

B. 研究方法

卵丘顆粒膜細胞および壁側顆粒膜細胞は、国立成育医療研究センターにおける不妊治療に伴う生殖補助医療において、採卵時に各患者の同意を得て回収した。

卵丘細胞は卵子-卵丘細胞複合体の成熟度合いに応じて mature, immature そして dysmature と三段階に分類した。各段階の卵丘顆粒膜細胞と壁側顆粒膜細胞は、0.1%BSA 添加 TBS で洗浄後、4%ホルマリンで 20 分間固定し、0.1%BSA 添加 PBS で洗浄し、スライドガラスに風乾固定した。

風乾固定した標本を、0.1% Tween 20 含有 PBS で洗浄し、1% BSA 添加 0.1% Tween20 / PBS でブロッッキング処理を施した。一次抗体には 500 倍希釈抗 LC3 抗体を用い 4°C で一晚反応させ洗浄した後、1000 倍希釈 Alexa546 結合二次抗体で検出した。さらに Hoechst33342 を用いて細胞核を染色した。

蛍光染色を施した標本は、CCD カメラ内蔵倒立蛍光顕微鏡で観察し、5-10 カ所の撮影をおこない、オリンパス DP コントローラーおよび DP マネージャーを用いて解析を行った。

C. 研究結果

卵丘顆粒膜細胞および壁側顆粒膜細胞を採取した患者は、平均年齢が 38.5 歳、hCG を投与する前のホルモン値の平均はエストラジオールが 3367.1pg/ml であり、プロゲステロンが 0.53ng/ml であった。平均採卵数は 13.1 個であり、mature (平均 6.5 個)、immature (平均 4.4 個) そして dysmature (平均 2.3 個) 三種すべてを分類できた症例のみを本研究に供した。

各群の細胞数は Hoechst33342 染色による核の識別によって行った。また Hoechst33342 では核の断片化を観察し、アポトーシス出現率を計測した。各細胞群のアポトーシス出現率は

mature 1.01%, immature 0.92%, dysmature 3.44% と壁側顆粒膜細胞 1.11% であり、dysmature 群で有意に高い割合であった (図 1)。

抗 LC3 抗体を用いた細胞染色では、オートファジーが活発になるに伴い、粒子状の蛍光が強く鮮明に観察されるようになった。この粒子は隔離膜やオートリソソーム膜に結合していると推測された。

LC3 陽性率は卵丘顆粒膜細胞が 45.7% に対し、壁側顆粒膜細胞が 6.4% であり、卵丘顆粒膜細胞の方が有意に高い割合を示した ($P < 0.01$) (図 2)。さらに卵丘顆粒膜細胞の各群の内訳は、mature 44.9%, immature 43.1%, dysmature 49.4% と卵子-卵丘細胞複合体の成熟度による差は認められなかった。

D. 考察

オートファジーはプログラム細胞死の一種であり、飢餓状態などの細胞死がおきやすい状況で延命装置として機能し、感染防御やガン化抑制にも関与、その結果生物の恒常性維持に関与していることが知られている。その一方で、植物ではオートファジーが起こらないような変異体では老化が進んだり、種子収量が減ったりすると言ったいわゆる「加齢・不妊」につながる現象が起こるとも言われている。

アポトーシスとオートファジーはどちらもプログラム細胞死の一種であるとされているが、卵巣内卵胞ではオートファジーは起こらず、アポトーシスの細胞死のみが起こっているとされてきた。

しかし我々は卵子および卵丘顆粒膜細胞の質の低下・成熟度の差異に着目し、オートファジーの関与の可能性の有無を検討した。

卵胞の壁側顆粒膜細胞においては、アポトーシスは卵丘顆粒膜細胞と同様

に起こっているがその発現率は低率であった。本研究に用いた排卵直前の卵巣卵胞にある壁側顆粒膜細胞は、排卵に際し、卵胞壁の断裂を起こすことと黄体化し黄体ホルモン合成を行う。その結果壁断裂のため顆粒膜細胞はアポトーシスを起こし消失する一方、残った顆粒膜細胞はステロイド合成は卵胞期同様行うがそれ以上の機能変化を起こさないため比較的变化が少なく、オートファジーは低い状態と考えられる。

一方卵丘顆粒膜細胞では、LH サージまたは、hCG 負荷後、ヒアルロン酸の合成が急速に盛んになり卵-卵丘細胞複合体が形成される。その卵-卵丘細胞複合体成熟度により mature, immature そして dysmature の三群に分類したが、なかでも dysmature におけるアポトーシスが他の群に比べて有意に高い割合で起こっていた。これは、dysmature が成熟の過程において何らかの因子により変性を起こし、卵胞を閉鎖に向かっている可能性を示唆する。

またオートファジーは壁側顆粒膜細胞より卵丘顆粒膜細胞に高発現しており、卵子-卵丘細胞複合体の成熟度には差は認められなかった。これは、卵丘顆粒膜細胞は排卵に向かってヒアルロン酸合成を合成が盛んになり、卵子-卵丘細胞複合体を形成し排卵に備える変化をするために、オートファジーを用いて、ヒアルロン酸の原料を細胞内からも調達を行う排卵過程という生理的变化に対応した機能であることが推察された。

また、ヒアルロン酸合成により卵子の障害を防ぎ、老化を防止する恒常性を維持するはたらきも考えられた。

E. 結論

本研究から、卵丘顆粒膜細胞は壁側顆粒膜細胞とは異なり高度にオートファジーを起こし、卵子-卵丘細胞複合体を形成し物理学的だけではなく、生理

学的にも卵子を老化や閉鎖から機能的に保護している可能性があることを示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

石田恵理、伊藤めぐむ、大島 綾、中島 章、浦野晃義、山本 篤、齊藤隆和、齊藤英和。採卵時卵丘細胞におけるオートファジー関与の可能性 第 55 回日本生殖医学会 徳島 2010 年 11 月 11 日・12 日

Eri Ishida, Hirohiko Tani, Miwa Shimizu, Akiyoshi Urano, Takakazu Saito, Hidekazu Saito. Autophagy in the ovarian granulosa cells. 16th World Congress on In Vitro Fertilization Tokyo September 10-13, 2011

