

学術集会 ご報告



会長

村上 節

滋賀医科大学
産科学婦人科学
講座 教授

第28回 日本生殖内分泌学会学術集会ご報告

皆様のお陰をもちまして、第28回日本生殖内分泌学会は、2023年11月18日（土）と19日（日）の2日間に大津市民会館を会場に無事開催することができました。

日本内分泌学会の分科会に位置づけられる由緒正しい日本生殖内分泌学会は、内科、小児科、泌尿器科、産婦人科、そして農学部や薬学部など多様性に富む会員から成る集団です。そこで「好奇心・関心・探究心」をテーマとした今回は、学問領域として拡散するのを臆することなく、私の興味の赴くままプログラムを組みました。すなわち、オキシトシンの分泌作用があるのであれば漢方薬も、アンドロゲンを高める可能性があるならば原虫感染も生殖内分泌学に含まれてよいだろう、そしてLGBTQの生殖を考えるのも当然生殖内分泌学の範疇に入るだろうということで、多様性に富む、手前味噌ながら興味深い内容になったと思います。

また、特別企画として研究の楽しさや励みをメンターの方たちにお話しいただいたのは、ともすればうまく行かず、悩みがつかないことの方が多い研究という難事に励む大学院生に、将来への希望の光を見出して欲しかったからですが、演者を務めていただいた皆様のお話には研究を楽しむ心が込められており、明日からのモチベーション高揚につながったのではないかと思います。予想どおりであれ、予想外であれ、結果が出たときの喜びは何物にも代えられません。若き研究者の日々の努力が少しずつでも結実することを祈っております。

ところで、第1日目は、皆様を比良おろしがお出迎えし、寒風吹き荒むあいにくの天気ではありましたが、何よりも実現したかった琵琶湖湖上での懇親会を、夜空を彩る花火も交え開催できたのは、滋賀県の生殖医療施設の方々のご協力の賜でした。また、今回の学術集会では、当初は毎年滋賀県で開催している生殖関連の講演会とジョイントすることを企画していましたが、さまざまな事情で思うように事が運ばず、困り果てていたなか、多くのお力添えをいただき、お陰様でオンデマンドを含めて約180名の参加を得ることができました。学術集会はいつも多くの方たちのご支援で成り立っていますが、今回もその類に漏れず、この紙面をお借りして、あらためて2日間にわたり会期中に演者を務めていただいた皆様、座長の労を執っていただいた皆様、会を盛り上げていただいた皆様をはじめ、ご援助いただいたすべての皆様に心から感謝を申し上げて事後報告と致します。皆様本当にどうも有難うございました。

第28回日本生殖内分泌学会学術集会 会長

村上 節

滋賀医科大学産科学婦人科学講座

学術集会 ご案内



会長

寺田 幸弘

秋田大学大学院
医学系研究科
産婦人科学講座
教授

第29回 日本生殖内分泌学会を迎えて

令和6年10月26日（土）から27日（日）に秋田市で第29回日本生殖内分泌学会を開催させていただきます。会場の「にぎわい交流館 AU（あう）」は秋田駅より徒歩10分の「エリアなかいち」という秋田市の教育と文化の中心的な場所にあります。

招請講演は、慶應義塾大学文学部教授の河野礼子先生にお願いしました。河野先生はインドネシアのフローレス島に陸封され小人化したサピエンスである「フローレス原人」の骨の解析などで著名な人類進化学者で、現在共同研究をさせていただいております。近年の生殖補助技術の人類への急速な介入が今後どのような影響を及ぼすのか、予測不可能とも思いますが、進化人類学者のご見解をできる限り賜りたい所存です。

特別講演は東北大学名誉教授の笹野公伸先生にお願いしました。私自身、東北大学在籍中は笹野先生より沢山のご薫陶を授かりました。病理学と内分泌学を機能的に融合させた先生のお仕事をあらためてご教授いただくとともに、生殖内分泌学の今後の展望に関するお話しをお願いしております。教育講演は産婦人科領域での生粋の内分泌学者である島根大学の金崎春彦准教授に好きなことを自由なお気持ちでお話しいただくようお願いしました。

「プレコンセプションケア」は医学の諸領域になじんできた感触がありますが、生殖内分泌学はこの医学の中核を担っています。今回、プレコンセプションケアをシンポジウムの主題と致しました。内容は胚（受精卵）、胎児そしてAYA世代と連綿と続く命の流れのなかでのプレコン、を考えていただけるような（やや風呂敷が広がりますが）ご講演をいただける演者の方々をお招きしております。

例年よりやや早めの開催になりますが、10月の秋田はまだ降雪のリスクもなく広々とした秋空が広がっているとおもいます。

皆さまのご来秋をお待ちしております。

会 期：2024年10月26日（土）、27日（日）
会 場：にぎわい交流館 AU（あう）
事務局：秋田大学大学院医学系研究科 産婦人科学講座
TEL：018-884-6163 FAX：018-884-6447
E-mail：obgyn@doc.med.akita-u.ac.jp

第29回日本生殖内分泌学会 学術集会 会長
寺田 幸弘
秋田大学大学院医学系研究科 産婦人科学講座

学術集会 ご案内



会長

深見 真紀

国立成育医療
研究センター
分子内分泌研究部
部長

第30回 日本生殖内分泌学会学術集会に向けて

このたび第30回日本生殖内分泌学会学術集会を担当させていただくことになりました国立成育医療研究センターの深見と申します。伝統ある本学会の学術集会を担当させていただくことを大変光榮に存じます。

毎年の本学会学術集会では、さまざまな分野の臨床医、基礎研究者、メディカルスタッフ、学生の会員が集い、活発な議論を重ねてきました。本学術集会が学会のさらなる発展につながるよう、研究室が丸となって準備してまいります。なお小児科分野でこの学術集会を担当するのは、2013年の緒方勤先生（浜松医科大学小児科学講座）以来となります。小児科の視点からの新たな切り口の発表を加え、参加してくださる皆様に興味を持っていただけるような内容を企画いたします。

本学術集会では、テーマを「生殖内分泌学の新展開（仮）」といたしました。近年、生殖内分泌学の基礎研究と医療は著しい進展を見せています。シンポジウムや特別講演を通じて、最先端の知見を共有する場を設けたいと考えております。また、会員の多様な専門性を鑑み、狭義の生殖内分泌にとどまらない関連分野の講演を企画して学術性を高めてまいります。

会期は2025年11月15日（土）と16日（日）といたしました。都内の利便性の良い会場を計画しております。COVID-19も収まってまいりましたので、対面開催といたします。多くの会員の皆様のご参加をお待ちしております。どうぞよろしくお願い申し上げます。

会 期：2025年11月15日（土）、16日（日）
会 場：選定中（都内の予定）
プログラム：特別講演、シンポジウム、一般演題口演（予定）
お問合せ先：第30回日本生殖内分泌学会学術集会事務局
国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部
担当：鏡 雅代、秋山真由子
TEL：03-3416-0181（4900） FAX：03-5494-7026
E-mail：jsre2025@ncchd.go.jp

第30回日本生殖内分泌学会学術集会 会長
深見 真紀
国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部

性的マイノリティーと生殖

木村 正

堺市立病院機構

1. 性的マイノリティーとは何か

2023年6月に「性的指向およびジェンダーアイデンティティーの多様性に関する国民の理解の増進に関する法律（いわゆるLGBT理解促進法）」が施行された。こういうものを作らねばならないぐらい国民が理解していない、ともいえる。

性には、

- 生物学的性別(sex)：遺伝子・染色体に支配される生殖器で決まる
- 社会的性(gender)：社会的に構築された性、その性らしさ
- 性的指向(sex orientation)：性的な魅力を感じる相手に関する指向
- 性自認(gender identity)：個人が認識する自身の性があり、LGBTQ+など一括りにされるが、T（トランスジェンダー）とLGBQ+（レズビアン・ゲイ・バイセクシュアル・クエッシング／クイア）より性自認への適合という観点から医療を用いる可能性がより大きくなる点が異なる（表1）。

日本における頻度は2019年に大阪で行われた「性的指向と性自認の人口学－日本における研究基盤の構築」プロジェクトの結果によると生物学的男性の1.3%、女性の0.3%は同性へのみの性的指向を持ち、同様にそれぞれ0.7%、0.8%の人が現在は生物学的性と異なる性自認をもつなど、バイセクシュアルやクイア・アセクシュアルを含めると2-3%の人はLGBTQ+の範疇にはいるとされる¹⁾。

医療を用いて・用いずとも生物学的性を自認する性に転換する場合があります。男性になった人をトランス男性(trans male)、女性になった人をトランス女性と呼ぶ。性自認が生物学的性に一致する場合はシス男性、シス女性である。医療を希望して受診した場合に以前は「性同

一性障害 (gender identity disorder ;GID)」と診断したが障害ではないのでICD-11では「性別不合 (gender incongruence)」という名称を用いている。ただ、日本では「性同一性障害者の性別の取り扱いの特例に関する法律」（2003年制定）が基本的に残っており、戸籍上の性別を転換するためには、

- 一 18歳以上であること
- 二 現に婚姻をしていないこと
- 三 現に未成年の子がいないこと
- 四 生殖腺がないことまたは生殖腺の機能を永続的に欠く状態であること
- 五 その身体については他の性別にかかる身体の性器にかかる部分に近似する外観を備えていること

の条件を二人以上の専門的知識を有する医師の診断を受けたうえで満たさなくてはならない。これが国家による強制手術である、と批判され、2023年に四の条項が違憲・無効であるとの最高裁判決が下った。五に関しては高裁に差し戻され現在審理中である。四の条件がなくなるとトランス男性・トランス女性ともに妊娠出産の可能性が出てくる。その一方で、性ホルモン投与を含む性適合に関する医療は医師一人でその開始を決定するようなものではなく、米国内分泌学会が出しているガイドライン²⁾などを参照しつつ多職種が合同で総合的な情報提供と実践を行うべきである。われわれ生殖内分泌学を専門とする研究者にとって、性的マイノリティーと妊娠出産を含む生殖は当然必要な知識ということが出来る。

2. 性的マイノリティーと生殖

日本では同性カップルの婚姻は認められていない。生殖医療に関するさまざまな制約はこれまで専ら日本産科婦人科学会（日産婦）が出した見解しか存在しない。見解によると第三者由来精子を用いた人工授精は夫婦間でのみ認められている。しかし、平成13年厚労省母子保健課課長通知により、体外受精等に第三者配偶子を用いることは「法律の整備がなされるまで待つように」指導され、日産婦はこの指導に従っているだけである。現在配

連絡先：木村 正 堺市立病院機構
〒593-8304 大阪府堺市西区家原寺町1丁目1番1号
TEL : 072-272-1199
FAX : 072-272-9911
E-mail : tadashi@gyne.med.osaka-u.ac.jp

表1 性の多様性に関する用語

	生物学的性	性自認	性指向
L レズビアン	女	女	女
G ゲイ	男	男	男
B バイセクシャル	男/女	問わない	男女どちらにも向く
Q+ クエッションング /クイア +は他にもある, という意味	男/女	定まっていない/意図的に定めない	定まっていない/意図的に定めない
A アセクシャル	男/女	問わない	他者に性的欲求・恋愛感情を抱かない (意図的ではない)
T トランスジェンダー*	男 女	女 男	男 (女ならトランス女性のレズビアン) 女 (男ならトランス男性のゲイ)

*トランスジェンダーに対応する言葉でシスジェンダー（生物学的性と性自認が一致する）がある。シス男性・シス女性と呼ぶ。
ジョブレインボーマガジン <https://jobrainbow.jp/magazine/category/news> の解説を著者改変

偶子の管理, 情報提供を含む法案が作成されつつある(令和6年4月段階)と聞く。しかし, 第三者配偶子を用いて行う生殖補助医療の対象は夫婦とされるようである。体外受精では事実婚を夫婦に運用上含めている。同性カップルに事実婚・婚姻に準じる関係を法的に認めるかは, これを認め二人の関係の破綻に関する慰謝料請求を認めた判例や, パートナーが受けた犯罪に対して犯罪被害者給付金支給を認めないとする判例, 扶養手当支給に関する都道府県の姿勢のばらつきなどがあり, 一定していない。現時点では女性同性カップルへの第三者精子の人工授精あるいは体外受精が問題となるが人工授精は日産婦の見解で夫婦, とされており, 体外受精は平成13年厚労省母子保健課長通知とともに止められている。男性カップルの場合は第三者の卵あるいは懐胎者の卵を用いた代理懐胎あるいは養子縁組以外に方法はないが見解で代理懐胎は行うべきではない, とされている。米国生殖医学会は「婚姻状況, 性的指向, 性自認に関係なく」生殖医療を利用できる, としており, 米国産科婦人科学会もすべての人に質の高いケアを提供する, としている。欧州生殖医学会はトランス男性（生物学的女性）への卵子凍結をみとめる国, 費用補助がある国のリストを示している³⁾。

このような性的マイノリティカップルに配偶子提供あるいは代理懐胎により実子をなすことを認めるかどうか, については国としての在り方の問題である。(※この姿勢の差は“進んでいる・遅れている”の差ではなく, 旧来の規制倫理学から, さらに古典である個人の徳を幸福に重きを置くニコマコス倫理学への生命倫理の回帰が生んだもの, と著者は理解している。) 現在は日産婦が生まれてくる子の福祉・法的安定性の欠如を理由に会員に対して見解で指導しているが, 会員外には何の効

力もない。このような個人の願望に対する規制行為は本来一学会が行う事柄ではない, と著者は考えている。

レズビアン (L) カップルにとっては第三者精子が妊娠するために必要であるが, 妊娠する女性の女性パートナーから採卵し, 第三者精子と配偶子を作って胚移植をすることで, カップル双方が生殖に関与する実感を得て, 家族形成に有利, という主張もある⁴⁾。

性別不合の人（トランスジェンダー）はその自認する性に身体を一致させるためのホルモン療法を行うことが多い。トランス男性における男性ホルモン作用下の卵巣は皮質の肥厚や髄質の過形成などがあるが胞状卵胞数は変わらない, 閉鎖卵胞が増加する, AMHが低下する・あるいは変わらない, 子宮内膜もほとんどが活動性に乏しく委縮状だが一部に分泌期内膜がみられる, など多彩であり, 男性ホルモンを一時中止すると自然排卵が起こり妊娠する例もあるが多くは生殖補助医療のもとで自己の卵子を用いて妊娠している⁵⁾。調節卵巣刺激を用いるとシス女性にくらべトランス男性から得られる卵子数はテストステロン暴露の既往には影響されない, という報告もある⁶⁾。

