# 第１９回　神澤医学賞受賞講演　要旨

## 卵巣機能不全に対する新たな不妊治療「卵胞活性化療法」の開発

Development of novel therapy “ IVA: in vitro activation” for infertile patients with ovarian dysfunction

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卵巣不全 (POI; primary ovarian insufficiency) という疾患が存在する。POI 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 POI 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、卵巣内に残存する卵胞に着目し、基礎・橋渡し・臨床研究を行ってきた。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 POI 患者の妊娠･出産例を報告した。ここでは、一連の研究成果を紹介し、今後の研究展望につき考察する。

### 早発卵巣不全の病態

POI 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）など原因は多岐にわたるが[1]、共通の主要な病態は卵巣内の残存卵胞の急激な減少である。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。POI は全女性の 100 人に 1 人に自然発生することから、我が国の晩婚化の傾向により、これまでは POI 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 POI 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 POI 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。

### 卵胞活性化療法の開発

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[2]。しかし、いくらこのような因子を用いても、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[3-7]。

さらに、卵巣の断片化が初期卵胞の発育を促進することを見出した。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 成長因子などの産生を促進し、細胞増殖がおこ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。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。従って、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と考えられる [4-9]。

この卵巣断片化による Hippo シグナルの抑制と PI3K-Akt シグナルの活性化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、Hippo シグナルの抑制と PI3K-Akt シグナルの活性化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[4-9]。

## 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[3-7]。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[3-7]。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、早発卵巣不全患者に対し臨床応用を開始した。

始めに腹腔鏡施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、POI 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。卵巣機能不全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皮質に局在していることから、摘出した卵巣の髄質部分を切除し、卵巣皮質のみの組織を準備する。これを 1 x 1 $cm^2$, 1-2mm 厚に切離し、それぞれの卵巣皮質断片の約 5-10%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。また症例によっては、卵巣組織をガラス化法にて凍結保存し、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。

培養後、薬剤を体内に持ち込まないよう、培養した卵巣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。その空隙に卵巣小断片を 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。卵管漿膜下を移植部位に選んだ理由として、(1) 血流が抱負で血管新生に有利である、(2) 経腟超音波による卵胞発育モニターが容易である、(3) 卵胞発育時の採卵が容易である、といった点が挙げられる。

卵巣移植後は、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 製剤による卵巣刺激を行う。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、経腟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、通常の体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 の早発卵巣不全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 名の早発卵巣不全患者（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[4-10]。現在、中国、スペインで IVA の追試に成功し、妊娠例が出ている[11, 12]。

## 今後の展望

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巣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) 移植後の卵巣正着率が不十分、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、増加している卵巣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 AJW: 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 AJW: 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***, in press.

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 AJW: 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