

博士論文

子宮内膜症における卵巣機能への影響

竹内 亜利砂

要旨

子宮内膜症は子宮内膜類似組織を子宮外に認め、月経困難症や不妊症を呈し、女性の QOL を著しく低下する疾患である。近年、子宮内膜症と卵巣機能低下との関連が示唆されているが、その詳細は不明である。

本研究では、子宮内膜症の卵巣予備能の低下に抗がん剤と同様の、原始卵胞の異常活性化が関与している可能性を検討し、子宮内膜症による卵巣予備能の低下には、PI3K/Akt 経路を介した FOXO3 による原始卵胞の異常活性化が関与している可能性が示された。さらに、PI3K/Akt 経路を阻害する AS101 の投与により卵巣予備能が改善したことより、子宮内膜症の卵巣予備能低下への新たな治療戦略となりうると考えられた。

目次

| | |
|--------|----|
| 要旨 | 2 |
| 目次 | 3 |
| 序文 | 4 |
| 本研究の目的 | 20 |
| 方法 | 21 |
| 結果 | 31 |
| 考察 | 45 |
| 引用文献 | 52 |

序文

1) 子宮内膜症

子宮内膜症は、子宮内膜様組織が子宮外に存在する慢性炎症性疾患である。

子宮内膜症は、生殖可能年齢女性の約 5-10%に存在し、月経困難症、骨盤痛、不妊症等の症状を起こす[1]。子宮内膜症は、膀胱や腸管、肺や膈などに病巣をつくることもあるが、その多くは骨盤腔に病変を作ることが多く、子宮内膜症と診断を受ける患者のうち約 17-44%は、卵巣に子宮内膜症病変ができる子宮内膜症性卵巣嚢胞（Endometrial cyst: Emcyst）である。子宮内膜症の病因の詳細は明らかとはなっていないが、子宮内膜細胞を含む月経血が経卵管的に腹腔内に逆流し、卵巣や腹膜に生着して病変を形成する[2]という病因説が有力で、繰り返される排卵と月経が本症の増悪因子である。近代女性の社会進出に伴う出産回数減少と初産年齢の上昇も相まって子宮内膜症の罹患率は増加傾向にある。また、子宮内膜症患者の約 50%が不妊症となり、逆に不妊症女性患者の約 50%に子宮内膜症が合併するとも報告されており、本症は不妊治療にも大きな影響を及ぼしている[3-5]。

子宮内膜症の治療は、ホルモン療法、手術療法などが一般的にあげられる。ホルモン療法は、子宮内膜症病変の縮小効果はあっても根治させることはなく、ホルモン療法をやめると病変の増大や症状の増悪を招くことが知られている。また、少ない頻度ではあるが子宮内膜症には、癌化のリスクもあり、ホルモン療法

中の卵巣がん発症例も存在する[6]。さらに、ホルモン療法は排卵を抑制させるため、挙児希望のある患者には使用できない。一方、手術療法では近年の鏡視下手術の発達により腹腔鏡下手術で病変を取り除くことが可能である。しかしながら、約 11.7-30.4%が術後 2-5 年以内に再発することが明らかとなっており[7]、術後の高い再発率を考慮した手術のタイミングに苦慮することも多い。さらに、手術操作自体が卵巣機能低下をもたらすことも懸念される[8]。特に、妊娠を希望する生殖可能年齢の女性では、前述のようにホルモン療法と妊娠を両立することはできず、症状によっては手術療法を選択せざるを得ないことも多い。しかしながら、手術操作による卵巣機能低下へのダメージが回避できない可能性もあり、不妊治療への影響も懸念されている[9, 10]。特に、生殖補助医療を伴う不妊治療中の子宮内膜症患者においては、手術療法による卵巣機能低下への影響を考慮して、Emcyst 合併の不妊治療を先行することが多い[11, 12]。しかしながら、子宮内膜症の存在自体が骨盤内炎症性疾患 (Pelvic inflammatory disease: PID) を引き起こすリスクファクターであることが知られており[13]、Emcyst 合併の不妊治療中に PID を起こし、腹痛や発熱などの症状に苦しむだけでなく、骨盤内に膿瘍を形成し、結果として付属器切除 (卵巣、卵管を切除する) を要し、不妊治療を断念せざるを得ない症例もある。

このように、子宮内膜症は現代女性、特に生殖可能年齢の女性にとっては治療戦略に難渋することも多い疾患として近年特に注目を受けている。

2) 卵巣機能

卵巣機能とは、性周期すなわち排卵現象を伴って、卵巣からエストロゲンおよびプロゲステロンという女性ホルモンを分泌する卵巣の働きのことを示す。ヒト卵巣における、排卵までの卵子の変化は、胎生期からの長期的かつ複雑な過程を経て起こっている。胎生4ヶ月頃に、卵母細胞が一層の扁平上皮細胞（前顆粒膜細胞）で取り囲まれた原始卵胞が形成されるようになる。出生時には、原始卵胞の大部分は第1減数分裂前期で分裂を休止した状態で、思春期に至るまではこのまま長い休止期にはいる。性成熟期になると、これらの休眠状態の原始卵胞のストックの中から一部が、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞、成長卵胞へと活性化され排卵へと劇的な変化を起こす（図1）。

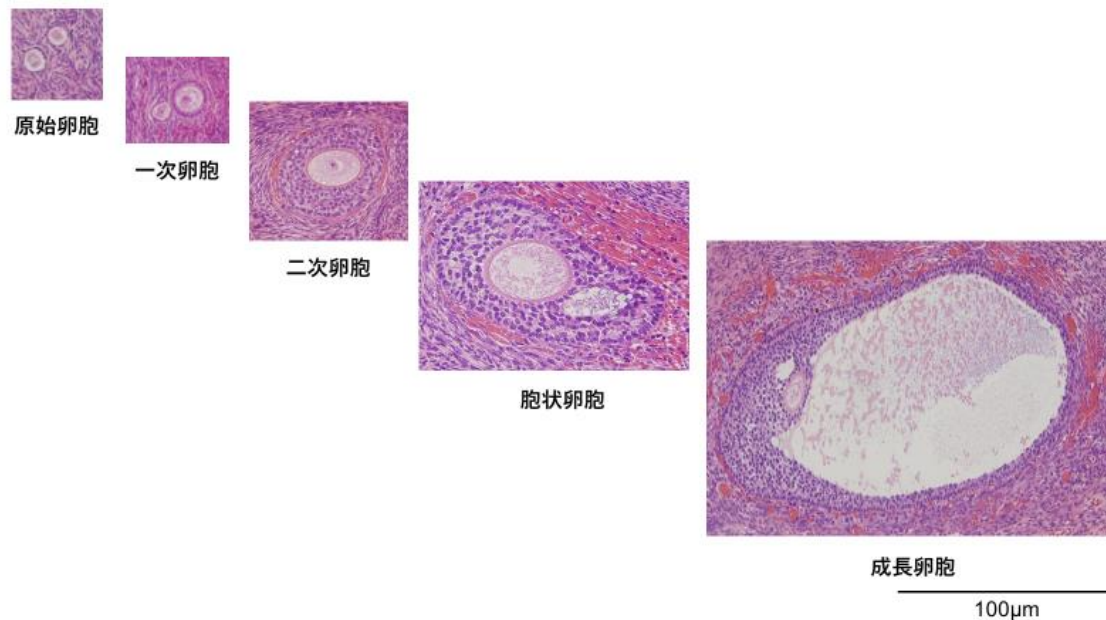


図1 ヒト卵巣における排卵までの卵胞の組織像

休眠状態の原始卵胞が、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞、成長卵胞と活性化され、劇的な変化を経て排卵に至る。

女性の原始卵胞数は加齢とともに減少することが知られている。図 2 に示すように、原始卵胞の数は、胎生 18-22 週時に 100 万個と最大であるが、出生時には 30 万個にまで減少し、思春期には 18 万個、25 歳では 6.5 万個、35 歳では 1.6 万個へと減少する[14]。

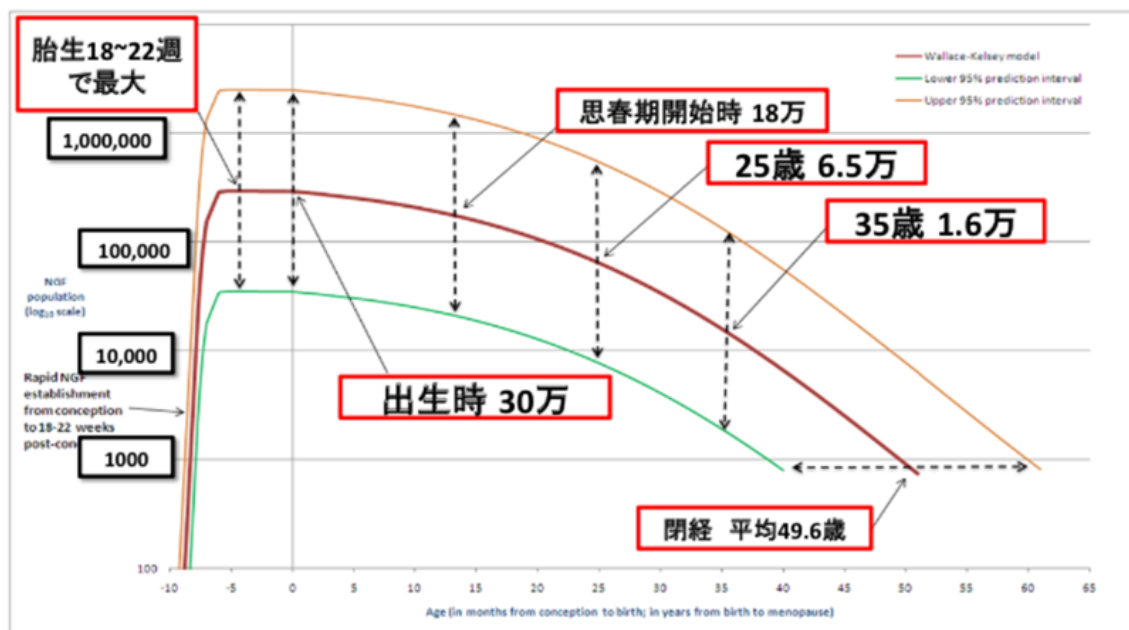


図 2 ヒトの年齢変化に伴う原始卵胞数（文献 14 より改編し引用）
 原始卵胞は、胎生 18-22 週時に 100 万個とピークであるが、出生後には、加齢とともに減少する。出生時には 30 万個であるが、思春期には 18 万個、25 歳では 6.5 万個、35 歳では 1.6 万個へと減少する。

卵巣機能は、加齢により低下し閉経を迎えるが、その卵巣機能がどれほど働くのかという卵巣予備能の評価指標として、卵巣内の残存原始卵子数、卵胞刺激ホルモン（Follicle stimulating hormone: FSH）、胞状卵胞数（Antral follicle count: AFC）、抗ミュラー管ホルモン（anti-Mullerian hormone: AMH）が用いられている。FSH は視床下部からの刺激により下垂体から放出されるホルモンの1つであり、主に顆粒膜に作用して卵胞の発育、分化を促進する。また、AFC は卵胞期早期の超音波断層法を用いて確認できる胞状卵胞数のことであり、AFC が多いほど不妊治療における排卵誘発への反応性が良いことが知られている。そして昨今、不妊治療の現場において、女性の卵巣予備能の指標として注目を浴びている AMH は、胞状卵胞の顆粒膜細胞から分泌され、月経周期や変動が少ない指標である。これら卵巣予備能の指標の中で、卵巣内の残存原始卵胞数の変化が、卵胞の発育過程の最初の段階の変化を捉えることになり、卵巣予備能維持のためには、いかに休眠状態の原始卵胞を消耗させずに維持するかということが重要であると言える[15]。しかしながら、临床上は、残存原始卵胞数を測定することは困難であるため、簡便かつ測定可能である FSH、AFC、AMH が用いられることが一般的である。

3) 原始卵胞の活性化経路

原始卵胞から一次卵胞になると、卵母細胞を取り囲む上皮細胞が立方状の顆粒膜細胞に分化し、このときに FSH レセプターを発達させるため、一次卵胞以降の卵胞発育は主に FSH 依存性であるが、原始卵胞の活性化は FSH の直接的な関与を受けず、他の制御機構が関与している[16]。

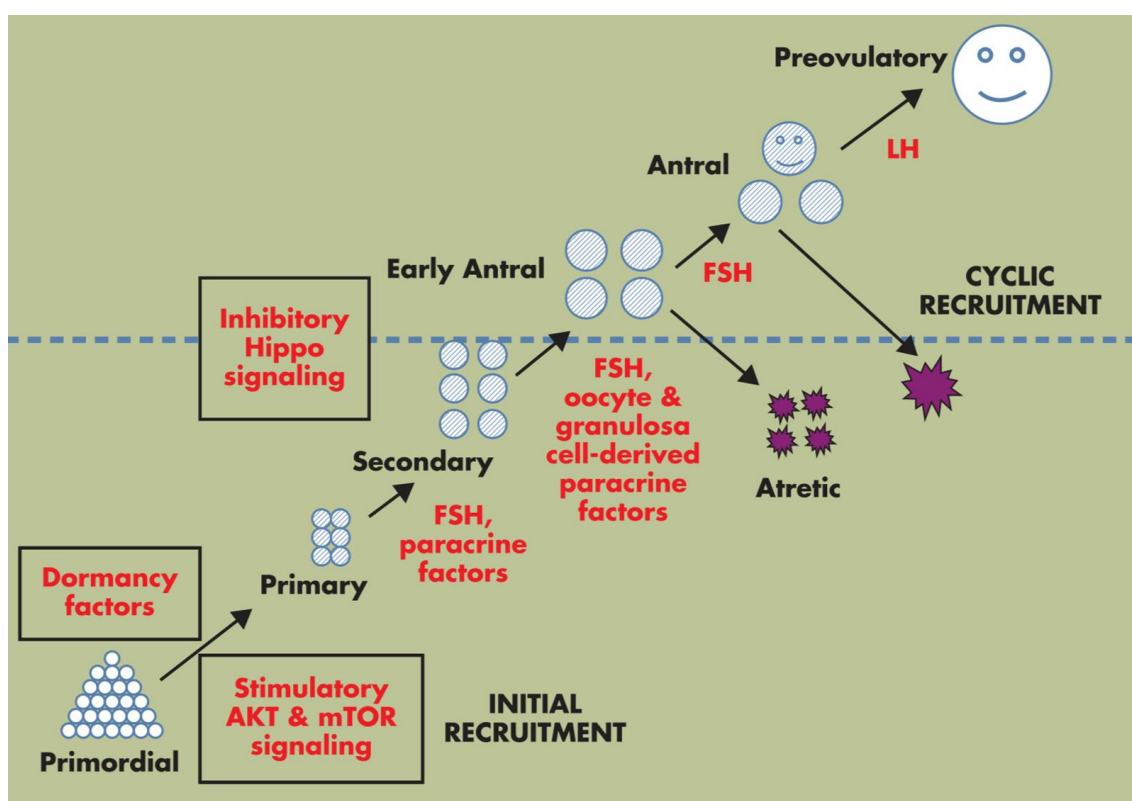


図3 卵胞発育の制御 (文献16より引用)

