



平成29年9月1日

加齢に伴い妊娠率が低下するメカニズムの解明と卵巣若返り法を開発

【本研究成果のポイント】

- 加齢に伴って妊よう性（＊1）が低下する原因を解明するため、遺伝子改変マウス（＊2）を使用し、性腺刺激ホルモン（＊3）の分泌異常による卵巣組織の繊維化（＊4）が卵巣機能低下を引き起こすことを解明しました。
- 上記の研究結果から、性腺刺激ホルモンの分泌を長期間抑制することで、卵巣組織の脱繊維化を誘導し（卵巣若返り）、妊よう性の改善に成功しました。

【概要】

広島大学大学院生物圏科学研究科 博士課程後期 3 年（日本学術振興会特別研究員）梅原 崇 研究員，島田 昌之教授，および Baylor College of Medicine（米国）JoAnne S. Richards 教授等の研究グループは、加齢による妊よう性低下は、異常な内分泌環境に起因する卵巣組織の繊維化であることを突き止めました。さらに、薬剤による内分泌環境の改善処置が、卵巣組織の脱繊維化を誘導し、妊よう性も完全に回復させることを明らかにしました。

本研究において、加齢に伴う卵巣機能の低下原因の探索を行った結果、排卵回数が増加に伴ってステロイドホルモン産生細胞が蓄積し、それにより脳下垂体から恒常的に性腺刺激ホルモンが多量に分泌されること、この異常な内分泌環境が卵巣組織の繊維化を引き起こすことを解明しました。さらに、卵巣組織の繊維化が、卵胞発育（図1参照）を抑制し、卵巣機能を低下させることを明確化しました。

今回の研究成果から、40 歳以上の不妊患者で多く見られる「性腺刺激ホルモンの血中濃度が高値を示し、卵巣機能が低下したローレスポンダー症例（＊5）」において、卵巣組織の脱繊維化を誘導することで、妊よう性を改善させる可能性が示唆されました。今後、高齢女性の不妊治療への応用が期待できます。

本研究成果は、ロンドン時間の2017年8月31日
「Aging Cell」オンライン版に掲載されました。

<発表論文>

論文タイトル

The acceleration of reproductive aging in *Nrg1^{flox/flox};Cyp19-Cre* female mice

著者

梅原 崇¹, 川合 智子¹, 川島 一公¹, 田中 勝洋¹, 奥田 哲司¹, 北坂 浩也¹, JoAnne S. Richards², 島田昌之¹

1. 広島大学大学院生物圏科学研究科 陸域動物科学講座

2. Department of Molecular & Cellular Biology, Baylor College of Medicine

掲載雑誌

【背景】

女性の社会進出に伴う晩婚化は、子供を希望する女性年齢の上昇という結果となり、不妊カップル増加の一因となっています。また、体外受精を含む高度生殖補助医療においても、40歳代では成績が低下することから、閉経前にホルモンバランスの異常（内分泌環境の破綻）だけでなく、卵巢機能そのものの低下が始まっていると考えられます。

ヒトの臨床研究では既に卵巢機能が低下したという結果を見ていることから、なぜ40歳を超えると急激に卵巢機能が低下するのか？の原因は明らかになっていません。

また、モデル動物の作製にも生殖能力が低下するまでの長期間飼育する必要があることから、基礎研究の進展も不十分でした。このようなことから、内分泌環境の破綻と卵巢機能の低下との関係の解明、それに至った原因追求、および予防法の開発は進んでいませんでした。

【研究成果の内容】

我々は、「加齢に伴う卵巢機能変化」＝「排卵経験数の増加」と置き換え、排卵という炎症状態（*6）の繰り返しを慢性炎症となり、卵巢機能を低下させると仮説立てました。そこで、「排卵は正常に誘起されるが、自然妊娠が成立し難い＝発情周期が高回転して排卵経験数が増加する *Nrg1^{flox/flox};Cyp19a1Cre* マウス（*1, 以下KOマウス）」を用いて、その仮説の立証を試みました。その結果、KOマウスは6ヶ月齢以降に妊よう性を失い、卵巢刺激（*7）を行っても排卵数は有意に少なく、その排卵した卵の成熟率、受精率、胚盤胞期胚への発生率も低値でした。さらに、卵巢原発の内分泌環境破綻（恒常的高FSH, 高LH, 低AMH（*8））が認められました。

