

—総説—

特集：卵胞発育の新知見—基礎から臨床応用まで

Hippoシグナル活性化による初期卵胞発育誘導の 臨床応用：Drug-free IVA (In vitro activation) の開発

Clinical application of stimulation of early-stage follicles through Hippo signal activation: development of Drug-free IVA (In vitro activation)

田中 佑佳・河村 和弘*

Yuka Tanaka and Kazuhiro Kawamura*

国際医療福祉大学医学部産婦人科 〒286-8686 成田市

*Department of Obstetrics and Gynecology, International University of Health and Welfare School of Medicine, 4-3
Kouzunomori, Narita, Chiba 286-8686, Japan*

要旨：これまでの生殖医療では、ゴナドトロピン依存性である胞状卵胞を内因性のゴナドトロピンあるいはゴナドトロピン製剤を用いて発育促進させることで様々な治療法を構築してきた。しかし、初期卵胞の発育を促進させる方法は無く、胞状卵胞数が減少した卵巣機能不全患者では、種々の卵巣刺激を行っても得られる卵子の数は限定的であり、治療に難渋することが多い。我々は最近、メカノバイオロジーに関連する細胞内シグナルであるHippoシグナルを調節することで初期卵胞の発育促進を可能とする新たな方法を開発し、その臨床応用に成功した。本総説では、その方法と臨床成績について紹介する。

キーワード：初期卵胞発育, Drug-free IVA, Hippoシグナル, 臨床試験, 基礎試験

Abstract: In reproductive medicine, different treatments have been established which promote the growth of gonadotropin-dependent antral follicles using endogenous or exogenous gonadotropin treatments. However, there is currently no method which can stimulate the growth of early stage follicles. Therefore, in patients with ovarian dysfunction with decreases in antral follicles, the number of oocytes obtained after ovarian stimulation is limited, leading to difficulty in infertility treatment. Recently, we developed a method to stimulate early follicular growth by regulating the Hippo signaling pathway, which is known as a signal related to mechanobiology, and succeeded in its clinical application. In this review, we introduce our protocol for stimulating early follicular growth which we named "drug-free IVA" and report the clinical outcomes of drug-free IVA in the infertility treatment of patients with ovarian dysfunction.

Key words: Early stage follicular growth, Drug-free IVA, Hippo signaling pathway, Clinical trials, Basic research

はじめに

近年の社会構造の変化などにより、女性の晩婚化は日本のみならず世界中で進んでおり、その結果として高齢不妊

患者が急増している。高齢不妊の原因は、卵巣内の残存卵胞数の減少による卵巣機能不全と卵子の老化が同時におこることが特徴である。また加齢以外に、遺伝的要因、自己免疫疾患、抗がん剤や放射線療法などの医原性要因など、様々な病的要因によっても卵巣機能は低下する。

卵巣機能不全では卵巣内の休眠原始卵胞数が減少するため、毎月活性化される原始卵胞数が減少する¹⁾。その結果、リクルートされる発育卵胞数が減少し、FSH刺激に反応するゴナドトロピン依存性の胞状卵胞数が激減する。内分泌学的には、血中FSHおよびLH基礎値の上昇とエストロゲン

(受付 2019年12月9日／受理 2019年12月12日)

別刷請求先：〒286-8686 千葉県成田市公津の杜4-3

国際医療福祉大学医学部産婦人科

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: kazuhironanami@gmail.com

基礎値の低下、抗ミュラー管ホルモン値の低下といった異常を示し、超音波下での卵状卵泡数測定 (AFC: antral follicle count) では、数個まで減少する。少なくとも体内においては、出生後は原始卵泡の再形成はおこらないため、卵巣機能不全における卵泡数の減少は進行性であり、さらに重症化すれば、休眠原始卵泡の活性化が不定期または停止する。この卵泡発育障害は月経不順や無月経といった症状で現れ、排卵障害による不妊となる。

