

第 60 回日本産科婦人科学会・学術講演会

シンポジウム 2「卵の発育・成熟・老化機構の解明と臨床応用」

シンポジウムに関するレビュー

¹⁾山口大学大学院医学系研究科産科婦人科学²⁾慶應義塾大学医学部産婦人科学教授 杉野 法広¹⁾ 教授 吉村 泰典²⁾

Mechanisms of Oocyte Growth, Maturation and Ageing and the Clinical Implications

Norihiro SUGINO¹⁾, Yasunori YOSHIMURA²⁾¹⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Yamaguchi²⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Tokyoはじめに

卵巣は月経周期の中できわめてダイナミックな変化を示し、女性の生殖内分泌機構において中心的役割を果たす臓器である。特に、卵胞発育は、生殖細胞である卵子の発育や成熟、女性ホルモンの産生など、生殖において最も基本的な機能に密接に関与している。したがって、卵胞発育から卵成熟、排卵、胚発育にいたるメカニズムを解明することは、臨床上きわめて重要な課題である。近年、遺伝子操作動物を用いた解析やマイクロアレイ解析などの実験手技の発展により、卵胞発育・卵成熟に関与する因子が数多く同定され、卵胞発育機構に関しては著しい進歩がみられる¹⁾²⁾。一方、卵の老化機構の解明も早期解決が望まれる課題である。卵の老化によって引き起こされる卵の質の低下により、受精率の低下、胚発生や胚発育の悪化、染色体異常の増加、初期流産の増加が引き起こされる。卵の老化についての詳細な分子機構の解明はいまだ十分ではないが、卵の発育・成熟機構の解明と同時に取り上げる重要な課題であると

思われる。そこで、シンポジウムの課題として、卵の発育・成熟・老化機構の解明と臨床応用を取り上げ、現時点での理解を深めることは、今後の研究の発展や臨床上の問題点の解決に対して意義のあることと思われる。

卵の発育・成熟機構の解明

卵胞発育は resting follicle である原始卵胞 (primordial follicle) と一次卵胞 (primary follicle) から発育段階にリクルートされることから始まり、各段階の発育を経て、1 個の成熟卵胞に到達する。この過程を発育からみると 3 つに分けることができる。(1) 発育の開始、(2) 初期卵胞発育、(3) 単一卵胞の選択と卵胞成熟、である。また、ゴナドトロピンである FSH に対する反応性から、ゴナドトロピン非依存性発育とゴナドトロピン依存性発育の 2 段階にも分類することができる。このような卵胞発育の概念は過去 10 年間大きくは変化していないが、ノックアウトマウスなどを含めた遺伝子操作を用いた研究手法の進歩により、卵胞発育に関するメカニズムの解明は大きく進歩している。特

Key Words: Follicle development, Oocyte maturation, Embryo development, Oocyte aging, Mitochondrial damage

に、卵子から産生される因子や顆粒膜細胞から産生される因子である、いわゆる局所因子が卵胞の初期発育、卵成熟などの卵胞発育過程に重要であることが明らかとなってきた³⁾。本シンポジウムでは、初期卵胞発育、卵成熟、胚発育における局所因子の役割について焦点が当てられた。本稿では、各演者の研究成果の位置付けを中心に述べる。

1) 発育の開始

(1) 原始卵胞から一次卵胞への発育

原始卵胞が発育を始め、周囲を取り巻く上皮細胞が立方化し顆粒膜細胞の形態を整えた卵胞を一次卵胞という。原始卵胞では発育は静止状態にある。どのようなメカニズムで原始卵胞の発育が抑止されているのか、また、どのような引き金によってこの卵胞が発育に向かうのかについては、卵胞発育機構の中でも最も謎とされる部分である。顆粒膜細胞は成長因子の一つである kit ligand をこの時期から産生し、卵にはその受容体である c-kit が発現している。両者の相互作用は卵と顆粒膜細胞の成熟に重要と考えられるが、この機構も一次卵胞以後に作動する¹⁾²⁾。

