

早発卵巣不全 primary ovarian insufficiency (POI)に関する最新の知見

富山大学大学院 医学薬学研究部 (医学) 産婦人科教室 吉野 修

はじめに

卵巣機能が40歳までに低下する早発卵巣不全患者 primary ovarian insufficiency (POI)は、卵胞の発育が著しく低下しているため、現状の医療では妊娠をあきらめざるを得ないことが多い。日本の出産年齢の高齢化のため、40歳以上の女性では妊娠を計画した際、すでに自身の卵巣機能が低下しているため不妊症となり、大きな問題となっている。現在、日本では早発卵巣不全症例は20歳で0.01%、30歳で0.1%、40歳で1%と推定されており、多くの患者(約1万人以上)が存在している。これまで、このような患者に対してホルモン補充下に排卵誘発剤を投与する方法が行われてきたが、妊娠率は極めて低く、有効な治療法がないのが実情であった。最近、同分野の研究が進み、臨床試験レベルではあるが、新たな治療も始まっている。そこで本稿では、①POIの原因、②POI患者に対する最新の不妊治療および③卵子再生医療研究について概説させていただく。

Keywords: POI, BMP-15, IVA, 再生医療

① POIの原因遺伝子

卵胞発育不全を引き起こす候補遺伝子は主にノックアウトマウスで得られた phenotype により発見されてきた¹。表1に散発発生型のヒトPOIでみられた遺伝子異常を示す。

始原生殖細胞の移動、増殖に関わる NANOS3, 細胞死に関連する PGRMC1、FMR1 の異常が知られている。また、卵子特異的な物質として、卵子特異的転写因子である FIGLA、NOBOX、卵子特異的発現で TGF-beta family に属する BMP15、GDF9 の異常が挙げられている¹。

卵胞発育に関連する因子として、転写因子 NR5A1, WT1, FOXL2、および卵胞発育に関与するホルモンおよびその受容体として、FSH 受容体、AMH およびその受容体である AMHR2 が原因遺伝子として

報告されている¹。POIの原因遺伝子の検索はサンプルサイズ数や人種等の違いもあり、頻度等を正確に検討することは難しいが、次世代シーケンサー検査により、今後解析が進むことが期待される。

POIの原因遺伝子のうち、特に卵子特異的蛋白であるBMP15に関する検討が多くなされている。Bonnetらは、羊における原始、一次、二次、胞状卵胞におけるBMP15 mRNA発現をLaser microdissection capture法、マイクロアレイを駆使して検討し、胞状卵胞における卵子でBMP15 mRNA発現が著明に上昇することを証明している²。また、表1にもあるように、POI患者におけるBMP15遺伝子異常の報告が多くなされており、その変異部位はBMP15蛋白発現に関与するpro-regionに多発していることから、卵子におけるBMP15蛋白の発現低下がPOIを引き起こすことが想定される³。大変興味深いことに、BMP15やGDF-9遺伝子異常は多胎家系を示すこともある。通常、ヒトの毎月の排卵数は1つであるが、一度に複数の排卵が起こっていることを示唆している。一般的に1つの排卵にむけて毎月1000個の原始卵胞が消失することが知られている。InagakiらはBMP15やGDF-9のpro-regionの異常により排卵数が増加し、それにむけて多くの初期卵胞が卵胞発育を行うため、早期に卵胞が枯渇してしまい、POIの病態を呈することを提唱している⁴。

表 1 散発発生型のヒト POI でみられた遺伝子異常

Genes	Mutation rate (%)	遺伝子異常が POI を誘導するメカニズム
BMP15	1.0-10.5	卵子特異的サイトカイン BMP15 の低下、顆粒膜細胞増殖作用の消失
PGRMC1	0.5-1.5	プロゲステロンによる顆粒膜細胞の坑アポトーシス効果を減弱させる。CYP7A1 への結合が減弱する
FMR1	0.5-6.7	FMR1 mRNA の上昇は認めるが、蛋白レベルの減少を認める。mRNA レベルの異常が機能低下を引き起こし、卵胞発育不全を誘導する。
FIGLA	0.5-2.0	E-box を含むプロモータへの結合障害、TCF3 helix-loop-helix (HLH) domain への結合障害
FSH 受容体	0.1-42.3	卵胞発育に重要な FSH シグナルの低下
FOXL2	1.0-2.9	顆粒膜細胞のステロイド産生および増殖に関連する遺伝子の発現異常(CYP19, CYP11A1, StAR, CCND2).
GDF9	0.5-4.7	顆粒膜細胞の増殖抑制。マウスでは1次卵胞で発育停止。
NOBOX	1.0-8.0	局在(核)の不安定化、蛋白異常をきたし、下流遺伝子(GDF9, OCT4, KIT-L, など)の発現低下、細胞周期 G2/M arrest 誘導の破綻
NR5A1	0.3-2.3	下流遺伝子の発現低下(CYP11A1, CYP19A1, AMH, INHIBIN-A, など).
WT1	0.5	AMH や CDH1 の発現低下および、FSH 受容体、CYP19 の発現上昇。顆粒膜細胞の分化異常および卵子-顆粒膜細胞の相互作用破綻により、卵胞消失
AMHR2	1.0-2.4	AMH 受容体シグナル低下
NANOS3	1.0-2.4	始原生殖細胞の維持低下
AMH	2.0	AMH 受容体シグナル低下