一次卵胞以降の卵胞発育は主に FSH 依存性であるが、原始卵胞の活性化は FSH の直接的な関与を受けず、他の制御機構が関与している。

前述したように、原始卵胞のほとんどは休眠状態で存在しており、性成熟期になると、その休眠状態の原始卵胞のストックの中から選択的な卵胞の活性化が起こり、卵巣機能をコントロールしているが、近年の報告によると、その原始卵胞の休眠状態の維持に、いくつかの制御機構が関与していることが分かってきた。その中でも、Akt 経路と Hippo 経路の 2 つが主に関与していることが報告されている[17]。

原始卵胞の核内に存在する forkheadboxO3 (FOXO3)は、原始卵胞の休眠状態を維持する働きをもつ転写因子である。図 4 に示すように、原始卵胞は成長因子などの Kit ligand の刺激により、Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)経路が活性化される。PI3K により、通常は phosphatase and tensin homolog (PTEN) により制御されている phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate(PIP2) を phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate(PIP3)へ変換する。さらに、PIP3 が phosphatidylinositol dependent kinase 1(PDK1)を介して、Akt をリン酸化し、リン酸化された Akt は原始卵胞の核内へ移動し、FOXO3 をリン酸化する。リン酸化された FOXO3 は、核外へ出ることで休眠状態の原始卵胞は活性化され卵胞の発育が始まる[18-20]。

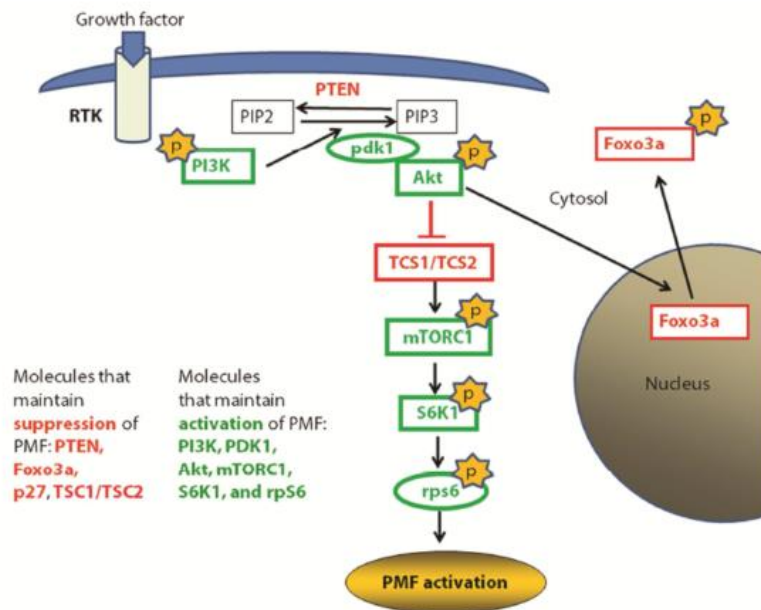


図4 原始卵胞内の活性化を制御する PI3K/PTEN/Akt 経路
(文献 33 より引用)

原始卵胞の休眠状態を維持しているのは、FOXO3 である。PI3K により、PIP2 が PIP3 へ変換され、Akt がリン酸化され核内の FOXO3 をリン酸化する。原始卵胞核内にある FOXO3 がリン酸化され核外へ出ると卵胞の活性化が始まる。

また、マウスの実験においても、FOXO3 のノックアウトマウスでは、休眠状態の原始卵胞が活性化され[21]、マウスの原始卵胞の核内に FOXO3 を保つことにより、卵胞の異常活性化を防ぎ卵巣機能の温存につながる可能性が示唆されている[22, 23]。これらのことを考慮すると、原始卵胞の休眠状態を維持しているのは、FOXO3 がリン酸化されずに核内に維持されていることであると言い換えることができる。

さらに近年、婦人科疾患領域においても卵胞の活性化の機序が徐々に明らかとなってきた。40歳未満の女性で卵巣性無月経を呈する早発卵巣不全（premature ovarian failure: POF）は、卵巣内に発育した卵胞が認められず、卵巣機能はほぼなく排卵が起こらない疾患である。POFと同様の現象は加齢による閉経期前後の女性でも起こるが、その原因は、卵巣内の残存原始卵胞数の急激な減少によると考えられている。POFでは、休眠状態にある原始卵胞がなんらかの影響で異常に活性化され、卵胞の発育が促進されることにより残存原始卵胞数が閉経期レベルまで減少し、原始卵胞の枯渇化が通常よりも早く起こってしまうことが示唆されている[24, 25]。POFの患者の不妊治療はこれまでは、卵子提供による出産しか可能性がなかったが、河村らは卵子の活性化経路の1つであるPI3K-Akt-FOXO3経路が関与している可能性を検証し、POF患者の卵巣から休眠状態の残存原始卵胞を採取し、体外にてPI3K-Akt-FOXO3経路による活性化を起こし、卵胞発育させたのち、体外受精-胚移植（in vitro fertilization and embryo transfer: IVF-ET）を行うことによって生児をうることに成功した[19]。

また、前述の PI3K-Akt-FOXO3 経路による制御機構に加えて、AMH が原始卵胞の休眠状態を維持するのに関与している[26]という報告がある。AMH は原始卵胞の休眠状態を保つ働きをしており、原始卵胞の枯渇化に伴い、発育卵胞が減少し、AMH を放出するような胞状卵胞が減少し、そのことによりさらに原始卵胞の異常活性化が促進されているのではないかと考えられている。

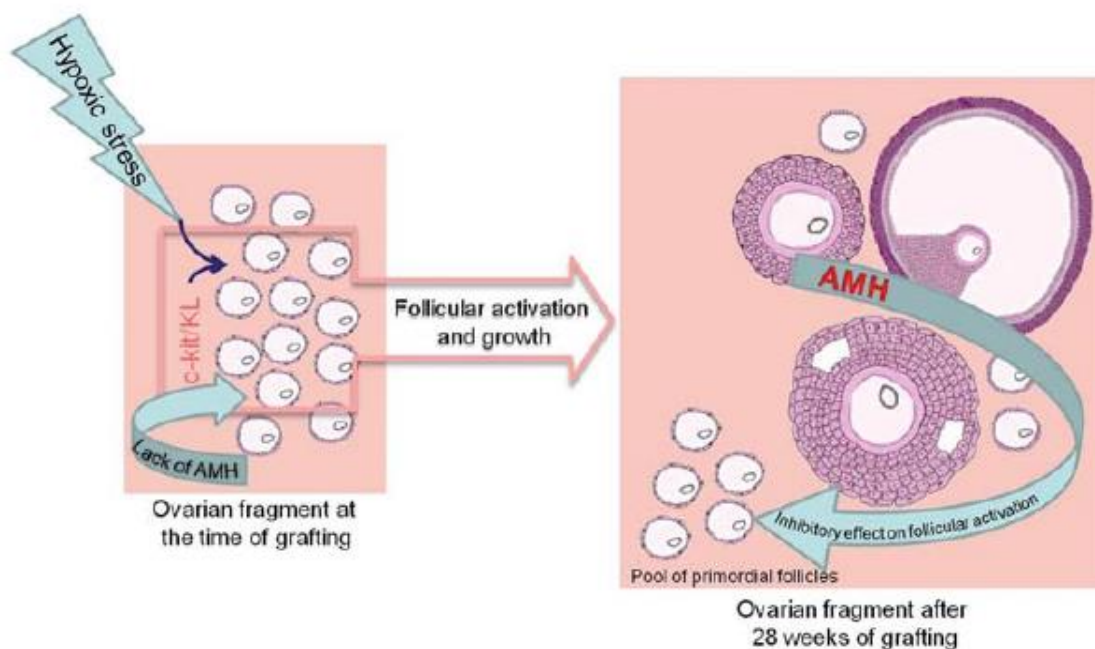


図5 原始卵胞の制御機構 (文献 26 より引用)

C-kit を介する細胞内活性化経路に加えて、AMH が原始卵胞の休眠状態を制御しており、AMH の低下によるさらに原始卵胞の異常活性化が促進される。

4) 子宮内膜症と卵巣予備能

子宮内膜症は前述したように不妊症の原因となるが、その機序として卵管癒着、卵巣機能低下、着床障害があげられている[27]。この機序の中で、卵巣予備能の低下は、近年の生殖補助医療をもっても克服しえない困難な課題である[28]。近年の研究では、Emcyst 罹患者の AMH は他の卵巣良性腫瘍罹患者や健常者と比較しても有意に低く[29, 30]、Emcyst の存在がないような軽度の子宮内膜症患者でも AMH が低下することが報告されている[30]など、子宮内膜症の存在そのものによる卵巣予備能への負の影響が明らかとなっている。これらの子宮内膜症による卵巣予備能の低下の原因としては、Emcyst のある卵巣では、正常卵巣に比して卵胞の密度が低く卵巣の皮質には線維化が進んでいることが[31]明らかとなっており、局所での炎症や線維化の影響が関与している可能性が示唆されるが、詳細は明らかとはなっていない。

さらに、卵巣予備能の中でも子宮内膜症による原始卵胞への影響も徐々に明らかとなってきている。北島ら[32]によると、Emcyst に罹患している卵巣では、正常卵巣に比して閉鎖卵胞数が増加していることに加えて、原始卵胞の割合が減少し、一次卵胞や二次卵胞の割合が増加しており、いわゆる原始卵胞の異常活性化が起こっている可能性が示唆されている。また、その原因として、閉鎖卵胞の増加と、原始卵胞の異常活性化に伴って、AMH を出すような胞状卵胞が減少

することにより、AMH がコントロールしている原始卵胞の休眠状態シグナル刺激がはずれ、より原始卵胞の枯渇化が進んでいる可能性が示唆されている[32]。しかしながら、原始卵胞の活性化の詳細なメカニズムにまで検討を行った報告はない。

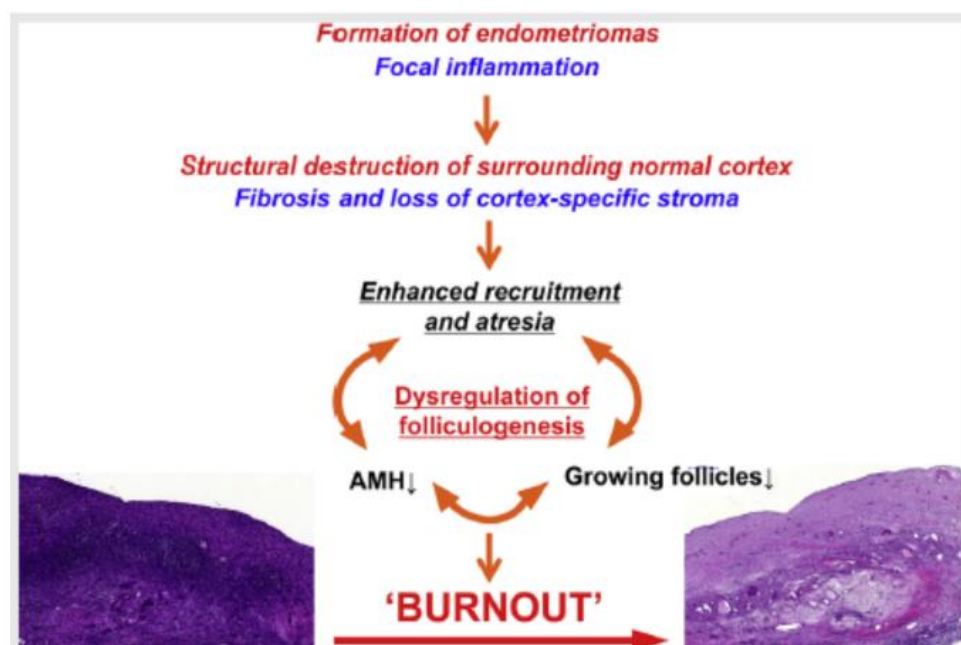


図6 子宮内膜症による卵巣予備能の低下（文献32より引用）

子宮内膜症による卵巣局所の炎症が卵巣の線維化を引き起こし、それにより原始卵胞の異常活性化が起こり、発育卵胞が減り、AMHが低下することにより卵胞の枯渇化を促進している可能性がある。