(2) 一次卵胞から二次卵胞への発育

上皮細胞が立方化し顆粒膜細胞の形態を整えると、増殖を開始し、やがて卵の周囲を2層の顆粒膜細胞が取り囲むようになった時点から二次卵胞 (secondary follicle) といい、基底膜が現れる。卵から産生される因子が卵胞発育に重要であるという考えが一般的になっている。もともと、卵が卵胞発育に関与するという概念は、卵胞の生存は生きた卵の存在が不可欠であるという事実からでている。最近、卵から産生され卵胞発育に関与する GDF-9、BMP-15 が同定された⁴⁾。GDF-9 は、TGF- β superfamily のメンバーで卵に発現しており、GDF-9 欠損マウスは卵胞発育が一次卵胞の段階で止まっている。BMP-15 は、遺伝子は X 染色体上にある GDF-9 と類似のタンパクであり、卵に発現している。BMP-15 の欠損マウスは GDF-9 欠損マウスと同様に、早発卵巣不全と同様の卵巣の phenotype を呈する。GDF-9、BMP-15 は顆粒膜細胞に作用し、kit ligand 発現を促進させるほか、

顆粒膜細胞の増殖を促進する。

2) 初期卵胞発育(二次卵胞から胞状卵胞への発育)

顆粒膜細胞の増殖が進み、数層に達すると卵胞周囲の基底膜に接する細胞は上皮細胞化して莢膜細胞となる。莢膜細胞層をもつ卵胞を前胞状卵胞 (preantral follicle) という。莢膜細胞ができると顆粒膜細胞の増殖は急激に亢進する。この時点で、血管供給を認めるようになり、血液中の諸物質が卵胞に供給されるようになる。卵胞腔が形成されると胞状卵胞 (antral follicle) と呼ばれる。

この時期の卵胞から FSH レセプターは発現してくるが、その詳細なメカニズムは解明されていなかった。この時期には顆粒膜細胞から産生され増加するアクチビンが FSH レセプターを誘導することが報告されている¹⁾²⁾。本シンポジウムでは、吉野は、GDF-9 および BMP-15 が顆粒膜細胞におけるアクチビン B を誘導し、FSH-independent の初期卵胞の発育における顆粒膜細胞の増殖や FSH レセプターの誘導に関与していることを示した。

初期卵胞発育における FSH の作用はよくわかっていない。この時期は、FSH の非存在下でも、多くの局所因子 (Activin B、EGF、TGF- β 、bFGF、HGF) が、卵から産生される GDF-9、BMP-15 と同様に顆粒膜細胞を増殖させる。しかし、FSH レセプター欠損マウスでは少数であるが前胞状卵胞は存在し、発育は障害されているが完全には止まっていないという事実もある。おそらく、FSH はこれらの局所因子と相乗作用を持って作用するのであろう。ラットでは、前胞状卵胞は FSH に反応するため、前胞状卵胞から胞状卵胞への発育は FSH が促進することは疑いがない¹⁾²⁾。

胞状卵胞以後の卵胞発育は FSH が重要となってくる。FSH レセプターの誘導とその後の発現増加に関する調節は重要である。本シンポジウムでは、吉野は卵からの BMP-6、-7 がこの時期の卵胞において FSH レセプターを誘導することを示し、FSH レセプターを多く発現した卵胞が主席卵胞へ発育できるという単一卵胞の選択への関与を示唆した。

