

mTOR 阻害剤による卵巣予備能温存法の開発

佐藤 可野, 河村 和弘

国際医療福祉大学医学部産婦人科高度生殖医療リサーチセンター

はじめに

先進国では近年初産年齢が高くなっている。しかし年齢とともに卵胞数と卵子の質の両方が低下し、不妊症の割合が高くなる。高齢女性における卵子の質の低下の主な原因は、減数分裂中の異常な染色体分離が原因であると考えられており、初期胚の異数性の増加につながっている¹⁾。さらに、ゴナドトロピン治療に対する卵巣の反応も卵巣予備能の低下により年齢とともに低下する²⁾。したがって、将来の妊娠を希望する女性にとって加齢に伴う卵巣予備能の低下を遅らせることにより、卵巣の残存卵胞を維持する方法を確立することが重要だと考えられる。

われわれは以前、PI3K/Akt 経路の刺激が原始卵胞活性化を誘導することを報告し³⁾、卵巣断片を Akt 製剤で処理し卵胞発育を誘導することを示した。この方法を用いて早発卵巣不全 (POI) の不妊患者に「in vitro activation (IVA) 法」として臨床応用している⁴⁾。しかし、これらの治療法は残存卵胞の活性化による卵胞発育を誘導するため、残存卵胞が存在しない場合、有用ではない。そこで本研究では、残存卵胞の維持を目的とした卵巣予備能の維持に関する治療法の開発を行った。

近年になり、PI3K の下流でもある mTOR が原始卵胞の活性化に関与していることが報告された⁵⁾。そこで、われわれは mTOR 阻害剤としてよく知られ、既に臨床応用されているラパマイシンに着目した。ラパマイシンはマウスの寿命延長を促進することが知られている mTOR 阻害剤であり⁶⁾、卵巣予備能を維持し早期の卵巣機能不全を予防することが報告されている⁷⁾。また、ラパマイシンは化学療法による卵巣損傷を予防することも報告され⁸⁾、さらに化学療法と組み合わせると mTOR 阻害剤を投与された動物の産仔数は、化学療法のみを投与されたマウスよりも多かった⁹⁾ことも示されている。しかしながら、ラパマイシン投与後の卵子の質は解析されて

おらず、ヒト卵胞発育に対するラパマイシンの作用の報告はない。そこで、本研究ではラパマイシンの休眠原始卵胞維持能についてさらなる調査を行った。

実験概要

本研究における実験概要を図1に示した。まずは、ラパマイシンを3週間投与したマウスの卵巣機能について評価を行った。そして次にラパマイシンを投与した後、マウスの卵胞発育期間である3週間休薬したマウスの卵巣機能について評価を行った。さらに、ラパマイシンの卵子の質への影響を調べた。最後にヒト卵巣を断片化したものを SCID マウスの腎被膜下に移植し、移植後のマウスにラパマイシンを投与することでヒト卵巣に対するラパマイシンの卵胞数温存効果について検証を行った。

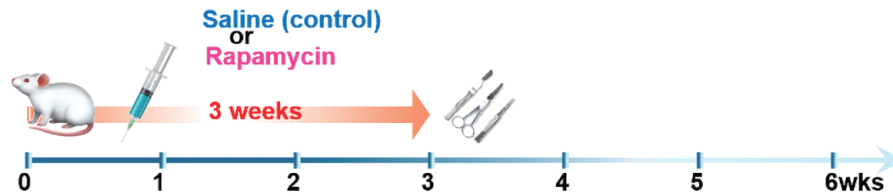
ラパマイシン投与マウスの卵巣機能評価

まず、ラパマイシン (15 mg/kg body weight) を卵胞発育期間である3週間マウスに投与し、その後の卵巣機能の評価を行った。まず、ラパマイシンによる mTOR シグナルが阻害できていることを確認した後、ラパマイシン投与で休眠原始卵胞が維持されているかを組織学的に解析し、投与後に得られた卵子の体外授精・胚移植を行い、投与マウスから得られた卵子の質について検証を行った。