5) 化学療法と卵巣機能

卵巣機能低下を起こす医原性の疾患として、化学療法施行後があげられる。若年女性の癌患者にとって、化学療法による早発閉経や不妊は重大な副作用となる。特にアルキル化剤であるシクロフォスファミド (Cyclophosphamide: CY) などは卵巣毒性が強く、DNA 変異や細胞分裂阻害を引き起こし、卵巣機能低下を招くことが知られている。近年、その卵巣機能低下に関して、DNA 損傷などによる細胞死だけではなく、休眠状態の原始卵胞の異常活性化が関わっていることが明らかとなってきた。Kalich-Philosoph らは CY 投与後に休眠状態であったマウスの原始卵胞が、PI3K/Akt のリン酸化経路により FOXO3 を介して異常活性化されることを示した[33]。CY 投与により、原始卵胞の卵母細胞および前顆粒膜細胞に直接作用して、PI3K/Akt のリン酸化経路により FOXO3 を介して休眠状態の原始卵胞を活性化させ、原始卵胞の異常活性化を促進することにより卵巣機能が低下することが示された (図 4)。

さらに、Kaelechman らによると、免疫調整因子である AS101 [ammonium trichloro(dioxoethylene-o,o')tellurate] を CY と併用してマウスに投与することにより、上述の卵巣機能低下が可逆的に改善することが示され、その詳細なメカニズムとして AS101 が PI3K/Akt 経路を阻害した可能性があることを示唆している[34] (図 7)。

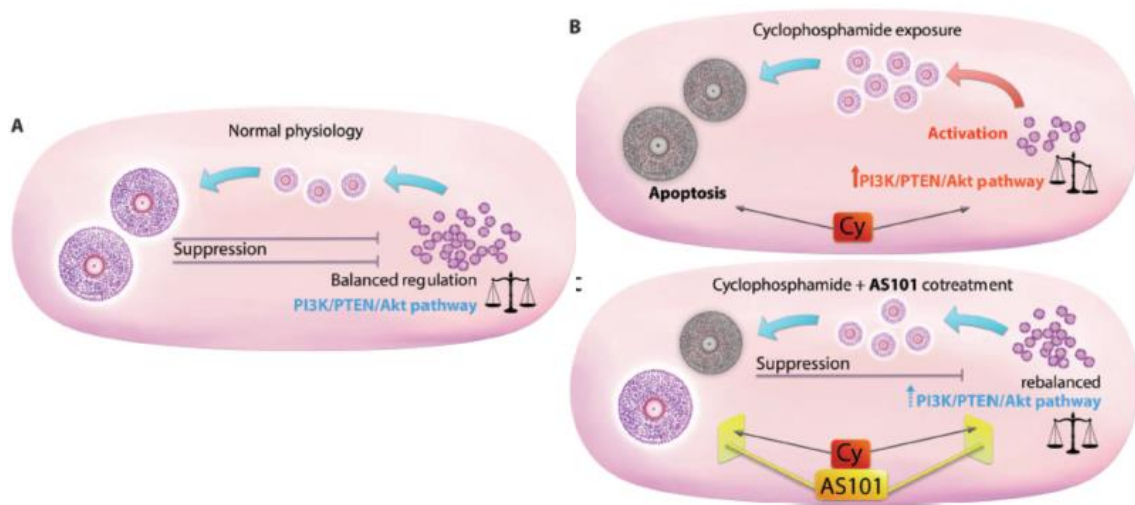


図7 CY投与と原始卵胞の異常活性化（文献34より引用）

CY投与後に休眠状態であったマウスの原始卵胞が、PI3K/Aktのリン酸化経路によりFOXO3を介して異常活性化される。免疫調整因子であるAS101をCYと併用すると、卵巣機能低下が可逆的に改善する。

AS101は小さな有機物であり、生物活性として抗炎症作用や抗ウイルス作用、化学療法による卵巣毒性を防ぐ役割などが報告されている[35-40]。その機序としては、システインの代謝産物と特異的な化学結合を起こし、その化学結合体が標的蛋白の構造変化を起こすことが考えられている[41]。AS101は癌患者においては、化学療法の神経毒性に加えて、卵巣への細胞毒性、放射線のダメージを防いでくれる免疫制御因子として機能しており、その機序として、AS101がインテグリンを介してPI3Kを阻害しその下流のpAktを阻害することが考えられている[42]。このように、AS101は化学療法による卵巣機能低下に対して、卵巣

凍結などの生殖補助医療には頼らない新しい機能温存の可能性について期待されている分子である。

以上から、子宮内膜症における卵巣予備能の低下は、原始卵胞の異常活性化による可能性が検討されているが、その機序について、卵胞の活性化経路に関して検討したものはない。今回、その機序として化学療法による卵巣機能低下と同様の働きの関与と AS101 による治療効果が可能性として考えられ、その検証とともに子宮内膜症における卵巣予備能低下に対する新しい治療戦略を探るべく以下の研究を計画した。

本研究の目的

子宮内膜症における卵巣機能への影響を、卵巣予備能とくに原始卵胞の活性化経路に着目して検証を行うことを目的とする。

- ① 子宮内膜症モデルマウスを用い、卵胞数の比較検討および、原始卵胞の異常活性化の可能性について検証する。
- ② 子宮内膜症モデルマウスとヒト卵巣検体を用い、原始卵胞の異常活性化に PI3K/Akt 経路が関与している可能性について検証する。
- ③ AS101 を子宮内膜症モデルマウスに投与することにより卵巣予備能低下が改善できるか検証する。

上記の①～③を通して、AS101 が子宮内膜症における卵巣予備能低下への新たな治療戦略となりうるかを検討する。

方法

1) 子宮内膜症モデルマウスを用いた卵胞の検討

① マウスの準備

子宮内膜症の発生が、子宮内膜細胞を含む月経血が経卵管的に腹腔内に逆流し、卵巣や腹膜に生着して病変を形成する[2]という病因説をもとに、レシピエントの腹腔内にドナーの細断した子宮を移植する方法による子宮内膜症モデルマウス[43, 44]を作成した。子宮内膜症モデルマウスでは、腹腔内に子宮内膜症病変ができるが、本研究においても病理組織学的に子宮内膜症病変が腹腔内に生着したことを確認のうえで、マウス卵巣の評価を行った。日本 SLC より、購入した 5 週齢の BALB/c 雌マウスを用い、子宮を摘出するドナーマウスとして 2 匹、摘出した子宮を細断して腹腔内に注入するレシピエントマウスとして 4 匹、計 6 匹を 1 群として使用し、2 回繰り返し実験を行った。すべてのマウスは、搬入時より卵巣摘出までエストラジオール 100 μ g/kg（あすか製薬）を 1 週間おきに皮下投与した。初回のエストラジオール投与後 1 週間でドナーマウスの子宮を摘出し、細断して PBS 0.6ml で懸濁したものをレシピエントの腹腔内に注入した。移植後 2 週間でレシピエントを sacrifice し、腹腔内の内膜症病変を回収、卵巣の摘出を行った（Em 群）（図 8）。

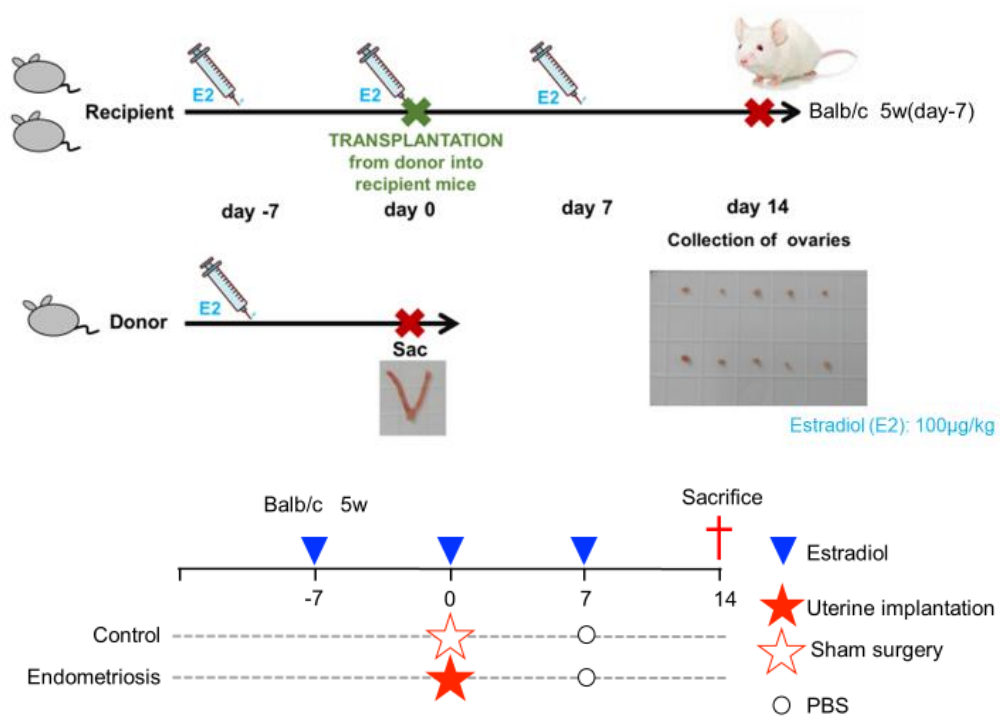


図8 子宮内膜症モデルマウス

ドナーの細断した子宮を腹腔内に移植し、子宮内膜症モデルマウスを作成した。移植後2週間で卵巣を摘出した。

また、卵巣機能低下モデルマウスとして、[33]をもとに、CY（東京化学工業）を腹腔内に投与してモデルマウスを作成した。sacrifice の1週間前に75 mg/kgのCYを1回投与し、卵巣を摘出した（Cy群）（図9）。

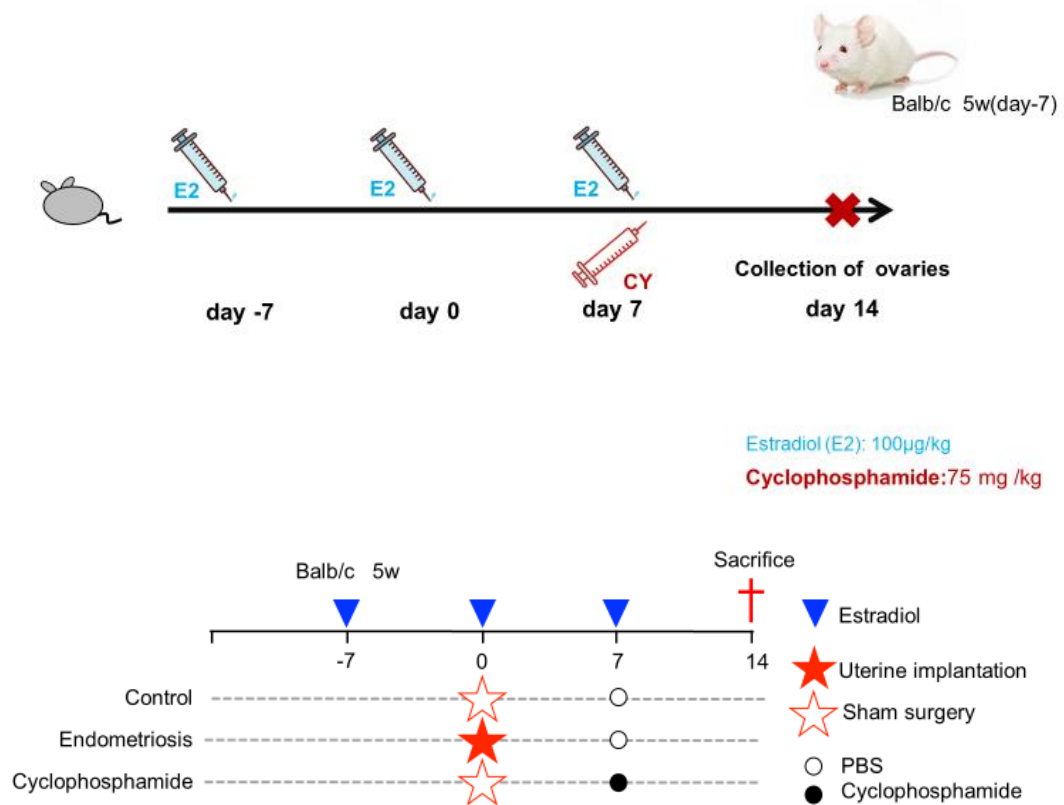


図9 卵巣機能低下モデルマウス

CYを腹腔内に投与することで卵巣機能低下モデルマウスを作成した。卵巣摘出1週間前にCYを腹腔内に投与した。

これらのEm群、およびCy群に対して、コントロール群として、PBSを腹腔内に投与したマウスを作成し（Ct群）、Ct群とEm群、Cy群での比較検討を行った。

全ての実験は、東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を得た動物実験計画をもとに行った（承認番号：医-P15-127）。

② マウス卵胞数のカウント評価

摘出したマウス卵巣は大きさと重さを測定し、片側をブアン液に 24 時間保管した。その後 70%アルコールにて脱水後にパラフィン固定し、長軸方向となるように包埋しブロック化したのち、卵巣半分を 20 μ m の連続切片を作成し、卵胞数をカウントした。ブロックの残りは後述の免疫染色に利用するため、カウントした卵胞数を 4 倍して摘出卵巣全体の卵胞数を推定した (図 10)。