3) 単一卵胞の選択と卵胞成熟

(1) 単一卵胞の選択

顆粒膜細胞はFSHに反応できるようになり、卵胞期初期のFSHの増加と局所のEGFなどにより増殖する。Selectable follicleの段階では、FSHによりアクチビンが産生され、同時にアクチビン受容体も増加し、成熟顆粒膜細胞ではアクチビンとIGF-1がFSHによるLHレセプターの誘導を促進する。多量のエストロゲンを産生する能力を他の卵胞より早く獲得し、FSHレセプターの発現の多い卵胞が主席卵胞となる。エストロゲンのネガティブフィードバックとインヒビンの作用によりFSH分泌が低下し、主席卵胞のみが生き残り、単一卵胞発育機序が成立する。主席卵胞では卵胞周囲の血管新生が著明になることも選択される一因として知られる。本シンポジウムでは、吉野が、卵胞の増大につれ、顆粒膜細胞は低酸素環境となり、angiogenin, IL-8, midkineという血管新生因子が誘導され、卵胞周囲の血管新生の発達に関与していることを示した。

(2) 卵の最終成熟

LHサージによりgap junctionが低下し壁顆粒膜細胞の解離が起こり、卵丘細胞の膨化が起こる。卵丘細胞の膨化はヒアルロン酸の増加による。卵から産生されるGDF-9は卵丘細胞の膨化に係るhyaluronan synthase, cyclooxygenase-2を誘導する。核成熟は、卵核胞の崩壊と第一極体の放出が特徴的変化として観察される。卵丘細胞からgap junctionを通してcAMPを代表とする成熟抑制因子が卵内部へ移行し、核の成熟を抑制していたのが、LHサージによりgap junctionの消失でcAMPが到達せず、卵内部のcAMP濃度が急速に低下することにより、減数分裂の再開、卵核胞の崩壊が誘導されると考えられている。LHサージによる減数分裂の再開には、MPF (Maturation Promoting Factor)が働いている。これは、cyclin Bとcdc-2 kinaseのheterodimerである。cdc-25 phosphataseによるcdc-2の脱リン酸化、cyclin Bのリン酸化によりMPFは活性化する。最近、LH刺激により顆粒膜細胞からEGF-like growth factorsが産生され、卵丘細胞に作用しそこからの

因子が卵核胞の崩壊を促進させることが明らかになっている⁵⁾。このようにLHサージが卵の最終成熟をもたらすが、卵成熟はLHの卵への直接作用ではなく、LHにより顆粒膜細胞や内荏膜細胞から産生される局所因子により誘導される。本シンポジウムでは、河村が、ゴナドトロピン投与後に採取したマウス卵巣をDNAマイクロアレイに供し、網羅的に遺伝子検索を行い、LHにより誘導される遺伝子で、その受容体が卵に発現しているものに絞った結果、新規母体由来の因子として、brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Insulin-like 3 (INSL3), レプチン, kit ligandを同定した。BDNFは培養実験で第一極体の放出を促進させ、胚盤胞期胚への発生率を増加させるほか、細胞内グルタチオン濃度を増加させるといった細胞質成熟も促進させた。INSL3は卵核胞の崩壊を促進、レプチンは卵核胞の崩壊と第一極体放出の促進、kit ligandは第一極体放出の促進に働いた。卵巣においては、BDNFは初期卵胞の発育に必須であることが示されているが、この結果は卵成熟や排卵にも関与している可能性を示すものである。

4) 胚発育

排卵後、受精が成立した胚は、卵管内を通過し、子宮内腔に到着し着床する。この間に胚は発育し成熟するが、卵管や子宮内膜から産生される種々の因子によって調節されている。実際に、生体外における卵成熟や胚発育は生体内の環境に比べると劣ることから、生体内における卵成熟や胚発育は卵管・子宮由来のパラクライン因子により制御されていることが考えられる。本シンポジウムでは、河村が、母体由来パラクライン因子による胚発育・アポトーシスの調節機構に焦点を当てた。子宮内膜上皮や胚で発現するものとしてGnRH-Iを挙げ、これはパラクライン・オートクライン作用で胚発育を促進しアポトーシスを抑制することを示した。さらに、胚におけるアポトーシス制御のkey factorとしてsurvivinの重要性を明らかにした。卵管や子宮内膜上皮から産生される因子としてTGF- α を取り上げ、胚のPI3-kinase経路を介しsurvivinを増加させアポトーシスを抑制

