵子のミトコンドリア活性、ATP産生能

43週における細胞内ATP量には、両群で差を認めなかった。

表1 排卵数、受精率、胚盤胞到達率

	13週	23週	33週		43週	
			コントロール	メラトニン	コントロール	メラトニン
排卵数(個)	24.4±8.9	26.3±3.3	12.8±4.3	19.0±1.0	7.6±2.6	11.0±5.1
受精率(%)	71.2	-	-	-	43.2	56.6
胚盤胞到達率(%)	59.5	-	-	-	45.5	66.0

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 24 件)

- Maekawa R, Lee L, Sugino N (他 6 名、9 番目) Changes in gene expression of histone modification enzymes in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation. *J Ovarian Res* 9:15, 2016. 査読有
DOI: 10.1186/s13048-016-0225-z
- Urahama T, Sugino N, Kurumizaka H (他 11 名、8 番目) Histone H3.5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis. *Epigenetics & Chromatin* 9:2, 2016. 査読有
DOI: 10.1186/s13072-016-0051-y
- Maekawa R, Jozaki K, Sugino N (他 9 名、11,12 番目) Tissue-specific expression of estrogen receptor 1 is regulated by DNA methylation in a T-DMR. *Mol Endocrinol* 30: 335-347, 2016. 査読有
DOI: 10.1210/me.2015-1058.
- Yamagata Y, Jozaki K, Sugino N (他 10 名、12,13 番目) Retinoic acid has the potential to suppress endometriosis development. *J Ovarian Res* 8:49, 2015. 査読有
DOI: 10.1186/s13048-015-0179-6
- Arai Y, Hayakawa K, Sugino N. (他 16 名、12 番目) Putative epimutagen in maternal peripheral and cord blood samples identified using human induced pluripotent stem cells. *BioMed Res International* 2015 article ID 876047 査読有
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/876047>
- Tanabe M, Yamagata Y, Sugino N (他 7 名、10 番目) Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. *J Reprod Dev* 61: 35-41, 2015. 査読有
DOI:10.1262/jrd.2014-105.
- Tamura I, Jozaki K, Sugino N (他 10 名、12,13 番目) Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* 28: 1656-1669, 2014. 査読有
DOI: 10.1210/me.2014-1117.
- Yamagata Y, Nishino K, Sugino N (他 4 名、7 番目) Genome-wide DNA methylation profiling in cultured eutopic and ectopic endometrial stromal cells. *PLOS ONE* 9 (1): e83612, 2014. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083612>
- Tamura I, Sato S, Sugino N (他 7 名、10 番目) Importance of C/EBP β binding and histone acetylation status in the promoter regions for induction of IGF1, PRL and Mn-SOD by cAMP in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 155, 275-286, 2014. 査読有

DOI: 10.1210/en.2013-1569

Sato S, Maekawa R, Sugino N (他 6 名、9 番目) Potential mechanisms of aberrant DNA hypomethylation on the X chromosome in uterine leiomyomas. *J Reprod Dev* 60: 47-54, 2014. 査読有
DOI: 10.1262/jrd.2013-095

〔学会発表〕(計 20 件)

- 河本 舞、城崎幸介、杉野法広 (他 7 名、9,10 番目) 加齢に伴う卵胞数の減少、卵子の質の低下をメラトニンが予防する。第 68 回日本産科婦人科学術講演会 2016/4/22 東京都千代田区、東京国際フォーラム
杉野法広 生殖医療とアンチエイジングホルモン・メラトニン 第 12 回北海道生殖医療カンファレンス 2015/7/11 北海道札幌市、ホテルさっぽろ芸文館
田村博史、河本 舞、杉野法広 メラトニン長期投与によるマウス卵巣加齢の予防効果 第 15 回日本抗加齢医学会総会 2015/5/29 福岡県福岡市、福岡国際会議場
Tamura H, Kawamoto M, Okada M, Maekawa R, Jozaki K, Sugino N. Long-term melatonin treatment for the prevention of ovarian aging. IFFS (International Federation of Fertility Society)/JSRM (Japan Society for Reproductive Medicine) International Meeting 2015 2015/4/26 Yokohama, Kanagawa, PACIFICO Yokohama
杉野法広 教育講演：生殖医療とアンチエイジング 日本抗加齢医学会講習会 2015/1/25 福岡県福岡市、福岡国際会議場

〔図書〕(計 2 件)

- Sugino N, Tamura I, Maekawa R, Jozaki K. Decidualization and epigenetic regulation. *Uterine Endometrial Function*, edited by Kanzaki H, Springer, in press 2016.
杉野法広 他 エピジェネティクスキーワード辞典 産婦人科疾患 子宮筋腫と子宮内膜症 羊土社 318(220 - 227)、2013

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉野 法広 (SUGINO, Norihiro)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10263782

(2)研究分担者

城崎 幸介 (JOZAKI, Kousuke)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80721323

(3)連携研究者

なし