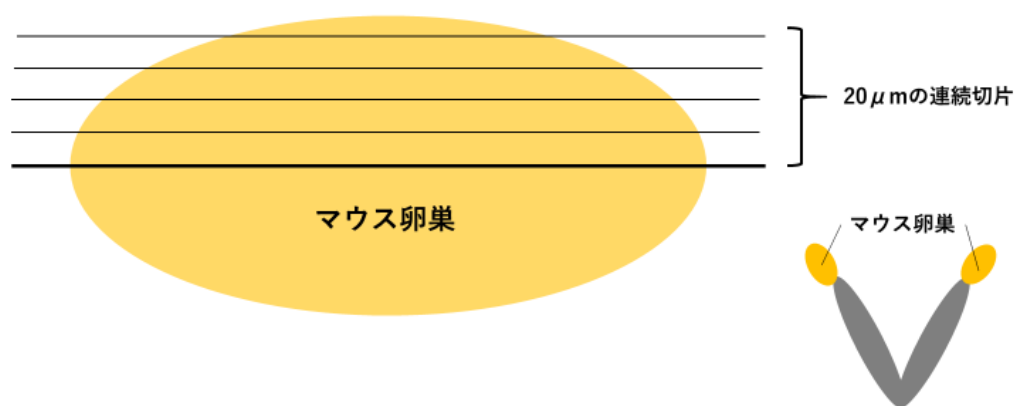


図 10 マウス卵巣の固定法

摘出した卵巣は、長軸方向となるように包埋し、20 μ mの連続切片を作成し、卵胞数をカウントしたのち、4 倍して摘出卵巣全体の卵胞数を推定した。

上述のように作成した切片をヘマトキシリンエオジン染色 (HE 染色) し、光学顕微鏡下にて観察を行った。卵胞は、Myers らの報告[45]をもとに原始卵胞 (Primordial)、一次卵胞(Primary)、二次卵胞(Secondary)、胞状卵胞(Antral)、成長卵

胞(Growing)へ形態学的に分類し、それぞれの数をカウントした。Primordial は、扁平な 1 層の前顆粒膜細胞に囲まれた卵子であり、Primary は、1 層の立方状の顆粒膜細胞に囲まれた卵子、Secondary は、2 層以上の立方状の顆粒膜細胞に囲まれ、胞状空を持たない卵子、Antral は、胞状空をもつ卵子、Cumulus 顆粒膜細胞を持つものを Growing と形態学的に分類した (図 11)。

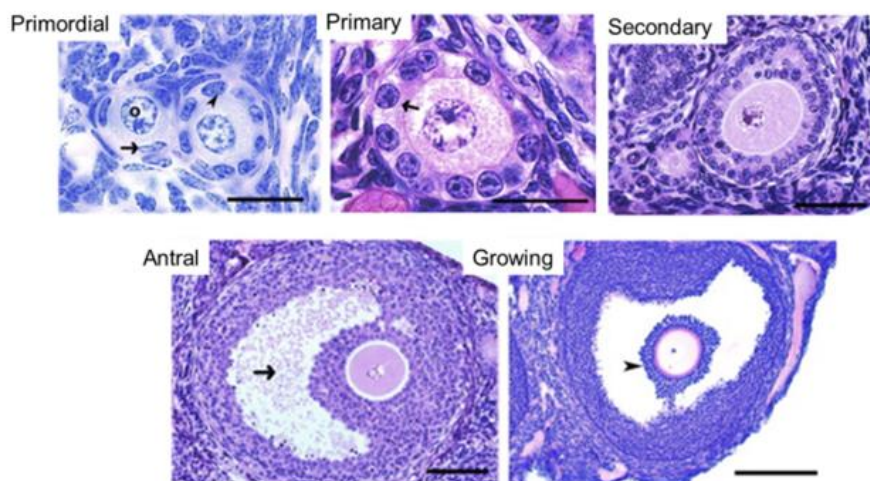


図 11 卵胞の形態学的分類 (文献 45 より引用)

Primordial は、扁平な 1 層の前顆粒膜細胞に囲まれている。Primary は、1 層の立方状の顆粒膜細胞に囲まれている。Secondary は、2 層以上の立方状の顆粒膜細胞に囲まれ、胞状空を持たない。Antral は、胞状空をもつ。Cumulus 顆粒膜細胞を持つものを Growing と形態学的に分類した。

また、各卵胞は大きさが異なることが知られており、原始卵胞は約 12-16 μm なので、全ての切片でカウントを行い、一次卵胞は約 20-60 μm なので、平均 40 μm と仮定して 2 枚毎の切片でカウントを行い、二次卵胞は、60-100 μm なので、

平均 80 μm と仮定して 3 枚毎の切片でカウントを行い、胞状卵胞は 100 μm 程度、成長卵胞も 100 μm 以上であるため、5 枚毎の切片でカウントを行った（図 12）。それらのカウントした卵胞数を 4 倍して摘出卵巣全体の卵胞数を推定した。

カウントは実験者が 2 回、実験助手が 1 回の合計 3 回行い、その平均を算出した。

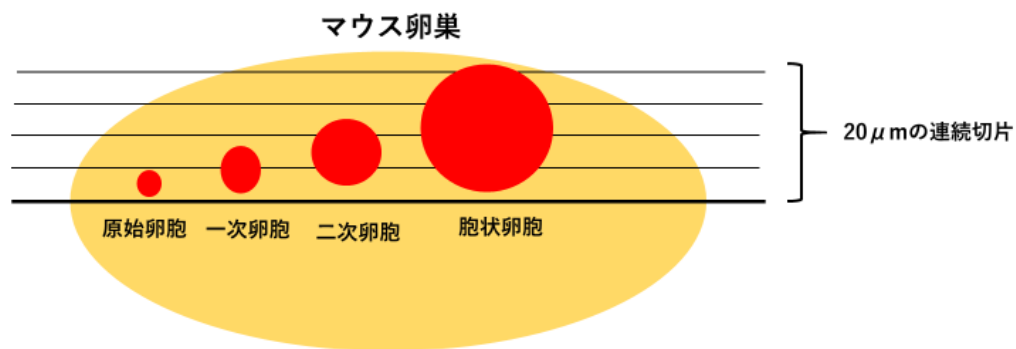


図 12 卵胞数のカウント法

各卵胞は大きさが違うので、一次卵胞は 2 枚毎、二次卵胞は 3 枚毎、胞状卵胞と成長卵胞は 5 枚毎の切片でカウントを行った。

2) ヒト卵巣検体

子宮内膜症性卵巣嚢胞にて腹腔鏡手術を行った患者 17 人より摘出した卵巣検体を用いた。コントロールとして、年齢の適合した卵巣転移のない子宮頸癌にて卵巣摘出を行った患者 20 人より摘出した卵巣検体を用いた。子宮内膜症の年齢は、 35.9 ± 0.99 (平均 \pm 標準偏差) 歳で、コントロールは 35.9 ± 0.99 歳で 2 群に有意差は認めなかった。

摘出した卵巣検体は、ブアン液にて 24 時間固定後、70%アルコールにて脱水し、それをパラフィン固定したうえで、 $5\mu\text{m}$ ごとの切片を作成し、HE 染色および免疫組織学的染色を行った。

これらのヒト検体の実験は、東京大学の倫理規定に基づき、承認された実験計画により患者からの同意を得たうえで行った (倫理番号 : 0324-4)。

3) 免疫組織学的染色

PI3K/Akt 経路を介した FOXO3 の key 蛋白の中から、原始卵胞の核内に存在する FOXO3 と pAkt について着目した。前述したように FOXO3 は pAkt を介したリン酸化により卵子細胞の核外に放出されることにより、休眠状態の原始卵胞の活性化が始まることがわかっている[21]。今回それらの FOXO3 と pAkt について免疫組織学的染色を行い、各群間での比較検討を行った (図 3)。

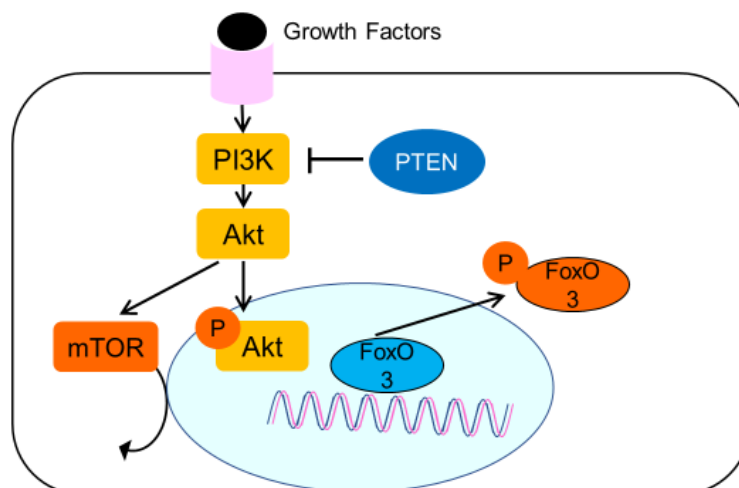


図 13 原始卵胞における PI3K/Akt 経路

PI3K/Akt 経路を介した FOXO3 のリン酸化により原始卵胞が活性化される。原始卵胞の核内に存在する、pAkt と FOXO3 の免疫組織学的染色を行った。

抗体は以下のものを使用した。monoclonal rabbit Foxo3a antibody (12829) を 500 倍, monoclonal rabbit p-Akt antibody (4060) を 100 倍 希釈で使用した (抗体は全て Cell Signaling Technology より購入)。

各スライドは、脱パラフィン後、抗原賦活化処理を行い、その後に 0.3% H₂O₂にて内因性のペルオキシダーゼを除去した。さらに、ブロッキングしたのち上記の抗体を 4℃で一晩静置後、DAB で染色し、ヘマトキシリンにて核の二重染色を行った。Negative control については、non-immune IgG をそれぞれの一次抗体の代わりに使用した。

4) AMH の測定

卵巣摘出時にマウスの血液を採取し、1000 x g 15 分で遠心し血漿を回収した。回収した血漿は測定まで-80℃で保存し、Mouse anti-mullerian hormone ELISA kit (CUSABIO)を用いて AMH を測定した。

5) AS101 の投与実験

Kaelechman ら[34]によると、AS101 は、化学療法施行時の原始卵胞異常活性化を防ぎ、卵巣機能を改善させた PI3K/Akt 阻害薬の 1 つである。そこで、我々は AS101 を Sigma Aldrich より購入し、マウスへの投与実験を行なった。

移植の 1 週間前より sacrifice まで、1 日おきに AS101 10 μ g/匹を腹腔内投与

し、卵巣を摘出し前述のように各群間にて、卵胞数の比較検討を行った(図 14)。

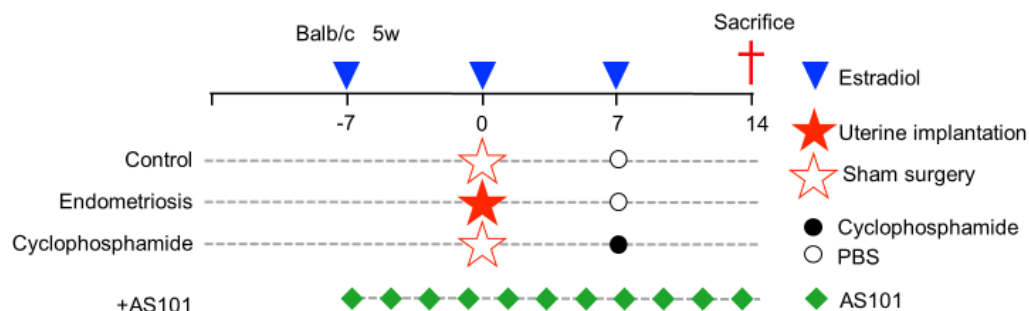


図 14 AS101 の投与実験

各群に、AS101 を移植 7 日前より隔日腹腔内投与を行った。

6) 統計学的分析

統計学的分析は、Jmp software (version 11.0, SAS Institute Inc. Cary, NC)によって行った。2 群間の分析は、Mann-Whitney U 検定を行い P 値<0.05 を有意差ありとした。また、3 群間の比較には ANOVA 検定を用い、さらに Steel-Dwass 検定を用い、各群の比較を行い、P 値 < 0.05 を有意差ありとした。各数値は、平均±標準偏差である。

