

9 卵巣の老化

菅原かな 浜谷敏生

形態学的変化

卵巣の大きさは、15～29歳で平均 $41 \times 30 \times 17$ mmと最大値となり、その後30歳以降は加齢とともに縮小し、50歳代には平均 $27 \times 15 \times 10$ mmとなり、以降さらに縮小する¹⁾。

生殖細胞は胎生5カ月時の胎児卵巣に600万以上存在するが、出産時の卵母細胞は70～100万まで減少する。卵母細胞は胎児期に第1減数分裂前期を終了し、思春期まで分裂は進行しない。この間に卵母細胞が退化し、思春期までに約4万の卵母細胞が残るといわれる¹⁾。その後30歳代後半までほぼ一定の割合で卵母細胞は減少し、40歳代に入ると急激に減少する。40歳代後半で卵巣中の原始卵胞は、ほぼ認められなくなり、閉経時には卵母細胞は卵巣中より消失する¹⁾。このようにヒト卵巣では閉経と卵母細胞の消失はほぼ一致している。

卵巣は、表層より組織学的に表層上皮、白膜、皮質、髄質に分けられている。組織学的変化としては、20歳代以降では白膜と皮質の境は明瞭となり、一次卵胞は皮質最外層にほぼ一列に並ぶ。閉経前期に結合織の増殖が始まり、白膜が肥厚するとともに卵胞数の減少に伴う、皮質の菲薄化と間質結合織の増殖がみられる。また、性成熟期には黄体から変化した白体はすぐに吸収されるが、40歳代になると吸収速度が低下するために堆積するようになり、閉経後には集団塊となる¹⁾。卵巣血管には筋層の委縮・消失、弾性線維の乱れ・断裂、内腔の狭小化・閉鎖がみられ、血管硬化の病態が強まり血管の著しい機能低下が推測される。

内分泌学的変化

性成熟期には間脳-下垂体-卵巣系により制御されているが、加齢とともに以下のような内分泌学的変調をきたし閉経に至る。

☆ゴナドトロピン

閉経前期には卵巣のゴナドトロピンに対する感受性が低下し卵胞の発育不全をきた

し、卵巣からのエストロゲン産生低下をきたすとともに、血中ゴナドトロピンは上昇する。Shermanらは、閉経前のFSH/LH比は1より高くなることはないが、閉経後は常に1を超えると報告している³⁾。エストロゲン産生が低下することで、ネガティブフィードバックによりゴナドトロピンが増加するが、LHよりFSHの分泌の感受性がより高いためであると考えられる。

❖エストロゲン

卵巣の老化によりエストロゲンの産生が低下するが、これは胞状卵胞の減少やエストロゲンを分泌する顆粒膜細胞の減少が原因と考えられる。血中エストロン (E_1)、エストラジオール (E_2)、エストリオール (E_3) は40歳代になると徐々に減少し、閉経後3年以降ではさらに低値となるが、なかでも E_2 の低下が最も著明といわれる¹⁾。この機能低下がどの時期から始まっているのかについて、広井ら²⁾によると、各年代別に月経周期の第7日目よりhMG150IUを5日間連続投与して血中のエストラジオールの変化をみたが、20歳代では月経周期9日目より急速なエストラジオールの増加を示し、排卵日直前では3,000pg/mLと著明な上昇を示した。30歳代からは反応が低下し、50歳代ではほとんど反応を認めなかったことから、卵巣のゴナドトロピンに対する感受性の低下は30歳代から始まっていることが示唆された。また閉経期の卵巣からのエストロゲン低下をきたす原因として、P-450アロマターゼ、P-450SCC、 3β HSD、P-450C17などのステロイド合成酵素の低下も関連していると考えられる⁴⁾。

❖プロゲステロン

加齢に伴ってプロゲステロン分泌は減少する。加齢とともに、基礎体温において黄体期が短縮する傾向が観察されたり、妊娠が途中で中断される頻度が増加したり、あるいは無排卵性周期の頻度が増加したりすることなどからも容易に推測される。また、血中プロゲステロンやデヒドロキシプロゲステロンは、デキサメサゾン投与することで低下し、ACTHの投与で上昇するといわれ、副腎がプロゲステロン産生に重要な役割を果たしていると考えられる⁵⁾。一方で、副腎でも加齢に伴いコルチゾールのネガティブフィードバックに対する視床下部-下垂体の感受性が低下し、ACTHが上昇するという変化がみられる⁶⁾。

❖アンドロゲン

卵巣から分泌される主なアンドロゲンには、アンドロステンジオンとテストステロンがある。血中アンドロステンジオンは加齢に伴い減少傾向がみられるが、血中テストステロンは50歳代で一時的に減少するものの、閉経後の卵巣間質細胞において産生亢進するため、その後は徐々に増加傾向を示す⁷⁾。閉経後の卵巣は、エストロゲン分泌からアンドロゲン分泌優位になるといえる。

❖抗Müller管ホルモン

抗Müller管ホルモン (AMH) は前胞状卵胞より分泌され、生殖年齢女性では、卵巣の顆粒膜細胞より分泌される。生殖年齢女性の血清AMH値は加齢とともに減少

表1 排卵誘発に対する反応の予測の評価方法

単変量解析	オッズ比(95%CI)	P
AFC (per follicle)	0.70 (0.61~0.81)	<0.001
AMH (per 0.1 μ g/L)	0.82 (0.75~0.90)	<0.001
FSH (per IU/L)	1.41 (1.22~1.63)	<0.001
inhibin B (per ng/L)	0.98 (0.97~0.99)	<0.001
age (per year)	1.07 (0.99~1.16)	NS
E ₂ (per pmol/L)	1.003 (1.000~1.006)	NS

多変量解析	オッズ比(95%CI)	P
<i>All variables</i>		
AFC (per follicle) and	0.77 (0.65~0.90)	0.001
inhibin B (per pg/L) and	0.98 (0.97~0.99)	0.006
FSH (per IU/L)	1.27 (1.07~1.50)	0.006
<i>AFC excluded from analysis</i>		
AMH (per 0.1 μ g/L) and	0.90 (0.82~0.98)	0.018
inhibin B (per pg/L) and	0.98 (0.97~0.99)	0.005
FSH (per IU/L)	1.26 (1.07~1.50)	0.006

(文献⁹⁾より抜粋)

し発育卵胞の減少を反映するため、血清 AMH 値は卵巣予備能のマーカーとされている。蛋白ホルモンであり、構造的にインヒビンやアクチビンと関係し β 成長因子に属し、FSH による過剰な卵胞のリクルートメントを防ぐ働きがある。卵巣予備能の指標として妊娠率との相関を検討したところ、血清 FSH やインヒビン B や E₂ よりよい相関を示し、胞状卵胞数 (antral follicle count : AFC) と同程度に良好な相関が認められた³⁾ [表1]。

卵子の老化

一般的に女性の加齢とともに妊娠率は低下する。これは、アメリカでの高齢者の妊娠率と卵子ドナーによる妊娠率を比較することで明らかであるように、卵子の質の低下と関連すると考えられている。卵子の形成過程で発生する質的低下や退行変性がその後の発生異常の原因となることは実験的に証明されている。実際、加齢により卵子には、染色体異常率の上昇、染色体不分離、ミトコンドリア機能の低下、活性酸素防御機能低下、ジェネティック・エピジェネティック機能低下などが起こると報告されている。そのほか、卵巣内局所環境の悪化としての顆粒膜細胞数の減少や内分泌機能低下、ステロイド産生能低下が指摘されている。

◆染色体異常

加齢とともに自然流産率が上昇することはよく知られている。Stevenson ら⁹⁾によると、自然流産率は 34 歳以下が 10.5% (7,525 妊娠中 793 流産) であったのに対し、35~39 歳では 15.5% (1,417 妊娠中 219 流産)、40 歳以上では 24.1% と報告されている。

また、検体の採取が可能であった自然流産の約50%に染色体異常を認め、染色体の倍数体 (polyploidy) としては3倍体や4倍体が多く、異数体 (aneuploidy) としては常染色体トリソミーおよびXOを示す性染色体異常が大部分を占める。