このような患者で最も確実な不妊治療法は、若年女性の提供卵子を用いた体外受精胚移植 (IVF-ET) であるが、倫理的・医学的な問題もあり、自己の卵子を用いた妊娠を可能とする方法の開発が期待されていた。我々は、残存卵泡の減少により生体内では発育しない卵泡を特殊な卵巣組織体外培養と腹腔鏡下卵巣組織移植術を組み合わせる卵泡活性化療法 (IVA: in vitro activation) を開発し、卵巣機能不全の最重症型である早発卵巣不全 (早発閉経) 患者の自己卵子による妊娠分娩に成功してきた²⁻⁶⁾。しかし、IVA では腹腔鏡下に摘出した卵巣組織を、休眠原始卵泡を活性化させるために48時間体外培養を行う。そのため、活性化した卵巣組織を初回の手術後に再度腹腔鏡下に移植することになり、2回

の外科的手術が必要となる (図1)。

早発卵巣不全には至っていないが、卵巣機能不全で月経不順を呈している患者や十分な卵巣刺激を行っても低反応を示す患者においては、休眠原始卵泡の活性化はおきていると考えられるため、IVAによる治療は侵襲度の点から過剰な治療である。しかし、高齢の卵巣機能不全患者を含めたこのような患者では、適切な卵巣刺激を行っても0-数個程度の卵子しか採卵できず、得られた卵子の質も低いことが多いため、妊娠の可能性は非常に低い。我々はこのような患者に対し、卵泡内のメカノバイオロジーに関連する細胞内シグナルであるHippoシグナルを外科的な方法で調節することで、初期卵泡の発育促進を可能とする新たな方法 (Drug-free IVA) を開発し^{3,5,7)}、Drug-free IVAの臨床応用に成功した⁷⁾。本総説では、その方法について概説し、その臨床成績について紹介する。

IVA

早発卵巣不全患者では、卵巣内に休眠原始卵泡が残存していても、体内では活性化せず卵泡が発育しない。そこで我々は、休眠原始卵泡を活性化する細胞内シグナルを賦活

A) In vitro activation (IVA)



B) Drug-free IVA

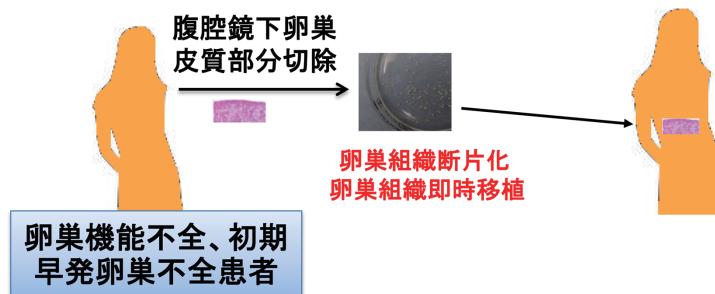


図1 IVAとDrug-free IVAの概要 (文献7を一部改変)

A) IVA: 対象は早発卵巣不全で無月経期間が長い患者、卵巣組織の体外培養と2回の腹腔鏡手術が必要、B) Drug-free IVA: 対象は卵巣予備能が低下した卵巣機能不全患者または初期の早発卵巣不全患者、1回の腹腔鏡手術のみで可能。

化するための体外培養を行い、卵胞発育を再生する方法を考案し、早発卵巣不全患者が自らの卵子で妊娠可能となる方法の開発を行った。

休眠原始卵胞を活性化するための細胞内シグナルを同定するため、ノックアウトマウスの網羅的な *in silico* 解析を試みたところ、PTENおよびFOXO3遺伝子のノックアウトマウスでは、原始卵胞が自発的に活性化し、生後2-5週目で卵巣が大きくなり、多数の発育卵胞が認められ、生後16週では卵巣内の卵胞が喪失し、卵巣が萎縮する報告を見出した^{8,9)}。この結果から、FOXO3は原始卵胞の活性化を抑制する働きがあり、PI3K-AktシグナルはFOXO3を抑制することで原始卵胞を活性化する。また、PTENはPI3Kを抑制する作用を持つことから、PTENが欠如するとPI3K-Aktシグナルの活性化により原始卵胞が活性化するという分子機構が想起された。