高度生殖補助医療において、40歳以上では、胞状卵胞への卵胞発育（図1）がほとんど見られない（ローレスポonder）症例が多く認められ、その症例では血中FSH値の上昇とAMH値の低下が知られています。さらに、40歳以上の症例では、血中LH値とFSH値に正の相関関係があることから、本モデルマウスは、高齢女性の高度生殖補助医療の成績が低い主要因の1つであるローレスポonder症例のモデルとなると考えられました。

本モデルマウスの卵巢組織を詳細に検討した結果、卵巢間質においてLH受容体発現細胞とステロイドホルモン産生細胞が観察されること、コラーゲンの細胞内蓄積とアクチンの集積による繊維化が認められました（図2）。さらに、このステロイドホルモン依存的な卵巢組織の繊維化が、卵胞発育を著しく抑制することが示されました。血中の高LHと高FSHを改善する目的で、長期間のGnRH antagonist投与を行ったとき、卵巢間質のステロイドホルモン産生が低下する結果、卵巢間質が脱繊維化され、卵胞発育の再開と血中AMH値の改善だけでなく、卵巢刺激への応答も正常化されました（図3）。さらに、交配試験により処置後3ヶ月にわたり正常な妊よう性を示しました。

以上の結果から、加齢に伴う卵巢機能低下は、異常な内分泌環境による卵巢組織の繊維化に起因することが明確化され、さらに、内分泌環境の改善により妊よう性を回復させることができることが明らかとなりました。

【今後の展開】

高齢女性に多く見られるローレスポonder症例は、内分泌環境破綻とそれに起因する卵巢皮質の繊維化により引き起こされること、薬理的な脱繊維化誘導により卵巢

機能を改善可能であることが明らかとなりました。本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）の成育疾患克服等総合研究事業「高齢不妊克服のための卵子・卵巣機能改善法」の一員として実施しており、本事業内での臨床研究に向けた準備を進めています。

【参考資料】

図 1. 卵胞発育の概要，卵巣には 1 つの卵と体細胞からなる卵胞という構造体が多数存在する。これは，出生前後に原始卵胞が形成され，それらがある一定の個数ずつ卵胞発育を開始し，一次卵胞→二次卵胞→初期胞状卵胞→胞状卵胞に至る。卵巣にどれだけの卵胞が残存するかを卵巣予備能といい，血中 AMH 値がその指標となる。各月経周期（発情周期）に卵胞は排卵に至るか閉鎖するので，加齢と共に卵巣予備能は低下する。二次卵胞までの卵胞発育は卵分泌因子により誘起されるが，それ以降は，下垂体から分泌される性腺刺激ホルモン（FSH と LH）により誘起される。ローレスポonderでは，血中 FSH と LH 濃度が高値にもかかわらず，卵胞発育が二次卵胞で停止している。