3倍体の約70%は母側に原因があり、4倍体のほとんどが原形質の分裂を伴わない核の分裂による初期の卵割異常によると考えられている。

また Benadiva ら¹⁰⁾ は、FISH法を用い、IVF施行時の195個の卵および割球の染色体を解析したところ、16番染色体の異数体は、34歳以下の女性から得られた卵では認められなかったが、35~39歳では6.3%、40歳以上では11.7%と加齢に伴い増加し、その72.7%がモノソミーであったとしている。加齢に伴う卵子のaneuploidyの発生のメカニズムには不明な点が多いが、染色体不分離との関連が注目される。

❖染色体不分離

染色体の不分離は主に第1減数分裂時に発生していると考えられる。胎生初期に増殖した卵原細胞は、一次卵母細胞に分化した後に第1減数分裂を行うが、metaphase II (M II) で排卵時までの長期間の休止状態に入る。その後、排卵直前にLHの作用により再度分裂を開始する。この休止期の間にかかるなんらかの変化により染色体の不分離が生じる可能性がある。Battaglia ら¹¹⁾ は、正常月経を有する若年(20~25歳)および中年(40~45歳)女性の自然発育した卵胞より回収した卵の減数分裂時の紡錘糸や染色体配置などの解析により、中年女性から得られた卵の79%においてチューブリンの整列異常を示す紡錘糸や1つ以上の染色体が逸脱するなどの第2減数分裂中の異常が認められたと報告している。これに対して、若年女性から得られた卵では、染色体の異数性が認められたものは17%であった。加齢に伴い紡錘糸集合化の調節障害を生じることで染色体異常の発生が増加することが示唆される。核型異常のなかで最も多いトリソミーは、母の出産年齢が高くなるとともに増加することは広く知られている。鈴木らによる、生後17~18カ月の加齢ラットを用いた生殖機能に関する実験では、老化卵子の成熟分裂では紡錘糸の退化により染色体の不分離が生じていたと報告されている¹²⁾。また、卵胞卵の染色体分析では、第1減数分裂中期にキアズマが減少し、相同染色体が離れて一価染色体となるものが増加していた。トリソミーの多くは一価染色体が第1減数分裂後期に卵細胞質と第1極体に不均等に配分されていくことで発生すると考えられている。

❖ミトコンドリア機能の低下

成熟卵子にはどの細胞よりも多数のミトコンドリアが存在するが、加齢とともにミトコンドリア数の減少とATP産生量の低下をきたすと報告されている¹³⁾。しかし、ミトコンドリア数の減少だけではATP産生量の低下にはつながらないため、ミトコンドリアの機能低下が主因であると考えられる。これには、ミトコンドリア自体における電子伝達系に由来する活性化酸素により、加齢とともにミトコンドリアDNAに変異が蓄積することも一因になる。また、ミトコンドリアは細胞内のカルシウムイオンの恒常性にかかわっており、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇はATPに依存し

ている¹⁴⁾。Oligo-DNA マイクロアレイを用いたマウス加齢卵の網羅的遺伝子発現解析でも、ATP代謝や酸化ストレス防御などミトコンドリアにかかわる多くの遺伝子発現が有意に低下していたと報告されている¹⁵⁾。また、ヒト加齢卵子を用いたマイクロアレイ解析でも同様の結果が導き出された¹⁶⁾。

❖活性酸素防御機能の低下

活性酸素種は細胞膜を構成する2層のリン脂質を標的とする。膜を構成している多価不飽和酸中の炭素二重結合がfree radicalに攻撃を受けると、膜の脂質が過酸化され細胞膜が脆弱化する。卵巣で起こる排卵現象では、卵胞の中に保持された卵子がダメージを受ける可能性がある。しかし、その酸化ストレスから卵巣を守るために、生体内では抗酸化剤として知られるビタミンEが防御機構として機能していると考えられた¹⁷⁾。ラットの各種組織のビタミンE濃度の測定により、ラット卵巣にはほかの組織と比較して非常に高濃度のビタミンEが存在していること、ラットでは排卵直後の未受精卵および交尾後の受精卵のビタミンE濃度を測定すると受精により卵子のビタミンE濃度が減少することなどが報告されている。また、ビタミンE以外のradical scavengerとしてsuperoxide dismutase (SOD)が重要である。卵胞液中のCu/Zn-SOD濃度を若年女性群(26~37歳, n=24)と高齢女性群(38~43歳, n=22)で比較したところ、若年者群に比較して高齢者群では卵胞液中のCu/Zn-SOD濃度が減少しており、これも活性酸素防御機能の低下を示唆するものである。

❖テロメア長

哺乳類の培養細胞では、染色体の末端にあるテロメアDNAというTTAGGG配列の繰り返し構造があり、これが細胞分裂ごとに短くなり細胞の寿命が決定されるといわれている。

テロメア長と卵発生能の関係について、興味深い報告がある。ヒトにおいてIVFの受精卵のday 3胚のテロメア長と細胞質のフラグメンテーションには、年齢、FSHの基礎値、年齢とFSHの基礎値を調整したうえで負の相関関係があるというのだ¹⁸⁾。この報告によると、テロメア長が1kb減少するごとにday 3胚のフラグメンテーションが0.31%増加するとされている。さらに、活性酸素とテロメアの関係についての報告があり、そのなかでは分割が停止した胚と分割を続ける胚の分析がなされ、FCCP (protonophore carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone)により酸化ストレスを負荷すると、テロメアの摩擦や減少、染色体の融合が起こり、ミトコンドリアの機能不全が引き起こされると報告されている¹⁹⁾。すなわち、加齢により卵巣における酸化ストレスは増大し、ミトコンドリアは機能低下をきたし、テロメアの短縮も誘導され、卵の質の低下に至ると考えられる。

❖卵子の老化における網羅的遺伝子発現解析

卵子の加齢変化に関与する分子メカニズムの解析のため、C57BL/6Jの若齢マウス(5~6週齢)と高齢マウス(42~45週齢)卵について網羅的遺伝子発現解析を行った報告がある²⁰⁾。マイクロアレイに載っていた21,393遺伝子のうち、若齢マウス卵で

表2 卵細胞の加齢における遺伝子発現変化を特徴づける GO term カテゴリー

	GO term カテゴリー	各カテゴリーを代表する発現変化遺伝子
▲oxidative damages	▲mitochondrial electron energy pathway (genes encoded by mitochondrial genome)	<i>mt-Nd3, mt-Atp6, mt-Co (Cox) 1-3</i>
	▼energy pathway and mitochondrial function (genes encoded by nuclear genome)	<i>Sdha, Sod1, Atp5a1, Idh3a, Mrpl9, Hmgcl</i>
▼ATP production	▼nucleotides and ATP metabolism	<i>Atp2c1, Atp6v1d, Atp10a, Adss2</i>
	▼ATP-binding	<i>Nek1-2, Abcb6, Camk2g, Dhx32, Ddx48</i>
▼protection against stress	▼anti-apoptosis	<i>Txn1, Apacd, Rnf34</i>
	▼chaperone	<i>Hspa4, Hspa8, Hsp70-4, Cct1-3, Cct5</i>
	▼ubiquitin-proteasome pathway	<i>Hip1, Ubc, Ube1c, Pama6, Pamb1, Psmc2</i>
▼regulation of cell cycle	▼microtubule cytoskelton	<i>Hook1, Tuba2, Tubd1, Rnf19, Kif3b</i>
	▼chromosome segregation	<i>Smc4l1, Nin, Pcnt2</i>
	▼genome stability	<i>Ccgbp1, Fxr2h, Msh3, Exo1, Pms1, Tert</i>
	▼polycomb	<i>Bmi1, Ezh2, Rybp, Sfmbt1</i>
epigenetic modification	DNA methyltransferase	(▼) <i>Dnmt1o, Dnmt1s, Dnmt3L, Dmap1</i>
		(▲) <i>Dnmt3b</i>
oocyte-specific genes	reproduction/gameteogenesis/	(▼) <i>Vasa, Kit, Zp1-3, ePAD, Zfp38, Mater</i>
	unknown function	(▲) <i>Oosp1, Nohma, 4933427D06Rik, IkBa</i>

(文献²⁰より抜粋)

