

【特集】 卵巢の aging と妊孕能

卵の加齢のメカニズム

高橋 俊文

山形大学医学部産科婦人科講座

1. はじめに

日本産科婦人科学会の報告によると、2011年に生殖補助技術(assisted reproductive technology, ART)により年間3万2,426人(総出生数の約3%)の児が出生している¹⁾。ART治療を受けた女性の中で40歳以上の割合は、2007年は31.2%であったが、その割合は年々上昇し、2011年では37.9%となっている¹⁾。この背景には、女性の晩婚化と挙児希望年齢の高齢化などの社会的要因が存在する。女性は35歳以降になると、妊娠率の低下のみならず、流産率が増加し妊孕性が低下する²⁾。これは、加齢による卵の染色体異常や受精後の胚発育の悪化が原因である。このような加齢による変化は、卵の加齢による「卵の質の低下」と言い換えることができるが、卵の加齢による「卵の質の低下」の詳細な分子機構はいまだ不明である。本稿では、卵の加齢による「卵の質の低下」のメカニズムについて概説する。

2. 卵の加齢の定義

“卵の加齢”には、「排卵前の卵の加齢」と「排卵後の卵の加齢」が存在する。両者は混同されて用いられることがあるので“卵の加齢”について定義する。「排卵前の卵の加齢」は、母体の加齢に伴うものであり、「排卵後の卵の加齢」は、排卵した卵子がすぐに受精せず、卵管内または体外におい

て一定時間経過したものである。PubMedで“oocyte aging”を検索すると、排卵前または排卵後の卵の加齢の両者がヒットしてくる。また、卵の加齢に関する論文を詳細に読むと、卵子レベルでの変化について両者を混同して引用している場合が少なくない。いずれの“卵の加齢”においても生殖現象に対する影響や細胞レベルでの変化が共通であることが原因であると考えられる。しかし、各々の“卵の加齢”は、必ずしも同じメカニズムが関与しているとはいえず、排卵前、排卵後の卵の加齢については別々に論じる必要がある³⁾。

3. 母体の加齢による卵の加齢(排卵前の卵の加齢)

1) 母体の加齢による卵子数の減少

母体の加齢による卵の質の低下メカニズムを考えるうえで、加齢による卵胞・卵子数の減少という生理的な変化は重要である。すなわち、母体の加齢により個々の卵子の質が低下するばかりでなく卵子の絶対数も減少する。妊娠5か月になると、卵巣には600万~700万個の卵祖細胞から卵母細胞が形成される。600万~700万個まで増えた卵母細胞は妊娠5か月をピークに、その後急速にその数が減少する。この後、卵母細胞数は増加することとはなく、閉経に至るまで継続して減少する⁴⁾。出生時には、卵母細胞数は100万~200万個となり、排卵が起こり始める思春期頃には、その数は30

万個まで減少する。30万個の卵母細胞中生涯にわたり排卵する卵子は400~500個である(約0.2%)。胎児期に数百万個超に増加した卵母細胞が閉経期までに減少していくメカニズムとして、卵母細胞を含む卵胞(原始卵胞)のアポトーシスが関与しているが、哺乳動物での詳細なメカニズムはほとんど解明されていない²⁾。