トランス男性は, 自らが妊娠をした場合はテストステロンを中断しなければならない。胎内でのテストステロン暴露は, 偶発的投与（ほとんどは運動選手のドーピング事例）で女兒の性器形態異常を起こすことが知られているが, その精神的影響について先天性副腎過形成 (CAH) の子どもに対して検討されている。女兒で比較した場合, 攻撃的 (aggressive) な行動は CAH 児の方が強いが, コントロール男児よりは弱いレベルであった。CAH 女兒はおもちゃや遊び友達, 行動が男児のパターンに似るが男児では CAH の有無で行動は変わらない, などの報告があり, 主に女兒に影響が出るようである^{7,8)}。

また、トランス男性が自らの膣を用いた性交渉を経験することはあり、HPV感染のリスクはあるので子宮頸がん検診の対象とすべきである⁹⁾。

一方、エストロゲン暴露を受けたトランス女性の精巣に関しては外科的性別適合のため精巣摘出を受けた85人(うち73人は同時に陰形成術を受けている)の組織学的報告がある。その中では活動性造精は8.2%、精子形成は28.2%に見られた。精巣のガラス化は年齢が上(40歳より上)の群で高率に見られていた。エストロゲン投与期間別で大きな差は見られず、投与が短くても造精障害は起こっていたが、長くても造精が認められた人もあり個体差が大きい¹⁰⁾。また、1年以上エストロゲン療法を受けたトランス女性の40%にspermatids(性細胞)が存在するとし、造精状態は精巣容積が指標になるとされた。トランス女性で一度始めたエストロゲン療法をやめる人はほほえないので、より若年で治療を希望する場合は始める前に思春期発来を抑制することで時間を稼ぐ、あるいはすでにエストロゲン投与を受けている方ではTESE-spermatid-ICSIなどの戦略も考えられる¹¹⁾。

性的マイノリティーの人々は、そもそも親になることを希望するのであろうか。スウェーデン(2013年に性腺摘出を性適合の条件から外した。日本での昨年最高裁判所判決で日本も同じ状況になる可能性がある)の調査によるとトランス男性の7割、トランス女性の8割が将来親になることを望んでおり、トランス男性の26%、トランス女性の75%は配偶子(卵・精子)の凍結保存を行っていた¹²⁾。カナダにおける性的マイノリティーのシス男性に対するオンライン質問では回答者112名の中で3割以上の男性が子を持つことを希望し、それよりやや少ない割合で(3割弱)血縁のある子を求めていた。44%は将来親になるだろうと予測し、経済力とパートナーとの安定した関係が親になるための重要な条件、と考えている¹³⁾。性別不合も含めた性的マイノリティーの人たちのパートナーシップは、性指向と性自認が独立した因子となり、科学の進歩に伴い、さまざまな生殖戦略を医療として提供できる時代になった(表2)。むろん、これ以外に養子縁組などの方法もある。子の福祉に最大限留意しつつ、この方たちの親になりたい、とする願望にどのように対応するのか、を多様性社会の中で真剣に考える時代になっている。

3. 性的マイノリティーと妊娠出産

では、生殖が首尾よく成し遂げられて、妊娠した場合の予後はどうであろうか。妊娠にストレスはよくない、

とされ、性的マイノリティーの方々は多様性社会という掛け声にもかかわらず、さまざまな差別、貧困、偏見などのストレスを受けていることは間違いない。唾液中の cortisol 値の変化を一定のストレステスト(Trier Social Stress Test)を行う前後で検討するとヘテロセクシャル(異性への性指向を持つ)女性に比べ、レズビアン・バイセクシャル女性ではストレス後の cortisol 値上昇が長く続き、ヘテロセクシャル男性に比べゲイ・バイセクシャル男性は cortisol 値上昇がみられなかった。もともと、この用いたストレステストの反応性には性差があることが知られており、各群20名程度の検討ではあるが性的マイノリティー女性はストレス感受性が高いのかもしれない¹⁴⁾。米国で出産した女性の性指向(対男性のみと性交する女性)とヘテロセクシャル(女性と性行為を持つ・レズビアン、バイセクシャルなど)が自記式に記載されたレジストリで19,995件の妊娠を後方視的に解析すると流産はヘテロセクシャル女性に(OR:1.25)、死産はレズビアン、バイセクシャルと答えた人に(OR:2.85)多く、低出生体重児や早期早産のリスクもレズビアン、バイセクシャル女性に多かった¹⁵⁾。また、カリフォルニア州での病院出産で家族が母-母であるものや、分娩者が父(パートナーは問わない)であるものを性的マイノリティー分娩と仮定するとそれぞれ、148万件のレジストリの中に2,572名、498名存在し、母-母のカップルの分娩では多胎妊娠、分娩誘発、産後出血、重症合併症などの率が有意に高いが妊娠糖尿病、妊娠高血圧症候群、帝王切開、早産、低アプガー(<7)の確率は変わらなかった。父が分娩した、とされた群では多胎が多い傾向であったがその他は変わらなかった¹⁶⁾。性的マイノリティーの方々は社会的・経済的に不利であることが多く、医療や保険へのアクセスが悪い可能性があるが、これらの検討ではその背景は解析できていない。

トランス男性の妊娠は特にそのケア(外見上男性の妊婦の健診場所、外性器形成後の分娩様式、授乳、内診、など)に工夫が必要であり、ネット上で公募した出産経験があるトランス男性10名へのインタビューをまとめた narrative 論文¹⁷⁾や、トランスと nonbinary(自身を男性とも女性とも認識しない)方の妊娠・分娩・産後ケアについてのケアを受けた側の意見をまとめた narrative 論文¹⁸⁾は、どのような医療者の行為(理学的所見を取る、検査、診療場所など)や言動に性的マイノリティーが傷ついたり、配慮を望むか(例えば breast feeding は chest feeding と言ってほしいなど、日本の場合でも医療現場における日本語による事例集積が必要である)などが記

表2 性的マイノリティーにおける様々なパートナーシップと生殖

クライアント	パートナー	代表的妊娠方法（これ以外にもあり得る）
シス女性	シス女性	ドナー精子, 本人またはパートナー卵子
シス男性	シス男性	ドナー卵子+代理懐胎, 第三者への人工授精・体外受精
トランス女性	シス男性	ドナー卵子+代理懐胎, 第三者への人工授精・体外受精
	シス女性	自然妊娠, トランス女性（凍結）精子による ART, シス女性出産
	トランス男性	自然妊娠, トランス女性（凍結）精子による ART, トランス男性出産
	トランス女性	ドナー卵子+代理懐胎, 第三者への人工授精・体外受精
トランス男性	シス女性	ドナー精子, 本人またはパートナー卵子
	シス男性	トランス男性が出産する自然・生殖補助医療妊娠
	トランス女性	自然妊娠, トランス女性（凍結）精子による ART, トランス男性出産
	トランス男性	ドナー精子, 本人またはパートナー卵子, トランス男性出産

性自認と性指向は独立したものであるためこのような代表的なパターンが考えられる。BやQ+はここでは触れていない。赤字は戸籍上の変更を性腺除去なしに行うことが認められたら法的婚姻関係を結ぶことができる可能性のあるカップル。

載されていて、今後そのような事例に遭遇した場合の参考になる。

性的マイノリティーの出産がなされた場合、その子どもたちの成育はどうであろうか。Narrativeな論文も多い中でのメタ解析がなされていて、性的マイノリティーの親と異性間の親の比較を行うと、子どもの心理的適合度(children's psychological adjustment)はマイノリティー群でむしろよく、身体的健康はどちらの親であれ、親の結婚状態に依存していた。子どもの性的役割では両者は変わらない、とするものとレズビアンカップルで男児が男の子らしくない (less masculine) 傾向がある、とされていた。親子関係はマイノリティーの方が良い、子の学業成績はマイノリティーの方が劣る・あるいは良い、親の精神的適合度は変わらない、カップルの関係性の満足度は変わらない、他にもいくつかの比較項目があるが明らかな傾向の差は見られないとのことであった。しかし、性的マイノリティーの親は社会的サポートの欠如や差別による安全への脅威を感じており、むしろこちらの方が問題である、と指摘されていた¹⁹⁾。

4. まとめ

筆者が日本産科婦人科学会理事長の時代に、レズビアンカップルの女性が第三者精子を用いて妊娠し、その出産を分娩施設が断った、という事案が発生した。日産婦がそのような妊娠を成立させるための医療行為を禁じている、というような理由だったと記憶しているが、出産に関しては全くそのような見解はなく、また出生届も日本の法律に則り提出すればよい。すでに妊娠した方に対するケアはこれまでの報告からハイリスク妊娠と認識しつつ行うのが当然で厚生労働省から「性的指向や性自認を理由とした不当な扱いの防止について（2023年10月厚生労働省総務課）」という文章が発出され、出産に限らず医療全体に対して不当な扱いをしないように求められ

ている。

ダイバーシティードアンド インクルージョン(D&I)は今後の社会のあるべき姿であり、性的マイノリティーはこの概念の中に含まれている。最高裁判所令和5年10月25日付特別抗告事件に対する大法廷決定²⁰⁾による影響は大きく、今後トランスジェンダーの方を含め妊娠出産が可能な時代となるであろう。その方々に生殖補助医療まで含めた医療を提供するべきかどうかに関して一学会が決定する時代は終わっている。医療者・医学者だけではなく社会全体での意見交換がなされるべき時代である。

性的マイノリティー、特にトランスジェンダー当事者から平易な解説書が出ており、考えるきっかけとして適していると考え最後に参考文献として掲載する²¹⁾。

引用文献

1. 「大阪市民の働き方と暮らしの多様性と共生にかんするアンケート」報告書 <https://www.ipss.go.jp/projects/j/SOGI/>
2. Hembree WC, Cohen-Kettenis PT, Gooren L, Hannema SE, Meyer WJ, Murad MH, Rosenthal SM, Safer JD, Tangpricha V, T'Sjoen GG (2017) Endocrine treatment of gender-dysphoric/Gender-Incongruent persons: An endocrine society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab 102, 3869-3903.
3. Female Fertility Preservation (2020) Guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology. pp 32-36. <https://www.eshre.eu/guidelines>
4. Aktöz F, Loreti S, Darici E, Leunens L, Tournaye H, De Munck N, Blockeel C, Roelens C, Mackens S (2024) IVF with reception of oocytes from partner in lesbian couples: a systematic review and SWOT analysis. Reprod Biomed Online 48, 103411.
5. Moravec MB, Kinnear HM, George J, Batchelor J, Shikanov A, Padmanabhan V, Randolph JF (2020) Impact of exogenous testosterone on reproduction in transgender men. Endocrinol 161, 1-13.
6. Leung A, Sakkas D, Pang S, Thornton K, Resetskova N (2019) Assisted reproductive technology outcomes in fe-

- male-to-male transgender patients compared with cisgender patients: a new frontier in reproductive medicine. *Fertil Steril* 112, 858–865.
7. Spencer D, Pasterski V, Neufeld S, Glover V, O'Connor TG, Hindmarsh PC, Hughes IA, Acerini CL, Hines M (2017) Prenatal androgen exposure and children's aggressive behavior and activity level. *Horm Behav* 96, 156–165.
 8. Spencer D, Pasterski V, Neufeld S, Glover V, O'Connor TG, Hindmarsh PC, Hughes IA, Acerini CL, Hines M (2021) Prenatal androgen exposure and children's gender-typed behavior and toy and playmate preferences. *Horm Behav* 127, 104889.
 9. Potter J, Peitzmeier SM, Bernstein I, Reisner SL, Alizaga NM, Agenor M, Pardee DJ (2015) Cervical cancer screening for patients on the female-to-male spectrum: a narrative review and guide for clinicians. *J Gen Intern Med* 30, 1857–1864.
 10. Sinha A, Mei L, Ferrando C (2019) The effect of estrogen therapy on spermatogenesis in transgender women. *Fertil Steril Rep* 2, 347–351.
 11. Jiang DD, Swenson E, Mason M, Turner KR, Dugi DD, Hedges JC, Hecht SL (2019) Effects of estrogen on spermatogenesis in transgender women. *Urology* 132, 117–122.
 12. Mattelin E, Strandell A, Bryman I (2022) Fertility preservation and fertility treatment in transgender adolescents and adults in a Swedish region, 2013–2018 *Hum Reprod Open*, 1–17.
 13. Yee S, Mamone AA, Fatima M, Sharon-Weiner M, Librach CL (2024) Parenthood desire, perceived parenthood stigma, and barriers to achieving parenthood in childless sexual minority men. *J Assist Reprod Genet* doi:10.1007/s10815-024-03098-6.
 14. Juster RP, Hatzenbuehler ML, Mendrek A, Pfaus JG, Smith NG, Johnson PJ, Lefebvre-Louis JP, Raymond C, Marin MF, Sindi S, Lupien SJ, Pruessner JC (2015) Sexual orientation modulates endocrine reactivity. *Biol Psychiat* 77, 668–676.
 15. Everett BG, Kominiarek MA, Mollborn S, Adkins DE, Hughes TL (2019) Sexual orientation disparities in pregnancy and infant outcomes. *Maternal Child Health J* 23, 72–81.
 16. Leonard SA, Berrahou I, Zhang A, Monseur B, Main EK, Obedin-Maliver J (2022) Sexual and/or gender minority disparities in obstetrical and birth outcomes. *AJOG*, 846 : e1–e14.
 17. Hoffkling A, Obedin-Maliver J, Sevelius J (2017) From erasure to opportunity: a qualitative study of the experiences of transgender men around pregnancy and recommendations for providers. *BMC Pregnancy and Childbirth* 17 (Suppl 2), 332.
 18. McCracken M, DeHaan G, Obedin-Maliver J (2022) Perinatal considerations for care of transgender and nonbinary people: a narrative review. *Curr Opin Obstet Gynecol* 34, 62–68.
 19. Zhang Y, Huang H, Wang M, Zhu J, Tan S, Tian W, Mo J, Jiang L, Mo J, Pan W, Ning C (2023) Family outcome disparities between sexual minority and heterosexual families: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Global Health* 8 : e010556.
 20. 裁判例 (2020) https://www.courts.go.jp/app/files/hanrei_jp/527/092527_hanrei.pdf?ref=factcheckcenter.jp
 21. 周司あきら, 高井ゆと里 (2023) *トランスジェンダー入門*. 集英社新書. 東京.