449 遺伝子、高齢マウス卵で 81 遺伝子と、比較的少数の計 530 遺伝子が有意な発現変化をきたしており、特異的な RNA が加齢変化に関与していると考えられた。これらの有意な発現変化を示した遺伝子がどのような GO term をもつか検討し、特徴的な GO term が抽出された[表2]。GO term とは、molecular function (遺伝子産物の機能や個々の能力)、biological process (1つ以上の機能により達成される細胞内イベント)、cellular component (遺伝子産物の局在位置などの情報) について、遺伝子それぞれに与えられたキーワードである (<http://www.geneontology.org/>)。酸化ダメージに関連した GO term カテゴリーでは、ミトコンドリアゲノムにコードされミトコンドリアの電子エネルギー代謝に関する遺伝子 (*mt-Nd3, mt-Atp6, mt-Co(Cox)1-3*) は増加し、核ゲノムにコードされエネルギー代謝やミトコンドリア機能に関する遺伝子 (*Sdha, Sod1, Atp5a1* など) は減少していた。ATP 産生に関するカテゴリーでは、ヌクレオチドや ATP 代謝に関する遺伝子 (*Atp2c1, Atp6v1d, Atp10a* など) や ATP 結合に関する遺伝子 (*Nek1-2, Abcb6, Camk2g* など) が減少し、ストレスに対する防御機構を示すカテゴリーでは、アンチアポトーシスに関する遺伝子 (*Txn1, Apacd, Rnf34*) やシャペロンに関する遺伝子 (*Hspa4, Hspa8, Hsp70-4* など)、ユビキチン-プロテアーゼ経路に関する遺伝子 (*Hip1, Ubc, Ube1c* など) はいずれも減少していた。また、細胞周期の制御を示すカテゴリーでは、微小管の細胞骨格に関する遺伝子 (*Hook1, Tuba2, Tubd1* など) や染色体分離に関する遺伝子 (*Smc4l1, Nin, Pcnt2*)、ゲノムの安定性に関する遺伝子 (*Ccgbp1, Fxr2h, Msh3* など) のいずれも減少しており、加齢とともに発現が変化することが明らかとなった。

表3 卵細胞と体細胞の加齢における遺伝子発現変化の比較

主な GO term カテゴリー	卵における加齢	脳や肝などの体細胞における加齢
ミトコンドリア機能, 酸化ストレス防御	↓	↓
テロメラーゼ (<i>Tert</i>)	↓	↓
DNAメチル酵素遺伝子	<i>Dnmt1</i> ↓, <i>Dnmt1s</i> ↓, <i>Dnm3L</i> ↓, <i>Dnmt3b</i> ↑	<i>Dnmt1</i> ↓, <i>Dnmt3b</i> ↑ (in fibroblast senescence)
クロマチン・リモデリング関連遺伝子	<i>Hdac2</i> ↓, polycombs (<i>Bmi1</i> など) ↓	→
生殖関連, 卵特異的遺伝子	RNAヘリカーゼ (<i>Vasa</i> など) ↓, <i>Zp1-3</i> ↓, <i>Nalp</i> ↓, <i>Oosp</i> ↑	-
インスリン成長因子関連遺伝子	→	↑
炎症 関連遺伝子	→	↑

(文献²⁰⁾より抜粋)

卵の加齢における遺伝子発現変化を、脳や肝などの体細胞におけるそれと比較すると、ミトコンドリア機能や酸化ストレス防御に関する遺伝子、DNAメチル転移酵素遺伝子 (*Dnmt1*) やテロメラーゼ (*Tert*) は、いずれにおいても減少していた[表3]。しかし、クロマチン・リモデリング関連遺伝子や卵特異的遺伝子は、卵の加齢においてのみ発現が減少し、インスリン成長因子関連遺伝子や炎症関連遺伝子は、体細胞においてのみ発現が増加していた。

成人女性では、加齢とともに卵巣の形態学的・内分泌学的変化が現われ、卵子の老化により染色体異常や染色体不分離、ミトコンドリア機能や活性酸素防御機能の低下、卵子DNAのテロメア短縮など、妊孕性低下につながるさまざまな変化が生じてくる。今後多角的アプローチにより、卵巣および他臓器の老化における分子機構の解明が進められ、妊孕性の拡大へとつながることを期待したい。

[文献]

- 1) 北川武司, 安藤智子, 菅沼信彦: 加齢と卵. 産科と婦人科, 1998; 65: 1783-1790.
- 2) 広井正彦, 斎藤憲康: 加齢と卵巣. 産科と婦人科, 1984; 51: 1439-1445.
- 3) Sherman BM et al.: The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol, and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women. J Clin Endocrinol Metab, 1976; 42: 629.
- 4) Beatrice, C. et al.: The postmenopausal ovary is not a major androgen-producing gland. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001; 86(10): 5060-5066.
- 5) Vermeulen A.: The hormonal activity of the postmenopausal ovary. J Clin Endocrinol Metab, 1976; 42: 247.
- 6) Parker Jr CR et al.: Effects of aging on adrenal function in the human: responsiveness and sensitivity of adrenal androgens and cortisol to adrenocorticotropic in premenopausal and postmenopausal women. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000; 85: 48-54.
- 7) Purifoy FE et al.: Steroid hormones and aging: free testosterone, testosterone and androstenedione in normal females aged 20-87 years. Human Biol, 1980; 52: 181.
- 8) van Rooij LA et al.: Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. Hum

- Reprod, 2002 ; 17 : 3065-3071.
- 9) Stevenson AC, Warnock HA. : Observations on the results of pregnancies in women resident in Belfast : 1.Data relating to all pregnancies ending in 1957. *Ann Hum Genet*, 1958 ; 23 : 382-394.
- 10) Benadiva CA et al. : Aneuploidy 16 in human embryos increases significantly with maternal age. *Fertil Steril*, 1996 ; 66 : 248-255.
- 11) Battaglia DE et al. : Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod*, 1996 ; 11 : 2217-2222.
- 12) 鈴木秋悦 : 加齢と卵子の Aneuploidy. *産婦人科の治療*, 2005 ; 90 : 195-196.
- 13) van Blerkom J, et al. : ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod*, 1995 ; 10 : 415-424.
- 14) Van Blerkom J, et al. : Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis : engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction*, 2004 ; 128 : 269-280.
- 15) Hamatani T, et al. : Age-associated alternation of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet*, 2004 ; 13 : 2263-2278.
- 16) Steuerwald NM, et al. : Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes. *Reprod Biomed Online*, 2007 ; 14 : 700-708.
- 17) 可世木久幸 : 卵巣の加齢と活性酸素. *産科と婦人科*, 2007 ; 12 : 1597-1601.
- 18) David L Keefe, et al. : Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women-Toward a telomere theory of reproductive aging in women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2005 ; 192 : 1256-1261.
- 19) Lin Liu, et al. : Mitochondrial dysfunction leads to telomere attrition and genomic instability. *Aging Cell*, 2002 ; 1 : 40-46.
- 20) 浜谷敏生 : 遺伝子発現プロファイリングによる卵の加齢機構の探索. *日本産科婦人科学会雑誌*, 2008 ; 60 : 1798-1812.

卵胞発育と成熟の局所調節因子

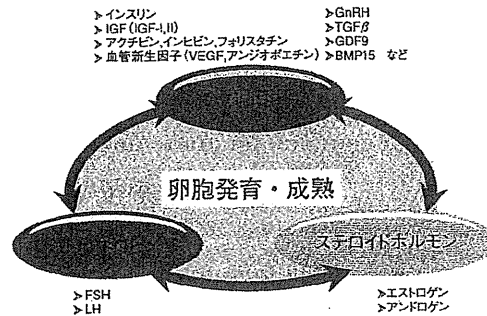


Key words

IGF/インスリン/アクチビン/インヒビン/フォリスタチン/VEGF/アンジオポエチン/GnRH

はじめに

卵巣における卵胞発育や成熟は、視床下部-下垂体系からの内分泌的な調節と、卵巣内で局所的に機能する因子の調節を受けている。主要な調節因子はゴナドトロピンやステロイドホルモンであるが、卵胞の発育段階によっては必ずしもこれらの因子に依存しないことも知られている。卵胞発育を特徴づける顆粒層細胞の増殖・分化調節機構や卵胞の選抜機構については未だ不明な部分も多いが、近年、ゴナドトロピンやステロイドホルモンによる中枢的な役割に加えて、インスリン、インスリン様成長因子(IGF, insulin-like growth factor), トランスフォーミング増殖因子- β (TGF β , transforming growth factor-beta)ファミリー, 血管内皮成長因子(VEGF, vascular endothelial growth factor), 骨形成タンパク質(BMPs, bone morphogenetic proteins), 増殖分化因子(GDF, growth differentiation factor), ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH, gonadotropin-releasing hormone)など、多くの局所調節因子(群)の関与が報告されている。これらの因子は、ゴナドトロピンやステロイドホルモンの作用と相補的に機能することで、卵胞発育・成熟を調節していることが明らかになってきている。つま



図VIII-36-1.