卵胞数は、卵胞の選択・リクルートと卵胞の閉鎖のバランスによって維持されていると考えられる。この卵胞の選択・リクルートや閉鎖の過程については未だ不明な点が多い。近年、卵子特異的に遺伝子欠損させたマウスを用いた研究から、原始卵胞の選択・リクルートには phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN)/phosphatidylinositol-3(PI3)キナーゼ経路の活性化が重要であることが明らかにされた⁵⁾。PI3キナーゼ経路は、細胞の分化、増殖、アポトーシスなどの生理的な刺激に対する応答機構のみならず、がん細胞の増殖、転移に関与する多機能な細胞内シグナル伝達経路である⁶⁾。3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)はPI3キナーゼの下流にあり、PI3キナーゼ経路の司令塔であるAktを活性化する重要な分子である。一方、PTENはPI3キナーゼ経路のブレーキというべき役割を果たしており、脳腫瘍や前立腺癌患者における遺伝子変異として同定され、癌抑制遺伝子として広く知られるようになった分子である⁷⁾。PTENを卵子特異的に欠損させると(PI3キナーゼ経路の活性化)卵胞のリクルートが活性化され⁸⁾、一方PDK1を卵子特異的に欠損させると(PI3キナーゼ経路の抑制)卵胞の消失が促進することが報告された⁹⁾。すなわち、卵子におけるPI3キナーゼ経路の活性化は卵胞の過剰なリクルートが亢進し、その結果若年での卵胞の消失を引き起こした(PTENノックアウトマウス)⁹⁾。一方、PI3キナーゼ経路の抑制は、卵胞の閉鎖を促進し、その結果若年での卵胞の消失を引き

起こした(PDK1ノックアウトマウス)⁹⁾。しかし、このような実験動物での知見がヒトの早発卵巣不全(premature ovarian failure(POF)またはprimary ovarian insufficiency(POI))にも起きているかどうかの証拠は現在のところない。

母体の加齢による卵胞数の減少のメカニズムを考えるうえで、ヒトにおける早発閉経や早発卵巣不全はよいモデルである。放射線照射、化学療法、卵巣の摘出などの明らかな原因のないPOF(POI)が90%以上であるが、家族内発生の報告もあり遺伝的な関与が示唆されている。脆弱X症候群(fragile X syndrome)はX連鎖劣性遺伝により発症する精神発達障害として頻度の高い疾患である¹⁰⁾。脆弱X症候群の原因遺伝子として、X染色体上にあるFMR1遺伝子が同定され、FMR1遺伝子は通常5'非翻訳領域に6~45のCGGコドンの繰り返し配列(リピート)を持つが、脆弱X症候群のfull mutation例ではそのリピートが200を越す。FMR1のpremutation(CGGリピートが55~200)を有する女性の12~28%がPOF(POI)を発症するとの報告がある¹¹⁾。FMR1遺伝子のCGGリピート数と閉経の時期に影響を与えるとする報告もある。しかし、FMR1遺伝子のpremutationがどのようなメカニズムでPOF(POI)を発症するかは現在のところ不明である。FMR1遺伝子のfull mutationではFMR1蛋白が産生されず精神発達遅滞などの表現型を呈するが、FMR1のfull mutationとPOF(POI)の発症について関連はない。FMR1のpremutation保因者のFMR1蛋白のレベルは正常者と同程度であり、過剰に産生されたFMR1 mRNAが卵胞の閉鎖に影響している可能性がある¹²⁾。欧米の研究ではFMR1遺伝子のpremutationを有する女性は1/259と報告されており¹³⁾、American College of Obstetricians and Gynecologist(ACOG)は、POF(POI)患者または明らかな原因のない40歳未満女性でFSH値の上昇が認められる場合は、FMR1のpremutationのスク

リーニングを推奨している¹⁴⁾。

2) 母体加齢による卵の質の低下のメカニズム

母体加齢による「卵の質の低下」の詳細なメカニズムは現在のところ不明である。母体加齢による「卵の質の低下」の重要な要因のひとつとして、母体加齢による卵子の染色体異数性の増加がある。最近の研究成果によると、母体の加齢による染色体異数性は、細胞分裂時に姉妹染色分体の接着に関わるコヘーシン蛋白のひとつであるSMCβ1や紡錘体形成に重要な分子であるMad2の発現低下が関与していることが明らかにされた¹⁵⁾¹⁶⁾。