排卵を司る脳内メカニズムの最前線

井上 直子, 上野山賀久, 東村 博子

名古屋大学大学院生命農学研究科動物生殖科学

はじめに

哺乳類の生殖機能は、視床下部一下垂体一性腺軸の頂点に立つキスペプチンニューロンにより制御される。視床下部前方の前腹側室周囲核 (AVPV) / 視索前野 (POA) に局在するキスペプチンニューロンは、エストロジェンのポジティブフィードバックを仲介し、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) / 黄体形成ホルモン (LH) サージを誘起する排卵中枢であると考えられている。本稿では、哺乳類の排卵を制御する脳内メカニズムについてわれわれの最新の研究成果を含めて概説したい。

1. キスペプチン-GPR54シグナリングの発見

キスペプチン (当初はメタスチンと命名) は、2001年に武田薬品工業の大瀧らによってヒトの胎盤から発見された。大瀧らは、1996年に腫瘍転移抑制遺伝子として報告されていた *Kiss1* 遺伝子¹⁾ の転写産物であるメタスチンがオーファン受容体 GPR54 の内因性リガンドであることを明らかにした²⁾。2003年に米国とフランスの2つのグループにより、低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の患者に *GPR54* 遺伝子の機能喪失型変異が報告されると、キスペプチン-GPR54シグナルの生殖機能への関与に大きな注目が集まった^{3,4)}。この突然変異を持つ患者では、ゴナドトロピン分泌が著しく減弱し、*GPR54* 変異を持たない特発性ゴナドトロピン分泌低下症の患者と比較して、外因性 GnRH への反応性が高かった⁴⁾。また、*Gpr54* ノックアウト (KO) マウスは、卵胞発育を示さず性成熟が起きなかった一方、外因性 GnRH またはゴナドトロピンの両方に反応性を示し、視床下部における GnRH レベルは正常であった⁴⁾。その後、多くの研究によって GnRH ニューロンに *GPR54* が発現していること

や^{5,6)}、ラット⁷⁻⁹⁾やマウス¹⁰⁾、サル¹¹⁾などの実験動物やヤギ¹²⁾、ヒツジ¹³⁾、ウシ¹⁴⁾などの家畜、さらにはヒト¹⁵⁾において、キスペプチンが GnRH/LH の分泌を強力に促す神経ペプチドであることが示された。これらより、キスペプチンは哺乳類に共通して、生殖を第一義的に制御する神経ペプチドであることが明らかとなり、キスペプチン-GPR54シグナリングの発見は生殖内分泌分野において、GnRH の発見に次ぐパラダイムシフトをもたらした。

2. 生殖中枢として機能するキスペプチンニューロン

キスペプチンニューロンの細胞体は、主に視床下部の2つの領域、すなわち AVPV (げっ歯類) / POA (げっ歯類以外) と弓状核に局在する。これまでの膨大なキスペプチン研究の成果により、AVPV/POA のキスペプチンニューロンが GnRH/LH サージを制御する排卵中枢であり、弓状核の同ニューロンが GnRH / ゴナドトロピンパルスを制御する卵胞発育中枢であると考えられている (図1)。その根拠となった成果の一部を紹介しよう。われわれが作出した *Kiss1* KO ラットでは、LH サージおよび LH パルスは消失し、卵巣では3次卵胞以降の発育卵胞が認められずに不妊を呈する¹⁶⁾。また、両神経核のキスペプチンニューロンには、エストロジェン受容体 α (ER α) が発現しており^{8,17,18)}、AVPV/POA キスペプチンニューロンでは、エストロジェンによって *Kiss1* 発現が促進され、同ニューロンが活性化される^{17,19,20)}。このため、AVPV/POA キスペプチンニューロンは、エストロジェンのポジティブフィードバックを仲介し、GnRH/LH サージを誘起する排卵中枢として機能すると考えられる。一方、弓状核キスペプチンニューロンでは、エストロジェンにより *Kiss1* 発現が抑制される^{8,17,21)}。また、*Kiss1*-floxed ラットを作出し、アデノ随伴ウイルスにより Cre 組み換え酵素を強制発現させ、弓状核においてのみ *Kiss1* 遺伝子発現を欠損させると、AVPV キスペプチンニューロンが残存していても、LH パルスが消失した²²⁾。これらの結果から、弓状核の同ニューロンは、エ

連絡先: 井上直子 名古屋大学大学院生命農学研究科
動物生殖科学
〒464-0814 愛知県名古屋市千種区不老町
TEL : 052-789-4074
FAX : 052-789-4072
E-mail : ninoue@agr.nagoya-u.ac.jp

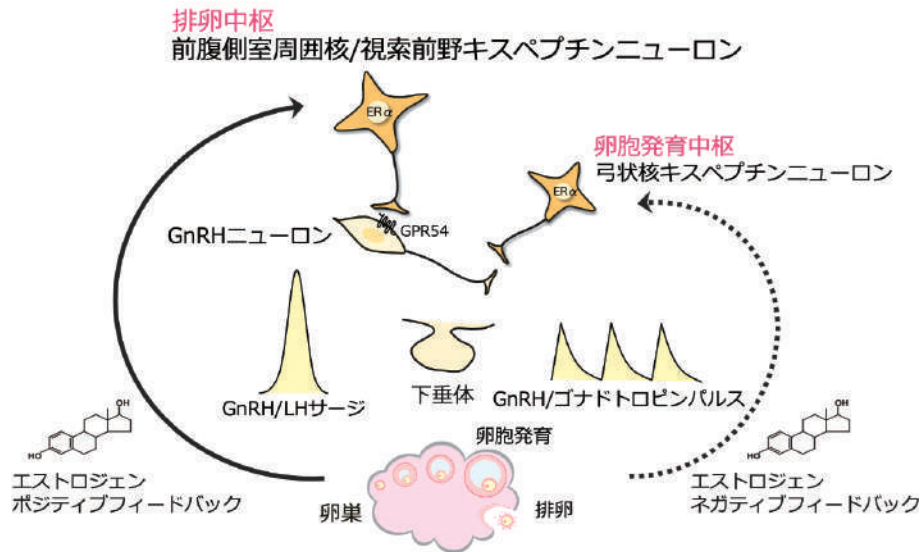


図1 生殖中枢として機能するキスペプチンニューロン
キスペプチンニューロンは、前腹側室周囲核(げっ歯類)/視索前野(POA, げっ歯類以外)と弓状核に局在する。AVPV/POAキスペプチンニューロンは、排卵中枢として機能する。卵胞が十分に発育して血中のエストロゲン濃度が高まると、エストロゲンのポジティブフィードバック作用により、AVPV/POAのキスペプチンニューロンにおけるキスペプチン遺伝子発現の上昇と同ニューロンの活性化が促され、GnRH/LHサージが起こり、排卵が生じる。一方、弓状核キスペプチンニューロンは、GnRH/ゴナドトロピンパルスを制御する卵胞発育中枢として機能する。発育中の卵胞から分泌される低レベルのエストロゲンのネガティブフィードバック作用は、弓状核キスペプチンニューロンを介してGnRH/LHのパルスを微調整することで、卵胞を適正に発育させる。

ストロジェンのネガティブフィードバックを仲介し、GnRH/LHパルスを調節する卵胞発育中枢として機能すると考えられる。興味深いことに、弓状核の *Kiss1* 遺伝子発現を欠損させたラット(すなわち AVPV の *Kiss1* 遺伝子は残存)に卵巣除去後に発情前期レベルのエストラジオールを代償投与(発情前期モデル)すると、LHサージを誘起できることから²²⁾、AVPVキスペプチンニューロンがGnRH/LHサージを制御する排卵中枢として機能することを証明することができた。

3. エストロゲンによる *Kiss1* 発現制御の分子メカニズム

われわれは、エストロゲンによる AVPV *Kiss1* 発現の亢進が、*Kiss1* プロモーター領域のヒストンアセチル化によって制御されることを明らかにした²³⁾。マウスの AVPV 組織を用いて、アセチル化ヒストン H3 抗体や ERα 抗体による ChIP アッセイを行ったところ、卵巣除去群に比べて発情前期モデルにおいて、*Kiss1* プロモーター領域におけるヒストン H3 アセチル化が有意に促進され、*Kiss1* プロモーター領域における ERα 結合が促進された。一方、マウス弓状核組織においては、発情前期モデルにおける *Kiss1* プロモーター領域におけるヒスト

ン H3 アセチル化が卵巣除去群と比べて有意に抑制され、*Kiss1* プロモーター領域における ERα 結合も抑制された。さらに、通常 *Kiss1* を発現しないマウス視床下部由来不死化細胞株(N6)において、ヒストン脱アセチル化阻害剤であるトリコスタチン A を添加したところ、*Kiss1* 発現が誘起された。これらの一連の結果から、*Kiss1* プロモーターにおけるエストロゲン依存的ヒストン H3 の活性化修飾が、AVPV *Kiss1* の発現誘導をもたらすことを示唆した。また、われわれは遺伝子改変マウスによる *in vivo* レポーターアッセイにより、*Kiss1* 遺伝子座 3' 領域に、AVPV における *Kiss1* 発現を制御するエンハンサーが存在することを明らかにした²³⁾。*Kiss1* 遺伝子座周辺領域におけるエピジェネティック修飾に伴うクロマチン構造の変化を Chromosome Conformation Capture (3C) 法で解析したところ、エストロゲン存在下で 3' エンハンサー領域が *Kiss1* プロモーター領域に接近することを見いだした。これらにより、エストロゲンが *Kiss1* プロモーター領域において、ERα のリクルートとヒストンアセチル化を誘導するとともに、プロモーター領域とエンハンサー領域とのクロマチンループの形成を促進することで、AVPV *Kiss1* 発現を誘起することが示唆された。現在われわれは、*Kiss1* の転写を調節する ERα 転写共役因子の同定に取り組んでおり、近い将

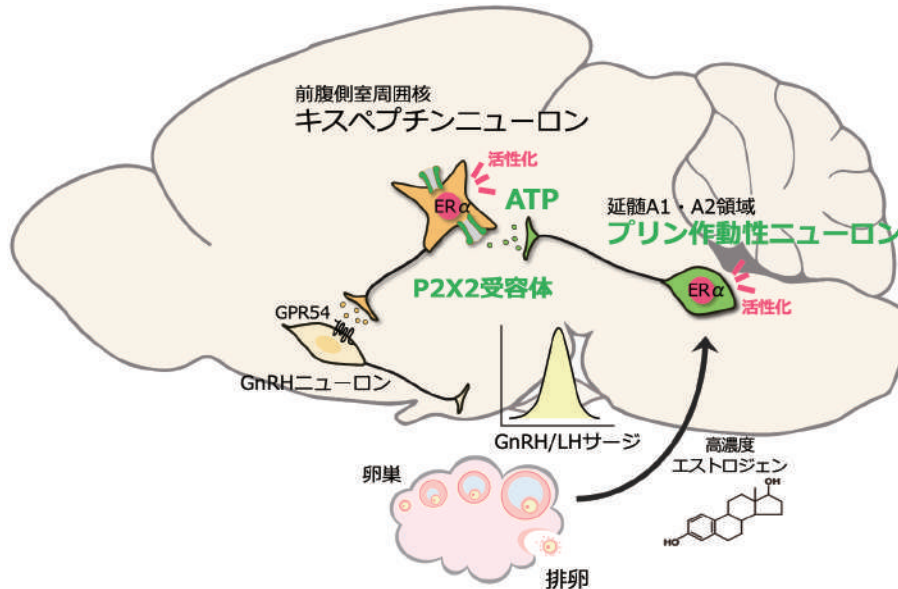


図2 プリン作動性ニューロンによるキスペプチンニューロン活性化と排卵誘起
 ラットにおいて、卵胞が十分に成熟し血中エストロゲン濃度が高くなると（発情前期レベルエストロゲン）、エストロゲン受容体 α を介して延髄A1およびA2領域のプリン作動性ニューロンが活性化され、神経伝達物質として終末から放出されたATPが、前腹側室周囲核キスペプチンニューロンのP2X2受容体を介して同ニューロンを活性化し、GnRH/LHサージ分泌、ひいては排卵を誘起すると考えられる。

来、エストロゲンによる視床下部の両キスペプチンニューロンにおける *Kiss1*発現調節メカニズムの全容を解明したいと考えている。

4. アデノシン三リン酸 (ATP) による排卵中枢キスペプチンニューロンの活性化

AVPV/POA キスペプチンニューロンが活性化するには、エストロゲンによって *Kiss1*発現が亢進するだけでなく、上位からの興奮性シグナルの入力が必要であると考えられる。なぜなら、卵巣除去ラットに発情前期レベルの高濃度エストロゲンまたは発情休止期レベルの低濃度エストロゲンのいずれを投与しても同レベルの *Kiss1*発現が誘起される一方、LHサージは発情前期レベルのエストロゲン存在下においてのみ誘起されるからである¹⁷⁾。

われわれは最近、プリン作動性神経が、エストロゲンによるAVPVキスペプチンニューロンの活性化を担う上位ニューロンであることを明らかにした²⁴⁾。まず、ラットキスペプチン蛍光可視化細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行い²⁵⁾、細胞の興奮に関与する受容体を探索したところ、興奮性イオンチャネルの一つであるプリン受容体 (P2X2受容体) がAVPVの *Kiss1*発現細胞にのみ高く発現することを見いだした²⁴⁾。ATPは、一

般に細胞内のエネルギー通貨として知られるが、脳内ではプリン作動性ニューロンから分泌される神経伝達物質としても機能している。そこで、発情前期ラットのAVPVキスペプチンニューロン近傍にプリン受容体 (P2X受容体) 拮抗剤であるPPADSを投与した結果、対照群と比較してLHサージが著しく抑制されるとともに、排卵された卵子の数が有意に減少した。さらに、発情前期モデルラットのAVPVにPPADSを投与したところ、LHサージが完全に消失した。加えて、発情前期モデルラットのAVPVキスペプチンニューロン近傍にATPを投与すると、すぐさまLHサージ様の分泌が誘起された一方で、*Kiss1* KOラットにATPを投与してもLHサージを誘起できなかった。これらの結果は、ATPが、AVPVキスペプチンニューロンを介してLHサージとそれに引き続く排卵を促すことを示唆している。

