

Akt シグナル活性化と Hippo シグナル抑制による 早発卵巣不全患者の新たな不妊治療法の開発

河村 和弘

聖マリアンナ医科大学 産婦人科学/生殖医療センター

はじめに

卵巣内には卵子の源となる原始卵胞が存在する。原始卵胞は胎生期に形成され、その数はピークに達し約700万個となる。しかし、出生後に原始卵胞数は増加せず、加齢とともに減少する。思春期の頃には数十万個の原始卵胞が存在しているが、第1減数分裂前期の休止期にあり、休眠した状態で卵巣内に保存されている。月経発来以降は最大1,000個/周期の原始卵胞が活性化され、休眠状態から脱し発育を開始する。卵巣内の残存原始卵胞数が1,000個以下になると、定期的な卵胞の活性化が停止して卵胞のリクルートが起こらなくなるため、発育卵胞が認められなくなる。その結果、発育卵胞の顆粒膜細胞より分泌されるエストロゲンが欠乏するため子宮内膜の増殖が起こらず、同時に排卵も起こらなくなり、黄体由来のプロゲステロン産生がなくなり閉経となる[1]。

早発卵巣不全 (POI; primary ovarian insufficiency) では、卵巣内の卵胞が急激に減少し、40歳未満で残存卵胞数が1,000個以下となり閉経となる[2]。染色体・遺伝子異常、自己免疫疾患、医原性(卵巣手術、化学療法、放射線療法)などが原因として知られているが、原因不明のものも多い[3, 4]。卵巣性の無月経となるため、下垂体由来のゴナドトロピン (FSH, LH) は高値となる。POIの最も有効な治療法は提供卵子を用いた体外受精胚移植であり、自らの卵子で妊娠することは非常に困難である。しかし、本邦では提供卵子を得ることは難しく、希望する者の多くは海外に渡って提供卵子による治療を受けているのが現状である。

POIの患者が自らの卵子で妊娠するためには、卵子の産生を再生する必要がある。例えば、体細胞よりiPS(induced pluripotent stem cell)細胞などの万能細胞を誘導し、始原生殖細胞を経て卵子を作り出す方法が考えられる。実際、マウスではiPS細胞から卵子を作成し体外

受精にて児の産出に成功した報告がある[5, 6]。また、ヒト卵巣皮質より卵子幹細胞を回収し、重症免疫不全マウスに移植して卵子を作成したという報告もある[7]。しかし、これらにより作成された卵子を不妊治療に用いるには多くの生物学的な検証が必要である。また、倫理的にも十分な議論が必要であり、実際に臨床応用されるまでには相当な時間を要すると考えられる。

われわれは、POI患者の卵巣に残存している卵胞を人為的に活性化し、卵胞を発育させて卵子を得る方法(IVA; in vitro activation)を開発した。本稿では、われわれが開発したIVAについて、その分子基盤とともに概説する。

原始卵胞の人為的活性化

休眠した状態で卵巣内に保存されている多数の原始卵胞のうち、一部の選択されたものが定期的に何らかのトリガーとなる刺激を受けて活性化する。最近われわれと他のグループは、卵胞活性化を制御する機構としてPhosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt-Forkhead box O3 (Foxo3)シグナル経路が重要な役割を果たすことを明らかにした[8-12]。PTEN欠損マウスは胎生致死であるが、PTENの卵子特異的な欠損マウスでは、原始卵胞が自発的に活性化して一斉に卵胞発育を開始する。その結果、卵巣は腫大し多数の発育卵胞が認められるようになるが、卵巣内の原始卵胞プールは早期に枯渇してしまい、16週齢ですでに卵巣内に卵胞を認めず、ヒトのPOIに似た表現型を呈する[8-10]。Foxo3欠損マウスもPTEN欠損マウスと全く同様の卵胞の自発的活性化とPOIに類似した表現型を最終的に呈する[11]。卵巣内の卵胞が原始卵胞のみで構成されている生後3日目のマウス卵巣を用いて、PTEN抑制剤およびPI3K活性化剤で一過性に処理したところ、PTEN、Foxo3遺伝子欠損マウスと同様に、原始卵胞が活性化して発育を開始した[12]。また、良性卵巣腫瘍の患者の摘出卵巣の正常部分を用いて作製した卵巣断片に対して、PTEN抑制剤による一過性処理を行うことで、原始卵胞が活性化されるこ