ラパマイシン投与により、マウス卵巣において mTOR の下流であるリン酸化 S6K の発現が減少したことが示され (図2A)、ラパマイシンによる mTOR 抑制がおきていることを確認した。そこでラパマイシン投与後の卵巣を HE 染色した後、各発育段階の卵胞数を計測したところ、コントロールと比較するとラパマイシン投与により原始卵胞数が有意に高値を示し、後期発育卵胞が減少していることが明らかになった (図2B, D)。また FOXO3 は核内で転写因子として細胞周期を停止させ、原始卵胞を休眠状態に維持しているが、核外に移行すると原始卵胞が活性化される。ラパマイシン投与群のマウス卵巣で FOXO3 の免疫染色を行うと、ラパマイシン投

連絡先：佐藤可野 国際医療福祉大学医学部産婦人科
高度生殖医療リサーチセンター
〒286-8520 千葉県成田市公津の杜4-3
TEL：0476-20-7701
FAX：0476-20-7702
E-mail：yorinos@yahoo.co.jp

Ex. 1 ラパマイシン投与マウスの卵巣機能評価



Ex. 2 ラパマイシン投与後3週間休薬したマウスの卵巣機能評価



Ex. 3 ヒト卵巣片の卵巣機能維持評価

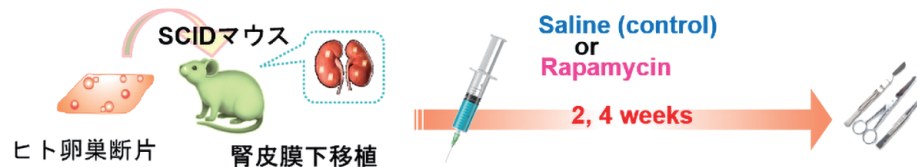


図1 本研究の概要

与群では FOXO3 が核内に認められ、原始卵胞が休眠状態であることが示された (図 2 C)。さらに過排卵処理後に排卵数を計測したところ、投与群において排卵卵子が有意に減少することが示された (図 2 E)。このことからラパマイシンにより休眠原始卵胞が温存されていることが示された。

次に、ラパマイシン投与マウスから得られた卵子の質について検証するため、体外授精と胚移植を行った。投与後に得られた卵子の体外授精率および胚盤胞到達率は有意さが認められなかった。これらを胚移植して得られた産仔について、体重と胎盤重量は正常性であり、これまで形態学的異常や生殖能力は正常であることを確認している。これらのことからラパマイシンを投与したマウスから得られた卵子の質は正常であると考えられる (図 3)。

ラパマイシン投与後に休薬したマウスの卵巣機能評価

次にラパマイシンにより活性化が抑制されていた休眠原始卵胞は、休薬することで正常に卵胞発育を再開するかを調べた。ラパマイシンを投与した後、休眠原始卵胞から排卵前卵胞までの期間である 3 週間、ラパマイシン投与を休止したマウスの卵巣機能について、このマウスの排卵数の減少が回復するかを調べた。

ラパマイシン投与後に 3 週間休薬したマウスでは、ラパマイシン投与で低下した排卵数が正常に戻ることが明らかになった。また得られた卵子の受精率、胚盤胞到達率は正常であった。この結果は休薬により mTOR の抑制が解除され、卵胞発育が再開したことで排卵数が正常に回復し、ラパマイシン自体は卵子の質に影響を与えないことが明らかとなった (図 4)。

ヒト移植卵巣片の卵巣機能評価

ヒト卵巣に対するラパマイシンの卵胞発育抑制効果を調べるため、ヒト移植卵巣断片の卵巣機能について評価を行った (図 5 A)。患者の同意が得られた凍結卵巣組織片を融解した後、1 mm 角に細切したものを SCID マウスの腎被膜下に移植した。このヒト卵巣断片を移植した SCID マウスにラパマイシンを投与し、その後の卵巣断片について評価を行った。2, 4 週間後に移植した卵巣断片を回収した後、HE 染色の組織標本を作製して卵巣断片中の全卵胞数を計測し、発育ステージを調べた。コントロール群では時間毎に発育卵胞が増加し原始卵胞数が減少していたが、ラパマイシン投与群では卵胞発育が抑制され、原始卵胞数が維持されることが明らかになった (図 5 B)。またこれらの卵胞はコントロールと比較して形態学的に異常は認められない (図 5 C)。