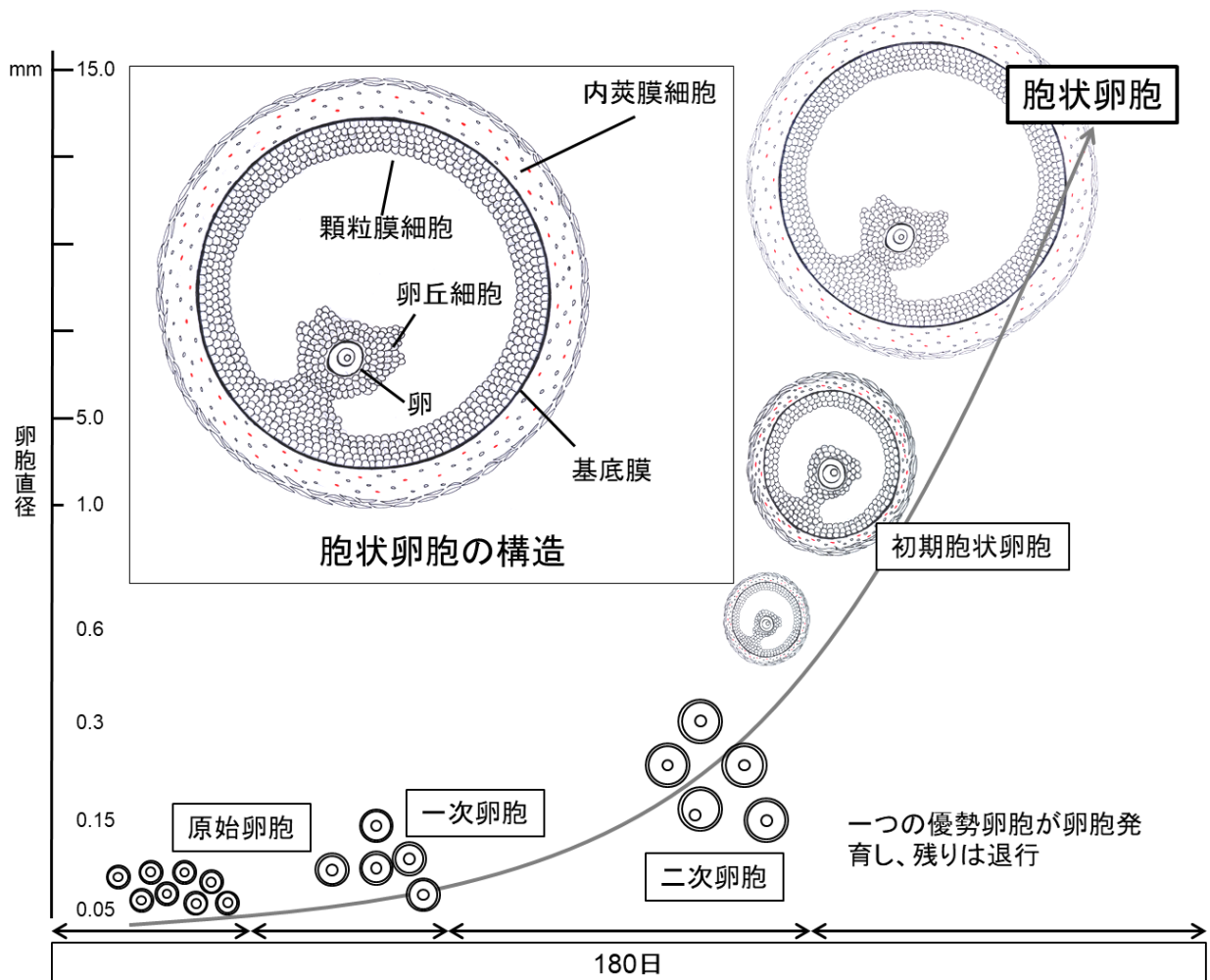


図 2. 卵巣のファロイジン染色像。WT は野生型マウス，KO は *Nrg1^{flox/flox};Cyp19a1Cre* マウス。青色は核の DAPI 染色，赤色が細胞内で平滑筋アクチンが集積した繊維化状態を示す。野生型マウスでは，12 ヶ月齢で繊維化が検出されるが，KO マウスでは，3 ヶ月齢から既に検出され，6 ヶ月齢で広範に認められる。