浜谷らは加齢マウスと若年マウスの排卵卵子を用いてマイクロアレイ解析による遺伝子発現の差異を検討した結果、加齢マウスから採取された卵子では、ミトコンドリア機能、酸化ストレスの制御、細胞周期、DNAや染色体の安定化に関与する遺伝子群の発現が低下すると報告した¹⁷⁾。ヒト卵子でも同様の検討がなされ、マウスでの報告と同様の遺伝子群の発現が低下していたと報告された¹⁸⁾。ミトコンドリアは酸化的リン酸化を経て細胞内ATPを供給するエネルギー工場であり、ミトコンドリアの機能異常はさまざまな疾病の原因となっていることが知られている¹⁹⁾。ヒト卵子のミトコンドリア膜電位を測定した結果、高齢女性から採取された卵子のミトコンドリア膜電位は若年女性のものとは有意に低下していたと報告された²⁰⁾。さらに、ミトコンドリアは独自のDNA(mtDNA)を持つが、高齢女性から採取された卵子は若年女性のものとは比べmtDNAの欠失や点突然変異の割合が高いと報告された²¹⁾。これらの報告は母体の加齢によりミトコンドリアの機能異常が起きることを示唆するものである。ミトコンドリアの機能異常の原因として、酸化ストレスの関与が想定されているが、母体の加齢により卵が酸化ストレスを受けていることを示す根拠は現在のところ存在しない。さまざまな体細胞では、加

齢による酸化ストレス・ミトコンドリア障害仮説が広く受け入れられているが、母体の加齢による卵の質の低下にその仮説が適応できるかはさらに検証が必要である。

4. 排卵後の卵の加齢

排卵後の卵の加齢は、LHサーージやヒト絨毛性ゴナドトロピン(human chorionic gonadotropin, hCG)投与による排卵刺激により排卵した卵子がすぐに受精せず一定時間卵管内または体外培養により時間の経過した状態である。母体加齢と同様に、排卵後の卵の加齢は染色体異常の増加、受精後の胚発生の悪化、初期流産の増加を引き起こすことが実験動物やヒトにおいて多数報告されている³⁾²²⁾²³⁾。

1) 排卵後の卵の加齢による卵細胞における変化

排卵後の卵の加齢は、排卵後卵管内で時間経過するもの(in vivo-postovulatory oocyte aging)と排卵後体外培養にて時間経過するもの(in vitro-postovulatory oocyte aging)に分類されるが、両者の卵の加齢による卵細胞の形態学的、生化学的な変化の多くは共通したものである¹⁹⁾²⁴⁾。形態学的変化：排卵後の卵の加齢により、卵細胞膜、透明帯、表層顆粒、ミトコンドリア、細胞骨格、紡錘体および染色体の配置に異常が起きることが報告されている³⁾²⁴⁾。特に、細胞骨格を形成するアクチンフィラメント、γチューブリン、微小管などの異常は染色体異数性に関与する重要な変化である³⁾²⁴⁾。生化学的变化：排卵後の卵の加齢により、抗酸化物質であるグルタチオンの含有量が低下するとともに活性酸素レベルが増加し、酸化ストレスが亢進することが報告されている²⁵⁾。また、細胞内ATPレベルは排卵後の加齢により低下することが報告されている²⁶⁾。