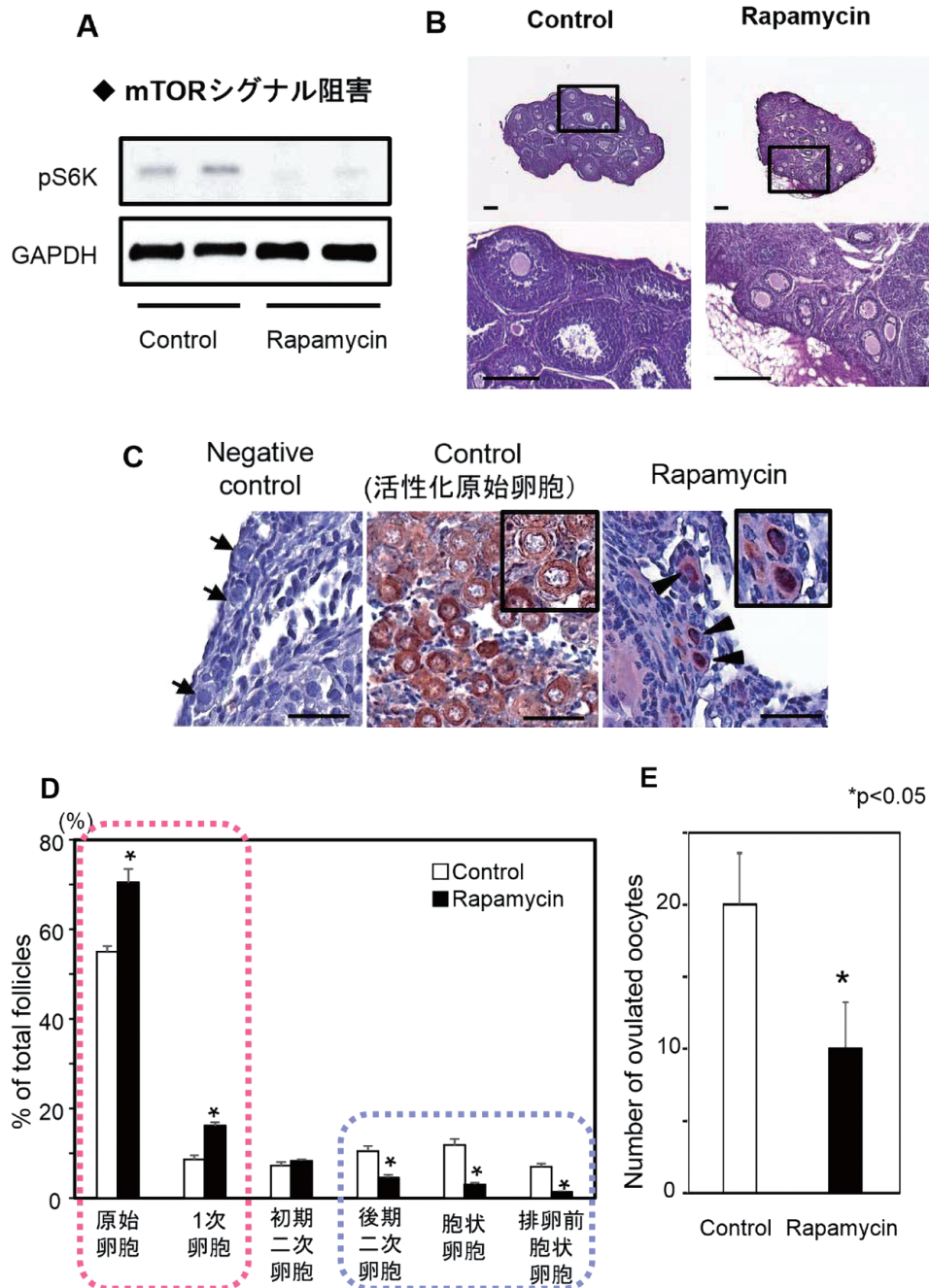


図2 ラバマイシン投与における原始卵胞活性化の抑制

A: mTOR 経路の下流タンパク質である S6K のリン酸化

ラバマイシンおよび対照群を21日齢雌マウスに3週間腹腔内投与した後に卵巣を摘出し、ウエスタンブロッティング解析を行った。

B: ラバマイシン投与後の卵巣組織像 Bar: 200 μ m

C: ラバマイシン投与後の卵巣 Foxo3免疫染色像

左: 対照群, 中央: 10日齢マウス卵巣, 右: ラバマイシン投与マウス卵巣, Bar: 50 μ m.