結果

1) 子宮内膜症モデルマウスにおける卵胞数の比較

① 子宮内膜症モデルマウスにおける子宮内膜症病変について

子宮内膜症モデルマウスにおいて、腹腔内に子宮内膜症病変が生着することを確認した。子宮内膜症病変は主に腸管膜に生着していた（図 15）。

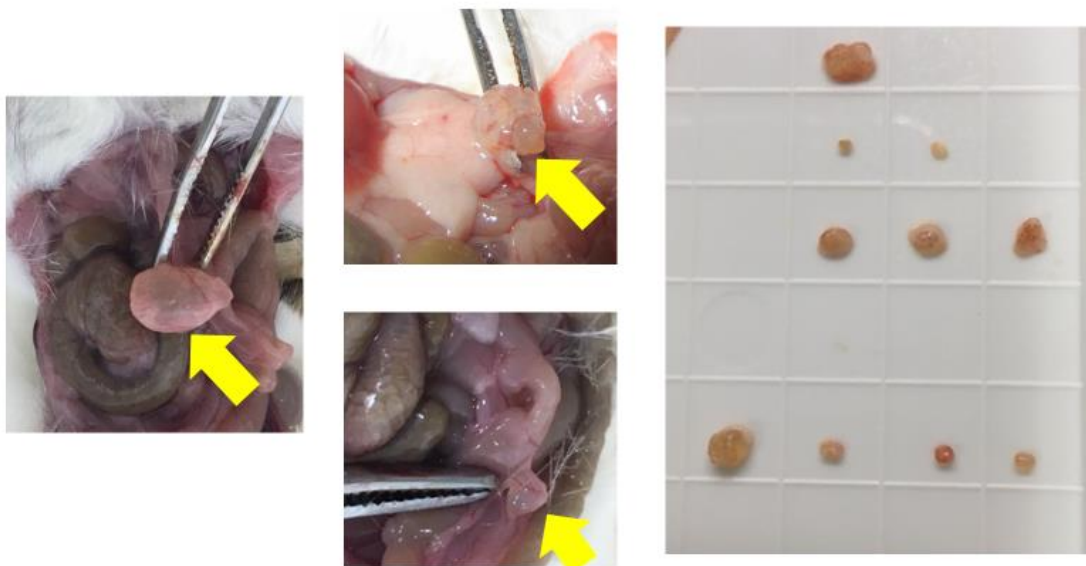


図 15 マウスの子宮内膜症病変（マクロ像）

腹腔内に嚢胞状の子宮内膜症病変が生着することを確認した。子宮内膜症病変は主に腸管膜に生着していた。

また、病変を H-E 染色することにより、子宮内膜症の特徴である、子宮内膜症上皮細胞と間質細胞を確認した（図 16）。

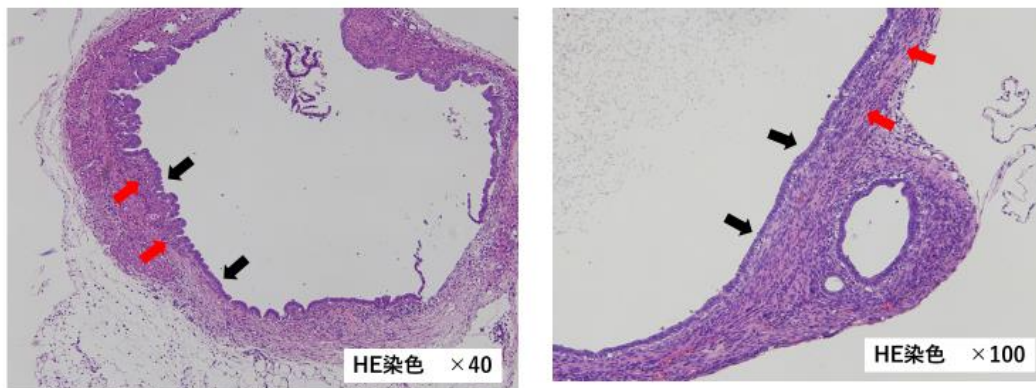


図 16 マウスの子宮内膜症病変（ミクロ像）

病理学的に、子宮内膜症の特徴である子宮内膜症上皮細胞(黒↑)と間質細胞(赤↑)を確認できた。

② 子宮内膜症モデルマウスの卵胞数の比較について

摘出した卵巣に関して、卵巣の長径と重量について各群で比較を行ったところ、Em 群の卵巣の長径は、 $3.4 \pm 0.29\text{mm}$ で、 Ct 群の $3.7 \pm 0.27\text{mm}$ および Cy 群の $3.7 \pm 0.27\text{mm}$ と比較して有意差は認めなかった。また、卵巣の重量についても、Em 群は $24.5 \pm 4.11\text{mg}$ で Ct 群の $14.5 \pm 4.11\text{mg}$ 、Cy 群の $13.1 \pm 3.87\text{mg}$ と比較して有意差は認めなかった（図 17）。

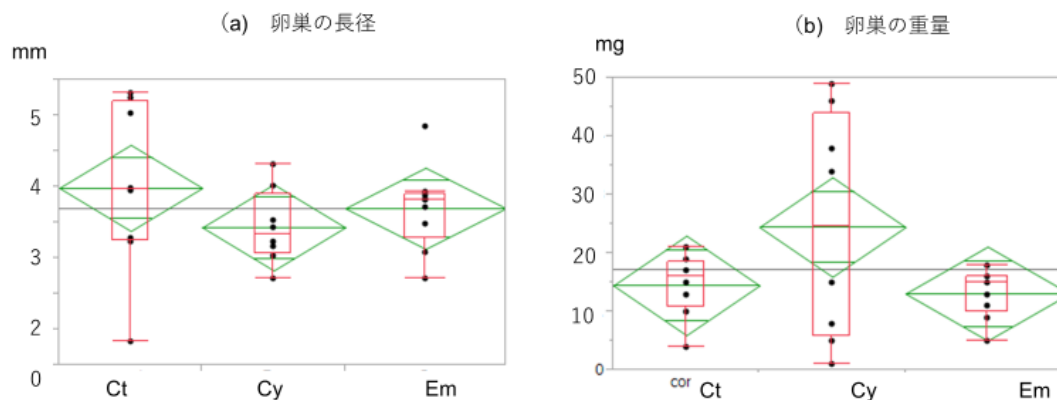


図 17 各群間の卵巣の長径と重量の比較

Em 群の卵巣長径は、Ct 群および Cy 群と比較して有意差は認めなかった。また、卵巣の重量についても、Em 群、Ct 群、Cy 群では、有意差は認めなかった。

卵胞数に関する結果では、全卵胞数は Em 群で 1242 ± 116.9 個と Ct 群の 1496 ± 112.9 個に比して有意差はないものの減少傾向にあった。一方で、Cy 群では 1046 ± 109.4 個と Ct 群に比して有意に減少していた。また、原始卵胞数は、Em 群で 704 ± 70.1 個、Cy 群で 472 ± 48.9 個、Ct 群で 1103 ± 100.3 個と Em 群および Cy 群ともに Ct 群より有意に減少していた。さらに、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞、成長卵胞の個数は、Em 群 (224 ± 31.2 個、 157.5 ± 22.4 個、 142.5 ± 8.6 個、 14.0 ± 2.5 個)、Cy 群 (226 ± 35.9 個、 180.5 ± 22.3 個、 155 ± 12.4 個、 12.5 ± 2.3 個) と Ct 群 (184 ± 12.5 個、 99.5 ± 10.6 個、 103.5 ± 10.8 個、 6.52 ± 2.26 個) と比べてそれぞれ増加傾向にあった (図 18)。

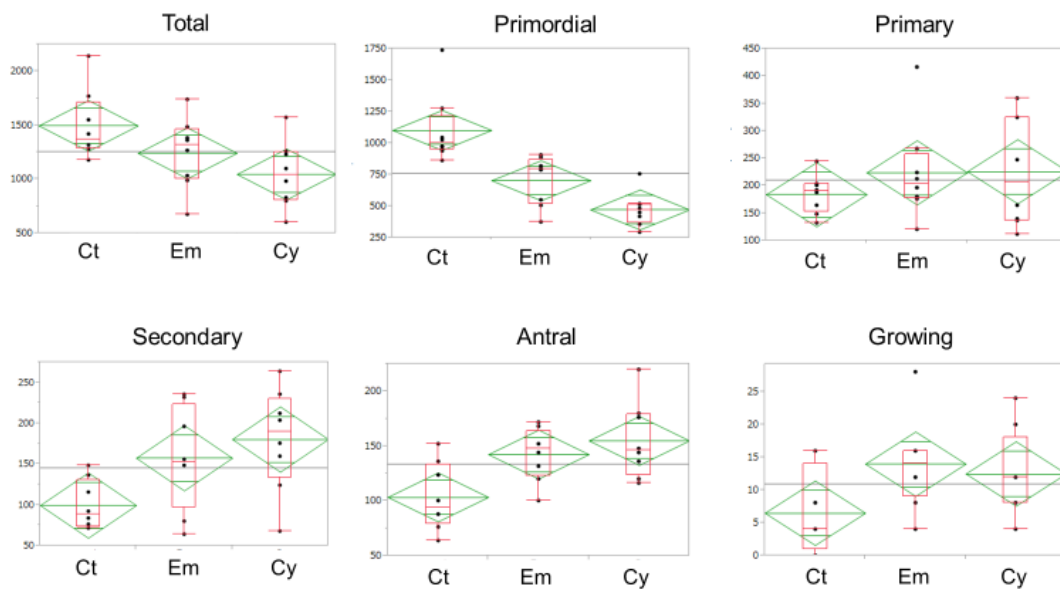
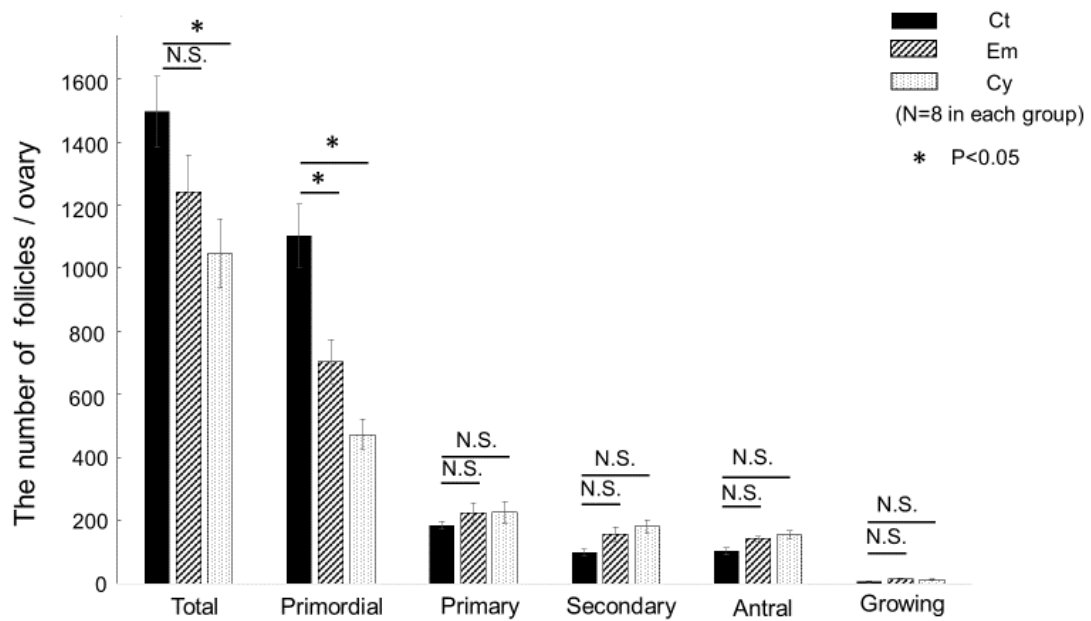


図 18 子宮内膜症モデルマウスの卵胞数

Em 群では、全体の卵胞数は Ct 群に比して減少傾向にあったが、有意差は認めなかった。一方、原始卵胞の数は Ct 群に比して有意に減少していた。

次に、各卵胞の割合についての比較では、Em 群および Cy 群における原始卵胞の割合は、それぞれ $56.5 \pm 1.6\%$ 、 $45.6 \pm 1.8\%$ と Ct 群の $73.3 \pm 1.6\%$ に比して有意に減少していた。さらに、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞の割合は、Em 群 (17.9 ± 1.2 , 12.4 ± 1.0 , $11.9 \pm 0.8\%$)、Cy 群 (20.8 ± 1.2 , 17.1 ± 1.0 , 15.3 ± 0.8) であり、Ct 群 (12.5 ± 0.8 , 6.7 ± 0.6 , $6.9 \pm 0.6\%$) に有意に増加していた。成長卵胞の割合は、Em 群 $1.2 \pm 0.2\%$ と Ct 群の $0.4 \pm 0.1\%$ に比して増えている傾向にあったが、有意差は認めなかった。一方で、Cy 群の成長卵胞の割合は $1.2 \pm 0.2\%$ と Ct 群に比して有意に増加していた (図 19)。

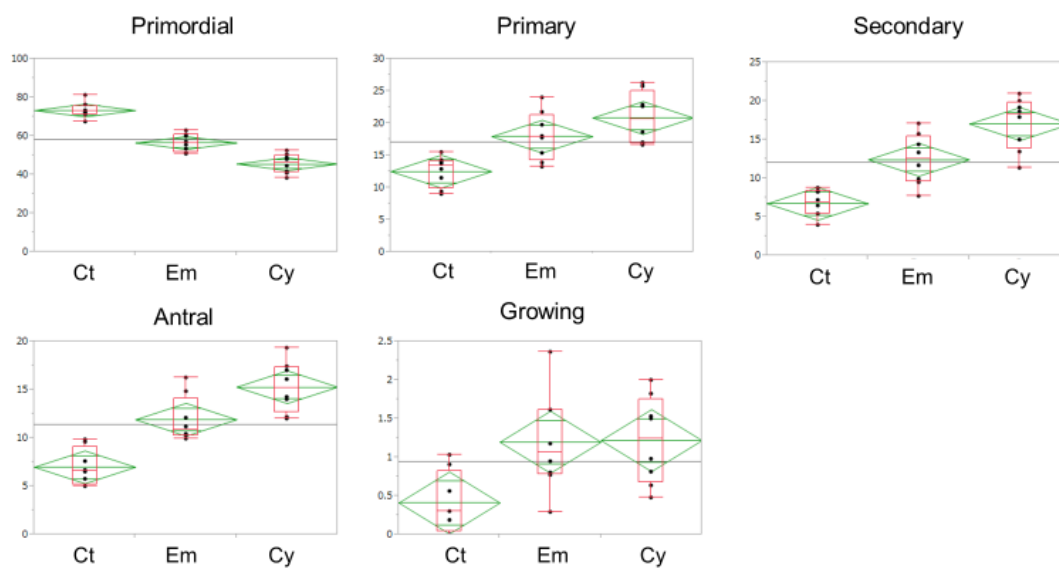
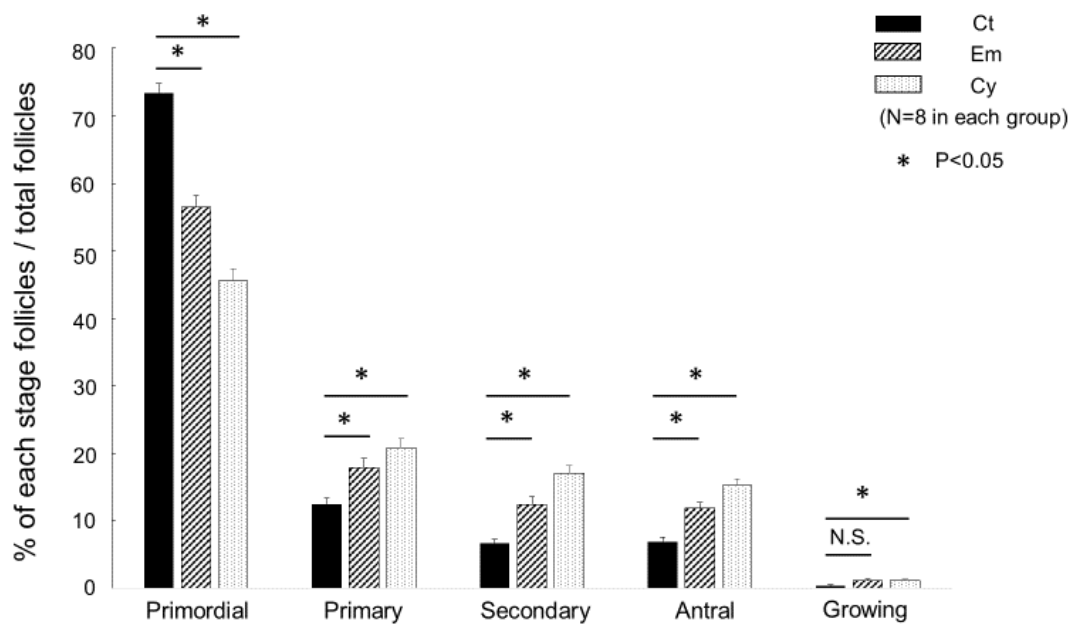