続いて、発情前期レベルのエストロゲンがP2X2受容体やプリン作動性ニューロンに及ぼす影響を免疫組織化学により検討したところ、発情前期モデルラットでは、AVPVキスペプチンニューロンにおけるP2X2受容体発現が発情休止期モデルに比べて増加していた。また、AVPVキスペプチンニューロン近傍に投射するプリン作動性ニューロンの線維がエストロゲン処置により増加した一方で、GnRHニューロン近傍には、プリン作動性ニューロンの投射はほとんど見られなかった。

さらに、キスペプチンニューロンを活性化させるプリン作動性ニューロンの起始核を組織学的に検討したところ、発情前期モデルラットの延髄 A1 および A2 領域では、c-Fos タンパク（神経活性化マーカー）を共発現するプリン作動性ニューロンが発情休止期モデルラットと比較して有意に増加することが明らかになった。また、延髄 A1 および A2 領域のプリン作動性ニューロンの一部は ERα を発現し、さらに AVPV キスペプチンニューロンの近傍に投射していることを見いだした。これらのことから、発情前期レベルのエストロジェンがラット後脳の延髄 A1 および A2 プリン作動性ニューロンの活動を刺激し、放出された ATP が AVPV キスペプチンニューロンを興奮させ GnRH/LH サージ、ひいては排卵を引き起こすことが示唆された（図 2）。

5. 嗅覚刺激による排卵中枢キスペプチンニューロンの活性化

他個体からの嗅覚刺激は、性成熟、性周期、排卵などの生殖機能を調節することが知られている。メスのラット²⁶⁾ やヤギ²⁷⁾、ヒツジ²⁸⁾ では、オス由来の嗅覚刺激により LH サージが増強されることが報告されており、これはオスの存在下での排卵をより確実にするための生殖戦略の一つと考えられる。われわれは、オスラット由来の嗅覚刺激がメスラット AVPV のキスペプチンニューロンを活性化することで、LH サージが増強することを示した²⁹⁾。具体的な実験内容をご紹介します。オスラットを 1 週間飼育したケージからオスラットを取り除いた後、同ケージへ発情前期モデルメスラットを一時間導入した群（オス床敷曝露群）と、未使用の床敷きケージに発情前期モデルメスラットを一時間導入した群（未使用床敷曝露対照群）を比較した。その結果、オス床敷曝露群の AVPV において c-Fos を共発現したキスペプチンニューロンが、未使用床敷曝露対照群と比較して有意に増加した。また、オス床敷曝露開始直後より、メスラットにおける血中 LH 濃度が増加し、LH サージのピーク値は未使用床敷曝露対照群と比べ有意に高かった。これらより、オスラット由来の嗅覚刺激は、メスラット AVPV キスペプチンニューロンを活性化させることにより GnRH/LH サージを増強することを示した。

主嗅覚系や鋤鼻系の嗅覚情報を仲介する神経シグナルは、分界条床核、扁桃体皮質核、扁桃体内側核などの大脳辺縁系で中継され、視床下部に入力すると考えられる。オス床敷曝露群では、対照群と比較して分界条床核、扁桃体皮質核、および扁桃体内側核における c-Fos 発現細

胞数が有意に増加した。このことは、オスラット由来の嗅覚シグナルが、大脳辺縁系を經由して AVPV キスペプチンニューロンを活性化する可能性を示唆している。すなわち、AVPV キスペプチンニューロンは、これらの大脳辺縁系ニューロンからの情報を統合して、GnRH/LH サージ、ひいては排卵を制御すると考えられる。

6. 交刺刺激による排卵中枢キスペプチンニューロンの活性化

哺乳類は交尾の有無によらず排卵を周期的に繰り返す自然排卵動物と、オスと交尾した場合のみ排卵する交尾排卵動物に分類される。ラットやマウス、ウシやブタ、ヒトを含む自然排卵動物では、性成熟を迎えるとオスとの交尾なしで、卵胞の成熟、排卵が周期的に生じる。一方、スルクス (*Suncus murinus*) やウサギなどの交尾排卵動物は、交尾刺激によってのみ排卵するので発情周期を示さない。これは、限られた交尾の機会を逃さず妊娠を成功させるための交尾排卵動物特有の生殖戦略である。われわれはスルクスにおいて、オスからの交尾刺激がメスの POA キスペプチンニューロンを活性化することを明らかにし³⁰⁾、キスペプチンニューロンが交尾排卵動物でも排卵を制御することを突き止め、大きな反響を得た。

まず、スルクスの *Kiss1* 遺伝子をクローニングし、視床下部における *Kiss1* 発現を組織学的に検討したところ、他の動物と類似して、POA および弓状核に *Kiss1* 発現細胞が局在していた。さらに、エストロジェンによって POA では *Kiss1* 発現が促進し、弓状核では抑制されたことから、スルクスにおいても POA キスペプチンニューロンがエストロジェンのポジティブフィードバックを仲介する排卵中枢として機能していることが示唆された。そこで、合成したスルクスキスペプチンをメススルクスの皮下に単回投与したところ、交尾刺激がなくても排卵が誘起された。また、このキスペプチン投与による排卵誘起効果が、GnRH 受容体拮抗剤の前投与でまったく見られなくなったことから、スルクスにおいてもキスペプチンが GnRH 放出を刺激し、ひいては排卵を誘起することを示唆した。続いて、オスからの交尾刺激によって、キスペプチンニューロンが活性化するかどうかを免疫組織化学により検討したところ、未交尾のスルクスでは POA キスペプチンニューロンに c-Fos の共発現はほとんど認められなかったが、オスと交尾したスルクスにおいて、c-Fos を共発現する POA キスペプチンニューロンが有意に増加した。一方で、弓状核キスペ

チンニューロンではこのような変化は見られなかった。これらの結果により、スunksにおいて交尾刺激は、POAキスペプチンニューロンを活性化させることによってGnRH分泌を刺激することが示唆された。すなわち、交尾排卵動物においてもPOAキスペプチンニューロンは、卵巣由来の血中エストロゲンレベルと交尾刺激に由来する神経情報を統合して、GnRH/LHサージ、ひいては排卵を制御すると考えられる。

終わりに

このように哺乳類では、AVPV/POAキスペプチンニューロンがエストロゲンに加えてさまざまな神経シグナルを統合することで、GnRH/LHサージ、ひいては排卵を制御している。現在は、われわれの研究室で独自に得た*Kiss1-Cre* 遺伝子改変ラットを駆使し、AVPV/POAキスペプチンニューロンの活性化を制御するさらなる神経シグナルの同定や、エストロゲンが*Kiss1*発現を促進する細胞内メカニズムの解明に取り組んでいる。これらの研究を通して、排卵を司る脳内メカニズムの全容解明に迫りたいと考えている。また、これらの基礎的知見が、医療や畜産現場における排卵障害の原因解明や排卵促進技術開発に資することを願っている。

引用文献

- Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR (1996) *KiSS-1*, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88, 1731-1737.
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M (2001) Metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411, 613-617.
- De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the *KiSS1*-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10972-10976.
- Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MBL, Crowley WF, Aparicio SAJR, Colledge WH (2003) The GPR 54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349, 1614-1627.
- Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA (2004) Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of *KiSS-1* mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80, 264-272.
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MBL, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SAJR (2005) Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 1761-1766.
- Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T (2004) Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 383-388.
- Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda KI (2005) Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146, 4431-4436.
- Pheng V, Uenoyama Y, Homma T, Inamoto Y, Takase K, Yoshizawa-Kumagaye K, Isaka S, Watanabe TX, Ohkura S, Tomikawa J, Maeda KI, Tsukamura H (2009) Potencies of centrally- or peripherally-injected full-length kisspeptin or its C-terminal decapeptide on LH release in intact male rats. *J Reprod Dev* 55, 378-382.
- Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA (2004) A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145, 4073-4077.
- Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM (2005) Increased hypothalamic GPR 54 signaling: A potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 2129-2134.
- Ohkura S, Takase K, Matsuyama S, Mogi K, Ichimaru T, Wakabayashi Y, Uenoyama Y, Mori Y, Steiner RA, Tsukamura H, Maeda KI, Okamura H (2009) Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J Neuroendocrinol*, 21, 813-821.
- Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben Saïd S, Morrissey A, Cognie J, Doughton B, Baril G, Briant C, Clarke IJ (2007) Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*, 148, 5258-5267.
- Naniwa Y, Nakatsukasa K, Setsuda S, Oishi S, Fujii N, Matsuda F, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda KI, Ohkura S (2013) Effects of full-length kisspeptin administration on follicular development in Japanese black beef cows. *J Reprod Dev*, 59, 588-594.
- Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatgei MA, Bloom SR (2005) Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 6609-6615.
- Uenoyama Y, Nakamura S, Hayakawa Y, Ikegami K, Watanabe Y, Deura C, Minabe S, Tomikawa J, Goto T, Ieda N, Inoue N, Sanbo M, Tamura C, Hirabayashi M, Maeda KI, Tsukamura H (2015) Lack of pulse and surge modes and glutamatergic stimulation of luteinising hor-

- hormone release in *Kiss1* knockout rats. *J Neuroendocrinol*, 27, 187–197.
17. Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda KI (2007) Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev*, 53, 367–378.
 18. Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A (2006) Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett*, 401, 225–230.
 19. Watanabe Y, Uenoyama Y, Suzuki J, Takase K, Suetomi Y, Ohkura S, Inoue N, Maeda KI, Tsukamura H (2014) Oestrogen-induced activation of preoptic kisspeptin neurons may be involved in the luteinising hormone surge in male and female Japanese monkeys. *J Neuroendocrinol*, 26, 909–917.
 20. Matsuda F, Nakatsukasa K, Suetomi Y, Naniwa Y, Ito D, Inoue N, Wakabayashi Y, Okamura H, Maeda KI, Uenoyama Y, Tsukamura H, Ohkura S (2015) The luteinising hormone surge-generating system is functional in male goats as in females: involvement of kisspeptin neurones in the medial preoptic area. *J Neuroendocrinol*, 27, 57–65.
 21. Uenoyama Y, Inoue N, Nakamura S, Tsukamura H (2021) Kisspeptin neurons and estrogen-estrogen receptor α signaling: Unraveling the mystery of steroid feedback system regulating mammalian reproduction. *Int J Mol Sci*, 22, 9229.
 22. Nagae M, Uenoyama Y, Okamoto S, Tsuchida H, Ikegami K, Goto T, Majarune S, Nakamura S, Sanbo M, Hirabayashi M, Kobayashi K, Inoue N, Tsukamura H (2021) Direct evidence that KNDy neurons maintain gonadotropin pulses and folliculogenesis as the GnRH pulse generator. *Proc Natl Acad Sci*, 118, e2009156118.
 23. Tomikawa J, Uenoyama Y, Ozawa M, Fukanuma T, Takase K, Goto T, Abe H, Ieda N, Minabe S, Deura C, Inoue N, Sanbo M, Tomita K, Hirabayashi M, Tanaka S, Imamura T, Okamura H, Maeda K-i., Tsukamura H (2012) Epigenetic regulation of *Kiss1* gene expression mediating estrogen-positive feedback action in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E1294–E1301.
 24. Inoue N, Hazim S, Tsuchida H, Dohi Y, Ishigaki R, Takahashi A, Otsuka Y, Yamada K, Uenoyama Y, Tsukamura H (2023) Hindbrain adenosine 5-triphosphate (ATP)-purinergic signaling triggers LH surge and ovulation via activation of AVPV kisspeptin neurons in rats. *J Neurosci*, 43, JN-RM-1496–22.
 25. Assadullah, Ieda N, Kawai N, Ishii H, Ihara K, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H (2018) Co-expression of the calcitonin receptor gene in the hypothalamic kisspeptin neurons in female rats. *Reprod Med Biol*, 17, 164–172.
 26. Beltramino C, Taleisnik S (1983) Release of LH in the female rat by olfactory stimuli: Effect of the removal of the vomeronasal organs or lesioning of the accessory olfactory bulbs. *Neuroendocrinology*, 36, 53–58.
 27. Chemineau P (1987) Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats—a review. *Livest Prod Sci*, 17, 135–147.
 28. Martin GB, Oldham CM, Cognié Y, Pearce DT (1986) The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams—A review. *Livest Prod Sci*, 15, 219–247.
 29. Watanabe Y, Ikegami K, Ishigaki R, Ieda N, Uenoyama Y, Maeda KI, Tsukamura H, Inoue N (2017) Enhancement of the luteinising hormone surge by male olfactory signals is associated with anteroventral periventricular *Kiss1* cell activation in female rats. *J Neuroendocrinol*, 29, 1–9.
 30. Inoue N, Sasagawa K, Ikai K, Sasaki Y, Tomikawa J, Oishi S, Fujii N, Uenoyama Y, Ohmori Y, Yamamoto N, Hondo E, Maeda K, Tsukamura H (2011) Kisspeptin neurons mediate reflex ovulation in the musk shrew (*Suncus murinus*). *Proc Natl Acad Sci*, 108, 17527–17532.