D: ラバマイシン投与マウスの各発育卵胞数の変移 *P<0.05 vs. control

E: ラバマイシン投与マウスの過排卵処理による排卵卵子数の変化 *P<0.05 vs. control

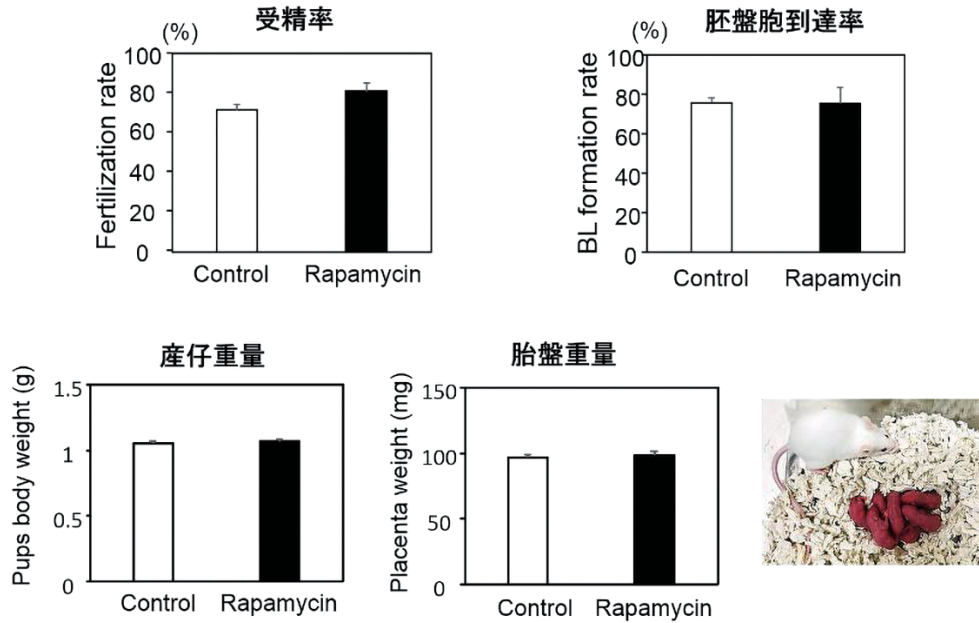


図3 ラバマイシン投与マウスから得られた卵子の質
 ラバマイシン投与マウスから得られた卵子は体外授精後に正常な胚発育を示し、胚移植後に得られた産仔の正常性が確認できた。受精卵をKSOM中で培養し胚盤胞期胚まで培養し、受精率、胚盤胞到達率を算出した。さらに胚移植後に得られた産仔の体重および胎盤重量を計測した。 *P<0.05 vs. control