そこで我々は、休眠原始卵胞の活性化のための体外培養系として、卵巣組織断片をPTEN抑制剤およびPI3K活性化剤を含む培養液で48時間培養するという方法を考案した。マウスおよびヒト卵巣組織を用いた基礎～橋渡し研究を行い、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休眠原始卵胞の人為的活性化に成功した¹⁰⁾。さらに、休眠原始卵胞の人為的活性化により得られたマウス成熟卵子は、遺伝子のメチル化解析では正常なゲノムインプリンティングを有しており、体外受精により正常な受精能と胚発育能を示した。この胚(胚盤胞)を偽妊娠マウスの子宮に移植したところ、妊娠に成功し、正常な児を得ることができた¹⁰⁾。さらなる動物実験により、本法の安全性を十分確認した後、早発卵巣不全患者から卵巣を腹腔鏡下に摘出し、体外で休眠原始卵胞を活性化させ、再度腹腔鏡手術で培養した卵巣組織を移植して卵胞発育を再生し、自らの卵子で体外受精胚移植を行うIVAを開発した。倫理委員会の承認と患者の同意の下に早発卵巣不全患者を対象とした臨床試験を行い、生児を得た²⁾。

IVAにおける初期卵胞の発育誘導

ヒトでは、原始卵胞が排卵前卵胞まで発育するために約4-6ヶ月を要する。そのため当初、IVAでは卵巣組織移植を行ってから4-6ヶ月後に卵胞発育が得られると考えていた(図2)。しかし、実際は一部の患者で早期に卵胞発育が認められた。その理由として、原始卵胞以外の初期卵胞がこれらの患者の卵巣に残存しており、IVAによって発育が促進されたと考えた。IVAでは、卵巣組織を気相液相海面培養法にて比較的長時間(48時間)体外培養するため、卵巣皮質組織を1-2 mm大に細断片化する必要がある^{2,10)}。我々は、この細断片化のプロセスに注目し、卵巣組織へ物理的な刺激をかけることで初期卵胞の発育が促進されるという仮説を立てた。

この仮説を検証するため、初期卵胞(1次卵胞、初期2次卵胞)を含む生後10日齢マウスの卵巣を断片化し、ホストマウスの腎皮膜下に移植したところ、断片化しない卵巣に比べ、断片化した卵巣の重量が増加し、2次卵胞の発育が促進されていることを見出した²⁾。さらに、その分子機構の解明を行っ

