

## 早発閉経に対する新たな不妊治療「卵胞活性化療法」の開発と臨床応用

聖マリアンナ医科大学医学部産婦人科学 准教授 河村 和弘

### はじめに

卵巣内の卵胞は加齢と共に減少するが、卵巣内の卵胞が急激に減少し、40歳未満で卵胞が発育しなくなり閉経する早発閉経（POF; premature ovarian failure）または早発卵巣不全（POI; primary ovarian insufficiency）と呼ばれる疾患が存在する。POFは全女性の100人に1人に自然発生し、排卵がおこらないため、難治性の不妊となる。これまで高齢による卵巣機能不全やPOF患者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った。このような患者が自らの卵子で妊娠することを可能とするため、卵巣内に残存する体内では発育不能な卵胞に着目し、それを人為的に活性化して発育を誘導する方法を開発してきた。その結果、卵胞活性化療法（IVA: in vitro activation）という新たな不妊治療法を開発し、2013年に世界初のIVAによるPOF患者の妊娠・出産例を報告した。ここでは、IVAに関する一連の研究成果を紹介する。

**Key words** : 早発閉経、卵胞活性化、PI3K、PTEN、Hippo

### POFの病態

卵巣内には胎児期に形成された原始卵胞が、休眠した状態で保存されており、出生後は少なくとも体内においては再形成されないため、加齢により休眠原始卵胞数は減少する。POFの原因は、染色体異常、自己免疫疾患、医原性（卵巣手術、抗がん剤・放射線治療）など多岐にわたるが<sup>1)</sup>、主要な病態は共通であり、卵巣内の残存卵胞が生理学的なレベルを超えて急激に減少することにある。その結果、残存している休眠原始卵胞数は閉経期のレベルまで減少し、ある限界値（約1,000個）まで到達すると月経毎の定期的な休眠原始卵胞の活性化がおこらなくなり、卵胞のリクルートが停止して発育卵胞が消失する。そのため排卵がおこらず、非常に難治性の不妊を呈する。

POFは全女性の100人に1人に自然発生し、疫学的には近年増加はしていない。しかし、我が国の晩婚化の傾向により、これまではPOFを発症する前に妊娠出産を済ませてきたため問題にならなかった女性達が、今後はPOF

が顕在化して不妊治療を望む件数が増加することが懸念される。このような POF 患者に対して、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、患者が自らの卵子で妊娠するためには新たな不妊治療法の開発が必要であった。

## IVA の開発

卵胞発育はゴナドトロピンの依存性により三つの段階に分類される。第1段階は、原始卵胞から前胞状卵胞に至るまでの期間であり、この時期はゴナドトロピン非依存性に卵胞が発育する。この時期では、休眠原始卵胞が不明のシグナルにより活性化されて1次卵胞へと発育し、1次卵胞から前胞状卵胞まで発育する。この間の卵胞発育には卵巣の局所因子が重要であり、その1つとして c-type natriuretic peptide を同定した<sup>2)</sup>。しかし、このような因子を用いても、卵胞発育の最初の過程である休眠原始卵胞の活性化が障害されている卵巣機能不全においては、根本的な解決には至らない。新たな治療法の開発には、残存卵胞の減少により体内では殆どおこらない原始卵胞の活性化を、強制的に行う方法を確立する必要があった。

これまで原始卵胞活性化のシグナルは確定されていなかった。また、多数の休眠原始卵胞からごく一部の卵胞が選択され活性化がおこる分子基盤も不明であった。我々と他のグループは、原始卵胞活性化に関与する機構として PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)-Akt-Foxo3 (Forkhead box O3) 経路が重要な役割を果たしていることを見出した。Foxo3 は核内で細胞周期を停止して原始卵胞が活性化することを抑制している。そこに PI3K-Akt シグナルが伝わると Foxo3 は核外に移行しその抑制機能を失う。その結果、休眠状態にあった原始卵胞が活性化するのである。この PI3K-Akt のシグナルは PTEN (phosphatase with TENsin homology deleted in chromosome 10) により負に制御されており、PTEN による PI3K-Akt 経路の抑制により卵胞の活性化が停止している。この状態で何らかの活性化開始シグナルが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 による抑制作用を上回る PI3K-Akt の活性化が生じ、Foxo3 の不活性化がおきて原始卵胞が活性化して発育を開始する<sup>3-7)</sup>。