図 19 子宮内膜症モデルマウスの卵胞割合
Em 群では、**Ct** 群に比して、原始卵胞の割合が有意に減少していた。一方で、一卵胞、二次卵胞、胞状卵胞の割合は有意に増加していた。

次に、子宮内膜症病変と原始卵胞の数についての相関を確認したところ、子宮内膜症病変が重いほど、原始卵胞の数は減少しており、負の相関が認められた($P < 0.05$, $R^2 = 0.766$) (図 20)。

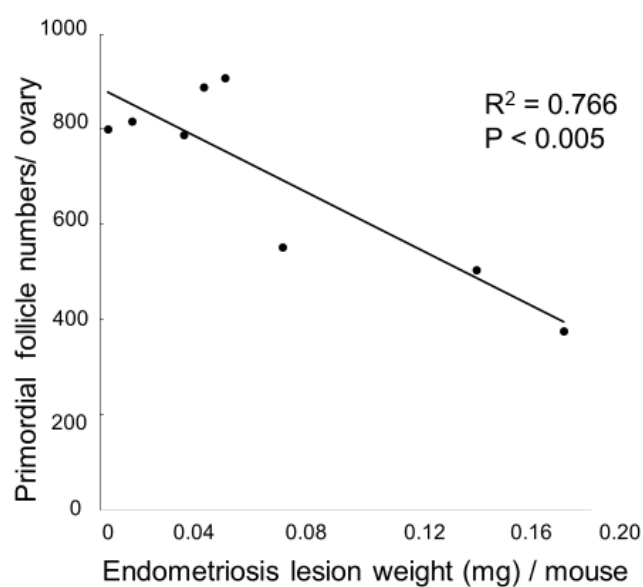


図 20 子宮内膜症病変と原始卵胞数の相関
子宮内膜症病変が重いほど、原始卵胞数は減少していた。

2) 免疫組織学的検討について

① マウス実験における免疫組織学的検討について

マウスの原始卵胞において FOXO3 と pAkt の代表的なマウス卵巣の顕微鏡写真を図 21 に示す。FOXO3 と pAkt は原始卵胞の核内に染色されていた。

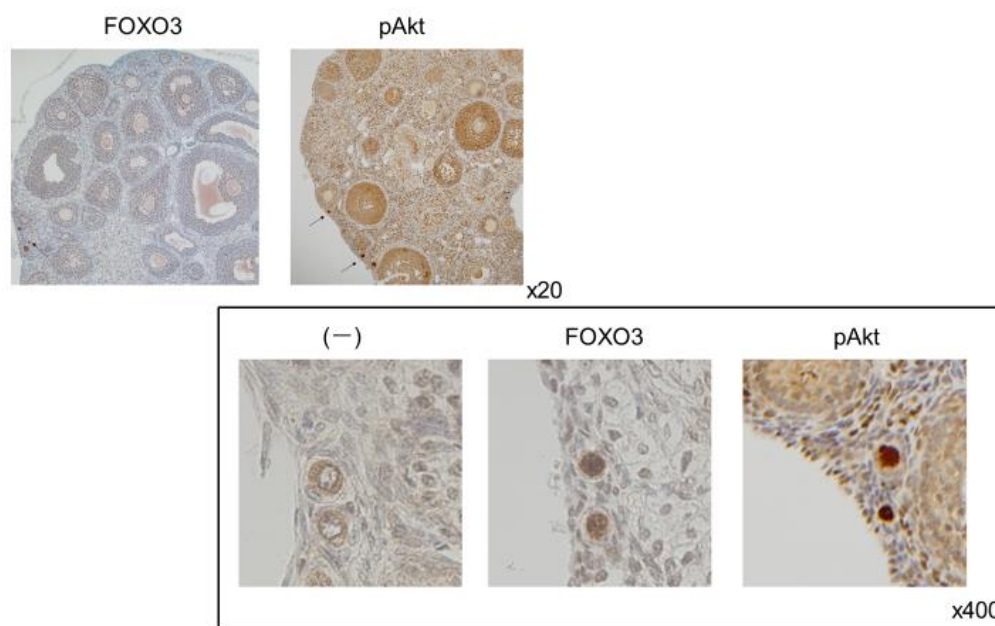


図 21 FOXO3 と pAkt の免疫組織学的写真
FOXO3 と pAkt は原始卵胞の核内に染色されていた。

FOXO3 陽性原始卵胞の割合は、Em 群で $37.2 \pm 19.5\%$ 、Cy 群で $21.0 \pm 0.1\%$ と、Ct 群の $69.3 \pm 5.7\%$ に比較して有意に低かった。一方で、pAkt 陽性割合は、Em 群で $35.2 \pm 22.2\%$ 、Cy 群で $35.7 \pm 0.1\%$ と、Ct 群の $32.1 \pm 15.6\%$ と比べて増加傾向にあったが、有意差は認めなかった (図 22)。

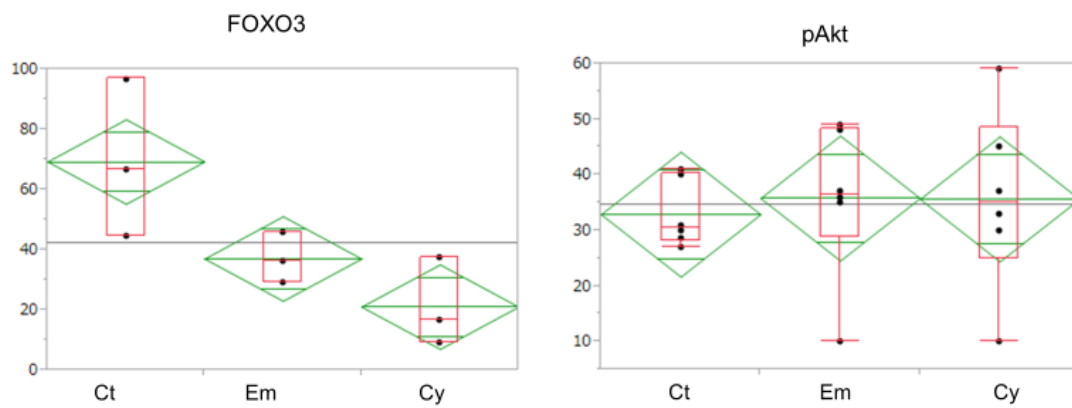
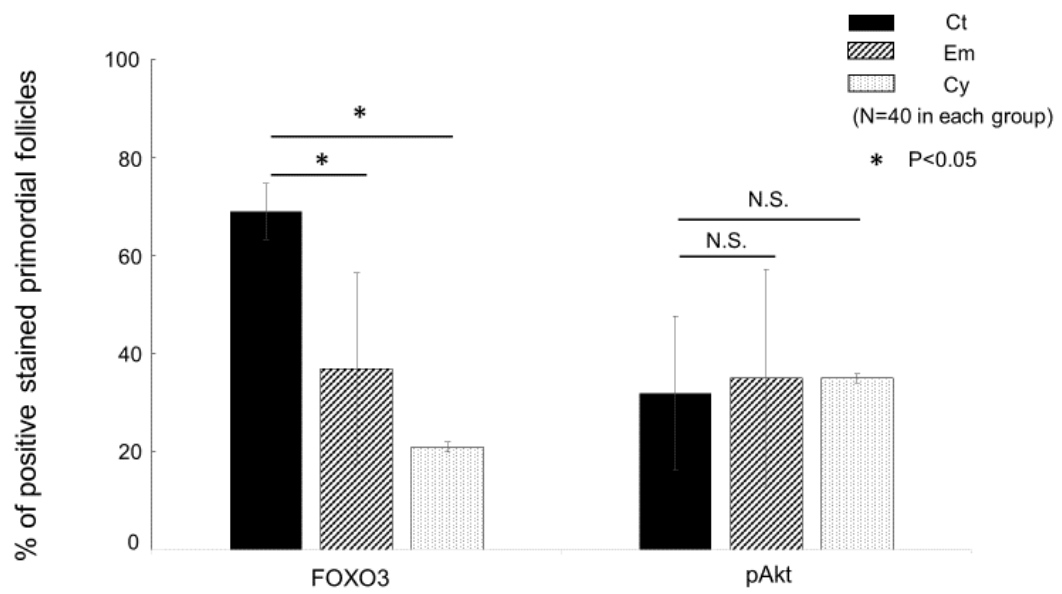


図 22 マウスにおける PI3K/AKT 経路免疫組織学的染色
Em 群では、Ct 群に比して FOXO3 陽性原始卵胞の割合が有意に減少していた。

② ヒト卵巣検体における免疫組織学的検討について

ヒト検体の原始卵胞の核内で PI3K/Akt 経路の key protein が染色されることを確認した (図 23)。また、HE 染色にて原始卵胞を確認し、その原始卵胞が FOXO3 と pAkt が陽性かどうかの判断を行った。原始卵胞のカウント数は、内膜症群で 78 個、コントロール群で 123 個であった。

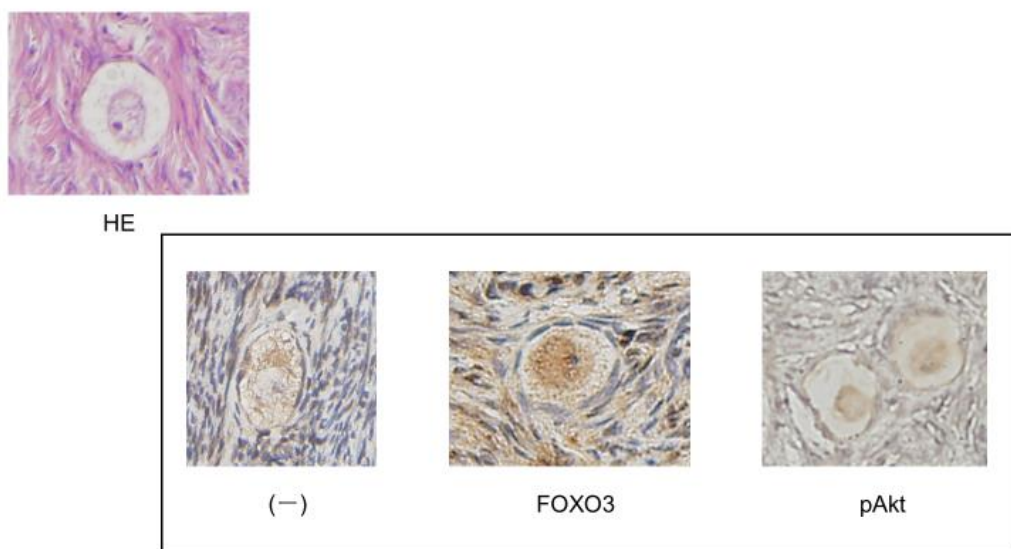


図 23 ヒト検体における原始卵胞の免疫組織学的染色
PI3K/AKT 経路の key protein である FOXO3、pAkt が原始卵胞の核内に染まっている。

FOXO3 陽性の原始卵胞の割合は、子宮内膜症罹患群で $14.9 \pm 5.1\%$ であり、非罹患群の $57.9 \pm 4.7\%$ に比して有意に少なかった。また、pAkt 陽性の原始卵胞の割合は、 $45.2 \pm 11.9\%$ であり、非罹患群の $47.3 \pm 6.7\%$ と比較して少ない傾向にあ

ったものの有意差は認めなかった (図 24)。

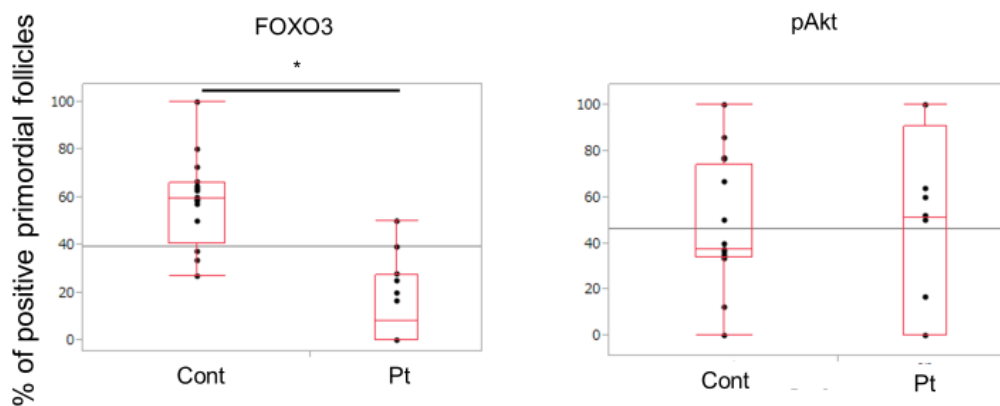


図 24 ヒトにおける PI3K/AKT 経路免疫組織学的染色
子宮内膜症罹患群では、コントロール群に比して FOXO3 陽性の原始卵胞数が有意に少なかった。

3) AMH 測定について

各群のマウスにおいて測定した AMH の値は、Em 群 8.28 ± 0.24 ng/ml、Cy 群 8.79 ± 0.75 ng/ml、Ct 群 8.34 ± 0.21 ng/ml と各群間で明らかな差は認めなかった (図 25)。