正常な卵胞発育・成熟は「ゴナドトロピン・ステロイドホルモン・局所調節因子(群)」これら三者の協調作用によって支えられている。

り、正常な卵胞発育・成熟は、「ゴナドトロピン」, 「ステロイドホルモン」, 「局所調節因子(群)」, これら三者による協調的作用によって支えられているといえる(図VIII-36-1)。ゴナドトロピンやステロイドホルモンによる調節機構については他稿に譲り、本節では局所調節因子の中から(1)IGF・インシュリン, (2)アクチビン・インヒビン・フォリスタチン, (3)血管新生因子, (4)GnRH, をピックアップし、それらの卵胞発育・成熟過程における局所的作用について概説する。

1 局所調節因子の分子構造と作用機序

(A) IGF, インスリン

細胞増殖を促す成長因子は、今日までさまざまな因子が発見、研究されているが、その中でも IGF および インスリンは、古くから発見されているペプチドホルモンで、代表的な成長因子である。IGF には IGF-I と IGF-II の 2 種類が存在しており、それぞれ分子量は約 7.7kDa、約 7.5kDa のポリペプチドである。いずれも主として肝臓で産生されるが、卵巣を含む多くの組織でもそれらの産生が確認されている。インスリンは、2 本のアミノ酸鎖がジスルフィド結合した分子量約 5.8kDa のポリペプチドである。膵島の B 細胞内で産生され、血中に分泌される。

IGF はインスリン様の作用のほかにも、細胞増殖、細胞分化促進、機能調節などの作用を有する。また、インスリンは血糖低下作用をはじめ、卵巣を含むさまざまな組織で 100 以上の遺伝子を調節するといわれており、その作用は幅広い。IGF-I、IGF-II および インスリンには、それぞれに特異的なレセプターが存在している。IGF と インスリンは構造が類似しているため、それぞれ親和性は異なるものの、インスリンは IGF-I レセプターとも結合し、IGF-I および IGF-II はインスリンレセプターと IGF レセプターのいずれにも結合することができる。また、IGF-I および IGF-II は、血中や組織中では IGF 結合タンパク質 (IGFBP, IGF binding protein) と結合して存在している。現在、IGFBP-1-IGFBP-6 が発見されており、単なる IGF キャ

リアーとしてだけでなく、IGF の作用を修飾する役割を果たしていると考えられている。このようなレセプター結合の柔軟性や IGFBP の修飾によって、IGF および インスリンの生理作用は複雑かつ多様なものとなっている。

(B) アクチビン, インヒビン, フォリスタチン

アクチビン, インヒビンは、下垂体からの FSH 分泌を調整する生理活性物質である。インヒビンは FSH 分泌促進因子として卵胞液から単離・精製され、一方、アクチビンはインヒビンの精製過程で FSH 分泌促進因子として同定された。アクチビンとインヒビンは、いずれも TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子に分類されており、共に二つのサブユニットが一つのジスルフィド結合により架橋された二量体の糖タンパク質である。アクチビンは β サブユニット (β A もしくは β B) からなるホモダイマーで、アクチビン A (β A β A), アクチビン B (β B β B), アクチビン AB (β A β B) の三つのアイソフォームが存在する。一方、インヒビンは α サブユニットと β サブユニットからなるヘテロダイマーで、インヒビン A (α β A) とインヒビン B (α β B) の二つのアイソフォームが存在する。また、フォリスタチンもインヒビンの精製過程で FSH 分泌促進因子として発見された。フォリスタチンは一本鎖の糖タンパク質であり、スプライシングと糖鎖の付加によって分子サイズの異なる複数のアイソフォームが存在する。

アクチビンは広範囲の組織に発現しており、臓器ごとに異なった作用を示すことが知られて

いる。アクチビンのレセプターにはI型、II型およびIII型の3種類が確認されており、そのシグナル伝達にはI型レセプターおよびII型レセプター両者の存在が必要である (Altisano et al, 1993)。FSH 分泌促進因子であるフォリスタチンはアクチビン結合タンパク質であり、アクチビンの β サブユニットと不可逆的に結合する。フォリスタチンが結合したアクチビンはII型レセプターへ結合することができなくなるため、フォリスタチンはアクチビンの作用を中和する作用を有している (Ueno et al, 1987)。フォリスタチンの発現はアクチビンの発現分布パターンと非常に似ていることからフォリスタチンは生体内でアクチビンのさまざまな作用を調節していると考えられている。また、フォリスタチンのアイソフォームのうち血中を循環しているアイソフォームは血中のアクチビンと結合しその作用を中和していることから、アクチビンのエンドクリン作用は存在せず、主としてオートクラインもしくはパラクライン作用で機能すると考えられている。インヒビンは卵巣内の顆粒層細胞に発現が見られ、主として下垂体-卵巣間のエンドクライン因子として下垂体からのFSH分泌を抑制する作用を有している。一方で、レセプターである β グリカンに結合すると、その複合体がアクチビンII型レセプターと結合して、局所的にアクチビンの作用を抑制する機能を有していることも明らかになっている (Lewis et al, 2000)。

(C) 血管新生因子

血管発生の過程は大きく二つの形に分けられる。胚形成期において未熟な血管叢が新規に形

成される「脈管形成 (vasculogenesis)」と、既存の血管から新しい血管が発芽し形成する「血管新生 (angiogenesis)」である。正常な血管発生は、脈管形成/血管新生の促進と抑制のバランスによって制御されている。特に、血管新生因子 (VEGF, アンジオポエチン) やそのレセプターが血管新生において中心的役割を果たすことが示されている。

VEGFは分子量45kDaの糖タンパク質で、ヒトでは五つのアイソフォーム (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃およびVEGF₂₀₆) が報告されている。VEGFは内皮細胞の細胞分裂の促進や微小血管の血管透過性の亢進といった作用を有し、主に脈管形成や血管新生の初期に機能する。VEGFには2種類のチロシンキナーゼ型レセプター (Flt-1およびFlk-1) が存在しており、それぞれは異なるシグナル伝達によって内皮細胞の機能や構造に変化を与える。血管新生はFlk-1の活性が刺激となって開始され、Flt-1の活性化によって管腔形成や血管壁の会合が促されると考えられている (Shibuya, 1995)。

VEGFは他の血管新生因子であるアンジオポエチン (Ang-1およびAng-2) と協調して機能する (Hanahan, 1997)。VEGFが血管形成の初期に機能するのに対し、アンジオポエチンは形成された血管の安定化もしくは脆弱化に機能する。Ang-1, Ang-2は共に内細胞特異的なチロシンキナーゼ型レセプターであるTie-2に結合するが、その作用機序は両者で異なる。血管新生にはTie-2のリン酸化が必要であるが、Ang-1がTie-2のリン酸化を誘導する一方で、Ang-2はTie-2のリン酸化を誘導しない。したがって、Ang-2はAng-1のアンタゴニストとして機能

エンドクライン/パラクライン/オートクライン (endocrine/paracrine/autocrine) : 内分泌で分泌された物質の作用様式のこと。エンドクラインとは、分泌された物質が体液によって分泌細胞から離れた器官に運ばれ、そこで作用する様式。パラクラインとは、分泌された物質が分泌細胞の近隣の細胞に作用する様式。オートクラインとは、分泌された物質が分泌細胞自身に作用する様式。

すると考えられている。通常、Ang-1の働きによってペリサイト（周皮細胞）が新生血管を取り囲み、成熟した血管が形成されているが、Ang-2が優勢となることで、ペリサイトが血管から離脱した不安定な状態となり、血管新生が開始する。その後、再度、Ang-1が優勢となることで血管は再び成熟した血管構造を保持するようになる。つまり、Ang-1とAng-2は、その量的バランスによって血管新生に機能している (Stratmann et al, 1998)。