さらに我々は、この卵胞活性化の方法を開発した際に、卵巣の断片化が初期卵胞の発育を促進することも見出した。Hippo シグナルは細胞増殖や生存を制御するシグナルであり、細胞同士の接着が障害されると不活性化する。通常はエフェクタータンパクである YAP (Yes-associated protein) は Hippo シグナルにより核移行が抑制されているが、組織・細胞が破壊されると Hippo シグナルが抑制され、YAP は核内へ移行し核内転写因子である TEAD と共役し

て CCN 成長因子や抗アポトーシス因子などの産生を促進し、細胞増殖がおり組織が修復される。卵巣を断片化すると Hippo シグナルが抑制され、顆粒膜細胞の核内への YAP の移行と、引き続く CCN 成長因子の急増と BIRC アポトーシス抑制因子の発現増加が認められた。一方、CCN 成長因子は卵巣組織培養において卵巣断片化と同様の 2 次卵胞発育促進効果を示した。これらの結果から、卵巣断片化により Hippo シグナルが抑制され、YAP による核内転写活性が高まり、成長因子である CCN ファミリーの発現が急増して卵巣顆粒膜細胞が増殖し卵胞発育が促進されることが明らかになった<sup>4-9)</sup>。

この PI3K-Akt シグナルの活性化と卵巣断片化による Hippo シグナルの抑制を同時に行うことで、原始卵胞を活性化させつつ、2 次卵胞の発育も誘導することができる。実際、マウスでは、PI3K-Akt シグナルの活性化と Hippo シグナルの抑制をそれぞれ単独で用いるよりも、同時に行った場合により多くの胞状卵胞が得られた<sup>4-9)</sup>。

### 卵胞活性化療法の臨床応用

これらの基礎研究の成果から、PI3K 活性化剤および PTEN 抑制剤を用いて休眠原始卵胞を活性化する方法を考案し、マウス卵巣を用いた基礎研究を行い、卵巣組織の体外培養下で PI3K 活性化剤および PTEN 抑制剤を作用させることで原始卵胞の人為的活性化に成功した<sup>3-7)</sup>。その後、倫理委員会の承認と患者の同意の下、ヒト卵巣皮質に対して、PTEN 抑制剤を用いた体外組織培養による橋渡し研究を実施し、ヒト原始卵胞の活性化にも成功した<sup>3-7)</sup>。さらに、動物実験により、本法の安全性を十分確認した後、本法を卵胞活性化療法 (IVA: *in vitro* activation) と名付け、POF 患者に対し臨床応用を開始した (図 1)。

本臨床試験では、始めに腹腔鏡手術により卵巣を摘出する。手術中に留意すべきことは、止血の際に卵巣自身および移植先となる卵管に熱凝固のダメージが伝わらないようにすることである。実際、POF 患者の卵巣は血流が悪いため、電気凝固をほとんど要さず卵巣摘出を施行できる。POF 患者の卵巣内に残存している可能性のある初期卵胞は卵巣表面から 1-2mm 以内の厚さの卵巣皮質に局在していることから、摘出した卵巣の髓質部分を切除し、卵巣皮質のみの組織を準備する。これを 1 x 1 cm<sup>2</sup>、1-2mm 厚に切離し、それぞれの卵巣皮質断片の約 10%の組織を組織検査用に切離する。組織検査用組織はブアン液で固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、顕微鏡下に組織内の各発育段階の残存卵胞を検出する。Hippo シグナルの抑制のため、摘出卵巣皮質を 1-2mm 四方に小断片化する。その後、前述の PI3K 活性化剤および PTEN 抑制剤を用いて 48 時間組織培養を気相液層界面培養法にて行い、PI3K-