G. 知的財産権

なし

図1. 顆粒膜細胞のアポトーシス陽性率

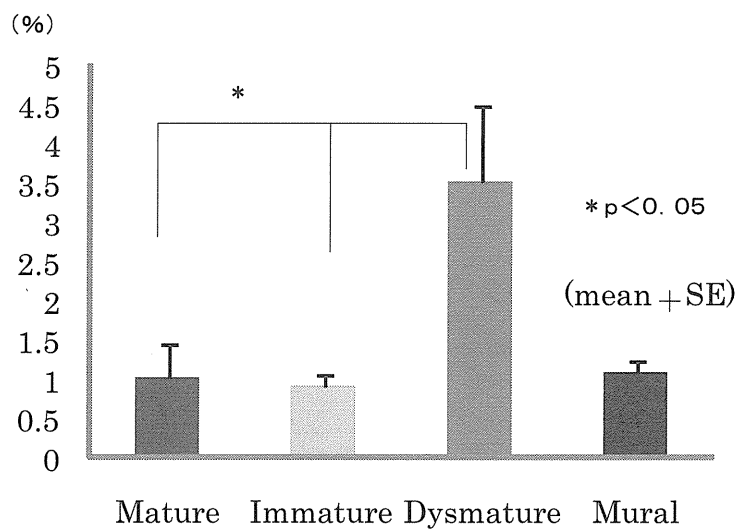
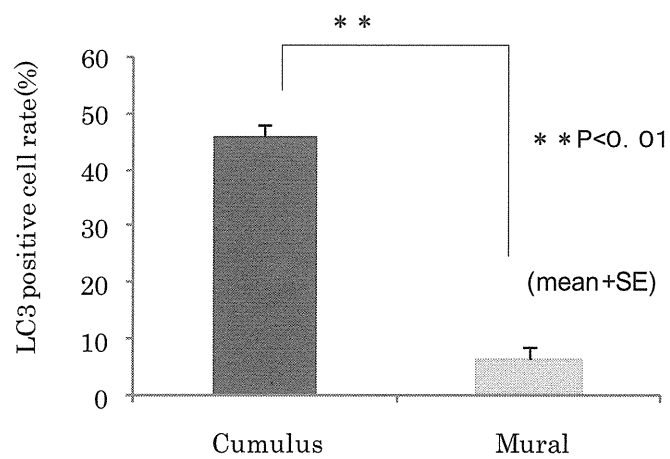


図2. 顆粒膜細胞のオートファジー陽性率



厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

ライフスタイルの変化に伴うPCOS婦人に対する生殖医療対策

分担研究者 苛原 稔 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
発生発達医学 教授
研究協力者 桑原 章 徳島大学産科婦人科 講師

研究要旨

近年の生殖医療現場における女性のライフスタイルの変化を検討すると高齢、複数
の妊娠を期待しつつ、ART を含む不妊治療の普及により有職者の増加が著しく、
治療、通院の負担、副作用への受容性が低く、成功率のみを重要視した治療が受け
入れがたくなっていることなどが上げられる。PCOS に対してクロミフェン、メトフ
ォルミン、腹腔鏡手術、FSH 低用量漸増療法（FSH 自己注射）等を含む治療方針に従
い、治療を行う事で7割の症例は妊娠が成立することが明らかとなった。さらに
PCOS 症例に対する ART 成績の特徴を検討したところ、卵巣過剰刺激症候群（OHSS）
が多く注意を要すること、PCOS の妊娠率は非 PCOS 症例と比べて変わらないこと、
LOD 後の ART 成績では OHSS が非 LOD 群に比べて少なく安全である一方、採卵数が減
少することが明らかとなった。

A. 研究目的

多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）は不妊患者の 10-15%に認められる比較的多い病態である。妊娠のためには排卵誘発治療が必要となることが大半であるが、OHSS や多胎妊娠の高リスク群であるため、ゴナドトロピン製剤は相対的禁忌とされている。事実、ゴナドトロピン製剤による排卵誘発治療では排卵数を厳密にコントロールすることが難しく、PCOS 症例を多数含む 3 胎以上の超多胎の発生が毎年報告されている。多胎妊娠は妊娠中の母体に大きな負担を与えるだけでなく、早期産、低出生体重児などのリスクも大きく、不妊症治療の増加に伴い多胎妊娠が周産期医療に与える負担が社会的問題ともなっているため、多胎を予防する効果が確実である生殖補助医療（ART）の利点が注目されている。

一方、加齢に伴う生殖能力の低下は既知の事実であり、卵子の老化は 30 代後半から急速に進行すると考えられる

が、近年の女性のライフスタイルの変化は顕著であり、複数回の妊娠を期待する有職女性の増加が著しく、治療、通院の負担、副作用への受容性が低く、成功率のみを重要視した治療が受け入れがたくなっていることなどが上げられる。従来、生殖補助医療では多量のゴナドトロピン製剤により絶対的に多数の排卵卵子を得ることが前提となっていたが、生殖補助医療技術の向上により少数の成熟卵子を得ることができれば、安定した妊娠成績を残せるようになったことから、確実に複数回の妊娠が期待でき、通院、副作用の負担が少ない治療として生殖補助医療がより受け入れられるようになっている。

そこで本年度は当施設における成績をもとに PCOS 女性に対する ART の必要性、その特徴に関して利点、問題点を明らかにし、多彩なライフスタイルや患者の高齢化を前提としている現在の PCOS 患者に対する治療に有用な知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

昨年、一昨年の研究により詳細が示された PCOS の診断基準 (表 1) および治療方針に基づき (図 1) 2009 年 4 月から当施設で治療を行った PCOS 症例の ART に至るまでの治療経過および ART 治療成績を同時期に実施した非 PCOS 症例と比較検討した。

倫理面への配慮：治療、調査においては患者名や生年月日など患者が特定されうる情報を含まないよう匿名化したうえで治療内容、結果を回収するよう配慮しており、問題ないと判断される。

C. 研究結果

集められた PCOS 症例は 84 症例で、排卵誘発治療実施 848 例の 9.9% を占めていた (図 2)。ART 実施例は 21 例あり、全 ART 実施 276 例の 7.6% を占めていた。

少なくとも 3 周期以上治療を継続した 70 例の転帰の内訳は妊娠 49 例、治療継続 12 例、ART 移行例 5 例、治療継続断念例 4 例、非 ART における累積妊娠率は 70% であった。妊娠症例の 70% 以上は治療 6 周期目までに妊娠が成立しているが、22 周期目に妊娠が確認できた症例もあった (図 3)。

PCOS で ART を実施した 21 症例と非 PCOS 255 例の患者背景および ART 治療成績を表 2、3 に示す。PCOS の診断基準および患者の特徴を示すように PCOS 症例では BMI が高く、FSH が低く、LH が高い症例が有意に多いが、ART 治療では排卵刺激日数、受精卵数、移植可能胚数、妊娠率、流産率、累積妊娠率に有意差を認めなかった。一方、使用ゴナドトロピン量が有意に少ないにも関わらず採卵数は有意に多く、OHSS 発症率が有意に高いことが判った。

ART 実施前に LOD を実施した症例が 5 例あり、非実施例との比較を試みたところ (表 4)、患者背景として ART 実

施直前の BMI には差が無いが、FSH は有意に高く、LH は有意に低いことが明らかとなった。さらに使用ゴナドトロピン量が有意に多いにも関わらず、採卵数は有意に少ないことが明らかとなり、妊娠率には有意差を認めなかった。