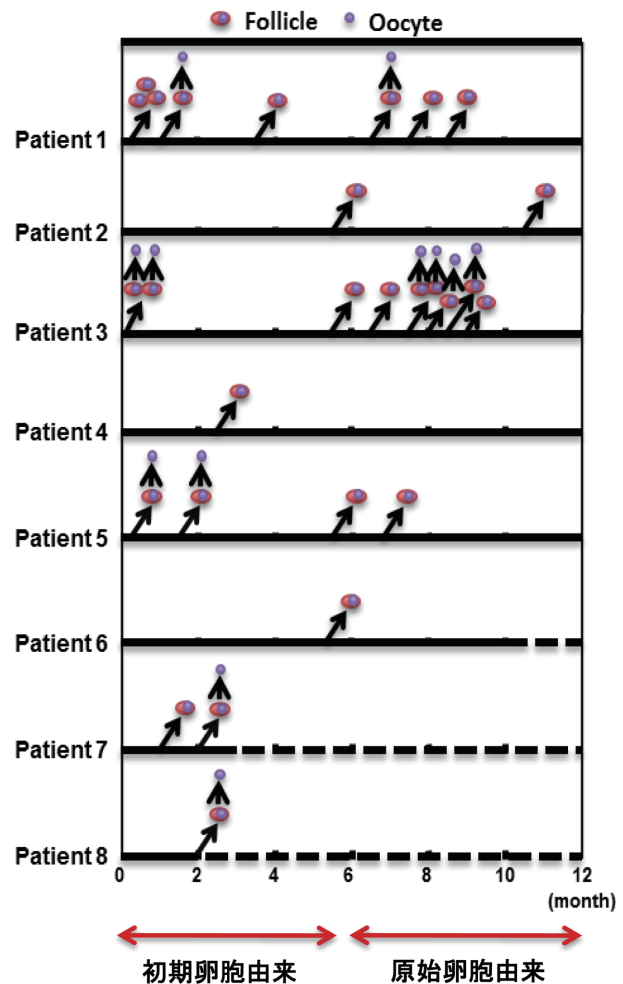


図2 IVAにおける卵巣組織移植術後の卵胞発育の時間経過(文献2を一部改変)

たところ、メカノバイオロジーにおいて重要な働きを示すHippoシグナルが関与していることが明らかとなった²⁾。

Hippoシグナル抑制による初期卵胞の発育促進

Hippoシグナル経路は、細胞の増殖を制御しながら臓器の大きさを規定する細胞内シグナルであり、後生生物から哺乳動物まで広く保存されている¹¹⁻¹³⁾。Hippoシグナルはいくつかのセリン/スレオニンキナーゼ経路を抑制する因子により構成されており、通常はYAP (Yes-associated protein) およびTAZ (Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) がHippoシグナルによりリン酸化され、細胞質内に存在している。Hippoシグナルが抑制されるとYAPのリン酸化が解除され核内に移行し、転写因子であるTEAD (Transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain) と共役してCCN成長因子やアポトーシス抑制因子であるBIRC (baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing) を産生する。Hippoシグナルの制御は、

細胞同士の接着や細胞濃度，細胞骨格の変化などによって規定されている¹⁴⁾。細胞に物理的な刺激が加わり，細胞同士の接着や細胞の形の変化がおこると，細胞骨格構成タンパク質である actin が速やかに G-actin (globular actin) から F-actin (filamentous actin) に重合化する。細胞内の F-actin 濃度が高まると Hippo シグナルが抑制され，YAP のリン酸化が解除されて核内移行が促進される¹⁵⁾。

我々は，マウスおよびヒトの卵巣において Hippo シグナル構成因子 (YAP, TAZ, MST1/2, LATS1/2) が卵巣内の顆粒膜細胞に発現していることを見出した。さらに，卵巣を細断片化して細胞に物理的的刺激を与えることで，一時的に G-actin が重合化し F-actin の割合が増えること，それに引き続いてリン酸化した YAP の減少と，非リン酸化型 YAP の核内移行，さらにその下流の CCN 成長因子の発現が増加することを見出した。最終的に卵巣の細断片化により，2次卵胞の発育が誘導されることを明らかにした²⁾。

我々はさらに，卵巣を断片化することなく Hippo シグナルを抑制する方法として，actin 重合化作用をもつ海綿動物由来の Jaspaklinolide (JASP)，および GPCR を介して Hippo シグナルを抑制する sphingosin-1-phosphate (S1P) を用いて，卵巣の断片化による物理的刺激的の非存在下で Hippo シグナルの抑制と，それに引き続く卵胞発育誘導を試みた。生後 10 日齢のマウス卵巣の器官培養系において，JASP および S1P は Hippo シグナルを抑制し，顆粒膜細胞および莢膜細胞における YAP の核内移行を促進することを明らかにした¹⁶⁾。さらに，JASP または S1P 処理した卵巣では，培養後に CCN2 成長因子の発現が増加し，2次卵胞の発育が促進されることが明らかとなった¹⁶⁾。さらに，ヒト卵巣組織培養系を用いて同様の試験を行い，JASP および S1P の添加培養により，CCN2 成長因子の発現増加を確認した¹⁶⁾。