Akt シグナルを活性化させる (図 2)。また未婚症例などでは、卵巣組織をガラス化法にて凍結保存し、婚姻後に卵巣組織移植が可能となった時点で 2-3 片の卵巣組織断片を融解し、卵巣組織培養を行うことも可能である。

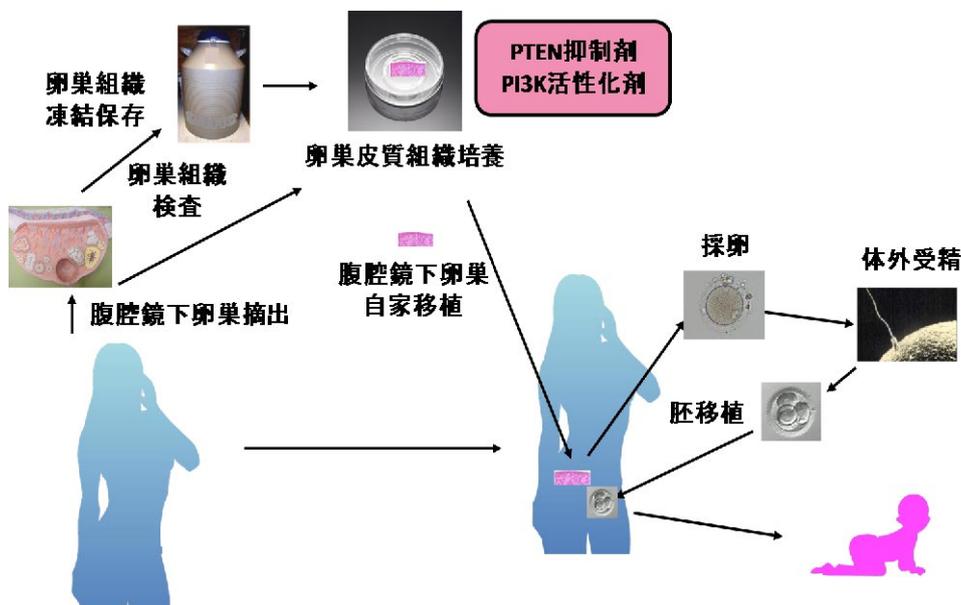


図 1 卵胞活性化療法の概要  
文献 8 より引用・改変

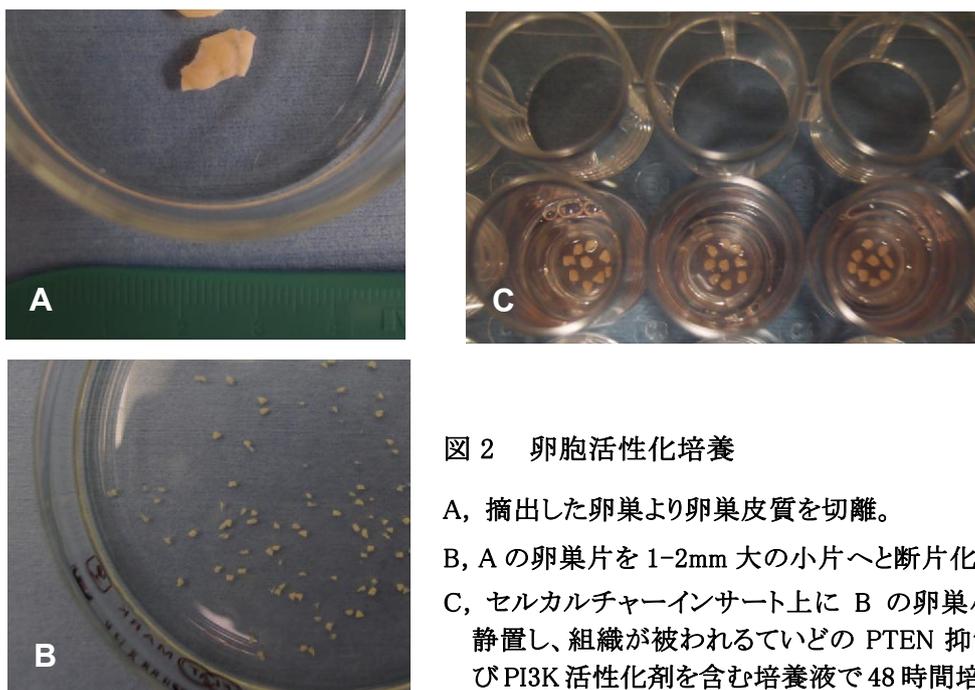


図 2 卵胞活性化培養

- A, 摘出した卵巣より卵巣皮質を切離。
- B, A の卵巣片を 1-2mm 大の小片へと断片化する。
- C, セルカルチャーインサート上に B の卵巣小断片を静置し、組織が被われるほどの PTEN 抑制剤および PI3K 活性化剤を含む培養液で 48 時間培養する。

培養後、薬剤を体内に持ち込まないように、培養した卵巢組織を十分に洗浄し、腹腔鏡下に卵管漿膜下に移植する。卵管漿膜に小切開をおき、切開創を広げないように留意しながら、漿膜を卵管から剥離して空隙を作製する。その空隙に卵巢小断片を20-30個挿入し、漿膜を縫合またはインターシードで被包する(図3)。卵管漿膜下を移植部位に選んだ理由として、(1)血流が豊富で移植組織の血管新生に有利である、(2)経腔超音波による卵胞発育モニターが容易である、(3)卵胞発育時の経腔的な採卵が容易である、といった点が挙げられる。