D. 考察

今回、診断基準を満たす PCOS に対するクロミフェン療法、メトフォルミン + クロミフェン併用療法、低用量 FSH 療法、FSH-GnRH pulse 療法、LOD 手術などを行うことで PCOS 症例の 70% が妊娠していた。非 ART 治療を継続している 17% にも今後妊娠が一定の確率で成立すると推測され、PCOS 症例の 8 割は ART を実施しなくても妊娠すると推測できる。これは非 PCOS に比べてより妊娠成立が期待できることを示しており、実際、排卵誘発治療例に占める PCOS の割合 10% に比べ、ART 実施症例に PCOS が占める割合は 7.6% と少なく、PCOS は排卵誘発で妊娠する症例が多く、必ずしも ART を必要とする症例は多く無いことを示している。一方、妊娠例の多くが排卵誘発治療開始から 1 年以内に妊娠成立している一方、2 年を越える治療を要した症例や、社会的要因も重なり治療継続を断念した症例があることが問題点であると考えられた。社会的リスクが高い (多忙な有職者、比較的高齢者) に対しては、より早くから ART の選択肢を提示することが重要と考えられる。

PCOS は卵質低下から ART 成績が良好でないとの報告もあるが、今回の検討では非 PCOS 症例と概ね差が無い成績を確認できた。しかし、使用ゴナドトロピン量が少ないにも関わらず OHSS は有意に多かったことから、ART 実施前に正しく PCOS の診断を行うことが非常に重要であり、加えてゴナドトロピン量の個別化が今後も必要と考えられた。PCOS に特異的な治療法として

LOD は多胎妊娠、OHSS がなく自然妊娠が期待できるため、PCOS に対しより積極的に実施すべき治療法である。妊娠が成立することが多いため LOD 実施後の PCOS 例の ART 成績を検討することは比較的稀であり、今回の検討は興味深い。LH の低下、FSH の上昇を認め、内分泌的に PCOS の状態から離脱しており、OHSS のリスクは低く、採卵数も少なく、従ってより安全に ART を実施することが可能な点が LOD 術後の特徴である一方、FSH の上昇、使用ゴナドトロピン量の増加が顕著で、LOD 手術による卵巣予備能の低下が明らかな症例が存在していたことから、LOD においては必要以上に卵巣予備能を低下させないよう慎重に手術を実施する必要があると考えられた。

E. 結論

PCOS 症例に ART を実施すると非 PCOS 症例と同等の成績が得られる。高齢、多忙な有職者など社会的リスクの高い症例は積極的に ART の選択肢を示すことが必要である。PCOS は OHSS のリスクが高いため、ART 実施前に正確に PCOS と診断し、ゴナドトロピン量の個別化が必要である。LOD 例は OHSS リスクが軽減している一方、卵巣予備能の低下が懸念され、高齢、卵巣予備能が低い PCOS に対し LOD を行う時には慎重な判断が必要とされる。

F. 研究発表

投稿中

G. 知的財産権

特になし

表 1 多嚢胞性卵巣症候群の診断基準

以下の1～3の全てを満たす場合を多嚢胞性卵巣症候群とする

1. 月経異常

2. 多嚢胞卵巣

3. 血中男性ホルモン高値

または

LH基礎値高値かつFSH基礎値正常

注1) 月経異常は、無月経、希発月経、無排卵周期症のいずれかとする。

注2) 多嚢胞卵巣は、超音波断層検査で両側卵巣に多数の小卵胞がみられ、
少なくとも一方の卵巣で2-9 mmの小卵胞が10個以上存在するものとする。

注3) 内分泌検査は、排卵誘発薬や女性ホルモン薬を投与していない時期に、
1 cm以上の卵胞が存在しないことを確認の上で行う。また、月経または消
退出血から10日目までの時期は高LHの検出率が低いことに留意する。

注4) 男性ホルモン高値は、テストステロン、遊離テストステロンまたはアン
ドロステンジオンのいずれかを用い、各測定系の正常範囲上限を超えるも
のとする。

注5) LH高値の判定は、スパック-Sによる測定の場合は $LH \geq 7$ mIU/ml
(正常女性の平均値 + 1 × 標準偏差)かつ $LH \geq FSH$ とし、肥満例(BMI ≥ 25)
では $LH \geq FSH$ のみでも可とする。