(D) GnRH

視床下部で産生されるGnRHは、エンドクライン作用で下垂体からのゴナドトロピン分泌を促す作用を有しており、哺乳類の生殖内分泌においてきわめて重要な役割を果たすことが知られている。GnRHはGnRH-IとGnRH-IIの2種類が発見されている。三つのアミノ酸残基が異なるが、いずれも10個のアミノ酸から構成されるデカペプチドである。GnRH-IとGnRH-IIのそれぞれに特異的なレセプターが発見されており、これらは異なったシグナル伝達によって作用することが示唆されている。いずれのGnRHも、魚類から霊長類まで広く保存されていることから、生物学的に重要な役割を果たしていることがわかるが、GnRH-IIの生理的作用については未だ不明な点が多い。

一般的に知られるGnRHの作用としては、その名が示すように下垂体からのゴナドトロピン放出を刺激することである。つまり、視床下部の神経分泌細胞で産生されたGnRHは下垂体門脈へパルス状に分泌され、下垂体前葉に存在するレセプターに結合することによって、下

垂体からのゴナドトロピンの生合成および放出を刺激する。高濃度のエストロジェンは、GnRHパルスの頻度を増加させる作用があり、卵胞期後期にはGnRHパルスの頻度が次第に増加することでLHサージを引き起こし、排卵を誘発することが知られている。ところが、近年、このようなゴナドトロピン放出刺激という中心的な役割に加えて、下垂体以外の組織におけるGnRHあるいはGnRHレセプターの発現が胎盤、卵巣、乳腺、子宮などで報告され、その生理的意義についても関心が集まっている。

2 卵胞発育・成熟における局所調節因子の作用

(A) IGF, インスリン

IGFは血中ホルモンとして内分泌的に機能するが、局所産生物質としてバラクライン、オートクライン的にも機能する。IGF-Iは顆粒層細胞や莖膜細胞で産生されるが、ラットやブタでは顆粒層細胞が主であるのに対し、ヒトでは莖膜細胞が主と、動物種によって特異性が見られるようである (Hernandez et al, 1992)。卵胞発育過程において、IGF-Iは顆粒層細胞の細胞増殖を促す (Bley et al, 1992) だけではなく、FSHに対する感受性を高めることで莖膜細胞でのアンドロゲン合成を促進させ (Talavera, Menon, 1991; Zhou et al, 1997)、さらには顆粒層細胞でのエストロゲン産生を促進するなど、顆粒層細胞の機能分化にも作用することが明らかになっている (Bergh et al, 1993)。閉鎖卵胞では発現しない (Oliver et al, 1989)。IGF-Iレセプターは発育卵胞、閉鎖卵胞の顆粒層細胞、卵子、莖膜細胞、黄体

と卵巣内に広く発現しており、顆粒層細胞における発現は、卵胞発育とともに増加し、卵胞閉鎖に伴い減少する (Samoto et al, 1993b). 一方、IGF-II も IGF-I と同様に、顆粒層細胞の細胞増殖と分化を促進する作用を有しており、胞状卵胞の顆粒層細胞で高い発現を示す (el-Roeiy et al, 1993). IGF-II レセプターも顆粒層細胞や莖膜細胞で発現が見られ、IGF-II の作用は IGF-I レセプターと TGF-II レセプターの両方を介していると考えられている。また、IGF の作用は、前述のように IGFBP と結合することで修飾されるが、顆粒層細胞では IGFBP-4 および 5 の発現が確認されている (Nakatani et al, 1991). それらの発現は FSH に対して抑制的であり、FSH 濃度の低い閉鎖卵胞で発現が高いことから、IGFBP は IGF と複合体を形成することで、IGF による顆粒層細胞の増殖や分化作用を抑制していると考えられる。これらのことから、卵胞発育・成熟過程において IGF は促進的に、IGFBP は抑制的に機能していると考えられる。また、インスリンも FSH 存在下で LH レセプター発現を増強し、そのレセプターは顆粒層細胞や莖膜細胞に確認されていることから、インスリンも顆粒層細胞の増殖、分化を促進し、卵胞発育に促進的に機能することが明らかにされている (Maruo et al, 1988). 一方で、インスリンレセプターは、閉鎖卵胞の莖膜細胞やその周囲間質にもその発現増加が見られることから (Samoto et al, 1993a), インスリンは卵胞発育・成熟のみならず、閉鎖後の周囲間質の修復にも機能していることが示唆される。

以上のように、IGF やインスリンは顆粒層細胞の増殖や分化、さらには卵胞閉鎖など、卵胞

発育・成熟過程においても、幅広い作用を有していることが示唆される。このような多面的な作用は、レセプターに対する柔軟な結合性や IGFBP の機能修飾によるものと考えられるが、その作用機序に関しては不明な点が残されている。今後、卵胞発育段階におけるこれらの複雑な作用機序を解明し、卵巣機能における IGF-I, IGF-II およびインスリン、それぞれの作用特性がさらに解明されることが期待される。

(B) アクチビン、インヒビン、フォリスタチン

これらの因子は、下垂体においては FSH 分泌、卵巣においては卵胞発育を調節していることが報告されている。卵巣においてアクチビンは二次卵胞以降の卵胞発育に促進的に作用する (Dierich et al, 1998). 卵胞の発育に FSH の作用は必要不可欠であるが、卵胞内の顆粒層細胞で産生されたアクチビンは顆粒層細胞に FSH レセプターの発現を促進させるとともに、FSH による LH レセプターの発現を誘導する。卵胞発育に伴うアクチビン、インヒビン、フォリスタチンの発現を調べてみると、 β サブユニットの発現は、卵胞発育の初期に高く、卵胞が発育するにつれて低下する。一方、 α サブユニット、フォリスタチンは、これとは逆に、卵胞発育とともに発現が高まる (Roberts et al, 1993; Yamoto et al, 1992). つまり、卵胞発育過程の前胞状卵胞から胞状卵胞初期では、アクチビンが強く発現して顆粒層細胞に FSH レセプターを発現させ、卵胞発育を促進させている。一方で、卵胞の FSH 依存性が低下するとアクチビンの必要性が低下するため、フォリスタチンやインヒビ

ンが合成・分泌されることでアクチビンの作用が中和され、その結果、卵巣内で主席卵胞以外の卵胞は発育が抑制され、卵胞閉鎖に至ることとなる (Knight, Glister, 2001)。

卵巣局所におけるアクチビン、インヒビンおよびフォリスタチンは、卵胞発育、さらには主席卵胞の選抜に重要な役割を果たしていることが示唆される。しかしながら、一般的に、卵巣局所におけるアクチビンやインヒビンの研究の多くは、各サブユニットの遺伝子やタンパク質の発現解析を手がかりとして行われているため、シグナル伝達など未解明な部分が多い。今後は、卵巣におけるアクチビンやインヒビンの作用メカニズムや重要性を明らかにしていくことで、卵胞発育・成熟の機構解明につながるものが期待される。

(C) 血管新生因子

哺乳類の卵巣においても、血管新生は卵胞発育・成熟の過程で重要な役割を果たしている。形態的に観察すると卵胞発育と血管新生には強い相関がみられる (Jiang et al, 2002; Miyamoto et al, 1996)。原始卵胞や一次卵胞では血管供給は観察されないが、二次卵胞になると1-2本の動脈による卵胞周囲への血管供給を認めるようになる。その後、前卵胞状卵胞に達した時点で基底膜周囲の血管網が完成する。卵胞周囲に豊富な血管網を持つようになった卵胞のうち、血管透過性が亢進したものはさらに大きく発育し、排卵へと向かう。このように、卵胞は血管との接触、卵胞周囲の血管網の発達、血管の透過性の亢進という過程を経て排卵へと向かう。一方、選抜されなかった卵胞の周囲では、発育卵胞に

見られるような血管網の発達は認められない。

近年、血管新生因子 (VEGF, アンジオポエチン) やそのレセプターが、卵巣内の血管新生において中心的役割を果たすことが示されている。卵胞周囲の血管網は、血管新生因子の産生部位である顆粒層細胞と血管内皮細胞が存在する莢膜細胞との相互作用によって形成される。卵胞発育・成熟過程における血管新生因子およびそのレセプターの発現を調べてみると、VEGF やそのレセプターである Flt-1 および Flk-1 は卵胞発育に伴って発現が増加する (Shimizu et al, 2002; Shweiki et al, 1992)。一方、アンジオポエチンにおいては、小卵胞では Ang-1 優勢であるのに対し、主席卵胞では Ang-2 優勢となっている (Shimizu et al, 2003a)。つまり、卵胞発育の進んでいる卵胞ほど、卵胞周囲の血管でペリサイトの離脱が起こり、血管新生を積極的に誘導していることが示唆される。