することを示した。

卵の老化機構の解明

難治性不妊症や生殖補助医療において解決されるべき問題点として、卵の質に関する問題がある。卵の質の低下により、受精率の低下、受精後の胚発生や胚発育の悪化、染色体異常の増加、初期流産の増加が引き起こされる。卵の質は卵の加齢によって悪化する。胎児以降の40年にわたる第一減数分裂における長い休止期によって、卵子の染色体不分離の率が増加することが知られているが、この原因の一つに、酸化ストレスや卵胞周囲の微小血流循環の障害が挙げられている¹⁾。また、加齢によるミトコンドリア傷害の増加は多くの臓器で知られており、酸化ストレスによるものと考えられている。実際に、高齢婦人では、卵におけるミトコンドリアDNAの欠失頻度の増加が報告されているが、これも酸化ストレスが原因であると考えられている。また、酸化ストレスによるDNA傷害の修復機構が加齢とともに低下することも大きな原因とされている。さらに、加齢によって、生体膜にも傷害が起こる。生体膜は細胞の外側を構成しているだけでなく、ミトコンドリアや小胞体などの細胞内小器官の構成物としても重要な役割を持っている。この生体膜にはリン脂質が多く含まれており、やはり酸化ストレスを受けやすい分子である。生体膜が酸化ストレスを受けると細胞の機能に異常をきたす。

卵の加齢の詳細な分子機構の解明はいまだ十分ではない。これまで、細胞の機能の面からみた研究が多くなされてきたが、最近では、老化を分子レベルで研究するため、DNAの変化に注目した研究も行われている。加齢による卵の質の低下は、卵の機能的な変化によるものなのか、また、種々の遺伝子の発現変化によるものなのかは非常に興味をもたれるところである。本シンポジウムでは、卵の老化機構の解明に関して、卵細胞の機能に焦点をあてた報告と、卵の加齢による遺伝子変化に焦点を当てた研究成果が発表された。

高橋は、受精時に起こる卵細胞内のカルシウム濃度の周期的な変動であるカルシウム・オシレー

ションという現象に注目して、卵の加齢のメカニズムにつき発表した。カルシウム・オシレーションは卵の活性化やその後の胚の発育に不可欠な反応である。卵の加齢には、排卵前にすでに起こっている加齢(母体の加齢)と、排卵後の卵の加齢に分類されるが、高橋は後者の post-ovulatory ageing に注目した。加齢卵では受精率、胚盤胞形成率が悪く、カルシウム・オシレーションに異常がみられる。卵は卵管内で受精しないで加齢すると、ミトコンドリアで活性酸素が発生し、酸化ストレスを受け、ATPの産生の低下がおこる。このATP産生の低下により、小胞体のカルシウム取り込みや放出の低下ほか、カルシウムストアも低下する。このような細胞内カルシウム制御機構の異常がある卵が受精すると、受精時のカルシウム・オシレーションの異常が起こり、胚発育障害をきたすと考えられる。すなわち、この卵の加齢メカニズムは、生体膜が酸化ストレスを受け細胞の機能に異常をきたすというメカニズムを卵において再確認した研究成果であるともいえる。

一方、浜谷は、母体加齢による卵の質の低下が、どのような遺伝子の発現変化によるのかを検討した。マイクロアレイを用いて、卵細胞で発現する遺伝子を網羅的に検索し、卵細胞の遺伝子発現プロファイリングを行った。高齢マウスから得られた卵細胞の遺伝子発現プロファイルと若齢卵と比較検討し、卵細胞における遺伝子発現プロファイルの加齢による変化を検討し、その特徴的な変化から、卵細胞における加齢メカニズムについて考察を加えた。加齢により発現が変化した遺伝子は、第一に、ミトコンドリア機能やATP産生に関する遺伝子の発現低下が顕著であった。次に、ヒートショック・プロテインやチオレドトキシンなどのストレス防御に関連した遺伝子や、細胞周期・転写調節に関わる遺伝子の発現低下を認めた。また、ゲノム修復遺伝子、テロメラーゼ、染色体の高次構造やDNA修飾に関わるような遺伝子(クロマチン・リモデリング関連遺伝子やDNAメチル転移酵素など)も、加齢とともに発現が低下していた。