研究から見えてきた生殖領域の新しい視点

吉野 修, 小野 洋輔

山梨大学医学部産婦人科

1. cine-MRI の研究

これまで、われわれの研究グループは月経困難症研究の観点からプロスタグランジンによる子宮収縮に注意を払ってきた。一方で子宮の収縮には生理的な意義がある、との仮説の下、われわれは cine MRI (動画 MRI) による検討により、子宮収縮には正常女性において月経周期内で変化があることを報告してきた。具体的には月経期に子宮筋層全体が子宮底部から子宮頸部方向に運動することで、月経血を子宮内腔より排出する作用があり、排卵期は子宮内膜直下の筋層が子宮頸部から底部に向かって運動することで、精子を汲み上げる働きをしていることを認めている。また、一方で着床期には、子宮内膜の蠕動様運動は殆ど見られなくなる。これら子宮内膜の蠕動様運動は女性ホルモンにより制御されており、エストロゲンは運動亢進を、プロゲステロンは運動抑制に寄与することが知られている^{1,2)}。

子宮筋腫、特に筋層内子宮筋腫が不妊症に与える影響はよくわかっておらず、また不妊症の観点からはその取扱いに苦慮することが多い。われわれは子宮筋腫により誘導される子宮内膜の異常蠕動様運動に着目し、これらが不妊症患者に対し悪影響を与えているかを検討した。MRI 検査を着床期に行ったところ、51例中22例(43.1%)と半数以下の症例で、本来は子宮内膜に蠕動様運動を認めない時期に異常運動を認めた。さらに、MRI 検査後に前方視的に妊娠について調査を行ったところ、蠕動様運動を高頻度に認めた22例中に妊娠症例を認めなかった(0%)のに対し、低頻度群では29例中10例(34%)に妊娠を認めた(図1)。低頻度群と高頻度群を比較したところ、子宮筋腫の個数、最大径、内腔の変形をきたしている患者の割合に差がなかった³⁾。

また、初回 MRI にて異常蠕動を示し、不妊治療を継続している症例(N=15)に子宮筋腫核出術を行ったところ、術後に全例で蠕動運動回数は減少し、15例中6例

に妊娠を認めた。一方、初回 MRI で異常蠕動様運動を認めなかったものの、妊娠に至らなかった11症例に筋腫核出術を行った。興味深いことに、術後 MRI では術前と同様に子宮内膜の異常蠕動様運動は認めなかったものの、その後の妊娠症例を認めなかった⁴⁾。仮説の域をでないが、このような初回 MRI にて異常蠕動様運動を認めていない症例では、子宮筋腫の存在が不妊症の原因になっておらず、筋腫核出術が不妊症の改善にはつながらなかったのかもしれない。上述したようにエストロゲンは子宮内膜の蠕動様運動を亢進させる作用がある。子宮筋腫にはエストロゲン産生に重要な酵素であるアロマターゼが発現していることから、子宮筋腫によっては局所のエストロゲン濃度が亢進することで、蠕動様運動を誘導しているのかもしれない。

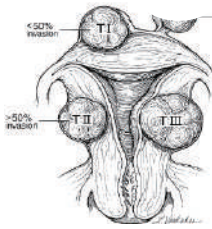
近年では、着床期に子宮の蠕動様運動が低下していた方が、妊娠率が上昇するというコンセプトが広く受け入れられつつある。子宮筋腫症例を用いた解析ではないことに注意が必要であるが、オキシトシン受容体のアンタゴニストである atosiban を着床期に利用すると臨床妊娠率がリスク比で1.50倍(1.18-1.89)に上昇することが複数の論文を用いて示されている(図2)。

2. 子宮内膜症におけるマイクロファージ(MΦ)の役割について

炎症性疾患である子宮内膜症の理解が及んでいない所として、Q1. 炎症の起点はどこか、Q2. 子宮内膜症患者の腹腔内のNK細胞活性が低下している原因は何か、Q3. 子宮内膜症患者の腹腔内にはMΦのうち、M2MΦが多いがその意義はなにか? という3点が挙げられる(図3)。これらについての検討を体系立てて検討を行ってきた。子宮内膜症のリスク因子として、経血量が多いことや月経時の子宮収縮が強いことがいわれており、腹腔内に卵管を介して月経血が逆流することが、子宮内膜症の発症に寄与することが想定される。われわれは、月経血中に含まれる子宮内膜由来のIL-33や血液成分由来の脂質S1PがMΦに働きかけて、炎症性サイ

連絡先: 吉野 修 山梨大学医学部産婦人科
〒409-3898 山梨県中央市下河東1110
TEL : 055-273-9632
E-mail : oyoshino624@gmail.com

問題点) どのような筋層内筋腫が不妊症の原因になるのか判らない



子宮筋腫症例において

着床期に異常蠕動運動のある症例が不妊を呈する

子宮筋腫のある状態で
 異常蠕動 (-) 症例 妊娠率 34% (10/29例)
 異常蠕動 (+) 症例 妊娠率 0% (0/22例)

O. Yoshino et al. Hum Reprod 2010

異常蠕動運動(+)症例に対し 筋腫核出術を行うと術後妊娠率が上昇する。

術前、異常蠕動 (-) であった症例 術後妊娠率 0% (0/7例)
 異常蠕動 (+) であった症例 術後妊娠率 40% (6/15例)

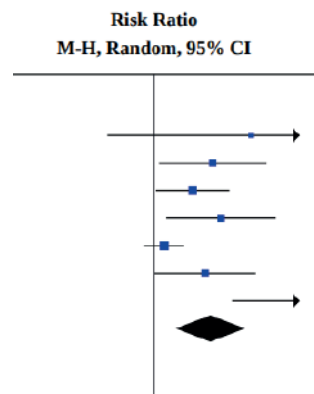
O. Yoshino et al. J Minim Invasive Gynecol 2012

図1 cine MRI を用いた子宮筋腫例の評価



7 RCTs, N = 1646

Study or Subgroup	Oxytocin antagonists		Control		Weight	Risk Ratio M-H, Random, 95% CI
	Events	Total	Events	Total		
1.4.1 Intravenous (IV) atosiban						
Ahn 2009 (1)	8	20	4	20	4.3%	2.00 [0.72, 5.59]
He 2016a (2)	35	60	23	60	14.5%	1.52 [1.03, 2.24]
Hebisha 2018 (3)	58	91	44	91	18.3%	1.32 [1.01, 1.71]
Moraloglu 2010 (4)	42	90	26	90	14.3%	1.62 [1.09, 2.39]
Ng 2014 (4)	201	400	187	400	21.9%	1.07 [0.93, 1.24]
Song 2013 (5)	36	60	25	60	15.2%	1.44 [1.00, 2.07]
Yuan 2019 (4)	46	102	16	102	11.5%	2.88 [1.75, 4.73]
Subtotal (95% CI)		823		823	100.0%	1.50 [1.18, 1.89]
Total events:	426		325			
Heterogeneity: Tau ² = 0.06; Chi ² = 19.51, df = 6 (P = 0.003); I ² = 69%						
Test for overall effect: Z = 3.36 (P = 0.0008)						



atosiban: オキシトシン受容体アンタゴニスト,

臨床妊娠率を上げる。RR 1.50 (1.18 to 1.89)

子宮収縮抑制が着床に大切では？

Craciunas L et al
 Oxytocin antagonists for assisted reproduction.
 Cochrane Database Syst Rev. 2021

図2 子宮収縮の抑制が着床に重要かもしれない

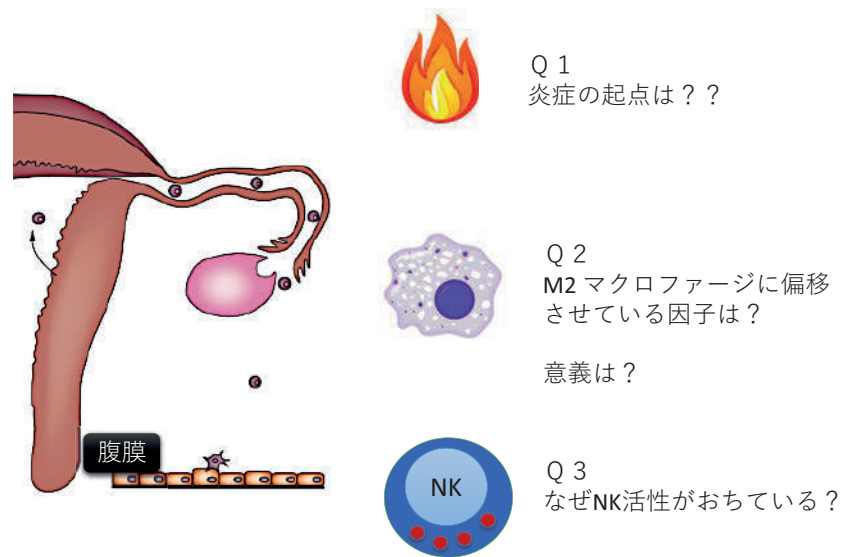


図3 子宮内膜症における疑問3つ!

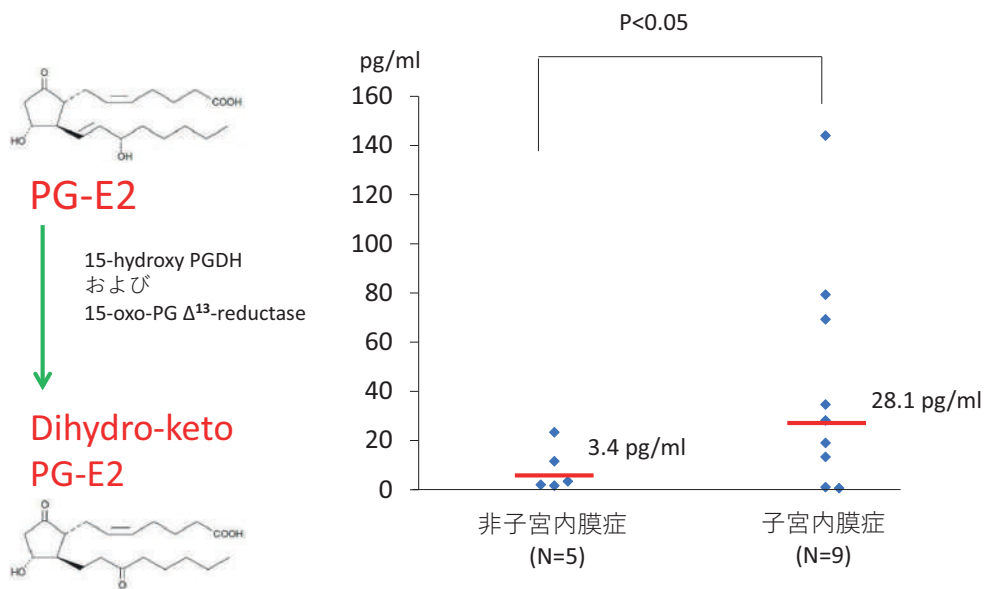


図4 腹腔内貯留液中PG-E2 およびその代謝産物 (dhk PG-E2) 濃度の合計値

トカインや COX-2 の発現および M2MΦ に誘導することを示した^{5,6)}。そして COX-2 により産生される prostaglandin-E2 (PG-E2) およびその代謝産物である Dihydro-keto PG-E2 の合計が子宮内膜症患者の腹腔内で高濃度に存在し (図 4), そして PG-E2 が NK 細胞活性を低下させることを明らかにした⁷⁾。次に, 腹腔内の M2MΦ が子宮内膜症の病態に関わるかを検討するため, 任意の時期に M2MΦ を除去することができる CD206 DTR マウスを用いて検討を行ったところ, M2MΦ は血管新生因子 VEGF を子宮内膜症様細胞から分泌させることで血管新生を促進し, 病変増悪に働きかけることを

明らかにした⁸⁾。M2MΦ は抗炎症性や alternative (代償性) の MΦ として認識されている。このマウス実験を行った当初, 抗炎症性の作用をもつ M2MΦ を子宮内膜症モデルから除去することで, さらに炎症が助長され, 子宮内膜症様病巣が増大するのでは, という予想を立てていたが, 結果は逆であり, M2MΦ を除去することで病巣は縮小した。われわれは解析を進め, 子宮内膜症様病変にある M2MΦ の作用として, TGF-β を産生することで血管新生因子 VEGF を子宮内膜症病巣から産生させることを想定している⁸⁾。