AMH, anti-Mullerian hormone; *AMHR2*, anti-Mullerian hormone receptor, type II; *BMP15*, bone morphogenetic protein 15; *CCND2*, cyclin D2; *CDH1*, cadherin 1; *CYP7A1*, cytochrome P450 family 7 subfamily a member 1; *CYP11A1*, cytochrome P450 family 11 subfamily a member 1; *CYP19*, cytochrome P450 family 19; *CYP19A1*, cytochrome P450 family 19 subfamily a member 1; *FIGLA*, folliculogenesis-specific basic helix-loop-helix transcription factor; *FMR1*, fragile X mental

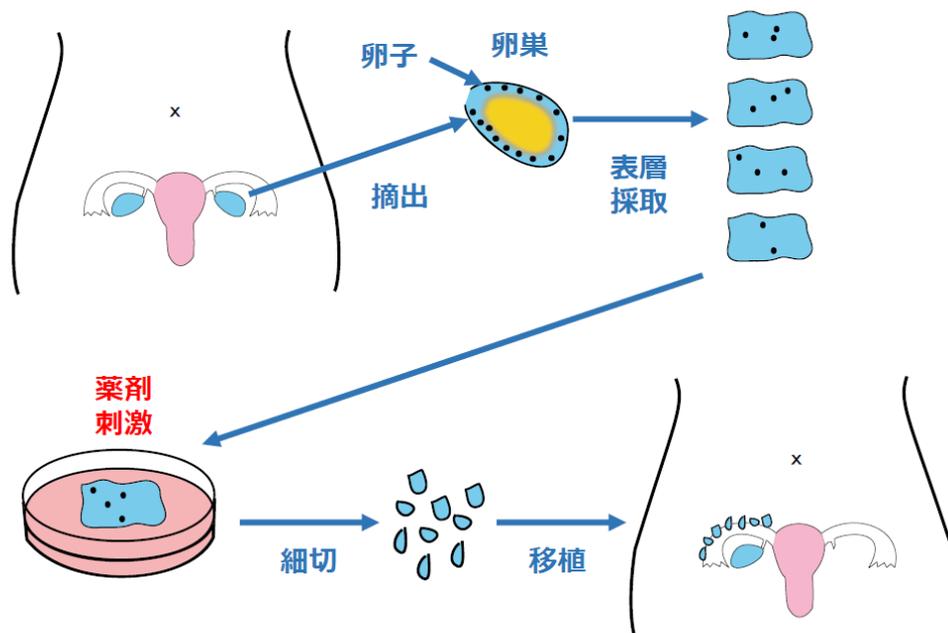
retardation 1; *FOXL2*, forkhead box L2; FSH, follicle-stimulating hormone; *FSHR*, follicle-stimulating hormone receptor; *GDF9*, growth differentiation factor 9; *INHIBIN-A*, inhibin alpha subunit; *KIT-L*, kit ligand; *NANOS3*, nanos homolog 3; *NOBOX*, newborn ovary homeobox gene; *NR5A1*, nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1; *OCT4*, octamer-binding protein 4; *PGRMC1*, progesterone receptor membrane component 1; *StAR*, steroidogenic acute regulatory protein; *WT1*, Wilms tumor 1.

文献 1 より改変

② POI 患者に対する最新不妊治療

近年、ノックアウトマウスの解析により、原始卵胞から一次卵胞への移行(リクルートメント)が PI3K シグナルにより誘導されること、また PTEN はその抑制に働くことが明らかになった⁵。Kawamura らを中心とするグループは、この理論をヒトに応用し、POI 患者から卵巣を腹腔鏡下手術にて摘出後、細切し、PI3K 刺激薬および PTEN 阻害薬にて卵巣を活性化後、卵巣を自家移植するという、in vitro activation (IVA) という技法を開発し⁶、臨床研究を行っている(図 1)。この技術開発は、POI 症例のみならず、晩婚化や初産年齢の上昇にともなう現代社会の少子化に対抗する有効な手段となり得る画期的な技術になる可能性があり、2013 年の Time 誌が選ぶ 10 大 medical breakthrough の研究成果の 1 つになっている。すでに日本、海外において POI 患者を対象に行い、数名の生児を得るに至っており^{6, 7}、2017 年より、富山大学もこの臨床研究に参加している。同法は卵子の再生医療ではなく、原始卵胞の残存している POI 患者に対してのみ有用である。よって卵子の完全に枯渇した POI 症例では卵胞発育を誘導することは難しい。