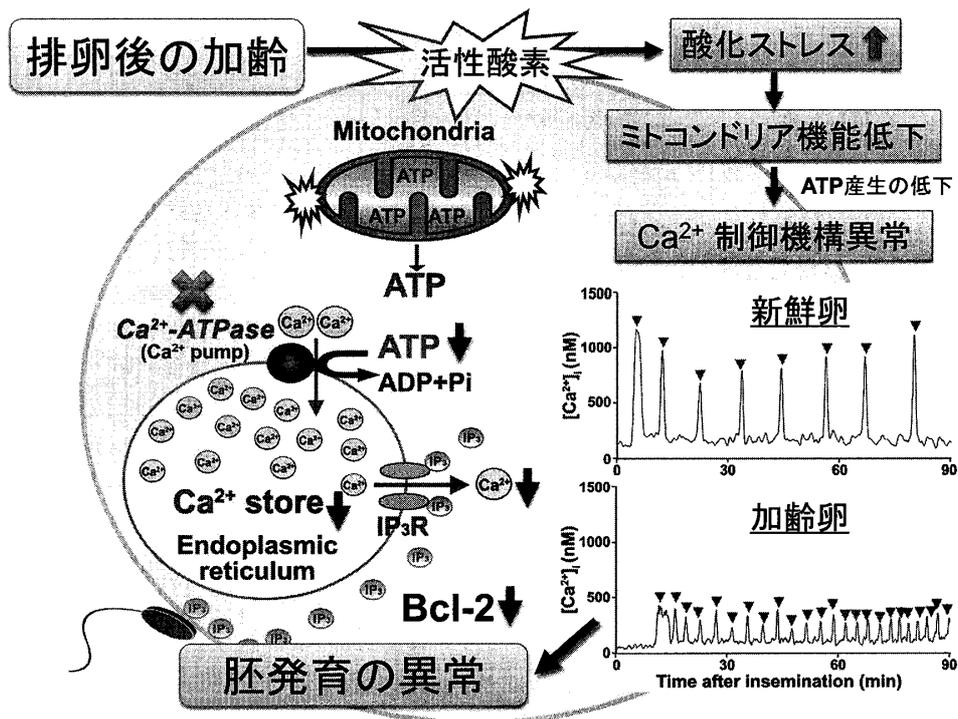


図1 「排卵後の卵の加齢」における胚発育悪化のメカニズム。

排卵後の加齢は活性酸素を増加させ酸化ストレスが亢進する。活性酸素の増加によりミトコンドリア機能が障害されATP産生が低下する。ATP産生の低下は小胞体を中心としたカルシウム制御機構の異常(Ca^{2+} -ATPaseによる Ca^{2+} の取り込みやイノシトール三リン酸受容体(IP3R)を介した Ca^{2+} の放出の低下)を引き起こす。カルシウム制御機構の異常の起きた卵が受精すると、カルシウムオシレーションの波形が低振幅・高頻度を示す。このカルシウムオシレーションの波形の変化と抗アポトーシス分子Bcl-2の低下により、受精後の胚はアポトーシスが促進され、胚発育が悪化する。新鮮卵(hCG投与後14時間目に卵管内より採取した排卵卵子)と加齢卵(hCG投与後20時間目に卵管内より採取した排卵卵子)。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$:細胞内 Ca^{2+} 濃度。矢頭はカルシウムオシレーションの個々の波形の頂点を示す。

2) 排卵後の卵の加齢による胚発育悪化のメカニズム

排卵後の加齢卵は、受精後の胚発育が悪化しフラグメンテーション胚が増加するが、これらの胚はアポトーシスを起こしている²⁷⁾²⁸⁾。排卵後の加齢卵は、アポトーシス促進分子であるBaxは変化しないが、抗アポトーシス分子であるBcl-2の発現が低下していることが報告されている²⁷⁾²⁹⁾。

卵は受精すると細胞内カルシウム濃度の周期的な変動が起こり、この現象はカルシウムオシレーションと呼ばれている。受精時のカルシウムオシレーションは、表層顆粒の放出、多精子進入の防

止、卵の活性化に重要であることが知られている³⁰⁾。排卵後すぐに受精した卵(新鮮卵)と排卵後時間経過した加齢卵を用いて受精時カルシウムオシレーションを測定すると、加齢卵では新鮮卵と比べオシレーションの振幅が低下し頻度が増加することが報告されている²⁷⁾³¹⁾。このカルシウムオシレーション変化は、小胞体における細胞内カルシウム制御機構の破綻が原因と考えられている³¹⁾³²⁾。小胞体のカルシウム貯蔵量を実験的に減少させた新鮮卵は、受精時のカルシウムオシレーションの波形が加齢卵の場合と同様の变化を示した²⁷⁾³³⁾。小胞体のカルシウム貯蔵量を規定する重要な因子と