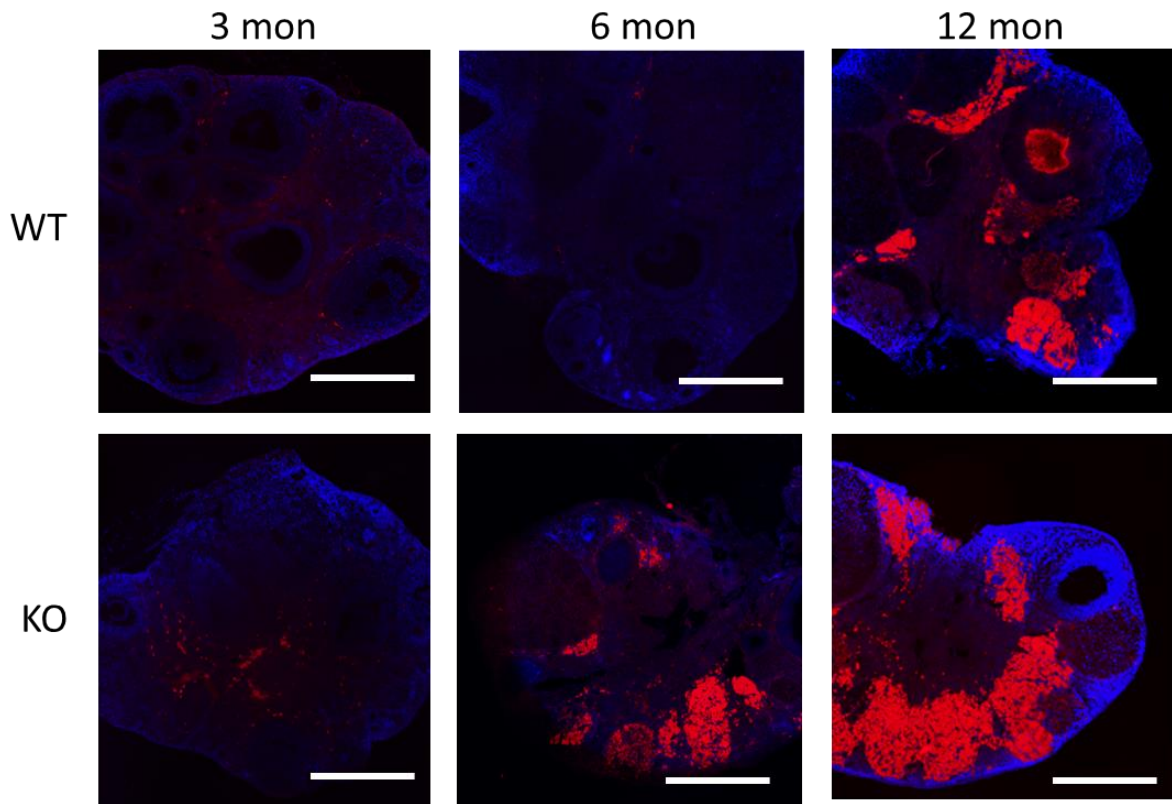
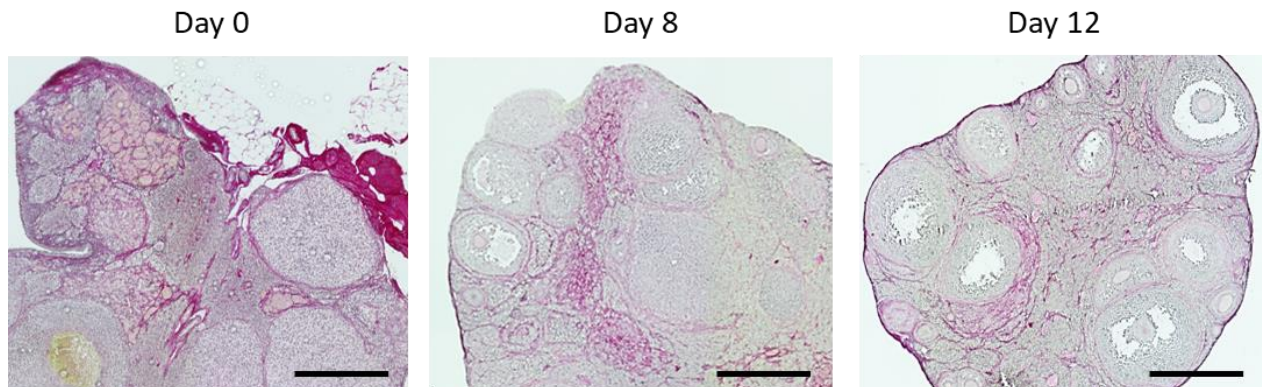