連絡先：河村和弘、聖マリアンナ医科大学産婦人科学
〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1
TEL：044-977-8111 (内線3327)
FAX：044-977-2944
E-mail：kazuhironanami@gmail.com

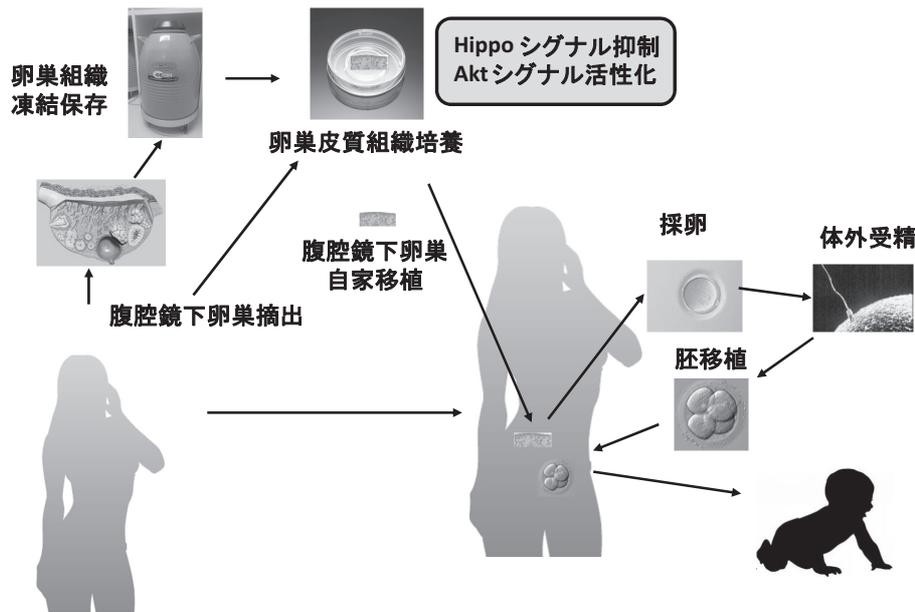


図1 IVAの概要

とも示した [12]. さらに、生後3日目のマウス卵巣に PTEN 抑制剤および PI3K 活性化剤による卵胞活性化を行った後、成体マウスの腎皮膜下に移植した。成体マウスの卵巣を摘出して内因性ゴナドトロピンレベルを上昇させ、さらに FSH を投与して卵胞発育を促進させたところ、移植後18日目に排卵前卵胞まで発育し、hCG 投与により成熟卵子を得ることができた。この成熟卵子を用いて体外受精を行い、胚を偽妊娠マウスに移植したところ、正常な児を得ることに成功した [12]。この手法で得られた成熟卵子に対して、代表的なインプリング遺伝子である *Igf2r*, *Lit1*, *H19* 遺伝子のメチル化解析を行ったところ、正常な遺伝子刷り込みを有しており、紡錘糸を含めた構造上の異常も認められなかった [12]。われわれはさらに、上記のヒト卵巣断片に対して PTEN 抑制剤による原始卵胞の活性化を行い、重症免疫不全マウスの腎皮膜下に移植した。マウスの卵巣を摘出して内因性ゴナドトロピンレベルを上昇させ、さらに FSH を投与して卵胞発育を促進させたうえで、ヒト原始卵胞が排卵前卵胞に到達すると考えられる6ヵ月後に、腎皮膜下に移植した卵巣を摘出した。PTEN 抑制剤処理を行った卵巣に多数の大きな胞状卵胞を認め、成熟した卵子を得ることができた [12]。

これらの知見から、卵巣内の原始卵胞は、phosphatase with TENsin homology deleted in chromosome 10 (PTEN) による PI3K-Akt 経路の抑制により活性化が停止し休眠した状態にあると考えられる。この状態で未だ不明の活性化シグナルが選択された原始卵胞に作用する

と、PTEN による PI3K-Akt 経路の抑制が解除されるか、または PTEN の抑制作用を上回る PI3K-Akt 経路の活性化が生じる。Foxo3は核内で細胞周期を停止して原始卵胞が活性化するのを抑制しており、そこに PI3K-Akt 経路のシグナルが伝わると Foxo3は核外移行してその機能を失う。その結果、休眠状態にあった原始卵胞が活性化すると考えられる。現在のところ、多数の原始卵胞の中から一部の活性化する原始卵胞が選択される機構については不明である。