図1) in vitro activation (IVA) の手順



③ 卵子の再生医療について

精子や卵子等、生殖細胞は次の世代に遺伝情報を伝えていくことができる。生殖細胞は胎生初期に多能性細胞集団である胚体外胚葉（エピブラスト）から発生する、始原生殖細胞（primordial germ cells: PGCs）を起源とする。PGCsが作られるタイミングは、卵巢や精巣が形成されるより前の段階であり、発生初期段階で作られる PGCs はマウスで 20-30 個と言われ、後から作られる卵巢原基へ移動する。卵巢では移動してきた PGCs はただちに減数分裂に移行し、卵原細胞、一次卵母細胞、2次卵母細胞へと成長し、卵子となる。

Hayashi, Saitou らのグループは、メスマウスの iPS/ES 細胞から分化誘導した始原生殖細胞様細胞（primordial germ cell-like cells: PGCLCs）を、胎生 12.5 日のメスマウスの胎仔卵巢の細胞と凝集培養し、免疫不全マウスの卵巢に移植、卵母細胞および生殖可能な卵子の誘導に成功している⁸。彼らは、エピブラストから始原生殖細胞への分化の過程で、BMP-4, WNT-3 が Blimp1, Prdm14 の発現を誘導することを見出している^{9, 10}。

最近では、同研究グループは、PGCLCs と体細胞との凝集塊の体外培養を 3 週間の in vitro differentiation 培養と 11 日間の in vitro

growth 培養および1日 in vitro maturation 培養を行うことで、個体形成可能なマウス卵子獲得を報告している。生体内でみられる卵子の減数分裂やその休止・再開が体外でも再現できることは大変興味深い¹¹。

これらマウスを用いた研究は、安全面や倫理的な側面から、直ちにヒトへの臨床応用に向かうというわけではないが、卵子形成のメカニズムを知ることは、不妊症や早発閉経のメカニズムの解明に繋がることが期待される。

卵巣の再生、という観点からの研究も進んでいる。RN Shah たちの研究グループは3Dプリンターで作製されたマイクロ多孔質の足場を使ってマウスの卵胞細胞を発育させ、こうしてできた人工的な卵巣を外科的に不妊となったマウスに移植したところ、マウスが妊娠可能な状態に戻り、健康な仔マウスを出産したことを明らかにしている¹²。

以上、POIの最近の研究について概説させていただきました。今後再生医療分野の研究は更に進むことが予想され、POIの原因究明および更なる治療法の開発が期待される。

【参考文献】

- 1 Jiao X, Ke H, Qin Y, Chen ZJ: Molecular genetics of premature ovarian Insufficiency. *Trends Endocrinol Metab* 2018.
- 2 Bonnet A, Bevilacqua C, Benne F, Bodin L, Cotinot C, Liaubet L, Sancristobal M, Sarry J, Terenina E, Martin P, Tosser-Klopp G, Mandon-Pepin B: Transcriptome profiling of sheep granulosa cells and oocytes during early follicular development obtained by laser capture microdissection. *BMC Genomics* 2011;**12**:417.
- 3 Hashimoto O, Moore RK, Shimasaki S: Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:5426-5431.
- 4 Inagaki K, Shimasaki S: Impaired production of BMP-15 and GDF-9 mature proteins derived from proproteins WITH mutations in the proregion. *Mol Cell Endocrinol* 2010;**328**:1-7.
- 5 Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hamalainen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K: Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 2008;**319**:611-613.
- 6 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 U S A* 2013;**110**:17474-17479.
- 7 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* 2016;**101**:4405-4412.
- 8 Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M: Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 2012;**338**:971-975.
- 9 Aramaki S, Hayashi K, Kurimoto K, Ohta H, Yabuta Y, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Kato Y, Shirahige K, Saitou M: A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Dev Cell* 2013;**27**:516-529.
- 10 Nakaki F, Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Yabuta Y, Saitou M: Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. *Nature* 2013;**501**:222-226.

- 11 Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, Hayashi K: Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature* 2016;**539**:299-303.
- 12 Laronda MM, Rutz AL, Xiao S, Whelan KA, Duncan FE, Roth EW, Woodruff TK, Shah RN: A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice. *Nat Commun* 2017;**8**:15261.