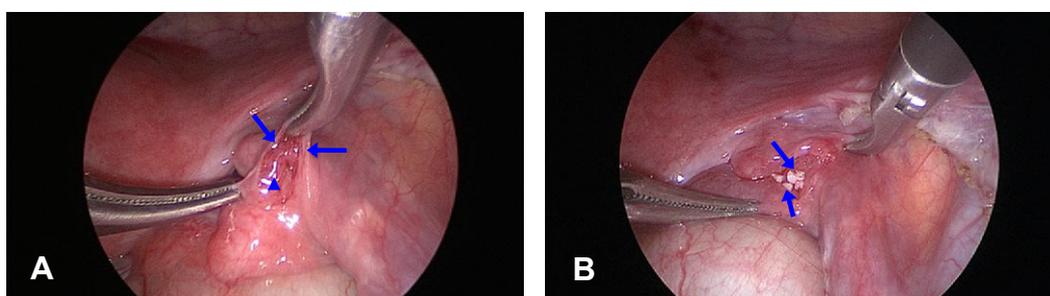


図3 卵巢組織移植

- A, 腹腔鏡下に卵管漿膜(矢印)と卵管(矢頭)の間にスペースを作る。
- B, 20-30個程度の活性化培養後の卵巢小断片を移植する。  
(文献10より引用・改変)

卵巢移植後は、エストロゲン製剤、プロゲステロン製剤、GnRHアゴニスト製剤を用いて卵胞発育障害や早期黄体化をきたす血中の高LH環境を是正した後、FSH/hMG製剤による卵巢刺激を行う。卵巢刺激のポイントは、血流の問題を解決するため、225-375IU位の高用量のFSH/hMG製剤を毎日注射することと、通常の外受精に比べ、長期間の刺激が必要となることにある。卵胞発育は血中ホルモン動態、特にエストロゲンの上昇に注目しながら、経腔超音波を併用しつつモニターし、卵胞発育を認めた場合には、通常の外受精と同様の方法を用いてhCG投与後36時間に採卵を行う。採卵は通常の外受精と同一の手技で行うことができる。成熟卵子が得られたら、精子所見により媒精または顕微授精を行う。受精卵はD2でガラス化法により凍結し、後日ホルモン補充周期下に解凍胚移植を行う。