IVA の臨床応用

POI 患者に対する自らの卵子による不妊治療として、これまで種々のホルモン療法、排卵誘発などが行われてきたが、その効果は限定的であり、新たな不妊治療法の開発が待たれていた。われわれは動物実験にて IVA の安全性を十分確認した後、この技術を臨床応用して POI 患者が自らの卵子で妊娠できる新たな不妊治療を、倫理委員会の承認と患者の同意の下に行った (図1) [13]。本法の有効性・安全性に関しては他のグループも追試により確認している [14]。IVA による POI 患者の不妊治療は以下の手順により実施する。

A) 腹腔鏡下卵巣摘出：

患者への侵襲を最小限にし、次の卵巣移植手術に備えて術後の腹腔内癒着を最小限にするため、腹腔鏡下手術により卵巣摘出を行う。移植部位は卵管漿膜下としており、卵巣摘出時の止血の際には卵巣および卵管にパ

ワーソースのダメージが及ばないように留意する。

B) 卵巣組織凍結，残存卵胞組織検査：

摘出した卵巣から髓質を除去し，卵胞が局在している皮質部分のみとする。卵巣皮質組織の約10%を固定して薄切標本とし，組織学的検索を行って残存卵胞の有無を確認する。必要に応じて卵巣を凍結保存する。凍結方法としてはガラス化法を用いている。

C) 卵巣皮質組織培養：

卵巣皮質組織を1～2 mm 大の小断片に細切し，cell culture insert 上に静置し，PTEN 抑制剤および PI3K 活性化剤を用いて48時間培養を行う。

D) 卵巣自家移植：

培養終了後に卵巣組織を十分に洗浄し，腹腔鏡下に卵巣移植を行う。移植部位としては，血流が豊富で経腔超音波により観察しやすく採卵手技が容易である卵管漿膜下を選択している。

E) 卵胞発育モニター，体外受精胚移植：

卵巣移植後は，ホルモン検査（LH, FSH, E2）および経腔超音波検査を行い，卵胞発育を約2週間毎に調べる。適宜エストロゲン補充下に rFSH/hMG による卵巣刺激を行う。卵胞が発育した際には，通常の体外受精と同様の方法で採卵可能である。成熟卵子が得られた場合は，媒精または顕微授精により受精させる。長期間の低エストロゲン状態により，着床に重要な子宮環境が不良であることが多いため，胚をガラス化法によりいったん凍結保存する。融解胚移植は十分なホルモン補充周期下に子宮の状態を詳細に確認したうえで行う。

論文公表時の成績を以下に示す。POI 患者37名（平均年齢 37.2 ± 4.6 歳，平均無月経期間 5.9 ± 5.0 年）に卵巣摘出を行い，組織学的検査により20名で残存卵胞が確認できた。移植後9/20名に卵胞が発育し，7/9名に成熟卵子を採卵することができた。組織学的検査にて残存卵胞を認めなかった17名に対しても IVA を施行したが，すべての症例で1年間の観察期間中に卵胞発育を認めなかった。5名に胚移植を行い，3名が妊娠した。1名は妊娠初期に流産となったが，2名は順調に妊娠が経過し，それぞれ3,254g の男児，2,970g の女児を出産した[13]。

Hippo シグナル抑制による2次卵胞発育誘導

ヒトの原始卵胞は，排卵前卵胞まで発育するには6ヵ月の期間を必要とする [13, 15] ことから，IVA 後の卵胞発育は卵巣移植後6ヵ月を経過してから起こると予測していた。しかし，移植後1ヵ月以内に発育した症例が複数認められ，その原因として原始卵胞のみならず残存

していた2次卵胞が IVA により発育したと考えられ，そのメカニズムの解明を行った。さまざまな探索を行い，最終的に Hippo シグナルの関与を見出した。

Hippo シグナルは細胞の増殖や生存を制御しながら臓器の大きさを規定する重要な細胞内シグナルであり，細胞同士の接着の障害や細胞骨格の変化により不活性化する [16-18]。通常はエフェクタータンパクである YAP (Yes-associated protein) は Hippo シグナルによりリン酸化され細胞質内に存在しているが，Hippo シグナルが抑制されると，YAP は非リン酸化型となり核内へ移行し，核内転写因子である TEAD と共役して CCN 成長因子などを産生し，細胞増殖や血管新生などが起こる [16, 19]。IVA では，卵巣を1～2 mm 大に細切するため，この Hippo シグナルの抑制が起こり顆粒膜細胞が増殖して卵胞が発育すると想定した。