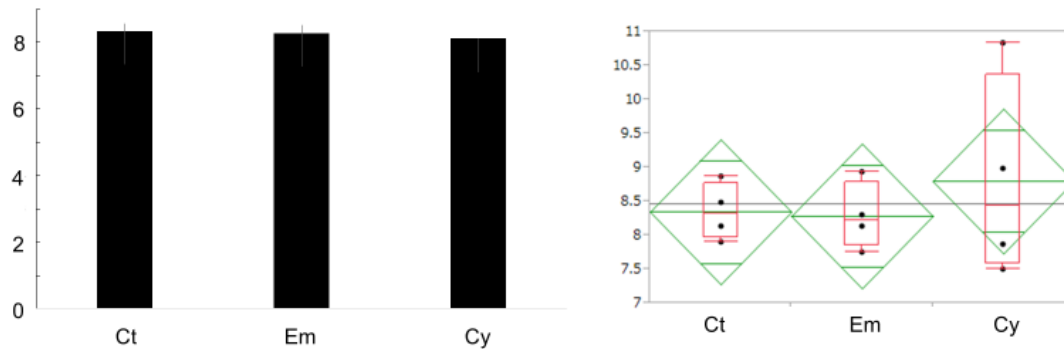


図 25 マウスにおける AMH 結果

各群のマウスにおいて測定したAMHの値は、Em群 8.28 ± 0.24 ng/ml、Cy群 8.79 ± 0.75 ng/ml、 Ct群 8.34 ± 0.21 ng/ml と各群間で明らかな差は認めなかった

4) AS101 の投与について

① 投与による卵胞数の変化について

AS101 を投与することにより、マウスの卵胞数の変化を検討したところ、Ct 群では AS101 の投与の有無で原始卵胞数の割合は $66.8 \pm 1.2\%$ から $60.4 \pm 3.6\%$ と変化しないのに対して、Em 群では、 $54.9 \pm 1.7\%$ から $61.1 \pm 1.2\%$ 、Cy 群では、 $41.7 \pm 2.6\%$ から $57.8 \pm 1.4\%$ と AS101 投与により原始卵胞の割合が有意に増加していた (図 26)。

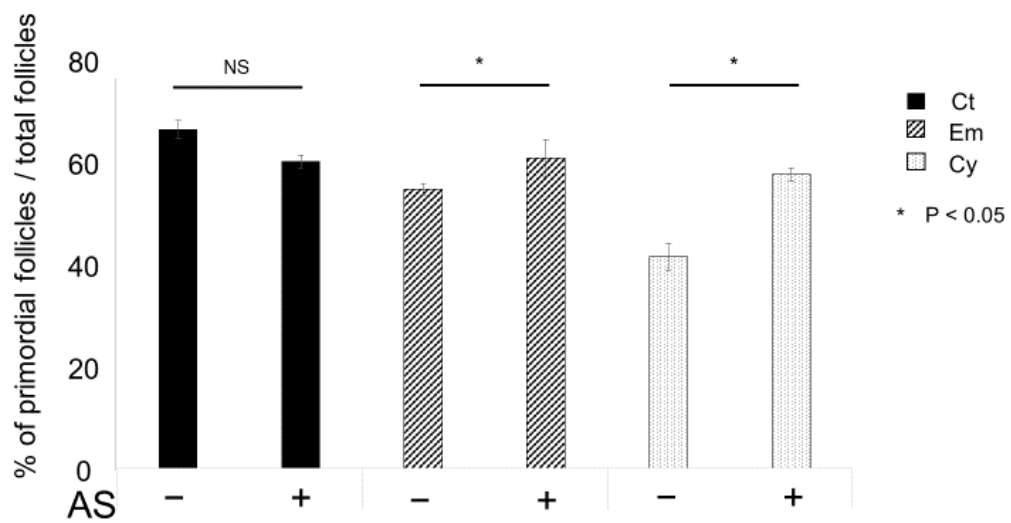


図 26 AS101 を投与によるマウスの卵胞数の変化
 AS101 を投与することにより、Em 群および Cy 群の原始卵胞数は増加した。

② 投与による免疫組織学的検討について

AS101 投与により、FOXO3 陽性原始卵胞の割合を検討したところ、Ct 群では差がなかったのに対して、Em 群では投与前後で $35.5 \pm 16.6\%$ から $57.6 \pm 8.8\%$ へ有意に増えていた (図 27)。

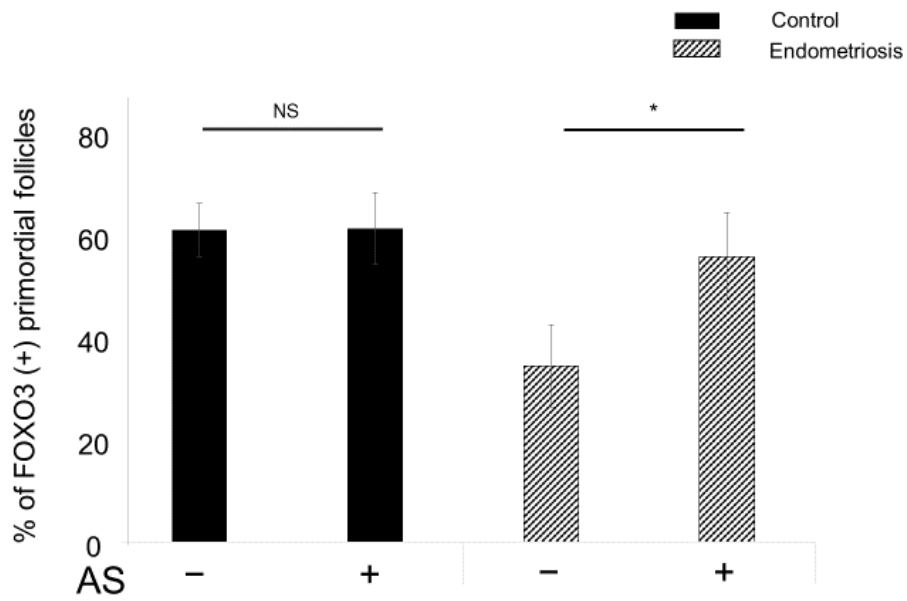


図 27 AS101 投与による免疫組織学的検討
Em 群では AS101 投与により、FOXO3 陽性の原始卵胞が増加した。

考察

1) 子宮内膜症モデルマウスにおける卵胞数の検討

Em 群の全卵胞数は 1242 ± 116.9 個で、Ct 群の 1498 ± 112.9 個に比して有意差はないものの減少していたが、Cy 群の 1046 ± 109.4 個に比べると減少率は低かった。Cy 群では卵胞数が減少し、卵巣機能低下を起こすことがこれまでの研究により明らかとなっているが、今回の実験結果により、子宮内膜症でも化学療法施行後と同じような卵胞数の減少がおこっている可能性が示唆された。

各卵胞数のうち、原始卵胞数は、Em 群で 704 ± 70.1 個と、Ct 群の 1103 ± 100.3 個と比べて有意に減少していたが、原始卵胞数以外の一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞、成長卵胞は Ct 群と比べて Em 群では卵胞数が多い傾向にあったが、有意差は認めなかった。また、各卵胞の割合では、Em 群の原始卵胞の割合が Ct 群と比べて有意に低下しており、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞ではその割合が有意に増加していた。Cy 群の卵胞数の減少は、シクロフォスファミドによる卵胞への細胞毒性によるアポトーシスの関与に加えて、原始卵胞の異常活性化が関与している[33]が、Em 群でも原始卵胞数が減少しているうえに、その割合も低下していたことを考慮すると、Cy 群と同様にアポトーシスだけではない原始卵胞の活性化が関与している可能性が考えられる。つまり、子宮内膜症でもシクロフォスファミドなどと同様に、限りある原始卵胞の異常活性化により、原始卵胞

が枯渇化へと向かい、卵巣予備能が低下している可能性について考えられる。さらに、子宮内膜症病変の重さと原始卵胞の数について負の相関が認められたことより、子宮内膜症が重症であるほど、卵巣予備能が低下していることが推測される。

しかし、本研究においては卵胞のアポトーシスの要素について詳細な検討を行っておらず、アポトーシスの要素と原始卵胞の異常活性化による原始卵胞の枯渇化のどちらが本現象にどれだけ関与しているか未検討である。今後、アポトーシスの検討についても加えることで、さらに子宮内膜症と原始卵胞の異常活性化の関連が明らかとなるのではないかと考えられる。

2)免疫組織学的検討

マウス卵巣の実験において、Em 群の FOXO3 割合は、 $37.2 \pm 19.5\%$ で、Ct 群の $69.3 \pm 5.7\%$ と比較して有意に低かった。一方で、pAkt 陽性割合は、 $35.2 \pm 22.2\%$ であり、Ct 群の $32.1 \pm 15.6\%$ と比べて増加していた。さらに、ヒト卵巣検体でも、PI3K/Akt 経路の key protein である FOXO3、pAkt が原始卵胞の核内に染色されたことより、子宮内膜症における原始卵胞の活性化にこれらの蛋白が関与している可能性がわかった。また、子宮内膜症罹患群で FOXO3 陽性の原始卵胞の割合が、 $14.9 \pm 5.1\%$ と非罹患群の $57.9 \pm 4.7\%$ に比して有意に少なかった。

原始卵胞の休眠状態を維持している、核内の FOXO3 が内膜症では減少していたことより、内膜症では休眠状態の原始卵胞が活性化されていることが示唆されている。この休眠状態の原始卵胞の活性化により、卵胞が発育し、原始卵胞の割合が低下していることが考えられる。また、PI3K/Akt 経路の key protein である pAkt が核内に染色され、子宮内膜症では増加していたことより、原始卵胞の活性化には PI3K/Akt 経路を介した FOXO3 のリン酸化が関与していることが考えられた。本実験では、PI3K/Akt 経路の key protein である pAkt を介した FOXO3 経路に着目をしたが、マウスの原始卵胞の休眠状態の維持には、この経路以外に、Janus kinase and signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT)経路が関与している可能性も報告されており [46]、今回検討した経路以外の可能性も今

後検討が必要である。また、子宮内膜症において、原始卵胞を異常活性化へ導く因子として、IL1 β や IL6,TNF、PGE2 などの炎症性物質、Insulin-like growth factors(IGF) などの関与があげられている[47]。子宮内膜症は慢性炎症性疾患であることを考慮すると、子宮内膜症から分泌される各種炎症性物質が、卵巢実質に線維化を引き起こし、卵巢予備能低下に関与していることにとどまらず、炎症性物質を介した原始卵胞の異常活性化を引き起こすことにより、原始卵胞が枯渇化し、さらなる卵巢予備能の低下を引き起こしている可能性が考えられる。

3) AMHの測定検討

Em 群のAMHは 8.28 ± 0.24 ng/ml で、Cy 群 8.79 ± 0.75 ng/ml、 Ct 群 8.34 ± 0.21 ng/ml と比べても各群間で明らかな差は認めなかった。

子宮内膜症患者では、AMH が低いことが報告されているが[29, 30]、本研究ではコントロール群と比べて明らかな差は認めなかった。AMH は胞状卵胞以降の卵胞から分泌されるが、今回の卵胞数の比較検討結果から、Em 群では胞状卵胞以降の卵胞割合は原始卵胞の異常活性化により増加傾向にあるため、AMH の測定結果に差が出なかった可能性がある。

また、子宮内膜症患者における卵巣予備能低下には、閉鎖卵胞の増加と、原始卵胞の異常活性化に伴って、AMH を出すような胞状卵胞が減少することにより、AMH がコントロールしている原始卵胞の休眠状態シグナル刺激がはずれ、より原始卵胞の枯渇化が進んでいる可能性が示唆されている[32]が、今回のマウスにおける卵胞測定の結果を考慮すると、子宮内膜症では原始卵胞の異常活性化による胞状卵胞が増加しており、AMH 低下とは別の機序による原始卵胞の異常活性化が関与している可能性が考えられる。一方で、シクロフォスファミド投与後の原始卵胞の枯渇化が AMH により改善することが報告されており[48]、AMH と子宮内膜症の関係においてはさらなる検討が必要である。

4) AS101 の投与検討

PI3K/Akt 経路を阻害し、原始卵胞の異常活性化を制御すると報告されている AS101 を投与することにより、Ct 群では AS101 の投与の有無で原始卵胞数の割合は $66.8 \pm 1.2\%$ から $60.4 \pm 3.6\%$ と変化しないのに対して、Em 群では、 $54.9 \pm 1.7\%$ から $61.1 \pm 1.2\%$ と AS101 投与により原始卵胞の割合が有意に増加していた。つまり、子宮内膜症病変の存在による原始卵胞の低下は AS101 の投与にて制御されることが分かった。さらに、AS101 投与の有無での、FOXO3 陽性原始卵胞の割合が、Em 群では投与前後で $35.5 \pm 16.6\%$ から $57.6 \pm 8.8\%$ へ有意に増えていたことより、AS101 の卵巣予備能維持の効果が PI3K/Akt 経路を介する FOXO3 によっていることが示唆された。一方で AS101 は PI3K 経路を促進することに加えて、DNA 損傷を修復することも知られており、今回投与実験において FOXO3 を介した活性化経路の他に、原始卵胞の DNA 損傷自体が修復された可能性もある。また、シスプラチン投与マウスにおいて、メラトニン投与により原始卵胞の枯渇が改善した[49]という報告や、mTOR inhibitor 投与により抗がん剤投与後のマウスの原始卵胞の枯渇が改善した[50]という報告もあり、AS101 以外の既存の薬剤についてその治療効果を検討する必要があると考えられる。

本研究により、子宮内膜症で卵巣予備能が低下する機序として、原始卵胞の異常活性化による可能性が明らかとなった。また、原始卵胞の異常活性化の1つにPI3K/Akt経路を介したFOXO3が関与しており、PI3K/Akt経路を阻害するAS101の投与によりその卵巣予備能の低下が改善される可能性が示唆された。今後、AS101のみならず、PI3K/Akt経路の阻害薬などが子宮内膜症における卵巣予備能低下への新たな治療戦略となりうると考えられた。