これらのことから図 5 の構図が見えてきた。すなわち,

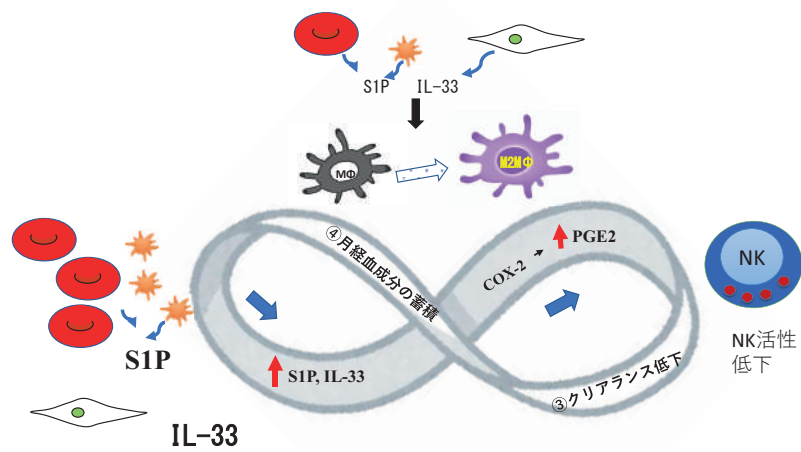


図5 腹腔内に逆流した月経血と自然免疫との関係

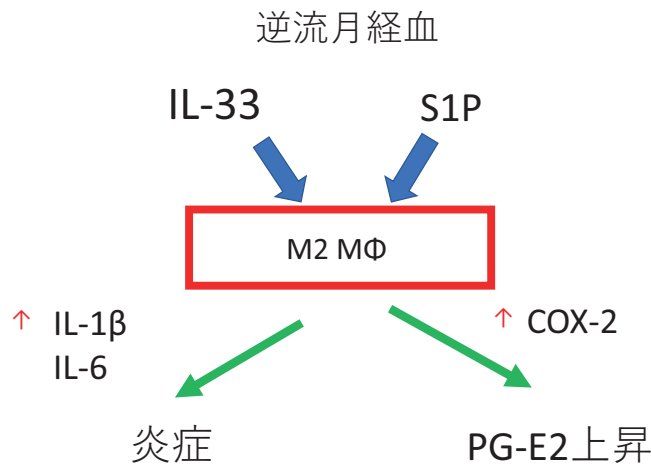


図6 逆流血が炎症を誘導する

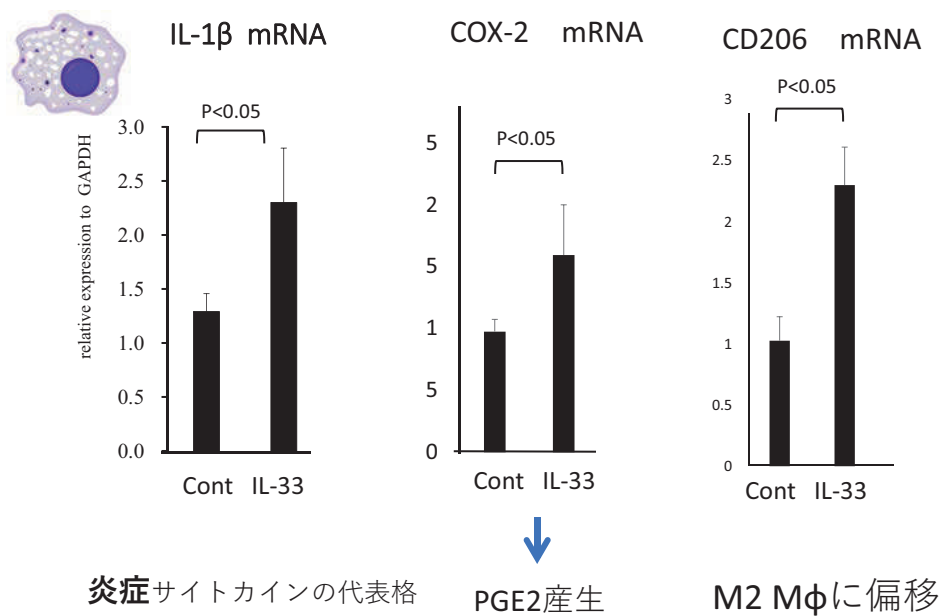


図7 MφにおけるIL-33の作用

腹腔内への逆流経血量が多いと月経血に含まれる成分、IL-33およびS1PにM ϕ が反応し、M2M ϕ に偏移しつつ炎症性サイトカイン、PG-E2が増加する(図6, 7)。PG-E2はNK活性を低下させることから、結果的に逆流経血を腹腔から除去できずさらにM2M ϕ 変異に傾く、いわゆる負のサイクルが子宮内膜症の病態だと考えた。そしてこの負のサイクルを断つためには低用量エストロゲン-プロゲステン製剤(low dose estrogen progestin: 以下LEP)といったプロゲステン作用による経血量を減らすこと、またNSAIDsによるCOX-2の発現低下が子宮内膜症の進展予防につながることを提唱したい。実際に、他グループの発表では子宮内膜症モデルでの検討で、各種NSAIDsにより子宮内膜症様病変が小さくなる事が報告されている⁹⁾。われわれの研究グループは炎症性シグナルとして重要な役割を果たすp38MAPKは腹腔内マクロファージの炎症性サイトカイン産生にも関わることを示している。具体的には、われわれは喫煙者では子宮内膜症の発生率が少ないことを参考に、喫煙、つまりニコチン刺激や $\alpha 7$ 受容体作動薬によるニコチン性アセチルコリン受容体活性化が腹腔内M ϕ におけるp38を抑制することで、抗炎症に作用することを示した¹⁰⁾(図8)。アセチルコリンは副交感神経系のトランスミッターであり、自律神経である副交感神経を刺激することが、炎症低下を介して子宮内膜症に作用するという仮説を提唱できる。実際、Lorgらの実験やわれわれの子宮内膜症マウスモデルにおいて交感神経系、副交感神経の活性化は病態をそれぞれ増悪、改善する^{10,11)}。そして、特に抗不安ということが自律神経の観点から子宮内膜症の治療に重要であることが想定された¹⁰⁾。

3. 子宮内膜症の意義とは？(仮説)

これまで子宮内膜症は炎症性の疾患でありながら、マクロファージやNK細胞といった自然免疫の活性が抑制されていることが知られている(図9)。これら自然免疫の抑制は、子宮内膜症の病態を考える上で重要かもしれない。子宮内膜症の病態として、子宮内膜が腹腔内に逆流することが原因とされる、いわゆる“逆流説”が正しい場合、自然免疫系が過剰に機能するならば、逆流した子宮内膜を異物として認識し、マクロファージは抗原提示細胞として獲得免疫を活性化し、B細胞やT細胞の活性化を通して抗子宮内膜抗体が産生され、子宮内膜に対する攻撃を開始する可能性がある。そして、子宮内膜症において自然免疫が抑制されているとするなら、この抑制は自己抗体の産生を避けるための戦略なのかもしれ

ない。つまり子宮内膜症は子宮内膜に対する自己抗体を生成させないために、自然免疫の機能を取って落とすことで、逆流子宮内膜が骨盤内に生着することを許容し、子宮内膜症が結果的に発症する、という仮説を立てることをお許しいただきたい(図10)。この考えは、高知大学産婦人科の前田長政先生も氏の講演等で提唱されており、私も前田先生の提唱に賛同している。

この仮説を進めると子宮内膜症は場合によっては、自己抗体を生成する方向に進む可能性があるということになる。実際、手稲溪仁会病院の山田秀先生と私たちの共同研究では、新規自己抗体であるネオセルフ抗体(抗 $\beta 2$ GPI/HLA-DR抗体)陽性の因子として、子宮内膜症がリスク因子になることを見いだしており、オッズ比で2.6(1.13-5.96)であった¹²⁾。これは、子宮内膜症患者では自己抗体が産生されることを示唆するが、子宮内膜症が必ずしも絶対的な不妊を意味しないという事実は、自己抗体の産生が完全には行われず、最低限に抑えられている可能性がある。まとめると、子宮内膜症は痛みや将来の卵巣癌のリスクなどの重大な症状を引き起こす一方で、自然免疫から獲得免疫への橋渡しを取って、抑える事で妊娠の可能性を完全には奪わない、という妥協の結果として存在しているかもしれない。

もしかしたら人類が子宮内膜症と組する際に取ったこの戦略には勝ち目があるのかもしれない。フィンランドからの興味深いデータを示す。手術で子宮内膜症と診断された患者を最長で27年間、計250万人年の生命予後に関するフォローを行ったところ、コントロールに比べて子宮内膜症群では生存率が高かったという事実がある¹³⁾。つまり、子宮内膜症は痛みによる患者QOL低下や卵巣癌リスクとなり、大変な病気ではあるが、うまく病気の制御ができれば生命予後を改善するのかもしれない。こうして見てみると、われわれ医療者がよいケアを提供することで、子宮内膜症患者さんの生命予後をよくできる疾患であることを示唆していると考える。

4. 山梨大学子宮内膜症ケアセンターの開設

近年、臨床の現場において、患者QOLを医療の中心に据えQOLを可視化する、いわゆる健康関連QOLを治療効果判定に用いられている。われわれは、ホルモン製剤であるlow dose estrogen-progestin (LEP)の服用が月経困難症で苦しむ女性のQOL向上に寄与すること、とくにLEP製剤は患者の精神的QOLスコアを改善することを見いだした^{14,15)}。

また、これまで基礎研究で得た子宮内膜症に関する知

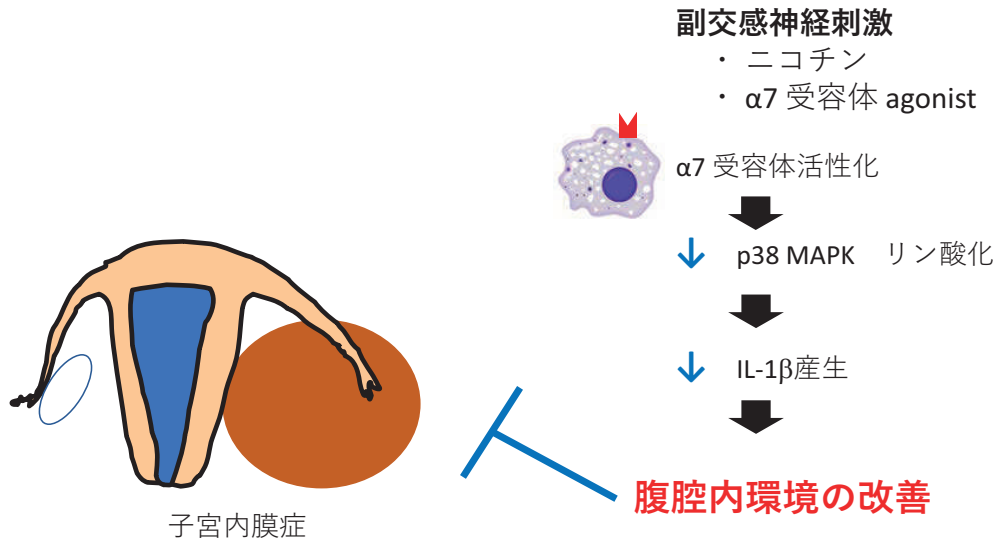


図8 副交感神経刺激が炎症を低下させるメカニズム

→ 子宮内膜症病変は獲得免疫へ
 移行させたくないための妥協点では？

子宮内膜症女性

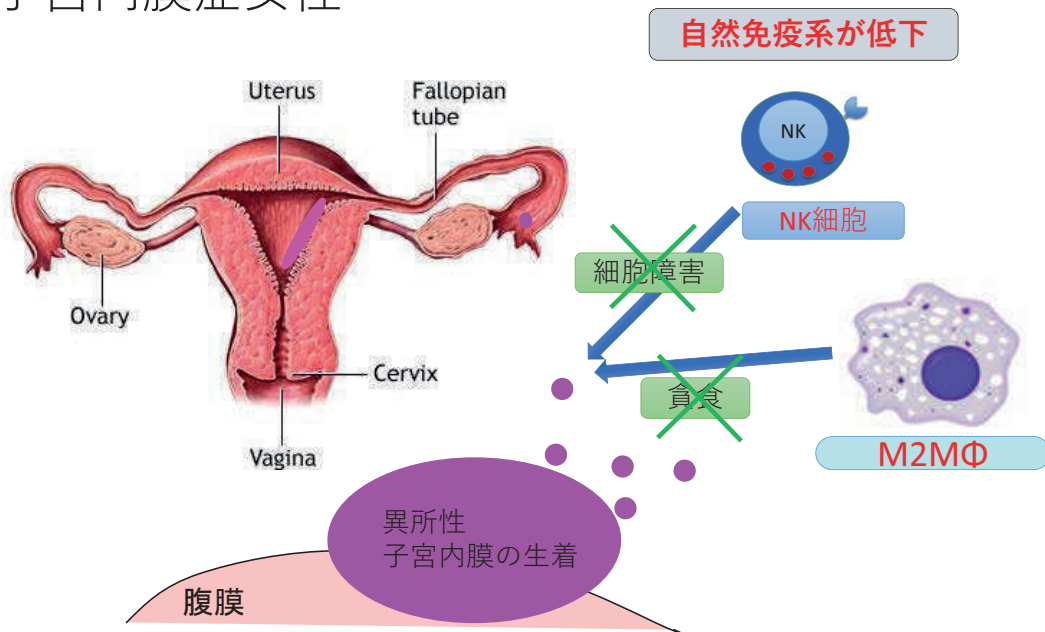


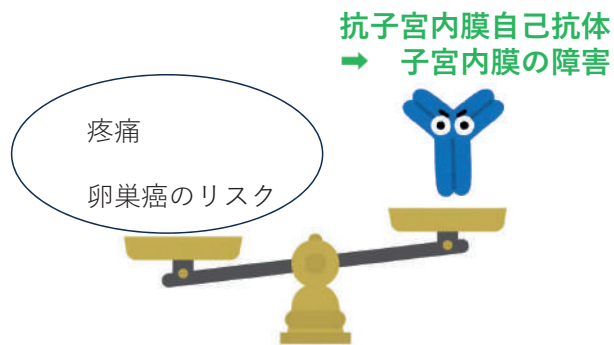
図9 子宮内膜症における自然免疫系低下の意義

見を積極的に外来に応用する必要がある。具体的には炎症性疾患である子宮内膜症の治療戦略として重要なターゲットとして、①子宮内膜および②マクロファージにおける炎症系シグナル p38MAPK の抑制が必要であり、それぞれ①子宮内膜では脱落膜化を誘導するプロゲステロン¹⁰⁾、および②マクロファージでは副交感神経系刺激であることを研究で明らかにしてきた¹⁰⁾。①に関しては、

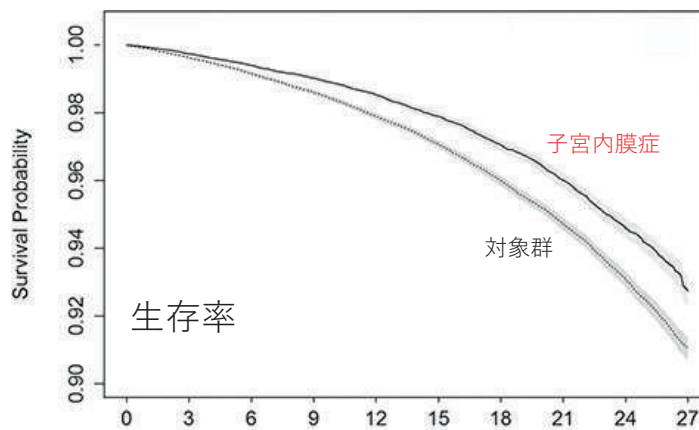
長期間の LEP 療法、プロゲステリン療法の推進が必要であり、②に関しては不安を取り除くような医療体系が必要であると考えた。

QOL 研究で見えてきたことや基礎研究で得た知見に加えて、上述させていただいたように、子宮内膜症の良いケアが患者生命予後を改善する可能性がある。そして子宮内膜症患者の不安を取り除き、患者エンパワーメン

子宮内膜症の意義とは？



子宮内膜症は 自己免疫疾患を回避する妥協点なのかもしれません。



適切に治療をしたら、生命予後的にはよい疾患！

なのかもしれません。。

図10 子宮内膜症の意義（私見）

トを高めることを目的として、山梨大学附属病院では子宮内膜症ケアセンターを開設した。特色としては、患者へのアプローチ方法としてナラティブアプローチを実践し、そして子宮内膜症治療のワンストップセンター化のために、麻酔科（痛みケア）、精神科、泌尿器科、消化器外科・内科、呼吸器外科・内科そしてリハビリテーション科を含めた協力体制を構築した。

まとめと謝辞

以上、これまで行ってきた基礎研究そして、臨床研究

を紹介させていただいた。そして、基礎研究をつづけたことで、各疾患の病態におけるエッセンスを自分なりに解釈できたことは、臨床医としてもとても大切なことであり、研究で得た知見を礎に山梨大学病院において子宮内膜症ケアセンター開設につなげることができた。