マウスおよびヒトの顆粒膜細胞における Hippo シグナル関連遺伝子の発現を調べたところ，すべての Hippo 関連遺伝子が発現していた。また，卵巣の小断片化により Hippo シグナルが抑制され，顆粒膜細胞における YAP の核内移行と，引き続き CCN 成長因子の増加が認められた。一方，CCN 成長因子は卵巣組織培養下で，卵巣断片化と同様の2次卵胞の発育を促進する作用を示した。これまで，細胞骨格の1つであるアクチンの重合が Hippo シグナルを抑制することが報告されていた [20, 21]。われわれは，マウス卵巣の断片化により，一時的なアクチンの重合が起こり，Hippo シグナルが抑制されることを示した。以上から，卵巣小断片化による2次卵胞発育の分子機序として，卵巣の小断片化によりアクチン重合が起こり，その結果 Hippo シグナルが抑制され，YAP の核移行が起こり，CCN 成長因子が産生され卵胞が発育する機構が考えられた。

おわりに

われわれの開発した IVA が適応となるのは，残存卵胞が存在する POI 患者である。しかし，残存卵胞の存在を摘出卵巣の組織学的検査以外に判断できる優れた方法はない。実際，これまでの卵巣を摘出し組織検査を行った患者のうち，半数近くの POI 患者で残存卵胞を認めなかった。そこで現在，残存卵胞の有無を判定することが可能な血中バイオマーカーの同定とその超高感度測定法の確立を目指し研究を進めている。このバイオマーカー測定により，術前に適応を確定することができると期待している。

謝 辞

本研究は日本学術振興会（科学研究費補助金基盤研究B：24390376，新学術領域研究：26114510，科学研究費基金挑戦的萌芽研究：24390376），喫煙科学研究財団，武田科学振興財団の援助を受けました。

引用文献

1. Macklon NS, Fauser BC (1999) Aspects of ovarian follicle development throughout life. *Horm Res* 52, 161-170.
2. Coulam CB, Stringfellow S, Hoefnagel D (1983) Evidence for a genetic factor in the etiology of premature ovarian failure. *Fertil Steril* 40, 693-695.
3. Nelson LM (2009) Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 360, 606-614.
4. De Vos M, Devroey P, Fauser BC (2010) Primary ovarian insufficiency. *Lancet* 376, 911-921.
5. Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M (2012) Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 16, 971-975.
6. Hayashi K, Saitou M (2013) Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 8, 1513-1524.
7. White YA, Woods DC, Takai Y (2012) Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med* 18, 413-421.
8. Reddy P, Liu L, Adhikari D, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hämäläinen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K (2008) Oocyte-specific deletion of *Pten* causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, 319, 611-613.
9. John GB, Gallardo TD, Castrillon DH (2008) *Foxo3* is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Dev Biol* 321, 197-204.
10. Adhikari D, Liu K (2009) Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev* 30, 438-464.
11. Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA (2003) Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor *Foxo3a*. *Science* 301, 215-218.
12. Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, Duan EK, Hsueh AJ (2010) Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 10280-10284.
13. 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 (2013) Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 17474-17479.
14. Adhikari D, Gorre N, Risal S, Zhao Z, Zhang H, Shen Y, Liu K (2012) The Safe Use of a PTEN Inhibitor for the Activation of Dormant Mouse Primordial Follicles and Generation of Fertilizable Eggs. *PLoS One*, 7, e39034.
15. McGee EA, Hsueh AJ (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21, 200-214.
16. Pan D (2007) Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev* 21, 886-897.
17. Halder G, Johnson RL (2011) Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 138, 9-22.
18. Hergovich A (2012) Mammalian Hippo signalling: a kinase network regulated by protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans* 40, 124-128.
19. Holbourn KP, Acharya KR, Perbal B (2008) The CCN family of proteins: structure-function relationships. *Trends Biochem Sci* 33, 461-473.
20. Sansores-Garcia L, Bossuyt W, Wada K, Yonemura S, Tao C, Sasaki H, Halder G (2012) Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO J* 30, 2325-2335.
21. Fernandez BG, Gasoar P, Bras-Pereira C, Jezowska B, Rebelo SR, Janody F (2012) Actin-Capping Protein and the Hippo pathway regulate F-actin and tissue growth in *Drosophila*. *Development* 138, 2337-2346.