その他の測定系による場合は、スパック-Sとの相関を考慮して判定する。

注6) クッシング症候群、副腎酵素異常、体重減少性無月経の回復期など、
本症候群と類似の病態を示すものを除外する。

図1 PCOS排卵障害の治療法

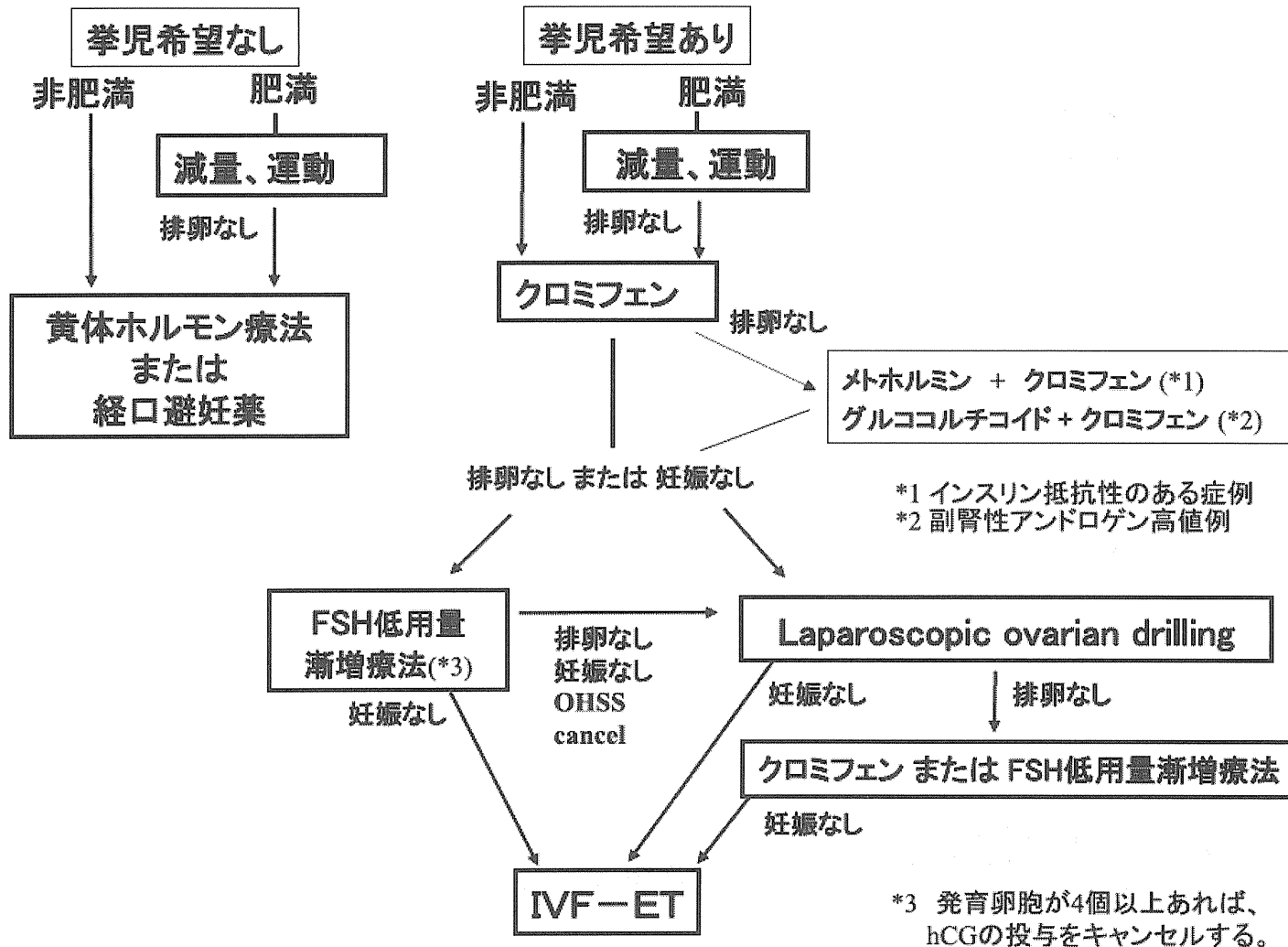


図2 PCOS症例の治療状況

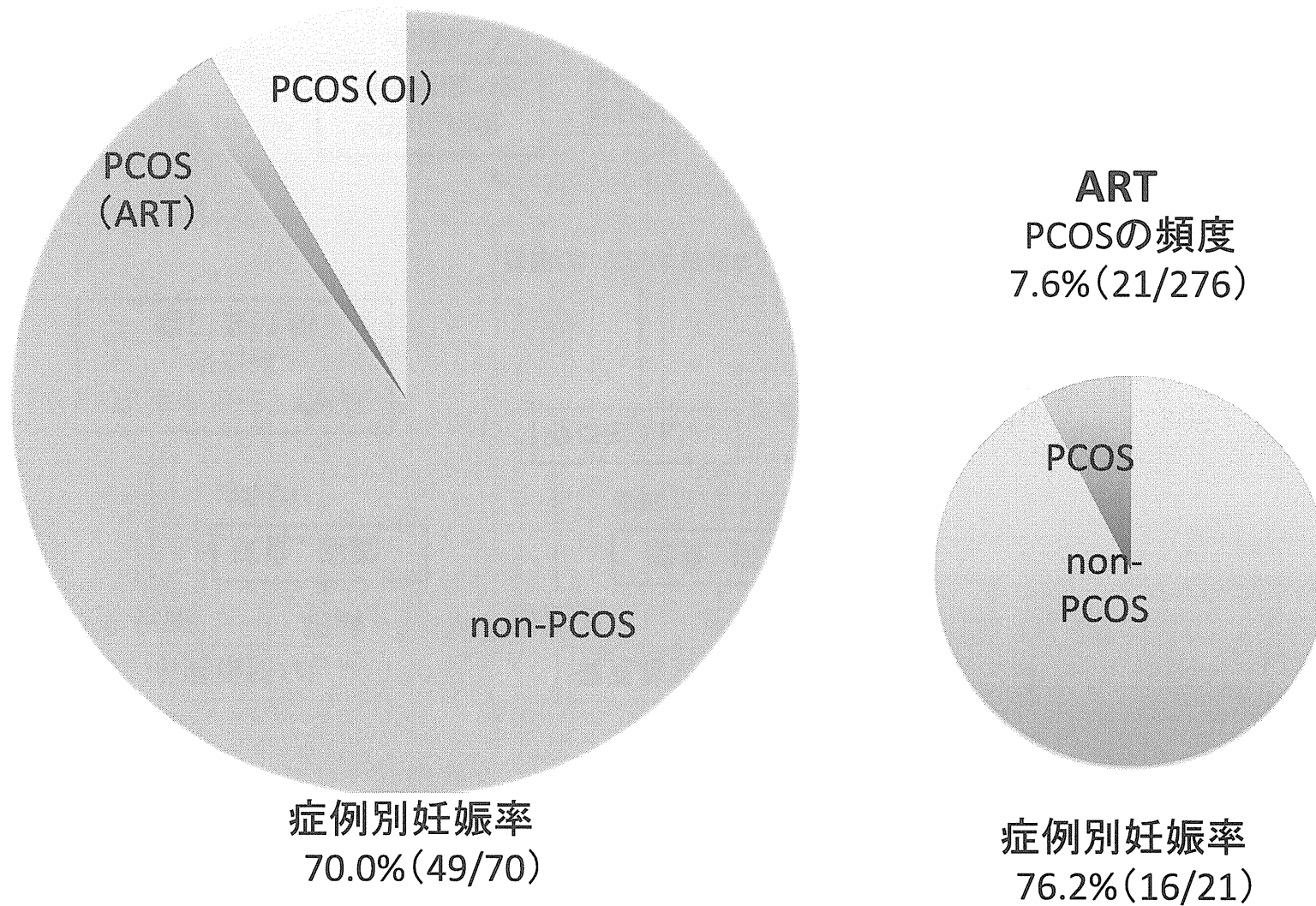
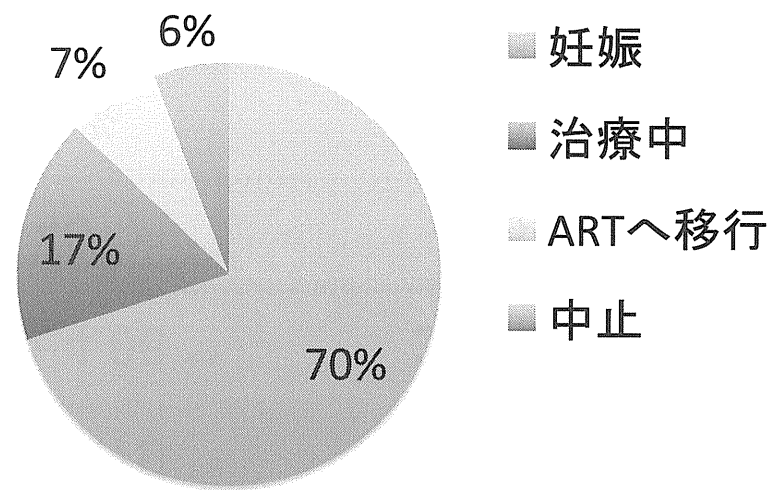