今回記した研究は、これまで多くの共同研究者の皆様のご指導、ご尽力の賜物である。この場をお借りして共同研究者の皆様にご感謝を申し上げたい。

引用文献

- Mueller A, Siemer J, Schreiner S, Koesztner H, Hoffmann I, Binder H, Beckmann MW (2006) Dittrich, R. Role of Estrogen and Progesterone in the Regulation of Uterine Peristalsis: Results from Perfused Non-Pregnant Swine Uteri. *Hum Reprod* 21, 1863–1868, doi : 10.1093/HUMREP/DEL056.
- Orisaka M, Kurokawa T, Shukunami KI, Orisaka S, Fukuda MT, Shinagawa A, Fukuda S, Ihara N, Yamada H, Itoh H, Kotsuji F (2007) A Comparison of Uterine Peristalsis in Women with Normal Uteri and Uterine Leiomyoma by Cine Magnetic Resonance Imaging. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 135, 111–115, doi : 10.1016/j.ejogrb.2006.07.040.
- Yoshino O, Hayashi T, Osuga Y, Orisaka M, Asada H, Okuda S, Hori M, Furuya M, Onuki H, Sadoshima Y, Hiroi H, Fujiwara T, Kotsuji F, Yoshimura Y, Nishii O, Taketani Y (2010) Decreased Pregnancy Rate Is Linked to Abnormal Uterine Peristalsis Caused by Intramural Fibroids. *Human Reproduction* 25, doi : 10.1093/humrep/deq222.
- Yoshino O, Nishii O, Osuga Y, Asada H, Okuda S, Orisaka M, Hori M, Fujiwara T, Hayashi T (2012) Myomectomy Decreases Abnormal Uterine Peristalsis and Increases Pregnancy Rate. *J Minim Invasive Gynecol* 19, doi : 10.1016/j.jmig.2011.09.010.
- Ono Y, Yoshino O, Hiraoka T, Akiyama I, Sato E, Ito M, Kobayashi M, Nakashima A, Wada S, Onda T, Unno N, Osuga Y (2020) IL-33 Exacerbates Endometriotic Lesions via Polarizing Peritoneal Macrophages to M2 Subtype. *Reproductive Sciences* 27, 869–876, doi : 10.1007/s43032-019-00090-9.
- Yoshino O, Yamada-Nomoto K, Kano K, Ono Y, Kobayashi M, Ito M, Yoneda S, Nakashima A, Shima T, Onda T, Osuga Y, Aoki J, Saito S (2019) Sphingosine 1 Phosphate (S1P) Increased IL-6 Expression and Cell Growth in Endometriotic Cells. *Reproductive Sciences* 26, doi : 10.1177/1933719119828112.
- Ono Y, Kawakita T, Yoshino O, Sato E, Kano K, Ohba M, Okuno T, Ito M, Koga K, Honda M, Furue A, Hiraoka T, Wada S, Iwasa T, Yokomizo T, Aoki J, Maeda N, Unno N, Osuga Y, Hirata S (2021) Sphingosine 1-Phosphate (S1P) in the Peritoneal Fluid Skews M2 Macrophage and Contributes to the Development of Endometriosis. *Biomedicine* 9, doi : 10.3390/BIOMEDICINES9111519.
- Ono Y, Yoshino O, Hiraoka T, Sato E, Furue A, Nawaz A, Hatta H, Fukushi Y, Wada S, Tobe K, Hirota Y, Osuga Y, Unno N, Saito S (2021) CD206+ Macrophage Is an Accelerator of Endometriotic-like Lesion via Promoting Angiogenesis in the Endometriosis Mouse Model. *Sci Rep* 11, doi : 10.1038/s41598-020-79578-3.
- Efstathiou JA, Sampson DA, Levine Z, Rohan RM, Zurawski D, Folkman J, D'Amato RJ, Rupnick MA (2005) Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs Differentially Suppress Endometriosis in a Murine Model. *Fertil Steril* 83, 171–181, doi : 10.1016/j.fertnstert.2004.06.058.
- Yamada-Nomoto K, Yoshino O, Akiyama I, Ushijima A, Ono Y, Shima T, Nakashima A, Hayashi S, Kadowaki M, Osuga Y, Saito S (2016) Alpha-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor (NACHR) Agonist Inhibits the Development of Endometriosis by Regulating Inflammation. *Am J Reprod Immunol* 76, 491–498, doi : 10.1111/aji.12592.
- Long Q, Liu X, Qi Q, Guo SW (2016) Chronic Stress Accelerates the Development of Endometriosis in Mouse through Adrenergic Receptor B2. *Hum Reprod* 31, 2506–2519, doi : 10.1093/HUMREP/DEW237.
- Ono Y, Wada S, Ota H, Fukushi Y, Tanimura K, Yoshino O, Arase H, Yamada H (2023) Anti-B2-Glycoprotein I/HLA-DR Antibody in Infertility. *J Reprod Immunol* 158, doi : 10.1016/J.JRI.2023.103955.
- Saavalainen L, But A, Tiitinen A, Härkki P, Gissler M, Haukka J, Heikinheimo O (2019) Mortality of Midlife Women with Surgically Verified Endometriosis—a Cohort Study Including 2.5 Million Person-Years of Observation. *Hum Reprod* 34, 1576–1586, doi : 10.1093/HUMREP/DEZ074.
- Yoshino O, Takahashi N, Suzukamo Y (2022) Menstrual Symptoms, Health-Related Quality of Life, and Work Productivity in Japanese Women with Dysmenorrhea Receiving Different Treatments: Prospective Observational Study. *Adv Ther* 39, 2562–2577, doi : 10.1007/s12325-022-02118-0.
- Yoshino O, Suzukamo Y, Yoshihara K, Takahashi N (2022) Quality of Life in Japanese Patients with Dysmenorrhea or Endometriosis-Associated Pelvic Pain Treated with Extended Regimen Ethinylestradiol/Drospirenone in a Real-World Setting: A Prospective Observational Study. *Adv Ther* 39, 5087–5104, doi : 10.1007/s12325-022-02301-3.
- Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Hirata T, Yano T, Ayabe T, Tsutsumi O, Taketani Y (2003) Endometrial Stromal Cells Undergoing Decidualization Down-Regulate Their Properties to Produce Proinflammatory Cytokines in Response to Interleukin-1 β via Reduced P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation. *J Clin Endocrinol Metab* 88, doi : 10.1210/jc.2002-021788.

ヒト子宮内膜オルガノイドモデルを用いた ヒト着床現象の模倣

柴田 峻, 有馬 隆博

東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野

緒言

近年の生殖補助医療 (ART) 技術の向上は、目覚ましい。晩婚化、晩産化が進む現代において、胚培養液や胚移植技術の発展により ART は一般に普及し、妊娠の可能性を大きく広げているが、その成功率はまだまだ十分とはいえない。その原因として、胚の着床障害が注目されている。着床とは、胚が母体の子宮内膜へ侵入し、胎盤を形成し始める一連の妊娠成立過程を指す。動物種により、この着床機序は異なることが知られている。また倫理的・技術的な制約があるため、ヒト着床の詳細な分子機序は不明な点が多く、未解決な課題も多く残されており、研究のための最適なモデルの必要性が指摘されていた。一方、近年子宮内膜上皮細胞をマトリゲル内で培養することで、ホルモン応答性の担保や長期継代を可能とした子宮内膜オルガノイド (EMO) が報告された¹⁾。しかしながら、この EMO は単純な球状構造であり、胚が接着する管腔 (アピカル) 面が露出しておらず、着床研究に供するのが困難であった。そこで私たちは、まず、アピカル面が外側に露出した新たなヒト子宮内膜モデルの開発を行い、その特性が生体の子宮内膜と類似することを確認した。次に、ナイーブ型ヒト多能性幹細胞から誘導した胚盤胞様構造 (プラストイド) を、この子宮内膜モデルと共培養することで、世界で初めてヒト胚着床を *in vitro* で再現する胚-子宮内膜アセンブロイドを作製することに成功した。このアセンブロイドを通じて、ヒト胚の着床過程について直接観察することが可能となった²⁾。このモデルについての詳細は、日本語の総説を³⁾参照していただきたい。本稿では、少し異なる視点からその内容を補いたい。

連絡先: 柴田 峻 東北大学大学院医学系研究科
情報遺伝学分野

〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町2番1号5号館9F

TEL : 022-717-7844

FAX : 022-717-7063

E-mail : shun.shibata.a3@tohoku.ac.jp

新たな子宮内膜オルガノイドモデルの作製

生体の子宮内膜組織はコラーゲンの含量が高い。私たちは EMO 培養時の 3D 培養基質に、コラーゲンを添加することを検討した。その結果、コラーゲンを用いた 3D 培養では、上皮細胞が細胞外基質の表層へ積極的に移動することを明らかにした。また、表面の上皮細胞層の高さを画像解析にて定量すると約 $20/\mu\text{m}$ であり、これはヒト子宮内腔上皮層の高さとほぼ同等であった。また、管腔面に局在する繊毛が外を向き、基底膜が内側に位置することをラミニンなどのマーカータンパク質の免疫染色により確認した。これらの特徴から、私たちはこの新たな EMO をアピカルアウト EMO (AO-EMO) と命名した (図 1A)。この AO-EMO は、表面の上皮細胞と内側の屈曲した上皮細胞とが連続し、生体の子宮内膜組織の空間構成を模倣していた。次に、トリプシン処理により、表層に露出した細胞と内部の細胞集団を区別し、遺伝子発現の違いについて検討した。表層の細胞では、生体の子宮内膜表面上皮と同様、*WNT7A* の有意な発現上昇を示した (図 1B)。遺伝子オントロジー (GO) 解析では、表層の細胞は “positive regulation of cell motility (細胞運動の正の調節)” “positive regulation of locomotion (運動の正の調節)” “positive regulation of cell migration (細胞移動の正の調節)” に関連する遺伝子が抽出され、ゲルの表層を覆うように移動する上皮細胞の表現型を反映していた。

AO-EMO のホルモン応答性

EMO はホルモン応答性を示す。AO-EMO に、エストラジオール (E_2)、メドロキシプロゲステロン酢酸エステル (MPA)、プロラクチン (PRL) などのホルモンと 8-Br-cAMP を順次添加した。その結果、AO-EMO は分泌期にみられるような子宮内膜腺の顕著な肥厚を示し、プロゲステロン受容体 (PGR) 等の発現が増加した (図 1C)。また、分泌期特異的蛋白である PAEP (グリコデリン) の分泌量は、従来のマトリゲルでの培養条件

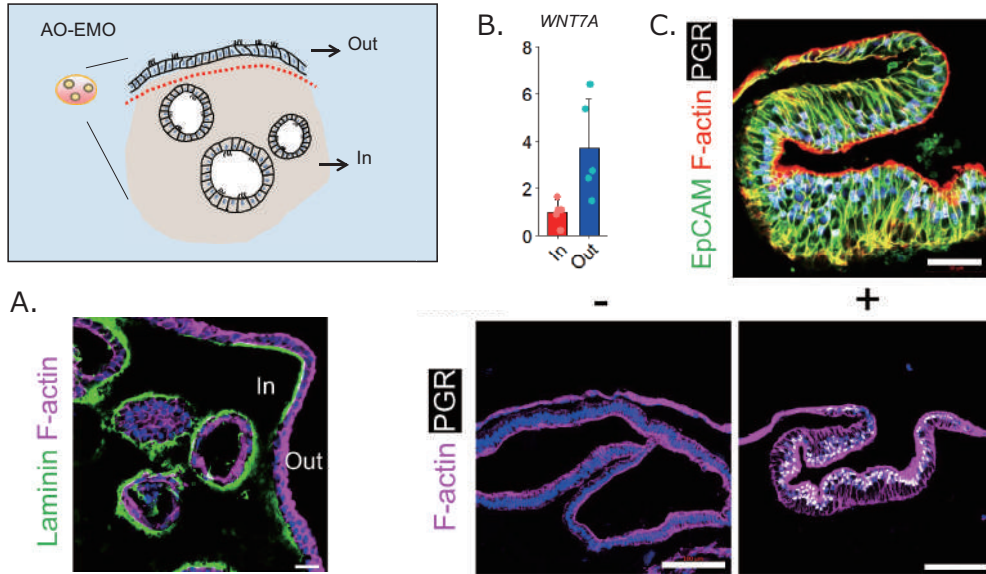


図1 新たな子宮内膜モデル (AO-EMO)
 A: 内側に基底膜を形成 B: 管腔上皮マーカー WNT7A の遺伝子発現 C: ホルモン応答性

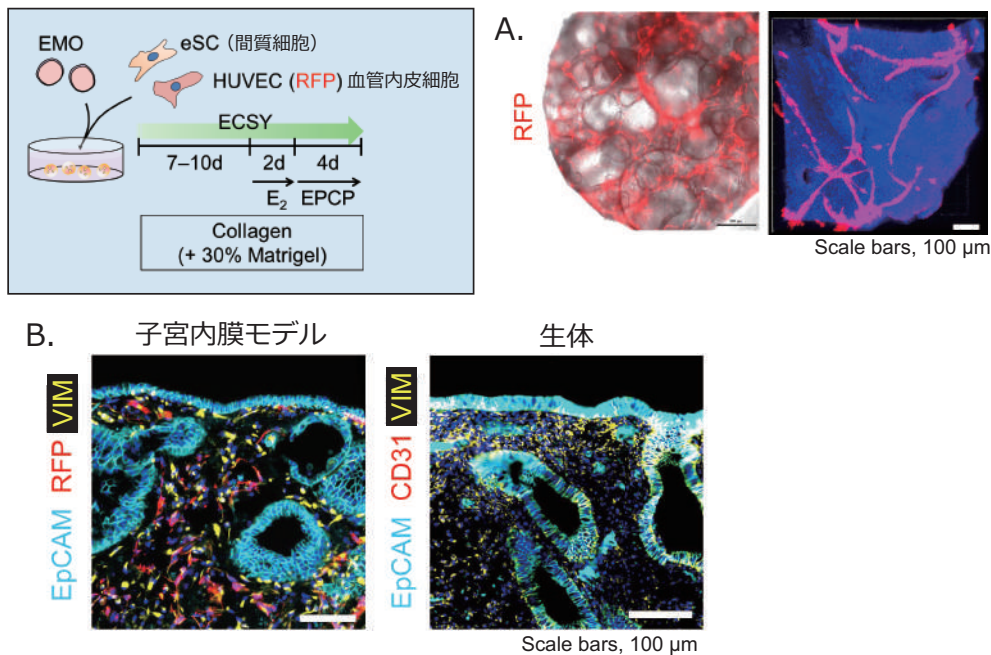


図2 複合型子宮内膜モデルの作製
 A: 血管網ネットワークを形成 B: 生体の子宮内膜組織に類似した構造

よりも上昇していた。これらの結果より、AO-EMO のホルモン応答による成熟が、従来のマトリゲルを用いた EMO よりも高度であることを示唆していた。また、コラーゲン培養は、低酸素下での子宮内膜組織の修復時にみられる遺伝子発現パターンを示すことも明らかとなった。