IVAのPOF患者における臨床成績は、2報目の論文を発表した時点では、37名のPOF患者(平均年齢37.2歳、平均無月経期間5.9年)に対しIVAを実施

し、37名中20名で残存卵胞を認めた。20名中9名で卵胞発育が認められ、7名の患者から成熟卵子が得られて体外受精を行った。5名の患者に胚移植を実施し、3名が妊娠した。1名は妊娠初期に流産となったが、2名は順調に経過し、それぞれ3,254gの男児、2970gの女児を出産した<sup>4-10)</sup>。現在、中国、スペイン、ポーランドでIVAの追試に成功し、妊娠例が出ている<sup>11, 12)</sup>。

### おわりに

現行のIVAには次のような改善点がある。1) 残存卵胞の有無は摘出卵巢の組織学的検査以外の方法で判定できない、2) 腹腔鏡の手術を2回実施する必要があり侵襲性が比較的高い、3) 移植後の卵巢正着率が不十分、4) 卵子の質は改善できない、5) 残存卵胞がない患者は治療対象外となる。それぞれの改善点に関し、現在精力的に研究を行っており、解決法が見つかったものもあり、臨床応用にむけて準備をしている。今後も、増加している卵巢機能不全患者の治療法の確立に向けさらなる研究を展開していきたい。

### 【参考文献】

- 1) Takae S, Kawamura K, Sato Y, Nishijima C, Yoshioka Y, Sugishita Y, Horage Y, Tanaka M, Ishizuka B, Suzuki N: Analysis of late-onset ovarian insufficiency after ovarian surgery: retrospective study with 75 patients of post-surgical ovarian insufficiency, *PLoS One*, 23: e98174, 2014
- 2) Sato Y, Cheng Y, Kawamura K, Takae S, Hsueh AJ: C-type natriuretic peptide stimulates ovarian follicle development, *Mol Endocrinol*, 26: 1158-1166, 2012
- 3) Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C Liu S, Duan EK, Hsueh AJ: Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs, *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 10280-10284, 2010

- 4) Kawamura K: A novel infertility treatment based on the technology of follicle activation: IVA; in vitro Activation, *J Mammal Ova Res*, 31: 102-106, 2014
- 5) Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BC: Intraovarian control of early folliculogenesis, *Endocr Rev*, 36: 1-24, 2015
- 6) Kawamura K, Kawamura N, Hsueh AJ: Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure? *Curr Opin Obstet Gynecol*, 28 : 217-222, 2016
- 7) Kawamura K, Kawashima I: Disorganization of the germ cell pool leads primary ovarian insufficiency, *Reproduction*, 153 : R205-R213,2017
- 8) 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*, 110: 17474-17479, 2013
- 9) Cheng Y, Feng Y, Jansson L, Sato Y, Deguchi M, Kawamura K, Hsueh AJ: Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP, *FASEB J*, 29 : 2423-2430, 2015
- 10) Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, Morimoto Y, Kawamura K: Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency, *Hum Reprod*, 30 : 608-615, 2015
- 11) Kawamura K, Cheng Y, Sun YP, Zhai J, Diaz-Garcia C, Simon C, Pellicer A, Hsueh AJ: Ovary transplantation: to activate or not to activate, *Hum Reprod*, 30 : 2457-2460, 2015
- 12) Zhai J, Yao G, Dong F, Bu Z, Cheng Y, Sato Y, Hu L, Zhang Y, Wang J, Dai S, Li J, Sun J, Hsueh AJ, Kawamura K, Sun Y: In vitro activation of follicles and fresh tissue auto-transplantation in primary ovarian insufficiency patients, *J Clin Endocrinol Metab*, 101 : 4405-4412, 2016