Drug-free IVA

これまでの研究成果から，IVA には PI3K シグナルの活性化による休眠原始卵胞の活性化と，Hippo シグナルの抑制による初期 2 次卵胞の発育促進の二つの卵胞発育に関する作用があることが示された (図 3)。

卵巣機能不全患者のうち，ごく早期の早発卵巣不全や DOR (diminishing ovarian reserve) 症例では，卵胞が比較的多く残存している。その場合，休眠原始卵胞の活性化はまだおきているが，その数は少なく不規則となっている。そのため，リクルートされる発育卵胞の数も少ない。その結果，胞状卵胞はほとんどなく，強力な卵巣刺激を行っても得られる成熟卵胞は 0-数個であることが多い。このような患者に対し，Hippo シグナル抑制による初期 2 次卵胞の発育促進を行う方法，すなわち摘出した卵巣皮質組織片を約 1 mm 大の小断片となるよう細切し，体外培養を行わず卵巣に対する物理的的刺激のみ与え，Hippo シグナルを抑制して 2 次卵胞の発育を誘起する方法を Drug-free IVA と名付け，臨床応用を行った⁷⁾。Drug-free IVA では，卵巣組織に物理的な刺激を与えた後，腹腔鏡下に組織移植デバイスを用いて卵巣組織移植術を行う。移植部位としては，卵管漿膜下および残存卵巣，後腹膜に行う (図 1)。本法の適応患者は，上記のまだ自発的な休眠原始卵胞の活性化があり，2 次卵胞が残存している患者に限られるが，1) 1 回の腹腔鏡手術での治療が可能である，2) 組織培養中の卵胞の喪失がない，3) 重度の POI 患者に比べ卵巣の血流が良く，卵巣に移植した場合の移植卵巣組織への良好な血管新生が期待でき，その結果排卵，自然妊娠も可能である，といったメリットがある^{3,7)}。