本節では血管新生因子の中でも VEGF およびアンジオポエチンに焦点を絞って紹介したが、ほかに TGF α や bFGF といった因子も卵胞発育・成熟過程において機能していることが報告されている (Shimizu et al, 2002; Yamamoto et al, 1997)。また、血管新生因子は、黄体化にも積極的に関わっていることが報告されており (Ferrara et al, 1998)、血管新生は卵巣機能においてきわめて重要な役割を担っていることが示唆される。卵胞周囲の血管新生は、発育段階によって作用機序の異なる複数の促進因子や抑制因子が、それぞれ単一ではなく協同的に作用していると考えられる。これらの複雑な作用機序を明らかにすることは、卵胞閉鎖や主席卵胞の選抜機構の解明につながるものと期待される。

主席卵胞 (dominant follicle) : 卵巣内に存在している卵胞のうち、実際に排卵に向けて大きく成熟していく卵胞のこと。

(D) GnRH

近年、GnRHは下垂体以外の組織にも作用することが報告されている。卵巢組織においてもGnRHやGnRHレセプターが確認され、卵巢機能における局所的な作用についても注目されている。卵巢で発現するGnRHやGnRHレセプターは、遺伝子レベルの解析において、下垂体で発現しているものと同一であることが明らかにされている(Kang et al, 2000a; Ohno et al, 1993)。前胞状卵胞においてGnRHはFSHレセプターおよびLHレセプターの発現を抑制し、FSH作用に拮抗する(Adashi et al, 1991)。さらに、細胞増殖においても抑制的に働くことや顆粒層細胞のアポトーシスを誘導することが示されていることから、GnRHは卵胞閉鎖に促進的に関与していると考えられる(Imai et al, 1998; Kang et al, 2001a)。一方、卵胞成熟過程では、LHによるアンドロゲン合成やFSH誘導性のアロマターゼ活性によるエストロゲン合成が盛んになるが、低濃度のGnRHはこれらを促進的に、高濃度では抑制的に働くことが報告されている(Kang et al, 2000b; Maeda et al, 1996)。しかしながら、ステロイドホルモン合成に対するGnRH作用については、それ以外にもさまざまな報告がなされていることから、議論の余地がありそうである。卵胞発育過程では、GnRHがオートクライン/パラクライン的に、GnRH自身およびそのレセプターの発現を調節することも報告されているが、低濃度では促進的に、高濃度では抑制的にと、その効果は濃度によって異なる(Kang et al, 2001b)。また、興味深いことに、ゴナドトロピンやエストロゲンはGnRH-I発現には抑制的に、GnRH-II発現には促進的にと、そ

れぞれのGnRHで異なる調節を受けていることが報告されている(Chen et al, 1999; Kang et al, 2001b)。卵巢機能における複雑なGnRH作用は、性格の異なる二つのGnRHが巧妙に関与している可能性が考えられる。

以上のように、GnRHは卵胞発育・成熟過程において抑制的に機能することが示唆されるが、卵巢組織におけるGnRHの発現レベルは下垂体における発現レベルと比較するときわめて小さく、現時点は、卵胞発育・成熟過程におけるGnRHの作用については不明な点が多い。しかしながら、これまでに明らかになっているGnRHおよびそのレセプター発現分布やその作用を見る限り、卵胞発育・成熟過程において局所的に機能しているのは間違いないと思われる。また、黄体にもGnRHやそのレセプターが発現していることから(Bramley et al, 1987)、GnRHは卵胞発育のみならず、黄体機能における役割にも関わっている可能性が高い。前述のように、GnRHにはGnRH-IおよびGnRH-IIの2種類が存在しており、それぞれで異なる役割を担っていると推察される。今後、GnRH-IおよびGnRH-II、さらにはそれらのレセプターの生理学的機能が解明されることで、卵巢機能におけるGnRHの局所作用についてより詳細に解明されることが期待される。

まとめ

近年の細胞生物学、分子生物学の発展により、卵胞発育・成熟過程における局所調節因子の関与が明らかになってきた。卵巢機能においては、あくまでもゴナドトロピンやステロイドホルモンがその中心的役割を担っていることには間違

いないが、本節で紹介したように局所調節因子は、それらの作用を補完するという重要な機能を有していると考えられる。卵巣内の卵胞は生殖細胞である卵子と、それを取り囲む顆粒層細胞や莢膜細胞から構成される特異な構造を示していることから、「卵子-顆粒層細胞-莢膜細胞」間の相互作用や、局所調節因子間の相互作用による機能調節も考えられる。しかしながら、これまでの機能解析研究の多くが、卵胞構造を破壊した細胞培養系による研究成果であり、*in vivo* 環境を反映しているとは言い難い。卵胞発育・成熟過程における局所調節因子の作用機序の解明には、このような点を考慮した研究も必要であると考えられる。最近、トランスジェニックやノックアウト動物を用いた卵胞発育の研究 (Matzuk, 2000; Matzuk et al, 1992), さらに遺伝子導入による局所調節因子の機能解析 (Shimizu, 2006; Shimizu et al, 2003b) も進められている。今後、このような新しい研究により、局所調節因子の興味深い機能や各因子間の相互作用が発見されることで、未だ不明な点が多い卵巣機能における卵胞発育・閉鎖機構や主席卵胞選抜機構が明らかにされることを期待する。

なお、本節で紹介した因子以外にも、TGF β スーパーファミリーである GDF9 (Dong et al, 1996) や BMP15 (Aaltonen et al, 1999; Otsuka, Shimasaki, 2002), インターロイキン 1 などのサイトカイン系 (Levitas et al, 2000; Simon et al, 1994) も卵胞の発育や成熟に重要な役割を果たしていることが報告されている。それらの詳細については本書の他節を参照していただきたい。

(横尾正樹・佐藤英明)

引用文献

- Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, et al (1999) Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis, *J Clin Endocrinol Metab*, 84; 2744-2750.
- Adashi EY, Resnick CE, Vera A, et al (1991) In vivo regulation of granulosa cell type I insulin-like growth factor receptors: evidence for an inhibitory role for the putative endogenous ligand (s) of the ovarian gonadotropin-releasing hormone receptor, *Endocrinology*, 128; 3130-3137.
- Artisano L, Carcamo J, Ventura F, et al (1993) Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors, *Cell*, 75; 671-680.
- Bergh C, Carlsson B, Olsson JH, et al (1993) Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin-like growth factor I and insulin, *Fertil Steril*, 59; 323-331.
- Bley MA, Simon JC, Estevez AG, et al (1992) Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis, *Endocrinology*, 131; 1223-1229.
- Bramley TA, Stirling D, Swanston IA, et al (1987) Specific binding sites for gonadotrophin-releasing hormone, LH/chorionic gonadotrophin, low-density lipoprotein, prolactin and FSH in homogenates of human corpus luteum, II: Concentrations throughout the luteal phase of the menstrual cycle and early pregnancy, *J Endocrinol*, 113; 317-327.
- Chen ZG, Yu KL, Zheng HM, et al (1999) Estrogen receptor-mediated repression of gonadotropin-releasing hormone (gnRH) promoter activity in transfected CHO-K1 cells, *Mol Cell Endocrinol*, 158; 131-142.
- Dierich A, Sairam MR, Monaco L, et al (1998) Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95; 13612-13617.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, et al (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis, *Nature*, 383; 531-535.
- el-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, et al (1993) Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary, *J Clin Endocrinol Metab*, 77; 1411-1418.
- Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, et al (1998) Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis, *Nat Med*, 4; 336-340.
- Hanahan D (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance, *Science*, 277; 48-50.
- Hernandez ER, Hurwitz A, Vera A, et al (1992) Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary, *J Clin Endocrinol Metab*, 74; 419-425.
- Imai A, Takagi A, Horibe S, et al (1998) Evidence for tight coupling of gonadotropin-releasing hormone receptor to stimulated Fas ligand expression in reproductive tract tumors: possible mechanism for homo-