して小胞体カルシウムポンプ(smooth endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA)があるが、加齢卵では細胞内 ATP の低下による SERCA の機能低下が起こり、これが排卵後の加齢による細胞内カルシウム制御機構の破綻のひとつの要因と考えられる²³⁾。加齢卵における細胞内 ATP の低下は、ATP 産生場であるミトコンドリアの機能が低下を示している。ミトコンドリア機能の低下を引き起こす原因として酸化ストレスの関与が想定されている。排卵後の加齢卵は、卵細胞膜の酸化の程度が亢進し活性酸素レベルが増加することが報告されている²⁷⁾³⁴⁾。また、新鮮卵に過酸化水素を投与し実験的に酸化ストレスを亢進させると、酸化ストレスが加わった新鮮卵における受精時のカルシウムオシレーションの波形は、加齢卵と同様の変化を示すことが報告されている³⁴⁾。排卵後の卵の加齢による胚発育悪化のメカニズムを図1に示す²³⁾。

5. おわりに

母体加齢による「卵の質の低下」のメカニズムに関する研究には、(1)適切な動物モデルがないこと、(2)実験に用いる卵の採取に1年以上の動物の飼育時間が必要なこと、(3)実験試料として卵の絶対量が少ないことといった問題点がある。このような理由から、母体加齢による「卵の質の低下」については分子レベルでの詳細な解析が困難である。一方、これまで多数の研究報告があることからわかるように、排卵後の卵の加齢は「卵の質の低下」のメカニズムを明らかにする有用な実験モデルと考えることができる。しかし、「母体の加齢による卵の加齢」のメカニズムは「排卵後の卵の加齢」と異なっている可能性が示唆されている³⁾。技術的な問題点を克服しながら、「母体の加齢による卵の加齢」のメカニズムに関する研究を今後も進めていく必要がある。

この論文に関連して開示すべき利益相反状態はありません。

文献

- 1) 日本産科婦人科学会平成24年度倫理委員会. 平成24年度倫理委員会登録・調査小委員会報告(2011年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および2013年7月における登録施設名). 日産婦誌 2013; 65: 2083—2115
- 2) Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: Mechanisms and clinical consequences. *Endocrine reviews* 2009; 30: 465—493
- 3) Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S, H. K. Cellular and molecular mechanisms of various types of oocyte aging. *Reprod Med Biol* 2011; 10: 239—249
- 4) Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963; 158: 417—433
- 5) Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine reviews* 2009; 30: 438—464
- 6) Fruman DA, Rommel C. Pi3k and cancer: Lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews Drug discovery* 2014; 13: 140—156
- 7) Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovannella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. Pten, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943—1947
- 8) 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
- 9) Reddy P, Adhikari D, Zheng W, Liang S, Hamalainen T, Tohonen V, Ogawa W, Noda T, Volarevic S, Huhtaniemi I, Liu K. Pdk1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Human molecular genetics* 2009; 18: 2813—2824