これまでの臨床試験では，11 名の DOR 患者に Drug-free IVA を行い，その後 1 年間にわたる卵巣刺激と体外受精胚移

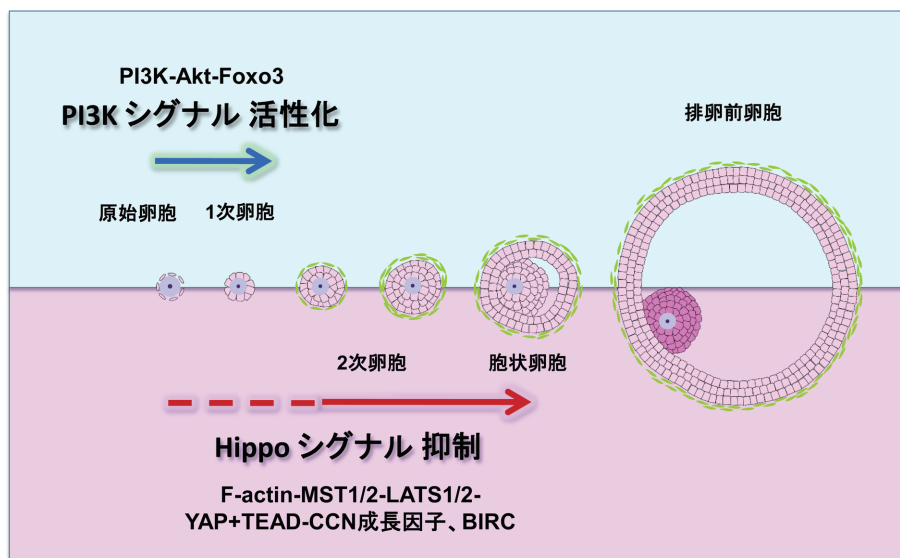


図 3 2種類の細胞内シグナル制御による IVA の卵胞発育促進効果

植を行った。患者年齢の中央値は34歳(30-45歳)で全て月経不順を合併しており、血中FSH値は高値(中央値47.3 mIU/ml, 13.4-84.9), 血中E2値は低値(0 pg/ml, 0-31), 血中AMH値も非常に低い値(中央値0.04 ng/ml, 0-0.8)であった。術前の卵巣刺激周期において、全ての患者の卵胞数は3個以下であったが、術後にゴナドトロピン製剤を用いた卵巣刺激を行ったところ、9症例において発育卵胞数または採卵数が増加し、1年間の治療期間中に6症例で10個以上の卵子の採卵が可能であった(図4)⁷⁾。Drug-free IVAにて得られた卵子の68.7%は正常に受精し、56.9%が高品質な胚へと成長した。11例中4例で妊娠が成立し、1例は流産となった。また、4例中1例は自然妊娠であった。現在の所、11名中4名で移植可能な凍結胚が保存されている状態である。最近、海外の病院でも成功例が報告されている¹⁷⁾。

まとめ

Hippoシグナル抑制による初期卵胞の発育促進は、これまでのクロミフェンやレトロゾールによる内因性のゴナドトロピン増加効果を用いた卵巣刺激やゴナドトロピン製剤を用いた直接的な卵巣刺激で不可能であった初期卵胞の発育誘導を可能とした。我々が開発したDrug-free IVAは、通常のIVAに比較して患者の侵襲性は低下したものの、依然全身麻酔下での腹腔鏡手術が必要であり、より侵襲度の低い治療の開発が待たれる。今後は、Hippoシグナルを抑制可能な薬剤を経腔的に卵巣へ注入する方法の開発や、特殊なデバイスを用いて経腔的に卵巣に対して物理的刺激を与えてHippoシグナルを抑制する方法の開発を進めて行く予定である。

文献

- 1) Nelson, L.M. (2009) : Clinical practice: Primary ovarian insufficiency. *N. Engl. J. Med.*, 360, 606-614.
- 2) Kawamura, K., Cheng, Y., Suzuki, N., Deguchi, M., Sato, Y., Takae, S., Ho, C.H., Kawamura, N., Tamura, M., Hashimoto, S., Sugishita, Y., Morimoto, Y., Hosoi, Y., Yoshioka, N., Ishizuka, B. and Hsueh, A.J. (2013): Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 110, 17474-17479.
- 3) Hsueh, A.J., Kawamura, K., Cheng, Y. and Fauser, B.C. (2015): Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr. Rev.*, 36, 1-24.
- 4) Kawamura, K., Cheng, Y., Sun, Y.P., Zhai, J., Diaz-Garcia, C., Simon, C., Pellicer, A. and Hsueh, A.J. (2015): Ovary transplantation: to activate or not to activate. *Hum. Reprod.*, 30, 2457-2460.
- 5) Kawamura, K., Kawamura, N. and Hsueh, A.J. (2016): Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 28, 217-222.
- 6) Suzuki, N., Yoshioka, N., Takae, S., Sugishita, Y., Tamura, M., Hashimoto, S., Morimoto, Y. and Kawamura, K. (2015): Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency, *Hum. Reprod.*, 30, 608-615.
- 7) Kawamura, K., Ishizuka, B. and Hsueh, A.J.W. (2019): Drug-free in-vitro activation of follicles for infertility treatment in poor ovarian response patients with decreased ovarian reserve. *Reprod. Biomed. Online*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.09.007>.
- 8) Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., Du, C., Tang, W., Hamalainen, T., Peng, S.L., Lan, Z.J., Cooney, A.J., Huhtaniemi, I. and Liu, K. (2008): Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, 319, 611-613.
- 9) Castrillon, D.H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J.W. and DePinho, R.A. (2003): Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor

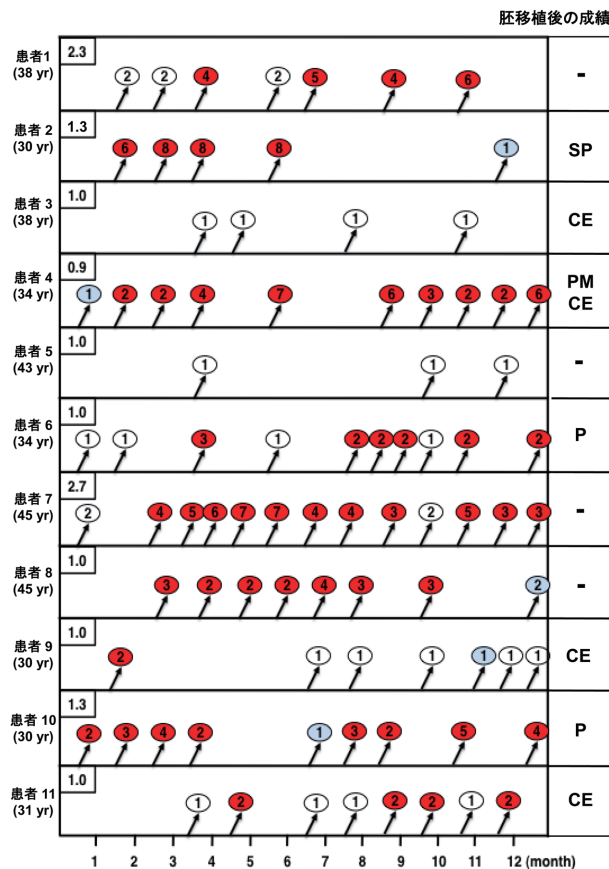


図4 Drug-free IVAの臨床成績(文献7を一部改変)
 左隅の四角内の数値はIVA手術前の卵巣刺激下の平均卵胞数。楕円内の数値はIVA手術後の卵胞数、赤の楕円は術後に卵胞数が増加したもの、青の楕円は術後の自然周期における卵胞数。
 - : 妊娠せず, P: Pregnancy after IVF-embryo transfer (体外受精胚移植後の妊娠), SP: Spontaneous pregnancy (自然妊娠), PM: Pregnancy followed by miscarriage (流産), CE: Cryopreserved embryos available (未移植の凍結胚あり)。

- Foxo3a. *Science*, 301, 215–218.
- 10) Li, J., Kawamura, K., Cheng, Y., Liu, S., Klein, C., Liu, S., Duan, E.K. and Hsueh, A.J. (2010): Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107, 10280–10284.
 - 11) Pan, D. (2007): Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev.*, 21, 886–897.
 - 12) Halder, G. and Johnson, R.L. (2011): Hippo signaling: growth control and beyond. *Development*, 138, 9–22.
 - 13) Hergovich, A. (2012): Mammalian Hippo signalling: a kinase network regulated by protein-protein interactions. *Biochem. Soc. Trans.*, 40, 124–128.
 - 14) Johnson, R. and Halder, G. (2014): The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 13, 63–79.
 - 15) Wada, K., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S. and Sasaki, H. (2011): Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development*, 138, 3907–3914.
 - 16) Cheng, Y., Feng, Y., Jansson, L., Sato, Y., Deguchi, M., Kawamura, K. and Hsueh, A.J. (2015): Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP. *FASEB J.*, 29, 2423–2430.
 - 17) Fabregues, F., Ferreri, J., Calafell, J.M., Moreno, V., Borrás, A., Manau, D. and Carmona, F. (2018): Pregnancy after drug-free in vitro activation of follicles and fresh tissue autotransplantation in primary ovarian insufficiency patient: a case report and literature review., *J. Ovarian Res.*, 11, 76.