- nal control of apoptotic cell death, *J Clin Endocrinol Metab*, 83; 427-431.
- Jiang JY, Macchiarelli G, Miyabayashi K, et al (2002) Follicular microvasculature in the porcine ovary, *Cell Tissue Res*, 310; 93-101.
- Kang SK, Choi KC, Cheng KW, et al (2000a) Role of gonadotropin-releasing hormone as an autocrine growth factor in human ovarian surface epithelium, *Endocrinology*, 141; 72-80.
- Kang SK, Choi KC, Tai CJ, et al (2001a) Estradiol regulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its receptor gene expression and antagonizes the growth inhibitory effects of GnRH in human ovarian surface epithelial and ovarian cancer cells, *Endocrinology*, 142; 580-588.
- Kang SK, Tai CJ, Cheng KW, et al (2000 b) Gonadotropin-releasing hormone activates mitogen-activated protein kinase in human ovarian and placental cells, *Mol Cell Endocrinol*, 170; 143-151.
- Kang SK, Tai CJ, Nathwani PS, et al (2001b) Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells, *Endocrinology*, 142; 182-192.
- Knight PG, Glistler C (2001) Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary, *Reproduction*, 121; 503-512.
- Levitas E, Chamoun D, Udoff LC, et al (2000) Periovarian and interleukin-1 beta-dependent up-regulation of intraovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) in the rat: potential role for VEGF in the promotion of periovarian angiogenesis and vascular permeability, *J Soc Gynecol Investig*, 7; 51-60.
- Lewis KA, Gray PC, Blount AL, et al (2000) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling, *Nature*, 404; 411-414.
- Maeda K, Kitawaki J, Yokota K, et al (1996) Effects of gonadotropin-releasing hormone and its analogue (buserelin) on aromatase in cultured human granulosa cells, *Nippon Sanku Fujinka Gakkai Zasshi*, 48; 89-95.
- Maruo T, Hayashi M, Matsuo H, et al (1988) Comparison of the facilitative roles of insulin and insulin-like growth factor I in the functional differentiation of granulosa cells: in vitro studies with the porcine model, *Acta Endocrinol (Copenh)*, 117; 230-240.
- Matzuk MM (2000) Revelations of ovarian follicle biology from gene knockout mice, *Mol Cell Endocrinol*, 163; 61-66.
- Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, et al (1992) Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice, *Nature*, 360; 313-319.
- Miyamoto Y, Nakayama T, Haraguchi S, et al (1996) Morphological evaluation of microvascular networks and angiogenic factors in the selective growth of oocytes and follicles in the ovaries of mouse fetuses and newborns, *Dev Growth Differ*, 38; 291-298.
- Nakatani A, Shimasaki S, Erickson GF, et al (1991) Tissue-specific expression of four insulin-like growth factor-binding proteins (1, 2, 3, and 4) in the rat ovary, *Endocrinology*, 129; 1521-1529.
- Ohno T, Imai A, Furui T, et al (1993) Presence of gonadotropin-releasing hormone and its messenger ribonucleic acid in human ovarian epithelial carcinoma, *Am J Obstet Gynecol*, 169; 605-610.
- Oliver JE, Aitman TJ, Powell JF, et al (1989) Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles, *Endocrinology*, 124; 2671-2679.
- Otsuka F, Shimasaki S (2002) A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99; 8060-8065.
- Roberts VJ, Barth S, el-Roeiy A, et al (1993) Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle, *J Clin Endocrinol Metab*, 77; 1402-1410.
- Samoto T, Maruo T, Ladines-Llave CA, et al (1993a) Insulin receptor expression in follicular and stromal compartments of the human ovary over the course of follicular growth, regression and atresia, *Endocr J*, 40; 715-726.
- Samoto T, Maruo T, Matsuo H, et al (1993b) Altered expression of insulin and insulin-like growth factor-I receptors in follicular and stromal compartments of polycystic ovaries, *Endocr J*, 40; 413-424.
- Shibuya M (1995) Role of VEGF-flt receptor system in normal and tumor angiogenesis, *Adv Cancer Res*, 67; 281-316.
- Shimizu T (2006) Promotion of ovarian follicular development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) and growth differentiation factor 9 (GDF-9) genes, *J Reprod Dev*, 52; 23-32.
- Shimizu T, Iijima K, Sasada H, et al (2003a) Messenger ribonucleic acid expressions of hepatocyte growth factor, angiopoietins and their receptors during follicular development in gilts, *J Reprod Dev*, 49; 203-211.
- Shimizu T, Jiang JY, Iijima K, et al (2003b) Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts, *Biol Reprod*, 69; 1388-1393.
- Shimizu T, Jiang J Y, Sasada H, et al (2002) Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts, *Biol Reprod*, 67; 1846-1852.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis, *Nature*, 359; 843-845.
- Simon C, Frances A, Piquette G, et al (1994) Immunohistochemical localization of the interleukin-1 system in the mouse ovary during follicular growth, ovulation, and luteinization, *Biol Reprod*, 50; 449-457.
- Stratmann A, Risau W, Plate KH (1998) Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis, *Am J Pathol*, 153; 1459-1466.
- Talavera F, Menon KM (1991) Studies on rat luteal cell response to insulin-like growth factor I (IGF-I): identification of a specific cell membrane receptor for IGF-I in the luteinized rat ovary, *Endocrinology*, 129; 1340-1346.
- Ueno N, Ling N, Ying SY, et al (1987) Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain

- Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone, *Proc Natl Acad Sci USA*, 84; 8282-8286.
- Yamamoto S, Konishi I, Nanbu K, et al (1997) Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) during folliculogenesis in the human ovary, *Gynecol Endocrinol*, 11; 223-230.
- Yamamoto M, Minami S, Nakano R, et al (1992) Immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits in human ovarian follicles during the menstrual cycle, *J Clin Endocrinol Metab*, 74; 989-993.
- Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, et al (1997) Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary, *Mol Endocrinol*, 11; 1924-1933.

Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption

Masaya Yamanaka¹, Shu Hashimoto^{1,*}, Ami Amo¹,
Takahiro Ito-Sasaki², Hiroyuki Abe³, and Yoshiharu Morimoto¹

¹IVF Namba Clinic, Osaka, Japan ²Clino Corporation, Miyagi, Japan ³Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University, Yamagata, Japan

*Correspondence address. E-mail: hashimoto@ivfnamba.com

Submitted on May 6, 2011; resubmitted on August 23, 2011; accepted on September 5, 2011

BACKGROUND: In this study, we aimed to develop a model for embryo selection based on oxygen consumption following cryopreservation, the relationship between the developmental competence of blastocysts and their oxygen consumption was assessed.

METHODS: Oxygen consumption of vitrified-warmed human blastocysts was measured at 0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9 and 24 h after warming using scanning electrochemical microscopy. On the basis of their developmental stage at 24 h, blastocysts were classified into four groups (hatched, hatching, arrested and degenerated). Moreover, cytochrome c oxidase (CCO) activity in vitrified-warmed blastocysts was assessed at 0 and 24 h.

RESULTS: The oxygen consumption rate of blastocysts just after warming was significantly lower than that of non-vitrified blastocysts ($P < 0.05$). The oxygen consumption rate of blastocysts was significantly higher in the hatched group than in the arrested and the degenerated groups after 1.5 h ($P < 0.05$) and than in the hatching group ($P < 0.05$) at 7.5 and 9 h. Moreover, CCO activity was absent in vitrified-warmed blastocysts at 0 h, but was detected at 24 h.

CONCLUSIONS: The respiratory rate of vitrified blastocysts after warming was significantly lower than non-cryopreserved blastocysts. Oxygen consumption of blastocysts with high developmental potential was restored earlier than that of blastocysts with low developmental potential. The results of this study suggest that it is possible to select vitrified-warmed blastocysts with high developmental potential based on their respiratory activity.