引用文献

1. Vigano, P., M. Candiani, A. Monno, E. Giacomini, P. Vercellini, and E. Somigliana, *Time to redefine endometriosis including its pro-fibrotic nature*. Hum Reprod, 2018. **33**(3): p. 347-352.
2. Sampson, J.A., *Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation*. Am J Pathol, 1927. **3**(2): p. 93-110 43.
3. Harada, T., F. Taniguchi, K. Onishi, Y. Kurozawa, K. Hayashi, T. Harada, E. Japan, and G. Children's Study, *Obstetrical Complications in Women with Endometriosis: A Cohort Study in Japan*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0168476.
4. Hamdan, M., G. Dunselman, T.C. Li, and Y. Cheong, *The impact of endometrioma on IVF/ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod Update, 2015. **21**(6): p. 809-25.
5. Hamdan, M., S.Z. Omar, G. Dunselman, and Y. Cheong, *Influence of endometriosis on assisted reproductive technology outcomes: a systematic review and meta-analysis*. Obstet Gynecol, 2015. **125**(1): p. 79-88.
6. Heidemann, L.N., D. Hartwell, C.H. Heidemann, and K.M. Jochumsen, *The relation between endometriosis and ovarian cancer - a review*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2014. **93**(1): p. 20-31.
7. Koga, K., Y. Takemura, Y. Osuga, O. Yoshino, Y. Hirota, T. Hirata, C. Morimoto, M. Harada, T. Yano, and Y. Taketani, *Recurrence of ovarian endometrioma after laparoscopic excision*. Hum Reprod, 2006. **21**(8): p. 2171-4.
8. Perlman, S. and J.J. Kjer, *Ovarian damage due to cyst removal: a comparison of endometriomas and dermoid cysts*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2016. **95**(3): p. 285-90.
9. Gizzo, S., A. Vitagliano, M. Noventa, P. Litta, C. Saccardi, and M. Quaranta, *Surgery, endometriosis-related infertility and negative impact on ovarian reserve: "which came first, the hen or the egg?" An unresolved dilemma*. Arch Gynecol Obstet, 2015. **292**(4): p. 709-11.
10. Muzii, L., A.A. Luciano, E. Zupi, and P.B. Panici, *Effect of surgery for endometrioma on ovarian function: a different point of view*. J Minim Invasive Gynecol, 2014. **21**(4): p. 531-3.
11. Somigliana, E., P. Vercellini, R. Daguati, E. Giambattista, L. Benaglia, and L. Fedele, *Effect of delaying post-operative conception after conservative surgery for endometriosis*. Reprod Biomed Online, 2010. **20**(3): p. 410-5.

12. Somigliana, E., L. Benaglia, A. Paffoni, A. Busnelli, P. Vigano, and P. Vercellini, *Risks of conservative management in women with ovarian endometriomas undergoing IVF*. Hum Reprod Update, 2015. **21**(4): p. 486-99.
13. Tai, F.W., C.Y. Chang, J.H. Chiang, W.C. Lin, and L. Wan, *Association of Pelvic Inflammatory Disease with Risk of Endometriosis: A Nationwide Cohort Study Involving 141,460 Individuals*. J Clin Med, 2018. **7**(11).
14. Kelsey, T.W., R.A. Anderson, P. Wright, S.M. Nelson, and W.H. Wallace, *Data-driven assessment of the human ovarian reserve*. Mol Hum Reprod, 2012. **18**(2): p. 79-87.
15. Kerr, J.B., M. Myers, and R.A. Anderson, *The dynamics of the primordial follicle reserve*. Reproduction, 2013. **146**(6): p. R205-15.
16. Hsueh, A.J., K. Kawamura, Y. Cheng, and B.C. Fauser, *Intraovarian control of early folliculogenesis*. Endocr Rev, 2015. **36**(1): p. 1-24.
17. Shah, J.S., R. Sabouni, K.C. Cayton Vaught, C.M. Owen, D.F. Albertini, and J.H. Segars, *Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review*. J Assist Reprod Genet, 2018. **35**(7): p. 1135-1148.
18. Zhang, H. and K. Liu, *Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood*. Hum Reprod Update, 2015. **21**(6): p. 779-86.
19. Kawamura, K., N. Kawamura, and A.J. Hsueh, *Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure?* Curr Opin Obstet Gynecol, 2016. **28**(3): p. 217-22.
20. Grosbois, J. and I. Demeestere, *Dynamics of PI3K and Hippo signaling pathways during in vitro human follicle activation*. Hum Reprod, 2018. **33**(9): p. 1705-1714.
21. Castrillon, D.H., L. Miao, R. Kollipara, J.W. Horner, and R.A. DePinho, *Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a*. Science, 2003. **301**(5630): p. 215-8.
22. Liu, L., S. Rajareddy, P. Reddy, C. Du, K. Jagarlamudi, Y. Shen, D. Gunnarsson, G. Selstam, K. Boman, and K. Liu, *Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a*. Development, 2007. **134**(1): p. 199-209.
23. Pelosi, E., S. Omari, M. Michel, J. Ding, T. Amano, A. Forabosco, D. Schlessinger, and C. Ottolenghi, *Constitutively active Foxo3 in oocytes preserves ovarian reserve in mice*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1843.
24. Li, J., K. Kawamura, Y. Cheng, S. Liu, C. Klein, S. Liu, E.K. Duan, and A.J. Hsueh, *Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(22): p. 10280-4.

25. Reddy, P., L. Liu, D. Adhikari, K. Jagarlamudi, S. Rajareddy, Y. Shen, C. Du, W. Tang, T. Hamalainen, S.L. Peng, Z.J. Lan, A.J. Cooney, I. Huhtaniemi, and K. Liu, *Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool*. Science, 2008. **319**(5863): p. 611-3.
26. David, A., A. Van Langendonck, S. Gilliaux, M.M. Dolmans, J. Donnez, and C.A. Amorim, *Effect of cryopreservation and transplantation on the expression of kit ligand and anti-Mullerian hormone in human ovarian tissue*. Hum Reprod, 2012. **27**(4): p. 1088-95.
27. Zondervan, K.T., C.M. Becker, K. Koga, S.A. Missmer, R.N. Taylor, and P. Viganò, *Endometriosis*. Nat Rev Dis Primers, 2018. **4**(1): p. 9.
28. Kitajima, M., K.N. Khan, A. Harada, K. Taniguchi, T. Inoue, M. Kaneuchi, K. Miura, and H. Masuzaki, *Association between ovarian endometrioma and ovarian reserve*. Front Biosci (Elite Ed), 2018. **10**: p. 92-102.
29. Muzii, L., C. Di Tucci, M. Di Feliciano, G. Galati, V. Di Donato, A. Musella, I. Palaia, and P.B. Panici, *Antimullerian hormone is reduced in the presence of ovarian endometriomas: a systematic review and meta-analysis*. Fertil Steril, 2018. **110**(5): p. 932-940 e1.
30. Kasapoglu, I., B. Ata, O. Uyaniklar, A. Seyhan, A. Orhan, S. Yildiz Oguz, and G. Uncu, *Endometrioma-related reduction in ovarian reserve (ERROR): a prospective longitudinal study*. Fertil Steril, 2018. **110**(1): p. 122-127.
31. Kitajima, M., S. Defrere, M.M. Dolmans, S. Colette, J. Squifflet, A. Van Langendonck, and J. Donnez, *Endometriomas as a possible cause of reduced ovarian reserve in women with endometriosis*. Fertil Steril, 2011. **96**(3): p. 685-91.
32. Kitajima, M., M.M. Dolmans, O. Donnez, H. Masuzaki, M. Soares, and J. Donnez, *Enhanced follicular recruitment and atresia in cortex derived from ovaries with endometriomas*. Fertil Steril, 2014. **101**(4): p. 1031-7.
33. Kalich-Philosoph, L., H. Roness, A. Carmely, M. Fishel-Bartal, H. Ligumsky, S. Paglin, I. Wolf, H. Kanety, B. Sredni, and D. Meirou, *Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility*. Sci Transl Med, 2013. **5**(185): p. 185ra62.
34. Kalechman, Y., M. Albeck, M. Oron, D. Sobelman, M. Gurwith, G. Horwith, T. Kirsch, B. Maida, S.N. Sehgal, and B. Sredni, *Protective and restorative role of AS101 in combination with chemotherapy*. Cancer Res, 1991. **51**(5): p. 1499-503.
35. Brodsky, M., S. Yosef, R. Galit, M. Albeck, D.L. Longo, A. Albeck, and B. Sredni, *The synthetic tellurium compound, AS101, is a novel inhibitor of IL-1beta converting enzyme*. J Interferon Cytokine Res, 2007. **27**(6): p. 453-62.

36. Brodsky, M., S. Hirsh, M. Albeck, and B. Sredni, *Resolution of inflammation-related apoptotic processes by the synthetic tellurium compound, AS101 following liver injury*. J Hepatol, 2009. **51**(3): p. 491-503.
37. Brodsky, M., G. Halpert, M. Albeck, and B. Sredni, *The anti-inflammatory effects of the tellurium redox modulating compound, AS101, are associated with regulation of NFkappaB signaling pathway and nitric oxide induction in macrophages*. J Inflamm (Lond), 2010. **7**(1): p. 3.
38. Ling, D., B. Liu, S. Jawad, I.A. Thompson, C.N. Nagineni, J. Dailey, J. Chien, B. Sredni, and R.B. Nussenblatt, *The tellurium redox immunomodulating compound AS101 inhibits IL-1beta-activated inflammation in the human retinal pigment epithelium*. Br J Ophthalmol, 2013. **97**(7): p. 934-8.
39. Indenbaum, V., H. Bin, D. Makarovsky, M. Weil, L.M. Shulman, M. Albeck, B. Sredni, and E. Mendelson, *In vitro and in vivo activity of AS101 against West Nile virus (WNV)*. Virus Res, 2012. **166**(1-2): p. 68-76.
40. Sredni, B., M. Albeck, T. Tichler, A. Shani, J. Shapira, I. Bruderman, R. Catane, B. Kaufman, and Y. Kalechman, *Bone marrow-sparing and prevention of alopecia by AS101 in non-small-cell lung cancer patients treated with carboplatin and etoposide*. J Clin Oncol, 1995. **13**(9): p. 2342-53.
41. Halpert, G. and B. Sredni, *The effect of the novel tellurium compound AS101 on autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(12): p. 1230-5.
42. Vishwakarma, P., N. Parmar, P. Chandrakar, T. Sharma, M. Kathuria, P.K. Agnihotri, M.I. Siddiqi, K. Mitra, and S. Kar, *Ammonium trichloro [1,2-ethanediolato-O,O']-tellurate cures experimental visceral leishmaniasis by redox modulation of Leishmania donovani trypanothione reductase and inhibiting host integrin linked PI3K/Akt pathway*. Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(3): p. 563-588.
43. Takamura, M., K. Koga, G. Izumi, Y. Urata, M. Nagai, A. Hasegawa, M. Harada, T. Hirata, Y. Hirota, O. Wada-Hiraike, T. Fujii, and Y. Osuga, *Neutrophil depletion reduces endometriotic lesion formation in mice*. Am J Reprod Immunol, 2016. **76**(3): p. 193-8.
44. Tomio, K., K. Kawana, A. Taguchi, Y. Isobe, R. Iwamoto, A. Yamashita, S. Kojima, M. Mori, T. Nagamatsu, T. Arimoto, K. Oda, Y. Osuga, Y. Taketani, J.X. Kang, H. Arai, M. Arita, S. Kozuma, and T. Fujii, *Omega-3 polyunsaturated Fatty acids suppress the cystic lesion formation of peritoneal endometriosis in transgenic mouse models*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73085.
45. Myers, M., K.L. Britt, N.G. Wreford, F.J. Ebling, and J.B. Kerr, *Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary*. Reproduction, 2004. **127**(5):

- p. 569-80.
46. Sutherland, J.M., E.R. Frost, E.A. Ford, A.E. Peters, N.L. Reed, A.N. Seldon, B.P. Mihalas, D.L. Russel, K.R. Dunning, and E.A. McLaughlin, *Janus kinase JAK1 maintains the ovarian reserve of primordial follicles in the mouse ovary*. Mol Hum Reprod, 2018. **24**(11): p. 533-542.
 47. Gonzalez-Fernandez, R., O. Pena, J. Hernandez, P. Martin-Vasallo, A. Palumbo, and J. Avila, *Patients with endometriosis and patients with poor ovarian reserve have abnormal follicle-stimulating hormone receptor signaling pathways*. Fertil Steril, 2011. **95**(7): p. 2373-8.
 48. Sonigo, C., I. Beau, M. Grynberg, and N. Binart, *AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice*. FASEB J, 2019. **33**(1): p. 1278-1287.
 49. Jang, H., O.H. Lee, Y. Lee, H. Yoon, E.M. Chang, M. Park, J.W. Lee, K. Hong, J.O. Kim, N.K. Kim, J.J. Ko, D.R. Lee, T.K. Yoon, W.S. Lee, and Y. Choi, *Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary*. J Pineal Res, 2016. **60**(3): p. 336-47.
 50. Goldman, K.N., D. Chenette, R. Arju, F.E. Duncan, D.L. Keefe, J.A. Grifo, and R.J. Schneider, *mTORC1/2 inhibition preserves ovarian function and fertility during genotoxic chemotherapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(12): p. 3186-3191.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究の立案から、実験手技、学会発表、論文執筆まで、様々な面において終始ご指導、ご鞭撻いただきました東京大学医学部産婦人科の甲賀かをり先生に深く感謝の意を表します。また、東京大学医学部産婦人科の大須賀穰教授、藤井知行教授には、研究にご理解、ご支援をいただき深く感謝の意を表します。