図3 PCOSの転帰



累積妊娠率

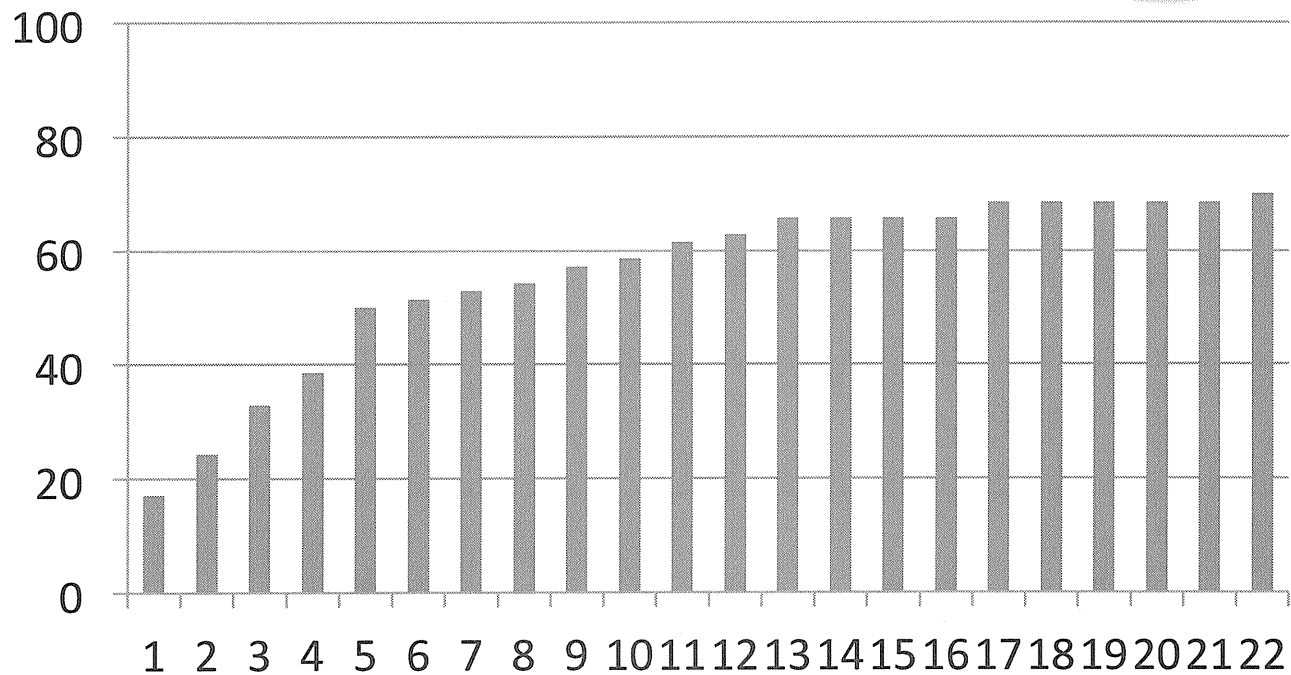


表2 ART症例の背景

	PCOS	Non-PCOS
症例数	21	255
年齢	33.0±5.1	34.4±4.2
BMI	23.5±5.2 *	21.5±3.2
FSH	6.98±1.79 **	9.27±5.46
LH	6.52±4.06 **	3.72±2.23
採卵周期数	40	518
採卵中止率	0.0%	10.2%
採卵回数	1.91±1.51	2.11±1.73

* P<0.05, ** P<0.01

表 3 PCOS ARTの結果

	PCOS	Non-PCOS
刺激日数	10.5±1.4	10.5±1.3
FSH使用量(IU)	2092±848 **	2805±1142
OHSS率 (／採卵あたり)	7.5% (3/40) *	1.9% (10/518)
採卵個数	17.0±12.0 **	10.0±7.1
受精卵数	7.25±5.8	6.11±4.84
移植可能胚数	2.88±2.42	2.28±2.33
移植胚数	1.75±0.68	1.68±0.85
妊娠率 (採卵あたり)	27.5% (11/40)	26.4% (137/518)
流産率 (妊娠あたり)	18.2% (2/11)	22.7% (30/137)
症例あたり妊娠率	57.1%	53.7%

* P<0.05, ** P<0.01

表4 PCOS LOD後のART

	LOD後	LOD無し
症例/周期数	5 / 8	16 / 32
年齢	33.8±3.2	32.6±5.6
BMI	23.5±5.5	23.5±5.3
FSH	8.45±2.64 **	6.39±1.75
LH	4.34±1.70 **	6.31±4.23
刺激日数	10.9±1.4	11.3±3.9
FSH使用量(IU)	2737±949 *	1907±734
採卵数	10.5±6.9 **	18.4±12.7
移植可能胚数	2.38±1.9	3.04±2.59
妊娠率 (採卵あたり)	25.0% (2/8)	28.1% (9/32)

子宮内膜症に関する研究

研究分担者 小林 浩 奈良県立医科大学 産婦人科 教授

研究要旨

子宮内膜症の異所子宮内膜腺管上皮細胞は毎月の出血にさらされることにより、その中の鉄がフェントン反応を介した酸化ストレスを惹起する。そのため細胞は微小環境の変化のため遺伝子変異を起し、解毒酵素・タンパクを大量に産生することにより、ストレス抵抗性を獲得している。その一つに HNF-1beta という転写因子の過剰発現が起こる。この遺伝子は酸化ストレス、糖代謝関連酵素、解毒機構関連タンパク、抗アポトーシス、細胞周期調節因子を誘導するマスター遺伝子であり、内膜症の癌化に密接に関与することが判明した。一方、癌化の初期イベントとしてクロマチン再構築遺伝子である ARID1A の遺伝子変異が報告されるようになった。今回はこの遺伝子機能について検討した。

A. 研究目的

卵巣チョコレート嚢胞の 0.5~1.0%が卵巣癌に移行することが示唆されている(1-4)。子宮内膜症全体のがん化に関しては、高いものではその頻度は 2.5%以上との報告もあり(5)、子宮内膜症と悪性化がクローズアップされている。さらに日本では明細胞腺癌が高頻度であることも両者の因果関係を理解する上で興味深い。

我々はチョコレート嚢胞患者を前方視的に追跡調査した国内の疫学研究により、チョコレート嚢胞から 0.72%の頻度で悪性化をきたすことを報告した。チョコレート嚢胞から発生する卵巣癌は、明細胞腺癌と類内膜腺癌が主体であった。癌化の危険因子は、45 歳以上で 6 cm 以上(そのほとんどは 9 cm 以上)の腫瘍径を有するチョコレート嚢胞であり、初診時から癌化するまでは約 5 年の歳月を有し、最初に子宮内膜症と診断されてから 10 年以上経過した。特に、チョコレート嚢胞の最大径が 10 cm 以上、閉経周辺期に増大するチョコレート嚢胞、腫瘍マーカー CA125 が増加する場合(実際には有意な上昇を示さない場合も多

い)。画像診断で隆起性病変を認めた場合、腫瘍内に血流を認めた場合などは悪性化を見逃さないようにする。Gn-RH アゴニストによるホルモン療法を実施してチョコレート嚢胞のサイズが縮小しても、将来、卵巣癌にならないことを保障するものではない。また、妊孕性温存を考慮して cystectomy することが癌化を予防できるというエビデンスは現在ない。