Key words: oxygen consumption, human, vitrified-warmed blastocyst

Introduction

Assisted reproductive technology (ART) carries a major risk of multiple pregnancies and births that are associated with adverse maternal and infant outcomes (Wright *et al.*, 2008). The principal factor contributing to this risk is the policy of transferring more than one embryo into the uterus. There is a growing trend toward transferring fewer embryos in many countries, but the practice of single embryo transfer (SET) remains uncommon (Andersen *et al.*, 2008). While the most effective means to minimize multiple pregnancies is to limit the number of transferred embryos, this policy must be balanced against the acceptance by patients and clinicians of the reduction in the pregnancy rate (Pandian *et al.*, 2005). Many patients and physicians remain uncertain about an elective SET policy in routine clinical practice. The contribution of supernumerary cryopreserved embryos to cumulative reproductive outcomes is essential when performing SET.

Consequently, the establishment of selection criteria for cryopreserved embryos on the basis of its developmental competence has gained importance since more embryos are now available for cryopreservation. Therefore, the establishment of a new parameter is required for the selection of single embryos that have high developmental potential after cryopreservation.

Mitochondria produce ATP, which is necessary for cell activity by oxidative phosphorylation. The tricarboxylic acid cycle (TCA) cycle has a higher ATP production ability per mole of substrate when compared with the anaerobic glycolytic pathway. Thus, oxygen consumption relates to the quantity of ATP production and mitochondrial respiration may be an effective index of embryo quality.

Several methods of measuring oxygen consumption have been reported, including the Cartesian diver (Mills *et al.*, 1967), spectrophotometric (Magnusson *et al.*, 1977, 1986; Nilsson *et al.*, 1982) and fluorescence (Houghton *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1996; Donnay

and Leese, 1999) methods. However, these methods are unsuitable for clinical use because they have low sensitivity, are unable to measure oxygen consumption of a single embryo, and are invasive to the embryo because of the exposure to the fluorescent dye and long time required for measurement.

Successful measurement of oxygen consumption of a single embryo by using scanning electrochemical microscopy (SCEM) based on a self-referencing microelectrode and nanorespirometer has been reported in mice (Trimarchi *et al.*, 2000) and cattle (Abe *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2005, 2007). Recently, Utsunomiya *et al.* (2008) demonstrated that the oxygen consumption of a single human embryo at the cleavage stage can be measured by using a modified SCEM system. They showed that embryos with an appropriate oxygen consumption had a high ability to develop into blastocysts. This measuring method is based on the calculation of the difference between oxygen levels in the vicinity of the sample and far from it (Trimarchi *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2005, 2007). Furthermore, it has been shown that the presence of appropriate energy substrates is important for accurate measurement of oxygen consumption (Trimarchi *et al.*, 2000).

Magnusson *et al.* (1986) suggested that human embryos that consumed more oxygen developed into blastocysts more quickly than did those that consumed less oxygen. It has been shown that the formation of the blastocoel cavity is dependent on Na/K-ATPase (Watson, 1992). Thus, the oxygen consumption of the blastocyst just after thawing is believed to be correlated with the subsequent re-expansion of the blastocoel. To test this hypothesis, we measured the oxygen consumption of human vitrified-warmed blastocysts and examined the relationship between the developmental competence of blastocysts and their oxygen consumption 0–24 h after warming.

Materials and Methods

Blastocysts

Forty-four cryopreserved blastocysts were used for this study. Informed consent was obtained from all patients after ART treatment for the use of blastocysts in research. This experiment was approved by the local ethics committee of the IVF Namba Clinic. The mean age of the women donors was 33.4 years. This study included blastocysts whose degree of expansion was categorized as BL3/4 (from full blastocyst to expanded blastocyst stage) and whose inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) grades were categorized before freezing as A or B, according to Gardner and Lane's (1997) criteria. The blastocysts were vitrified and warmed as previously described (Kuwayama *et al.*, 2005). In brief, blastocysts were equilibrated in 7.5% (v/v) ethylene glycol (EG), 7.5% (v/v) dimethylsulphoxide (DMSO), 20% (v/v) synthetic serum substitute (SSS, 99193; Irvine Scientific, St. Ana, CA, USA) dissolved in tissue culture medium (TCM) 199 medium for a maximum of 15 min, confirming shrinkage and re-expansion and transferred into vitrification solution which consisted of 15% (v/v) EG, 15% (v/v) DMSO, 1.0 M sucrose and 20% (v/v) SSS dissolved in TCM 199 medium. Each embryo was picked up with a small amount of vitrification solution (<1 µl) and placed on top of a very fine polypropylene strip (0.4 mm width, 20 mm length and 0.1 mm thickness). As soon as the embryo was placed on the strip, it was immediately submerged into liquid nitrogen. This procedure was carried out in 1 min. For warming of vitrified blastocysts, the strip was immersed into 1 ml of 1.0 M sucrose in TCM 199 at 37°C for 5 min, and then washed in culture medium. After warming, they were cultured individually

(Blastocyst Medium; COOK Medical, Queensland, Australia) at 37°C under 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂.

Blastocysts were segregated into four groups based on their developmental stage at 24 h after the culture. Hatched blastocysts were categorized into the hatched group; blastocysts in the hatching stage were categorized into the hatching group; blastocysts in the pre-hatching stage were categorized into the arrested group and degenerated blastocysts were categorized into the degenerated group. For controls, the oxygen consumption of 10 blastocysts that had been cryopreserved at the pronuclear stage on the day after IVF and cultured for 4 days after warming, and whose degree of expansion was categorized as BL3/4 was measured. To define a numerical blastocyst morphology grading system based on Gardner's grading system, the blastocyst grade was converted to the multiplicative blastocyst quality score (BQS) proposed by Rehman *et al.* (2007). The BQS is a metric of blastocyst quality that is based on established morphologic criteria, and it is defined as the product of the degree of expansion and hatching status and ICM and TE grades, where grade A is given the value 3; grade B, 2 and grade C, 1. For a 3AB blastocyst, the BQS is $3 \times 3 \times 2$, giving a BQS score of 18.

Oxygen consumption

After the morphological evaluation, oxygen consumptions of the TE adjacent to the ICM and far from the ICM were measured using an SCEM (CRAS-1.0; Clino Ltd., Miyagi, Japan) as previously described (Abe *et al.*, 2004) at 0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9 and 24 h after the culture at 37°C under air. Briefly, each blastocyst was transferred into a well filled with human tubal fluid-buffered with 21 mM HEPES containing 2.7 mM glucose and 0.33 mM pyruvate (Modified HTF Medium; Irvine Scientific, CA, USA) containing 5% (v/v) SSS, where it sank to the bottom of the cone-shaped microwell and remained at the lowest point. A platinum microdisk electrode was loaded into 5 ml of HEPES-buffered medium, and its tip potential was maintained at -0.6 V versus Ag/AgCl with a potentiostat to monitor the local oxygen concentration. The microelectrode scanned along the z-axis from the edge of the sample, and the oxygen consumption rate was calculated with custom software based on the spherical diffusion theory. Oxygen consumption rates were measured at one point of the TE located near the ICM and at two points of the TE far from the ICM if the ICM was identified. If the ICM was not identified and the blastocyst shrank just after thawing, oxygen consumptions were measured at three points of the TE. It took ~2 min for the measurement of oxygen levels.

Cell number

After the measurement of oxygen consumption at 24 h, blastocysts were stained with 10 µg/ml of bisbenzimidazole H 33342 trihydrochloride (Hoechst 33342; Sigma, MO, USA) and the cell numbers were counted using fluorescent microscopy (TE2000; Nikon, Tokyo, Japan).

Cytochrome c oxidase activity

Seven vitrified-warmed blastocysts were fixed at 0 h and two vitrified-warmed blastocysts were fixed at 24 h after warming to observe cytochrome c oxidase (CCO) activity as described in a previous study (Nonaka *et al.*, 1989). Briefly, they were fixed in 2% (v/v) glutaraldehyde (TAAB Laboratories, Berks, UK) and 0.15 M sucrose (WAKO, Osaka, Japan) in 0.05 M phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min at 4°C. After rinsing in the same buffer, they were incubated in 1.4 mM 3,3'-diaminobenzidine (DAB) tetrahydrochloride (Sigma), 0.1% (w/v) cytochrome c type II (Sigma), 0.23 M sucrose and 0.0002% catalase (w/v) (Sigma) in 0.05 M PBS for 3 h at 37°C. Blastocysts were then washed in PBS for 1 h. They were post-fixed in 1% (v/v) osmium tetroxide (TAAB Laboratories) for 2 h at 4°C. Next, they were dehydrated in