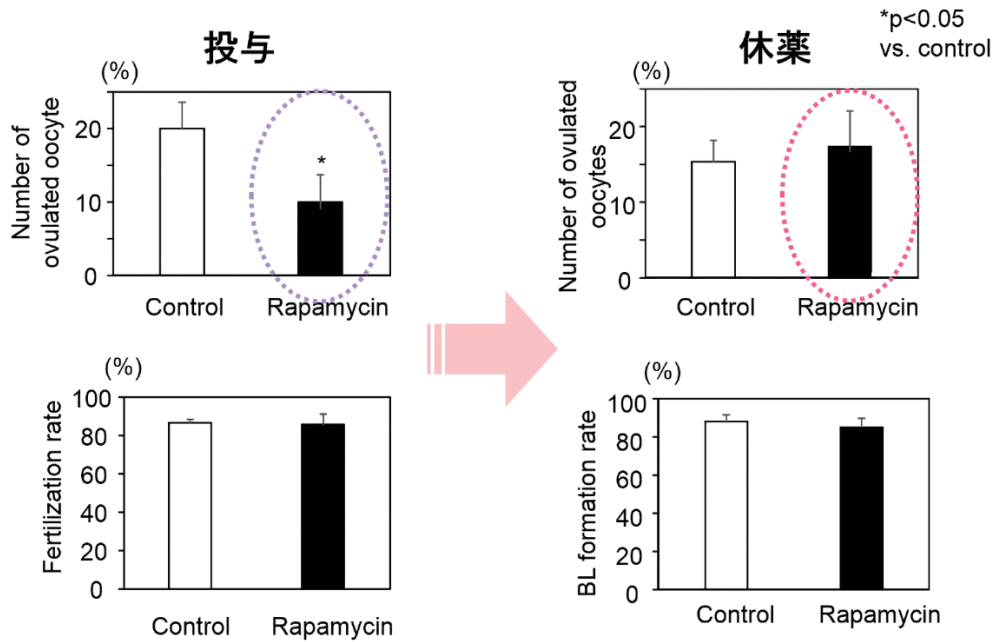
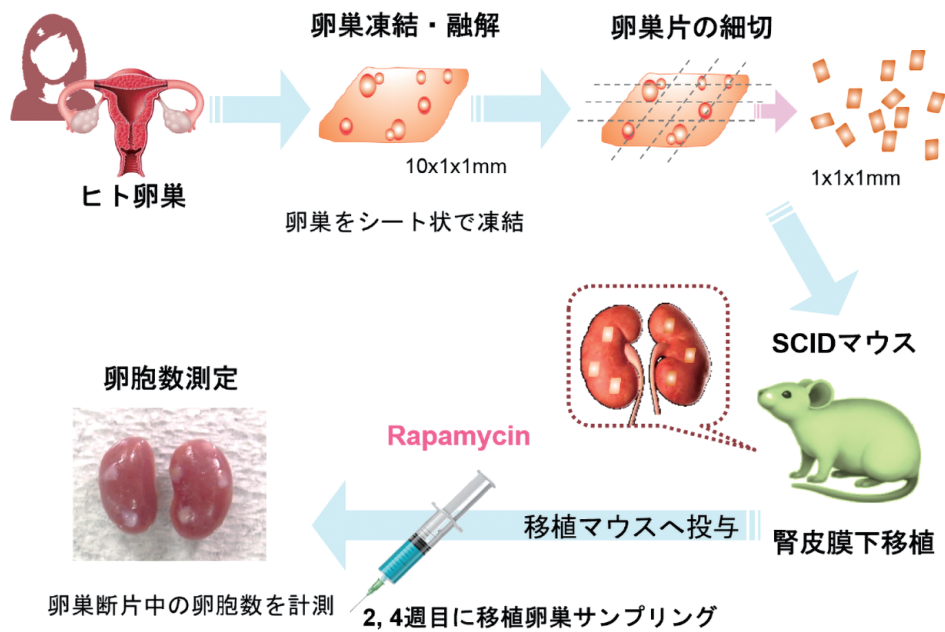
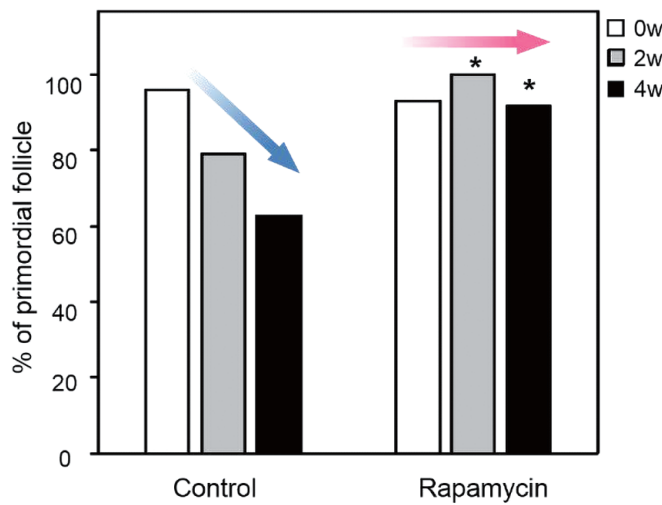