図 3. 妊よう性を消失した KO マウスに GnRH アンタゴニストを連続投与した時の卵巣の PSR 染色像。投与開始前 (Day0) には卵巣内部に赤紫の PSR 陽性細胞 (コラーゲン蓄積細胞) が検出されるが，卵胞はほとんど認められない。GnRH アンタゴニストを 8 日間連続投与する (Day8) ことで，PSR 陽性部位は膜構造のみとなり，間質細胞は陰性となる。この時，初期胞状卵胞も出現する。8 日で投与を終了し，その 4 日後 (Day12) には発達した胞状卵胞が複数認められる。



【用語説明】

（＊１）妊よう性

生物が子孫を残すための繁殖力、つまり妊娠のしやすさを意味する。

（＊２）遺伝子改変マウス

本研究では、卵巣の卵胞内特異的に *Nrg1* 遺伝子の機能を欠失させたマウスを示す。*Nrg1* は、排卵過程の卵胞内で発現する成長因子をコードする遺伝子であり、この成長因子（ニューレギュリン）は卵の受精可能時間を決定している。*Nrg1* 遺伝子を全身で欠損させたマウスは、出生前に死滅するため、卵胞内でのみ本遺伝子の機能を消失させるため、*Nrg1* 遺伝子に目印となる loxP 配列を挿入した遺伝子組み換えマウス（*Nrg1*^{lox/lox} マウス）と卵胞内でのみ loxP 配列を切断する Cre リコンビナーゼを発現する遺伝子導入マウス（*Cyp19a1Cre* マウス）を交配させて、*Nrg1*^{lox/lox};*Cyp19a1Cre* マウスを作成した。本マウスは、交配のタイミングが遅れると妊娠が成立しない表現系を示すことを 2014 年に発表している (Kawashima et al., 2014, Molecular Endocrinology, doi: 10.1210/me.2013-1316)。

（＊３）性腺刺激ホルモン

脳下垂体から分泌され、卵巣や精巣で機能する糖タンパク質ホルモンで、主に卵巣刺激ホルモン（FSH）と黄体化ホルモン（LH）を指す。

（＊４）組織の繊維化

臓器の機能低下を引き起こす構造的変化であり、腎不全や肝機能低下の原因として知られている。傷を修復するために間質細胞がコラーゲンを分泌して修復するが、これが持続的に起こると（慢性炎症状態）、修復後もコラーゲン合成が持続され、繊維化を引き起こすと考えられている。卵巣では、卵胞周囲の間質を構成する細胞内にコラーゲンが蓄積し、平滑筋アクチンが集積して、間質が繊維化していると考えられる。

（＊５）ローレスポンダー

高度生殖補助医療において、体外受精に用いる複数個の卵を得るために、卵胞発育を促す性腺刺激ホルモンを投与する（卵巣刺激を行う）が、その刺激への反応が低く、発達した胞状卵胞が得られない（得られる数が少ない）症例、40 歳以上に多く見られ、そのほとんどで血中 FSH が高値を示す。

（＊６）排卵

発達した胞状卵胞に高濃度の LH が作用することで、卵胞膜が破裂して成熟卵が卵管へと放出される現象。その過程で、様々な炎症系サイトカインが分泌され、速やかに破裂した卵胞膜は修復されることから、排卵は炎症反応であると考えられている。

（＊７）卵巣刺激

一度に多数の卵胞を発達させ、体外受精などに利用する成熟卵を複数得るためのホルモン療法。高度生殖補助医療では、FSH 製剤や LH 様の作用もつ製剤を用いた様々な方法が用いられている。マウスでは、FSH 製剤を投与し、その 48 時間後に LH 作用を有する製剤を投与することで、通常は 40 コ前後の成熟卵が得られる。

（＊８）AMH

アンチミュラーリアンホルモン（または抗ミュラー管ホルモン）の略で、発育過程にある卵胞から分泌されるホルモン。血中 AMH 値が原始卵胞から発育する前胞状卵

胞数を反映すると考えられている。その値は、卵巣内にどれくらい卵の数が残っているか、つまり卵巣の予備能がどれほどかを反映すると考えられている。

【お問い合わせ先】

大学院生物圏科学研究科 教授 島田 昌之 Tel : 082-424-7899 FAX : 082-424-7899 E-mail : mashimad@hiroshima-u.ac.jp

発信枚数：A4版 6枚（本票含む）