

## 論文の内容の要旨

論文題目 子宮内膜症における卵巣機能への影響

氏名 竹内 亜利砂

### 【序文】

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、生殖可能年齢女性の約 5-10%に存在し、骨盤痛や不妊などの症状を起こす。近年、女性の社会進出に伴う出産回数の減少と初産年齢の上昇も相まって、罹患率は増加傾向にあり、不妊治療にも大きな影響を与えている。

女性の卵巣機能は、性周期すなわち排卵現象を伴って、卵巣から女性ホルモンを分泌する卵巣の働きを示す。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。卵巣機能は、加齢により低下するが、その機能がどれほど残っているのかという卵巣予備能の指標の 1 つとして、卵巣内の残存原始卵子数がある。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。

近年の報告によると、その原始卵胞の休眠状態の維持に、Akt 経路と Hippo 経路の 2 つ制御機構が主に関与していることが報告されており、特に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ことが報告されている。成長因子などの刺激により、Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)経路が活性化され、Akt のリン酸化を経て原始卵胞核内の FOXO3 がリン酸化される。pFOXO3 が核外へ移行することで、休眠状態の原始卵胞は活性化され卵胞の発育が始まる。つまり、原始卵胞の休眠状態を維持しているのは、FOXO3 が核内に維持されていることだと言い換えることができる。

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いる。内膜症に罹患している卵巣では、正常卵巣に比し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、いわゆる化学療法施行後の卵巣機能低下と同様に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。しかしながら、原始卵胞の異常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。

以上から、子宮内膜症における卵巣予備能の低下について、PI3K/Akt のリン酸化経路による FOXO3 を介した原始卵胞の活性化に着目し、化学療法による卵巣機能低下と同様の働

きの関与と PI3K/Akt 経路阻害薬による治療効果について検証を行うとともに子宮内膜症の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。

#### 【方法】

腹腔内に子宮内膜症病変を発生させるマウスモデルを導入し、卵胞数の比較検討を行った。子宮内膜症モデルマウス(Em 群)は、ヒトの子宮内膜症発生が月経血逆流により発生するとする病因説をもとに、ドナーマウスの子宮を細切し、レシピエントマウスの腹腔内に投与する方法を用いた。腹腔内に子宮移植後卵巣を採取し、PBS を投与したコントロール群 (Ct 群) およびシクロフォスファミドを投与し卵巣機能を低下させた群 (Cy 群) との卵胞数の比較検討を行ない、子宮内膜症で原始卵胞の異常活性化が起こっているか検証した。

また、マウスモデルに加えて、子宮内膜症性卵巣嚢胞にて腹腔鏡手術を行った患者より摘出した卵巣検体を用いて、原始卵胞の活性化経路である PI3K/Akt 経路を介した FOXO3 のリン酸化について、免疫染色にてその関与について検証した。

さらに、PI3K/Akt 経路阻害薬である AS101 を投与することにより、子宮内膜症の卵巣予備能低下を防ぎうるか検証を行った。

#### 【結果】

卵胞数に関しての結果では、全卵胞数は Em 群で  $1242 \pm 116.9$  個と Ct 群の  $1496 \pm 112.9$  個に比して減少傾向にあった。一方で、Cy 群では  $1046 \pm 109.4$  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  $704 \pm 70.1$  個、Cy 群で  $472 \pm 48.9$  個、Ct 群で  $1103 \pm 100.3$  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 ( $224 \pm 31.2$  個、 $157.5 \pm 22.4$  個、 $142.5 \pm 8.6$  個、 $14.0 \pm 2.5$  個)、Cy 群 ( $226 \pm 35.9$  個、 $180.5 \pm 22.3$  個、 $155 \pm 12.4$  個、 $12.5 \pm 2.3$  個) と Ct 群 ( $184 \pm 12.5$  個、 $99.5 \pm 10.6$  個、 $103.5 \pm 10.8$  個、 $6.52 \pm 2.26$  個) と比べてそれぞれ増加傾向にあった。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 ( $17.9 \pm 1.2$ ,  $12.4 \pm 1.0$ ,  $11.9 \pm 0.8\%$ )、Cy 群 ( $20.8 \pm 1.2$ ,  $17.1 \pm 1.0$ ,  $15.3 \pm 0.8$ ) であり、Ct 群 ( $12.5 \pm 0.8$ ,  $6.7 \pm 0.6$ ,  $6.9 \pm 0.6\%$ ) より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。

免疫染色の結果では、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  $32.1 \pm 15.6\%$  と増加傾向にあった。ヒトの 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  $47.3 \pm 6.7\%$ と比較して少なかった。

さらに、AS101 の投与の有無により、Ct 群では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  $57.8 \pm 1.4\%$ と有意に増加していた。また、FOXO3 陽性原始卵胞の割合は、Ct 群では差がなかったが、Em 群では投与により  $35.5 \pm 16.6\%$ から  $57.6 \pm 8.8\%$ へ有意に増えていた。

### 【考察】

各卵胞数のうち、原始卵胞数は、Em 群で Ct 群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 群と比べて多い傾向にあった。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。これらの結果より、子宮内膜症でもシクロフォスファミドなどと同様に、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。

マウス卵巣の実験において、Em 群の FOXO3 割合は、Ct 群と比較して有意に低かった。一方で、pAkt 陽性割合は、Ct 群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、非罹患群に比して有意に少なかったことより、子宮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た。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との報告もあり、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 $\beta$ 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。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、卵巣実質に線維化を引き起こし、卵巣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、さらなる卵巣予備能の低下を引き起こしている可能性が考えられる。

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変化しないのに対

して、Em 群では、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。