- 10) de Vries BB, Halley DJ, Oostra BA, Niermeijer MF. The fragile x syndrome. *Journal of medical genetics* 1998; 35: 579—589
- 11) Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, Hudson R, Gorwill H, Nolin SL, Glicksman A, Jenkins EC, Brown WT, Howard-Peebles PN, Becchi C, Cummings E, Fallon L, Seitz S, Black SH, Vianna-Morgante AM, Costa SS, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Murray A, Webb J, Vieri F, et al. Fragile x premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: The international collaborative pof in fragile x study—preliminary data. *American journal of medical genetics* 1999; 83: 322—325
- 12) Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman PJ. Elevated levels of *fmr1* mrna in carrier males: A new mechanism of involvement in the fragile-x syndrome. *American journal of human genetics* 2000; 66: 6—15
- 13) Rousseau F, Rouillard P, Morel ML, Khandjian EW, Morgan K. Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the *fmr1* gene— and implications for the population genetics of the fragile x syndrome. *American journal of human genetics* 1995; 57: 1006—1018
- 14) American College of O, Gynecologists Committee on G. Acog committee opinion. No. 338: Screening for fragile x syndrome. *Obstetrics and gynecology* 2006; 107: 1483—1485
- 15) Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, Sandalinas M, Brenner CA. Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes. *Molecular human reproduction* 2001; 7: 49—55
- 16) Hodges CA, Revenkova E, Jessberger R, Hassold TJ, Hunt PA. *Smc1* beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nature genetics* 2005; 37: 1351—1355
- 17) Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MS. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Human molecular genetics* 2004; 13: 2263—2278
- 18) Steuerwald NM, Bermudez MG, Wells D, Munne S, Cohen J. Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes. *Reproductive biomedicine online* 2007; 14: 700—708
- 19) Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: From gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human reproduction update* 2009; 15: 553—572
- 20) Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, Lombardi L, De Placido G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2001; 16: 909—917
- 21) Barritt JA, Cohen J, Brenner CA. Mitochondrial DNA point mutation in human oocytes is associated with maternal age. *Reproductive biomedicine online* 2000; 1: 96—100
- 22) Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A. Consequences on offspring of abnormal function in ageing gametes. *Human reproduction update* 2000; 6: 532—549
- 23) Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S, Matsuo K, Kurachi H. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: Mini review. *The journal of obstetrics and gynaecology research* 2013; 39: 1431—1439
- 24) Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. Oocyte aging: Cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human reproduction update* 2009; 15: 573—585
- 25) Boerjan ML, de Boer P. First cell cycle of zygotes of the mouse derived from oocytes aged postovulation in vivo and fertilized in vivo. *Molecular reproduction and development* 1990; 25: 155—163
- 26) Chi MM, Manchester JK, Yang VC, Curato AD, Strickler RC, Lowry OH. Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova. *Biology of reproduction* 1988; 39: 295—307
- 27) Takahashi T, Igarashi H, Kawagoe J, Amita M, Hara S, Kurachi H. Poor embryo development in mouse oocytes aged in vitro is associated with impaired calcium homeostasis. *Biology of reproduction* 2009; 80: 493—502
- 28) Fissore RA, Kurokawa M, Knott J, Zhang M, Smyth J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*

- 2002; 124: 745—754
- 29) Gordo AC, Rodrigues P, Kurokawa M, Jellerette T, Exley GE, Warner C, Fissore R. Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in in vitro aged mouse eggs. *Biology of reproduction* 2002; 66: 1828—1837
- 30) Miyazaki S. Intracellular calcium oscillations in mammalian eggs at fertilization. *The Journal of physiology* 2007; 584: 713—714
- 31) Igarashi H, Takahashi E, Hiroi M, Doi K. Aging-related changes in calcium oscillations in fertilized mouse oocytes. *Molecular reproduction and development* 1997; 48: 383—390
- 32) Takahashi T, Saito H, Hiroi M, Doi K, Takahashi E. Effects of aging on inositol 1,4,5-triphosphate-induced ca^{2+} release in unfertilized mouse oocytes. *Molecular reproduction and development* 2000; 55: 299—306
- 33) Jones KT, Whittingham DG. A comparison of sperm- and ip3-induced ca^{2+} release in activated and aging mouse oocytes. *Developmental biology* 1996; 178: 229—237
- 34) Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, Tezuka N, Kurachi H. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Molecular reproduction and development* 2003; 66: 143—152

Mechanism of oocyte aging

Toshifumi Takahashi

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Yamagata University

Key words: Oocyte aging, Post-ovulatory oocyte aging, Embryo development, Oxidative stress, Calcium homeostasis