以上より、20 代の臨床的チョコレート嚢胞は腫瘍径が 10 cm 以上のときは悪性化を考慮し手術(oophorectomy)を勧める。妊孕性温存の場合は、cystectomy を行い迅速診断で組織を確認する。良性と判断しても、術後も定期的に悪性化を念頭において経過観察することを我々は提案してきた。

我々は子宮内膜症と卵巣明細胞腺癌の病態を分子生物学的手法を駆使して解明しているが、過剰発現している遺伝子として転写因子である hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) が最重要遺伝子として同定された。最近癌化の初期イベントとしてクロマチン再構築遺伝子である ARID1A の遺伝子変異が

報告されるようになった。今回はこの遺伝子機能について検討した。

さらに疫学的調査を実施し、本邦における卵巣明細胞腺癌の発現頻度および明細胞腺癌になりやすい遺伝子変異についても検討した。

B. 研究方法

1. 臨床的・疫学的検討の継続

日本産科婦人科学会の婦人科腫瘍委員会から発行している本邦における婦人科がん発生頻度報告を参考に解析した。

2. 子宮内膜症およびそのがん化に及ぼす ARID1A 遺伝子変異の関与

Affymetrix® Human Genome U219 Array Plate を利用し、一度に 96 サンプルのハイスループットの発現プロファイリングを実施する。本アレイのデザインに用いられているシーケンスは、UniGene データベース 219 (2009 年 3 月 30 日 ビルド)、RefSeq version 36 (2009 年 7 月 13 日)、および GenBank® (2009 年 5 月 12 日ダウンロード) の完全長ヒト mRNA から選択されている。

ARID1A の機能は腎癌における VHL 遺伝子の変異と類似しているためその分子モデルを考案した。

3. 組織検体

子宮内膜症の臨床検体 34 症例を用いた解析である。これらの研究はすでに当院の倫理委員会を承認を得ている。

4. 倫理面への配慮

患者から組織等を採取することに対しては、倫理委員会での承認が済んでいる。本研究にかかわる医師は個人情報保護法に基づいて、被験者の個人情報を厳格に管理する。そのため生体サンプルは連結可能匿名化をする。

C. 研究結果

1. 卵巣癌の組織型別発生頻度

最近では子宮内膜症の悪性化の報告が急増している。PubMed で調べたところ、**図 1** の前列の棒グラフが内膜症から間葉系への悪性化が報告された論文数であり、後列の棒グラフが内膜症から上皮系への悪性化が報告された論文数である。いずれも増加しているのがわかる。

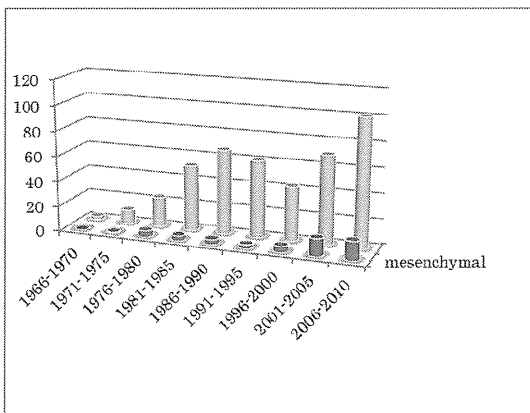


図 1

卵巣癌の組織型別頻度を調べると、**図 2** のように米国とカナダでは漿液性腺癌が 60% を占め、明細胞腺癌は 10% であるのに対して本邦は漿液性腺癌が 46% であり、明細胞腺癌は 24% であった。

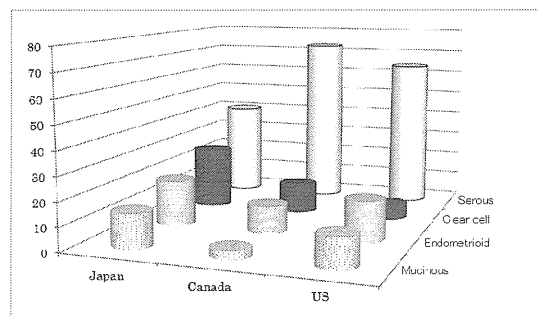


図 2

本邦では明細胞腺癌の発生頻度が高いと言われているが、むしろ漿液性腺癌の発生頻度が少ないために相対的に明細胞腺癌の発生頻度が高いのではないかとと思われる。

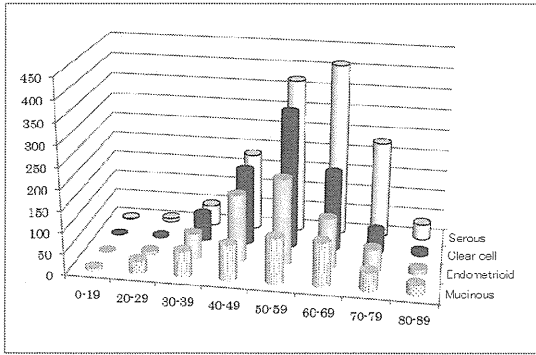


図 3

2. ARID 遺伝子族の作用機序

ARID ファミリーには ARID1A, ARID3A, JARID1B/KDM5B が存在する。下流遺伝子を同定するためにパスウェイ解析をすると、図に示したように ARID1A は HIC1 および XOX9 を介し、間接的に p53 遺伝子に影響を及ぼし、アポトーシス、細胞周期調節、クロマチン再構築に参与する重要な遺伝子であった。また、ARID3A の下流にも p53 が存在することにより、ARID ファミリーはすべてアポトーシス、細胞周期調節、クロマチン再構築に参与する重要な遺伝子であることが判明した。

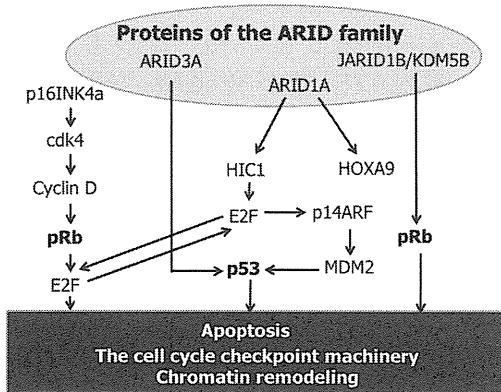


図 4

3. ARID1A の生物活性と癌化機序

まず、腎明細胞腺癌 (ccRCC) の発癌はすでに解明されている。図上段に示すように ccRCC の発癌は VHL 遺伝子の変異で起こることが知られている。VHL 遺伝子産物は ElonginC を介して結合しこれに HIF-1 alpha が結合する。HIF-1 alpha

