

博士論文

排卵過程における黄体化制御および卵成熟に関与する

fibronectin の機能解析

(要約)

平成 30 年 9 月

北坂 浩也

要約

第一章：緒論

少子高齢化，晩婚化，晩産化は生殖補助医療（assisted reproductive technology : ART）にも大きな影響を与えている．世界保健機構（World Health Organization : WHO）や日本産科婦人科学会における「不妊症」の定義は，治療をしないとそれ以降自然に妊娠する可能性がほとんどない状態をいい，特に，病気がない健康な男女が挙児を希望し，避妊をせず夫婦生活を営むが 1 年間妊娠の成功がない場合をいう．このような不妊症患者の増加による社会情勢の変化により，ART の必要性が高まり凍結融解胚移植は増加し，黄体ホルモン補充周期が盛んに行われている．また，若年者の早発卵巣不全および加齢による原始卵胞の減少，つまり卵巣予備能の低下による採取卵子数が減少し，得られた卵子を如何に治療に用いるかが重要である．しかし，LH サージによる排卵刺激後の顆粒膜細胞の黄体化制御機構および体外培養による未成熟卵子培養法については，未だ解明されず，確立された方法はない．これらの背景から，本研究では顆粒膜細胞における黄体化に関する基礎検討と体外培養による成熟卵獲得を低リスクかつ高率に獲得する事を目的に研究を行った．

第二章：排卵過程の顆粒膜細胞における fibronectin-integrin-FAK 経路の制御機構とその役割に関する分子生物学的研究

LH 刺激後の顆粒膜細胞から分泌された EGF-like factor は，顆粒膜細胞および卵丘細胞に作用して排卵を誘導することが知られている．顆粒膜細胞は，プロゲステロン産生のため，細胞を分化および形態変化をさせ，卵丘細胞は，脱接着によりヒアルロン酸を主成分としたマトリクスを蓄積する．さらに，LH もまた卵胞壁や顆粒膜細胞層における fibronectin を含む細胞外マトリクスの構成を変化させる．EGF-like factor や fibronectin は顆粒膜細胞および卵丘細胞に作用し，細胞に多能性を獲得させ，特に fibronectin についてはガン細胞の遊走において相乗的に重要な役割を果たすと考えられる．そこで，これらの仮説を立証するために，fibronectin およびその受容体である integrin の局在を免疫蛍光法によって観察した．次に，fibronectin-integrin のシグナル伝達下流にある FAK について，*in vivo* および *in vitro* 両方における排卵過程の生理学的役割について解析した．免疫蛍光染色により，integrin のシグナルは排卵前および排卵期の顆粒膜細胞および卵丘細胞で検出され，fibronectin および integrin 局在の変化に伴い，FAK はリン酸化された．FAK 阻害剤の投与は，排卵数だけでなく，顆粒膜細胞の黄体形成および卵丘細胞の膨潤も抑制した．顆粒膜細胞の培養においては，fibronectin は，FAK を活性化させ，さらに fibronectin+ EGF-like factor では相乗的に FAK を活性化させた．このような両者の刺激は，顆粒膜細胞の形態学的変化を誘導し，Hsd3b の誘導を介したプロゲステロン産生をもたらした．卵丘細胞卵複合体（COC）を血清+ EGF-like factor 添加培地で培養すると，卵丘細胞の膨潤が有意に増

加し、FAK 阻害剤によって EGF-like factor 添加区においても卵丘細胞の膨潤は抑制された。したがって、EGF-like factor と fibronectin の両者が、顆粒膜細胞および卵丘細胞に相乗的に作用し、排卵過程を成立させることが明らかになった。

第三章：fibronectin の卵成熟・排卵に対する役割に関する研究

排卵過程において、卵丘細胞は仮足形成を行い、運動性を獲得することで、卵丘細胞層の膨化が生じる。また、卵においては、tubulin の重合が紡錘体を形成し、actin のリモデリングが極体を放出させることから、排卵過程の卵成熟は細胞骨格の再構成とも定義することができる。このように排卵過程において細胞骨格のリモデリングが起こるが、その誘導機構はわかっていない。そこで本章では、排卵過程において卵胞内での fibronectin の生理活性が高まり、integrin を介して卵丘細胞および卵、それぞれの細胞種特異的な排卵期における細胞の機能的変化を誘導し、排卵現象を成立させると仮説立て、検討を行った。過排卵刺激後の COC を fibronectin が高濃度含有するウシ胎児血清添加条件にて、fibronectin と integrin の結合を競合阻害する RGD peptide を添加した DMEM 培地で 16 時間培養し、卵丘細胞の膨潤を観察すると共に、培養後には卵丘細胞を除去して卵の極体放出を観察した。さらに、過排卵後、卵丘細胞を除去したマウス GV 卵を fibronectin 添加の有無で培養し、極体放出率を比較検討した。卵丘細胞の膨潤は、RGD 添加区において有意に抑制され、卵の極体放出率は無添加区に比較して RGD 添加区で有意に低い値を示した。また、GV 卵の培養における極体放出率は、無添加区に比較して fibronectin 添加区で有意に高い値となった。RGD 添加区では卵丘細胞の膨潤がみられず卵への fibronectin の浸潤が抑制された事により、極体放出率が低い値を示し、GV 卵培養においては fibronectin が卵成熟に有効的に作用した。これまで排卵は、顆粒膜細胞が発現・分泌する因子が卵丘細胞の機能的変化を介して卵の減数分裂が進行すると考えられてきた。しかし本研究は、卵丘細胞の細胞骨格変化に起因する脱接着と細胞遊走により生まれた空間に形成される ECM が、卵丘細胞層の膨化だけでなく卵の細胞骨格制御により卵成熟に影響するという画期的な成果を示すものである。