卵細胞における加齢を脳や肝などの体細胞と比

較すると、酸化ストレスとそれに対する防御、ミトコンドリアの機能、テロメラーゼ、DNAメチル転移酵素などに関係する遺伝子の発現変化が同様であったため、生殖細胞にも体細胞と共通の加齢メカニズムが存在すると考えられた。ミトコンドリアには、核にあるようなDNA修復機構がないため、呼吸鎖から漏出する活性酸素がミトコンドリアDNAを損傷しミトコンドリアの機能を傷害すると考えられる。しかし、一方では、卵細胞の加齢に特異的な点も観察された。すなわち、体細胞の加齢と異なり、炎症やInsulin/IGFシグナル経路に関係する遺伝子の発現に変化がない点、クロマチン・リモデリング関連遺伝子などstemnessに関わる遺伝子の発現が低下した点、あるいは今回発見された胚発育に関与する卵特異的遺伝子であるNalpファミリーの発現低下が卵細胞の加齢に特徴的であった。

卵の加齢において、テロメラーゼの発現が低下していたことは注目すべき点である。テロメアは細胞分裂を繰り返すなかで、短くなり、寿命に寄与すると考えられているので、ほとんど分裂をしない卵母細胞では、テロメアが短くなることなどないと考えられてきた。そのため、卵におけるテロメラーゼの発現やテロメアの長さを検討した報告は、これまであまりみられていない。本研究の結果として、テロメラーゼの発現のみならず、活性についても、加齢とともに約半分くらいにまで有意に低下し、そしてテロメア長が有意に短縮していることが明らかとなった点は非常に興味深い。

おわりに

本稿では、各発育段階において、卵や胚発育に関与する種々の因子の働きについて紹介したが、現時点でもまだ把握できていないさまざまな因子の関与が考えられる。この分野の研究は日進月歩の勢いで進んでおり、近い将来にはさらに多くの物質が同定されよう。卵胞内に働く種々の調節因子は、それぞれが単独で働くというよりは、各発

育段階で、複雑に絡み合いながら、卵胞の発育、機能、形態変化に関与し、さらにはゴナドトロピンの作用を修飾していることは想像に難くない。また、卵の老化機構についても、老化による機能変化や遺伝子変化を知ることは、卵の発育機構の解明にも繋がる。

生殖補助医療を前提にした場合、ヒト未成熟卵子の体外成熟培養やヒト未発育卵胞の培養は、早発卵巣不全の治療、凍結保存した卵巣組織の利用法、また、長期間の卵巣刺激や卵巣過剰刺激症候群を回避できる方法として期待されているが、いまだ研究の途上である⁶⁾。さらに、卵の質の低下を防いだり、卵の老化を抑制することについても、さらなる解明が必要であることは言うまでもない。今後、さらなる研究の進展により卵胞発育の機構や卵の老化機構の詳細がより鮮明となり、その知見が臨床の場へフィードバックされることを期待したい。

文 献

- 1) Straus JY III, Williams CJ. The ovarian life cycle. In: Straus JY III, Barbieri RL, eds. Reproductive Endocrinology. Elsevier Saunders; 2003, p. 213—253
- 2) Gougeon A. Dynamics of human follicular growth: morphologic, dynamics, and functional aspects. In: Leung PCK, Adashi EY, eds. The ovary. Elsevier Academic Press; 2003, p. 25—43
- 3) Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 2890—2894
- 4) Dong JW, Albertini DF, Nishimori K. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. Nature 1996; 383: 531—535
- 5) Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SLC, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. Science 2004; 303: 682—684
- 6) Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. Reproduction 2005; 130: 147—156