は低酸素における血管新生に作用し VEGF 等を産生し癌の転移に深くかかわっている。

VHL が正常に作用すれば HIF-1 alpha は図上左に示すようにユビキチン化され、HIF-1 alpha が分解されるため、VEGF の産生は停止する。しかし、図上右に示すように、VHL 遺伝子に変異が起こると VHL タンパクの立体構造が変化し ElonginC-VHL-HIF-1 alpha 複合体が形成されないため HIF-1 alpha にユビキチン化が起こらず、持続的に HIF-1 alpha が産生されるため血管新生が過剰に起こり癌化するとされている。

ARID1A も ElonginC に結合するため、ccRCC と同様のモデルが考えられる。すなわち、図下左のように ARID1A が正常であれば、ヒストンタンパクである H2B が ElonginC-ARID1A-H2B 複合体を形成し、不要なヒストンタンパクは処理される。しかし、図下右に示すように、ARID1A 遺伝子に変異が起こると ARID1A タンパクの立体構造が変化し ElonginC-ARID1A-H2B 複合体が形成されないため H2B にユビキチン化が起こらず、ヒストンタンパクが処理されないため、クロマチン再構築に影響を来しがらんすることが考えられる。

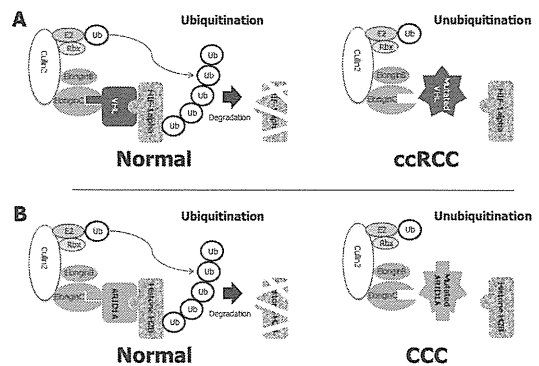


図 5

4. 卵巣明細胞腺癌と類内膜腺癌の病態
鉄による酸化ストレスにより活性酸素 ROS が産生され、この結果図に示すように細胞内シグナルが大きく変動する。

ROSにより例えば、ERKのリン酸化、PTEN活性低下、NOX過剰反応、遺伝子変異、EMTが惹起される。DNA障害がおこれば細胞周期を停止させ、修復かアポトーシス化に向かうことになる。しかし、HNF-1betaが過剰発現しているため、細胞周期でチェックポイントが作動せず、アポトーシスシグナルが発動しない。その結果、遺伝子変異が蓄積した癌細胞が増えていくことになる。この状態が前がん状態である。

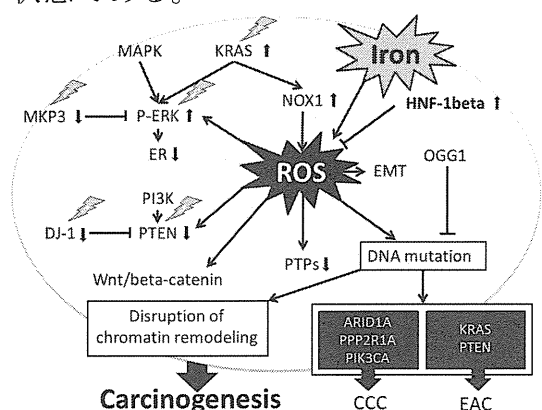


図 6

D. 考察

チョコレート嚢胞からの発癌機序

最近、我々を含めた複数の施設から hepatocyte nuclear factor (HNF)-1beta という転写因子が明細胞腺癌で過剰発現していることが報告されている。この転写因子の発現を詳細に検討すると、チョコレート嚢胞から発癌すると考えられている類内膜腺癌には HNF-1beta の過剰発現が見られない。HNF-1beta は子宮内膜症から明細胞腺癌への癌化を考える上で大きな示唆に富むバイオマーカーとしての転写因子である。HNF-1beta の下流には、抗癌剤耐性遺伝子、抗アポトーシス関連遺伝子や酸化ストレス・解毒遺伝子が多く存在するため治療法の開発にも最適なバイオマーカーであると考えられる。

すなわち、長期間子宮内膜症性嚢胞内

で出血を繰り返すことにより、過剰鉄による酸化ストレスを介して遺伝子やタンパク質の酸化が起こったり、LOHが高頻度に観察されるようになる。この状態はすでに組織学的に良性の子宮内膜症のときにも起こっており、monoclonalityを持つようになる。これら酸化ストレスや炎症環境の持続的暴露により、癌抑制遺伝子が失われたり、癌遺伝子が活性化する細胞が出現する可能性がある。このような機序を介して癌のイニシエーション、プロモーション、そしてプログレッションが起こり、明細胞腺癌が発生するものと考えられる。

その時に ARID1A の遺伝子変異が発生するとクロマチン再構築が不完全になり、細胞周期チェックポイントが作動せず、抗アポトーシス能を保有する反面、遺伝子損傷を受けた多くの細胞が悪性度を増すための環境を作ることになる。

また、子宮内膜症からの癌化と考えられる類内膜腺癌はエストロゲン受容体やプロゲステロン受容体が発現しており、ホルモンの影響下に癌化するのに対して、明細胞腺癌はこれらホルモン受容体の発現は消失している。このようなホルモン環境の相違が発癌時の組織型を決定している可能性がある。

E. 結論

チョコレート嚢胞内に出血すると、凝固→線溶→溶血→ヘモグロビン→ヘムとグロビン→鉄の放出となり、酸化ストレスの過剰産生により自然炎症の破綻が起こる。過剰鉄による持続的酸化ストレスにより慢性炎症が起こり、細胞や遺伝子 DNA が障害され、妊孕性の低下およびがん化へ向けて進展していくことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuk C, Gunawardana CG,

- Soosaipillai A, Kobayashi H, Li L, Zheng Y, Diamandis EP. Nidogen-2: A new serum biomarker for ovarian cancer. Clin Biochem. 2010 Mar;43(4-5):355-61.
2. Kobayashi H. Screening, epidemiology, molecular biology, and treatment strategies for endometriosis-associated ovarian cancer. Reprod. Med. Biol. 2010; 9 (1): 17-22.
3. Shigetomi H, Onogi A, Kajiwara H, Yoshida S, Furukawa N, Haruta S, Tanase Y, Kanayama S, Noguchi T, Yamada Y, Oi H, Kobayashi H. Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain. Inflamm Res. 2010 Sep;59(9):679-87.
4. Kajihara H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Sado T, Oi H, Kobayashi H. Clear cell carcinoma of the ovary: potential pathogenic mechanisms (Review). Oncol Rep. 2010 May;23(5):1193-203.
5. Shigemitsu A, Furukawa N, Koike N, Kobayashi H. Endometrial cancer diagnosed by the presence of bone metastasis and treated with zoledronic Acid: a case report and review of the literature. Case Rep Oncol. 2010 Sep;3(3):471-6. Epub 2010 Dec 13.
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし

ミトコンドリアとストレスの研究

研究分担者 末岡 浩
慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 准教授

研究要旨

本研究では、加齢卵子に特異的に生じる変化を卵子の大きさ、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の量的分析を介して、妊孕性改善等に有用な受精・胚発生に影響を及ぼす基礎データを集積することを目的とした。受精後 3 日目の 7~8 細胞分割胚割球 (36 歳) の平均 mtDNA copy 数は $673,722 \pm 12,952$ で、割球体積と mtDNA copy 数との間に、強い正の相関を認めた ($r=0.76$, $p<0.01$)。Veck 分類での Grade I から mtDNA copy 数も有意差は認めなかった。卵子細胞質体積は、40 歳未満群 (31~39 歳, $n=55$) では $305085 \pm 4329 \mu\text{m}^3$, 40 歳以上群 (40~47 歳, $n=53$) では $419263 \pm 19362 \mu\text{m}^3$ であり、40 歳以上において卵子細胞質体積は有意に大きい傾向を示した。加齢女性由来の卵子細胞質体積は大きく異なり、mtDNA copy 数の減少を認めたことから、加齢によって胚の mtDNA 密度の減少が胚発生低下の原因と深い関係を示唆した。

A. 研究目的

日本は社会生活の変化に伴い、生殖に携わる年齢は徐々に変化してきている。女性の高齢化による生殖能維持は困難であり、さらに環境ホルモンや骨盤内感染、種々の人為的要因にて低下の危機が指摘されている。近年多様な生殖補助技術が発展し、重症不妊に対しても一部の妊娠成立を可能にしてきている。しかし高齢による生殖能低下への有効な対応策は未解決である。わが国は、他国に比しても急速に日本は少子高齢化が進み、社会保障関係費が増大し、福祉制度の持続可能性を揺るがす問題に発展しつつある。高齢による生殖能低下への有効な解決策はわが国にとって急務である。加齢卵子に特異的に生じる変化を細胞質レベル、特にミトコンドリア関与する遺伝子発現に焦点を当てて解明することが必要と考えられる。

ミトコンドリアは生命活動に必要な酸化リン酸化代謝機能を司る細胞内小器官であり、その内部には独自の

遺伝情報であるミトコンドリア DNA (mtDNA) が存在している。近年、mtDNA と卵の老化との関係が示唆されてきている。酸化リン酸化代謝機能に不可欠であるミトコンドリアに着目し、mtDNA の分析、特に量的評価を介して、妊孕性改善等に有用な受精・胚発生に影響を及ぼす基礎データを集積することを目的とした。mtDNA の量的評価は細胞質体積に相関することを明確にし、卵子に生じる加齢変化を卵子の体積から検討した。

B. 研究方法

2005 年 8 月から 2011 年 2 月まで当院当科で行われた IVF で廃棄される、異常分割胚についてインフォームド・コンセントを得て検体とした。

(1) mtDNA の量的評価

7~8 cell の分割胚 ($n=4$) (36 歳) を受精後 72 時間で胚の形態評価を行った。評価は、Veck 分類を用いた。7~8 cell 分割胚からは個々の割球を採出 ($n=29$) し、検体とした。

それぞれの割球の長径 D , 短径 d を Hoffmann 微分干渉装置を用いて計測し, 体積 ($\pi ddD \div 6$) を算出した ($\pi=3.14$)。

分割胚割球各 1 個を cell lysis buffer (0.2% sarcosyl + 10mM の EDTA 添加 TE buffer) $4 \mu\text{l}$ を予め入れたマイクロチューブに分けてサンプリングし, 反応液を加えて $24 \mu\text{l}$ とし, real-time PCR で増幅し, 分析を行った。

mtDNA を 1 細胞中に 9100 copy 含むヒトリンパ球由来の細胞株 (ATCC, 143B; bone, osteocarcinoma: CRL-8393) を PBS で洗浄した後, 精製水で, 各 copy 数の異なる希釈系を作成し, real-time PCR で増幅した。定量分析は TaqMan® 蛍光プローブを用いた。Real-time PCR を施行した。

データの解析には縦軸にサイクル数での蛍光強度と base line での蛍光強度の差, 横軸にそのサイクル数からなるグラフの指数関数的に増幅する領域の中央に threshold line を定め, 検量線を作成した。その検量線もとに分割胚割球の mtDNA copy 数を定量した。

(2) 卵子体積の測定

卵細胞質内精子注入 (ICSI) 時に Hoffmann 微分干渉装置を用いて鏡検し, OCTAX システムで計測した。受精卵 ($n=108$, 31~47 歳)

細胞質を長径 D , 短径 d を測定し, 体積 ($\pi ddD \div 6$) を算出した ($\pi=3.14$)。

C. 研究結果

平均 mtDNA copy 数は $673, 722 \pm 12, 952$ であった。分割胚割球の mtDNA copy 数の最小は 515, 897, 最大は 836, 410 に分布していた。また, 同一胚内において割球間に mtDNA copy 数に差があることが示された。割球体積と mtDNA copy 数との関連性を確認したところ, 強い正の相関を認め ($r=0.76$), 割球体

積と mtDNA copy 数は有意性のある関係であることが確認された ($p < 0.01$)。 (表 1)

Veck 分類での Grade I 胚からの割球 $n=13$ と Grade III 胚からの割球 $n=16$ との間の比較検討を行った。両群間の体積に有意差は認めず, また mtDNA copy 数も有意差は認めなかった (表 2)。

卵子細胞質体積は 40 歳未満 (31~39 歳, $n=55$) が $305085 \pm 4329 \mu\text{m}^3$, 40 歳以上 (40 ~ 47 歳, $n=53$) は $419263 \pm 19362 \mu\text{m}^3$ であり, 40 歳以上において卵子細胞質体積は有意に大きい傾向を示した ($p < 0.01$) (表 3)。すなわち, 加齢により卵子の細胞質体積は大きく, mtDNA copy 数は減少することから, 卵子内の mtDNA copy 密度は減少することが示された。

D. 考察

ミトコンドリアの機能は卵子の quality に強く関わっており, 受精や胚の成長に重要な役割を果たしているといわれている。ミトコンドリアは, 細胞内小器官としてヒトの着床前の胚の 23% を占めているといわれている。ミトコンドリアは adenosine diphosphate を adenosine triphosphate に変化させる酸化リン酸化に重要な器官である。卵細胞内の ATP 活性の状況が着床や胚の発育の障害の原因になると考えられている。mtDNA に deletion や点変異が存在すると, free radicals clearance が低下し, mtDNA の酸化損傷の結果である 8-hydroxyguanosine が蓄積するとされ, さらに mtDNA の酸化損傷は呼吸鎖蛋白の合成障害を引き起こし, 活性酸素の産生増大や新たな mtDNA の変異を引き起こす悪循環が生まれる。それにより細胞が障害され, 着床障害の原因となると考えられている。また mtDNA が変異すると ATP の産生が低下