以上より、排卵過程において、卵丘細胞が脱接着しその細胞間にヒアルロン酸が蓄積することが知られているが、fibronectin もこの細胞外マトリクスの構成因子であり、それが卵丘細胞の膨潤及び卵成熟に関係することが明らかになった。

第四章：卵子紡錘体の可視化による臨床成績およびヒト卵子における fibronectin の卵成熟に果たす役割

第二章において、fibronectin は卵巣において EGF-like factor と相乗的に作用する事で、顆粒膜細胞の黄体化制御の一端を担う事が明らかになり、第三章ではマウス裸化卵子にお

けるfibronectinの卵成熟効果が認められた。つまり、「排卵過程においてfibronectinは卵巣で作用する」というこれらの動物実験による基礎的な知見から、ヒトにおいてもfibronectinが排卵過程に関与していると示唆された。

ヒトにおけるARTは、多数の成熟卵を得ることが成功の一步である。しかし、単一排卵動物のヒトでは、一度の排卵期に多数の成熟卵を得ることは難しい。そこで、初期の研究では一つの方法として、卵巣から回収した卵子を体外で成熟させる体外成熟培養（*in vitro* maturation : IVM）の検討が行われた。ヒトIVMの初期研究では、未成熟卵子は採取されると*in vitro*で自発的にMIIに成熟することが報告され、血清添加や様々な生理活性因子の添加効果の検討がなされた。しかし、ヒトIVMの卵成熟率は低く、その卵の受精能および発生能も限定的であり、その結果、臨床応用には不十分の技術であった。そこで本研究では、ヒト卵における成熟卵子を非侵襲的に判断するために、紡錘体を可視化し、紡錘体が可視であった卵子の受精・発生と不可視であった卵子の追加培養による紡錘体の出現と受精・発生について解析を行った。また、追加培養によりMIからMIIとなり、極体を放出した卵子の臨床的有効性も検討し、さらにヒト卵子におけるfibronectin添加の効果を検討した。まず初めに、紡錘体可視化システムを用い卵子を観察し、紡錘体の可視不可視による臨床成績を比較検討した結果、紡錘体が可視であることで、正常受精率が有意に高く、成熟卵としての指標となることが明らかになった。次に、MI期卵子の追加培養により、その臨床的有効性を見出した。最後に、MI期卵子をfibronectin添加培地で培養することで、早期に極体を放出し、tubulinの分離も良好な卵子が多く得られた。

まとめ

近年の晩産晩婚化により、2016年には出生数は100万人を割り込み、97万人となり、少子化が加速している。また、母体年齢（5歳階級）別にみると、出生数は15～39歳では前年より減少したが、40～49歳の各階級では増加し、高齢出産が増加傾向にあることも明らかである。このような背景は諸外国でも認められ、ARTの重要性が高まっている。特に、黄体ホルモン補充による凍結融解胚移植および、一定頻度で得られる未成熟卵子の利用については重要な課題であり、未解明な部分が多い。このような背景の基、本研究においては、fibronectin coating free plate 培養では、球状あるいは楕円状の形態を示し、顆粒膜細胞は集合体を形成しているが、fibronectin coating plate 培養では顆粒膜細胞は底面に強固に張り付き、扁平上の形態性を示した。また、eCG 刺激マウスに FAK 抑制剤である Y15 と hCG を同時投与し、排卵過程における顆粒膜細胞の形態変化と P4 産生に及ぼす影響を検討した結果、Y15 投与マウスでは顆粒膜細胞は円形を保持し、排卵や着床、妊娠の維持に必須である progesterone (P4) 産生に関わる遺伝子発現が低下することを明らかにし、P4 産生機構の一端を解明した。さらに、fibronectin 添加による紡錘体形成の正常性向上が認められ、さらに、排卵過程で卵丘細胞間および卵表面に展開する fibronectin が、卵丘細胞と

卵子の **integrin-FAK** 系を活性化させ、細胞遊走に起因する卵丘細胞の膨潤や、**actin** 重合による極体放出および **tubulin** 重合による紡錘体の形成といった卵子成熟に有効に働くことが示された。

このように本研究で明らかにされた **fibronectin** の黄体化制御の詳細なメカニズムの解明は、新しい観点から得られた知見であり、今後の黄体ホルモン補充による妊娠管理の一助および、最適な ART の発展に寄与するものである。また、裸化卵子培養においては、極少数卵子しか採取できなく、かつ未成熟であった場合には、既存培養液に **recombinant fibronectin** などの合成物を添加するという、安心安全でシンプルな方法で、臨床成績の向上が得られ、さらには家畜の生産向上にも波及効果が期待できる。