図4 ラバマイシン投与により減少した排卵数のラバマイシン投与休止による変化
 ラバマイシン投与後に卵胞発育期間である3週間ラバマイシンを休薬した後、過排卵処理を施し排卵数を計測した。 *P<0.05 vs. control

A ヒト移植卵巣片の卵巣機能維持評価



B



C



図5 ヒト移植卵巣片における原始卵胞数の維持

A: ラパマイシン投与によるヒト残存原始卵胞の休眠状態の維持を評価するための実験概要

卵巣機能不全の患者から卵胞活性療法の際に得られたヒト卵巣皮質のシート (10×10×1 mm) を1 mm 角に細切した後、SCID マウスの腎臓被膜下に移植した。その後ラパマイシンを投与し、2、4 週間後に卵巣片を摘出し HE 染色後に全卵巣片中の卵胞数を計測した。

B: ラパマイシン投与後のヒト卵巣片における原始卵胞数の変移。

C: ラパマイシン投与における原始卵胞の形態。 Bar: 50 μm.

終わりに

今回、mTOR 阻害剤であるラパマイシンを用いてマウス卵巣内の原始卵胞の活性化が抑制されるかを検討した。ラパマイシン投与群ではコントロールと比較して原始卵胞数が有意に高値となり、排卵数が減少した。また、受精率、胚盤胞到達率は影響がなく、胚移植により正常な産仔を得ることができた。ラパマイシンを休薬すると抑制されていた原始卵胞の卵胞発育が再開し、排卵数が回復した。そして、SCID マウスにヒト卵巣断片を腎被膜下移植した実験により、ラパマイシン投与はヒト休眠原始卵胞も温存することが明らかになった。以上から、ラパマイシンは卵子の質に影響を及ぼすことなく、原始卵胞の活性化を抑制することが示された。さらに休薬すれば原始卵胞の活性化が再開し、排卵数も回復することが明らかになった。

先述したように、卵巣内の卵子は加齢や病的原因により減少する。その結果、排卵障害による不妊を引き起こす。本研究の成果から、将来的には高齢不妊や早発卵巣不全に対して mTOR 阻害剤を用いて原始卵胞の活性化を抑制し、卵巣内の卵胞数を温存する治療が可能になると考えられる。今後はより安全な mTOR 阻害剤の探索を行い、卵胞温存療法のさらなる改善を試みる。

謝 辞

本稿は、令和 2 年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究内容をまとめたものであり、本稿を執筆する機会を与えてくださいました日本生殖内分泌学会理事 杉野法広教授、第25回学術集会会長 伊藤潔教授ならびに本誌編集委員の先生方に心から感謝申し上げます。

引用文献

1. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC (2009) Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev*, 30, 465-493.
2. Wilkosz P, Greggains GD, Tanbo TG, Fedorcsak P (2014) Female reproductive decline is determined by remaining ovarian reserve and age. *PLoS One*, 9, e108343.
3. 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.
4. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho C H, 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.
5. Adhikari D, Liu K (2010) mTOR signaling in the control of activation of primordial follicles. *Cell cycle (Georgetown Tex.)* 9, 1673-1674.
6. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA. (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460: 392-395.
7. Dou X, Sun Y, Li J, Zhang J, Hao D, Liu W, Wu R, Kong F, Peng X, Li J (2017) Short-term rapamycin treatment increases ovarian lifespan in young and middle-aged female mice. *Aging Cell*, 16: 825-836.
8. Zhou L, Xie Y, Li S, Liang Y, Qiu Q, Lin H, Zhang Q (2017) Rapamycin Prevents cyclophosphamide-induced Over-activation of Primordial Follicle pool through PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in vivo. *Journal of ovarian research*, 10: 56.
9. Goldman KN, Chenette D, Arju R, Duncan FE, Keefe DL, Grifo JA, Schneider RJ (2017) mTORC1/2 inhibition preserves ovarian function and fertility during genotoxic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114: 3186-3191.