複合型子宮内膜モデルの作製

子宮内膜組織は上皮細胞に加え、間質細胞、血管内皮細胞等により構成されている。私たちはまず、赤色蛍光タンパク質 (RFP) を発現する血管内皮細胞 (HUVEC) を、EMO と共培養した。その結果、HUVEC 同士が連結し、自律的に血管網を形成した (図 2 A)。また、この血管網は、内部に空洞を有する管腔構造を形成してい

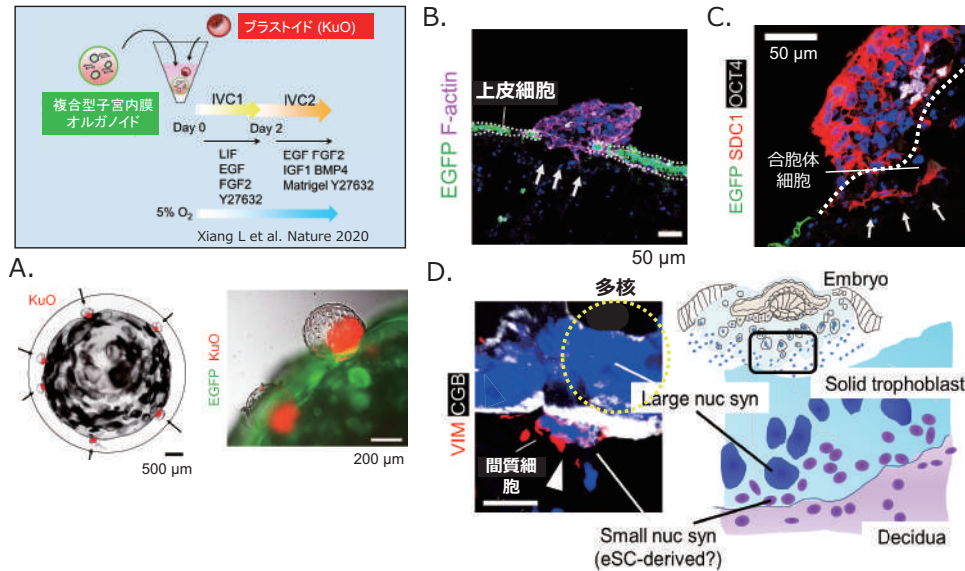


図3 ヒト Blastoid と子宮内膜モデルによる 3D 着床モデルの創出
 A: 着床モデルによる胚浸潤の再現 B: 上皮細胞の破壊 C: 合胞体細胞の浸潤 D: 原始合胞体様構造の出現

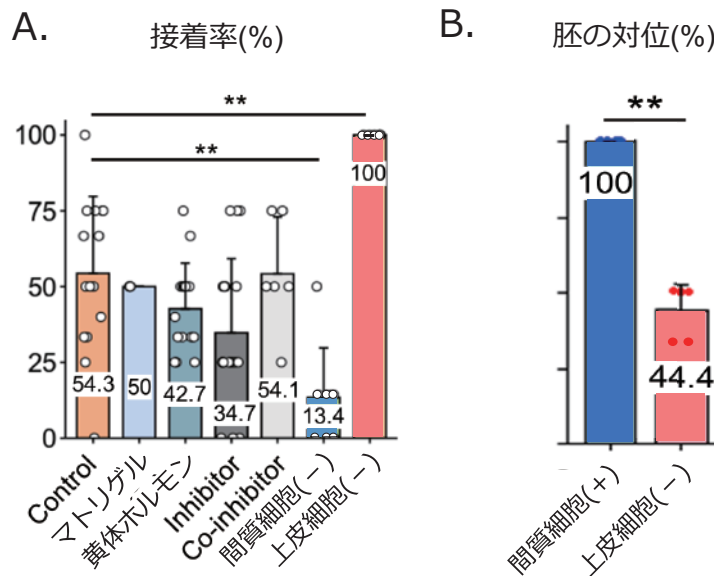


図4 胚着床への影響因子の検討
 A: 間質細胞と上皮細胞は、ブラストイドの着床率に大きな影響を及ぼす。
 B: 子宮内膜上皮を除いたモデルでは、着床の方向性がランダムとなる。

ることを確認した。さらに、間質細胞、HUVEC をコラーゲンベースのゲルに混合することで、生体内の子宮内膜組織と同様の空間配置と構成細胞を有する複合型ヒト子宮内膜モデルの作製に成功した(図2B)。遺伝子発現から総合的に評価するために、シングルセルのトランスクリプトーム解析を実施し、生体と類似することも確認した。以上より、細胞組成と空間的配置を模倣した、子宮内膜モデルの開発に世界で初めて成功した。

ヒト胚の着床を模倣する胚-子宮内膜アセンブロイドモデル

近年、ヒト胚の代替資源として、ヒト多能性幹細胞から誘導される胚盤胞様の構造であるブラストイド³⁻⁵⁾が注目されている。私たちは前出の複合型子宮内膜モデルとブラストイドを共培養し、その相互作用について検討した。子宮内膜上皮細胞を追跡するため、レンチウイルス

を用い緑色蛍光タンパク質(GFP)を遺伝子導入し, GFPを恒常的に発現するEMOを樹立した. また, Kusabira Orange (KuO)を導入したナイーブ型ヒトES細胞からプラストイドを作製し, 複合型EMOと浮遊培養で共培養を行った(図3A). その結果, プラストイドはICM側からEMOに接着し, さらに内部に入り込むように扁平化した. プラストイドの接着面では子宮内膜上皮が破壊され(図3B), OCT4+のICM様細胞の構造の直下では, SDC1+の合胞体栄養膜細胞が子宮内膜モデルの内部に浸潤している様子が確認された(図3C). さらに, 上皮細胞のバリアを破壊した合胞体栄養膜細胞は大きな核を形成し, 直下に存在するビメンチン(VIM)+間質細胞と接触していた(図3D). 大きな核を含む合胞体栄養膜細胞の構造は, ヒト胚の着床後にみられる胚-子宮内膜界面の原始合胞体に類似していた. これらの結果より, 3D共培養システムである胚-子宮内膜アセンブロイドは, 胚と子宮内膜の界面における事象を模倣していることが示唆された.

次に, この3D着床モデルを用いて, プラストイドの接着に影響を与える因子について検討した(図4A). まず, 培地中に添加した低濃度のマトリゲルやホルモン, ホルモン受容体の阻害剤処理の影響を調べたが, 有意な変化は認めなかった. 一方で, 子宮内膜上皮と間質細胞は, 着床率に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった. つまり, 子宮内膜上皮細胞がない場合には, すべてのプラストイドが接着し, 間質細胞がない場合は, 接着率は優位に低下していた. また, 着床モデルを用いて, 胚の対位(接着の方向性)について検討した(図4B). その結果, 上皮細胞がない場合, プラストイドの接着の方向性がランダムであった. 以上により, 子宮内膜上皮細胞は基本的に胚着床のバリアとして働きながら, 正常な胚の接着の方向性(対位)を制御していることが示唆された.

まとめ

これまで倫理的・技術的に困難であったヒト胚の着床現象の研究を行うため, 胚の代替となるプラストイドと子宮内膜モデルを利用し, 胚-子宮内膜アセンブロイドモデルを開発した. このモデルは, 胚と子宮内膜の境界面を3Dで可視化することを可能にし, ヒト胚発生初期の胚由来細胞と子宮内膜細胞の融合が起こることを観察することができた. 今後, さらに本システムの多様な胚由来細胞と子宮内膜細胞に, トランスフェクションやゲノム編集技術を活用し, 両方の細胞の相互作用に及ぼす影響を検討し, 着床に関与する分子メカニズムの全貌を明らかにすることが期待される. また, 胚着床のメカニズムの理解を深めることで, 生殖補助医療の成功率を高め, 反復着床不全に対する新たな解決策を提供できる可能性も期待できる.

引用文献

1. Turco MY, Gardner L, Hughes J, Cindrova-Davies T, Gomez MJ, Farrell L, Hollinshead M, Marsh SGE, Brokens JJ, Critchley HO, Simons BD, Hemberger M, Koo BK, Moffett A, Burton GJ (2017) Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat Cell Biol* 19 (5), 568-577.
2. Shibata S, Endo S, Nagai LAE, Kobayashi EH, Oike A, Kobayashi N, Kitamura A, Hori T, Nashimoto Y, Nakato R, Hamada H, Kaji H, Kikutake C, Suyama M, Saito M, Yaegashi N, Okae H, Arima T (2024) Modeling Embryo-Endometrial Interface Recapitulating Human Embryo Implantation. *Science Advances* 10, eadi4819.
3. 柴田 峻, 小林枝里, 有馬隆博 (2023) 胎盤発生と細胞運命決定機構. *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY* 30 (1)
4. Yu L, Wei Y, Duan J, Schmitz DA, Sakurai M, Wang L, Wang K, Zhao S, Hon GC, Wu J (2021) Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. *Nature* 591, 620-626.
5. Yanagida A, Spindlow D, Nichols J, Dattani A, Smith A, Guo G (2021) Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation. *Cell Stem Cell* 28, 1016-1022 e1014.

精巣 Leydig 細胞の熱ショック応答因子 (HSF1) を介する ストレス応答機構

岡 真太郎, 白石 晃司

山口大学大学院 医学系研究科 泌尿器科学講座

緒言

テストステロンは、精巣間質組織に存在する Leydig 細胞でコレステロールを原料として合成され、二次性徴の発達、筋肉の増強、骨密度の維持など、多くの生理的プロセスに寄与している。テストステロンは、精巣間質組織に存在する Leydig 細胞でコレステロールを原料として合成される。テストステロン合成の律速段階は、コレステロール輸送タンパク質 steroidogenic acute regulatory protein (StAR) を介するミトコンドリア内膜へのコレステロールの取り込みである。StAR の遺伝子発現は下垂体から分泌される Luteinizing hormone (LH) によって調節される。精巣は体温よりも低い温度で最適に機能する臓器であり、入浴やサウナ浴等による外部環境からの熱ストレスを受けやすい臓器である。熱ストレスは造精機能に影響を与えるのみならず、テストステロン合成過程にも影響が及ぶことが知られている。ステロイド合成過程においては、StAR の合成障害を引き起こし、テストステロン合成を低下させることが報告されている^{1,2)}。テストステロンを安定して合成するために熱ストレス応答機構が必要と考えられるが、ステロイド産生細胞における熱ストレス応答機構に関する報告は少ない。以上のことから、われわれは Leydig 細胞の熱ストレス応答機構に着目して研究を開始した。

熱ストレス応答は、生物が高温環境に晒された際に発現する細胞レベルでの防御機構である。熱ストレス応答は、生物が熱ストレスに適応し生存を確保する上で不可欠な要素である。熱ストレス応答によって、細胞は熱ショックタンパク質を自ら作り出し、タンパク質の損傷を修復し、細胞内の恒常性を維持している。その中心的な役割を、熱ショック応答因子 1 (heat shock transcription factor 1; HSF1) が担っている³⁾。われわれは、Ley-

dig 細胞の熱ストレス応答機構を解明するために HSF1 とステロイド合成の関連を調べた。HSF1 ノックアウトマウスを用いて、停留精巣による熱ストレス下でのテストステロン合成への影響を分析した⁴⁾。また HSF1 をノックアウトした Leydig 細胞株 (MA-10) を用いて細胞レベルでの機能解析を行った。

停留精巣モデルを用いたテストステロン産生における HSF1 の役割

H.E.染色により、停留精巣モデルマウスの Leydig 細胞と精子形成細胞の形態変化を評価した。それぞれのコントロールと比較して、wild type (WT) マウスと HSF1 ノックアウト (KO) マウスの精子形成細胞は減少傾向となった。HSF1 KO マウスでは WT マウスと比較して精子形成細胞の減少がさらに進み、精子形成がより早期に抑制された。これらの形態変化は、停留精巣モデルが精巣組織に慢性的な熱ストレスを誘発し、精子形成に影響を与えたことを示している。その一方で、WT マウスと HSF1 KO マウスの Leydig 細胞を比較したところ、細胞数は減少せず、個々の細胞形態変化は認められなかった。Leydig 細胞のステロイド産生能を評価するために、ELISA 法を用いて血清テストステロン値を測定した (図 1 A)。テストステロンの測定を行う 3 時間前にマウスに hCG を投与し、テストステロン産生を誘導した。WT マウスと HSF1 KO マウスの基礎テストステロン値に有意差は認められなかった。停留精巣モデルにおいては、HSF1 KO マウスの血清テストステロン値のみが有意に減少した。これらの結果から、HSF1 を欠損した Leydig 細胞は熱ストレス条件下でステロイド合成能を維持できないことが示された。

停留精巣モデルマウスのステロイド合成酵素の発現変化を、Western blotting 法を用いて解析した。コレステロール輸送タンパク質である StAR の発現量が著明に変化した (図 1 B)。停留精巣モデルを作成して 1 週間後には、WT マウスおよび HSF1 KO マウスの StAR はコントロール群に比べて有意に低下した。2 週間を経て比較

連絡先：岡真太郎 山口大学大学院医学系研究科泌尿器科学講座

〒755-8505 山口県宇部市南小串 1 丁目 1 番 1 号

TEL : 0836-22-2275

FAX : 0836-22-2276

E-mail : s-oka@yamaguchi-u.ac.jp

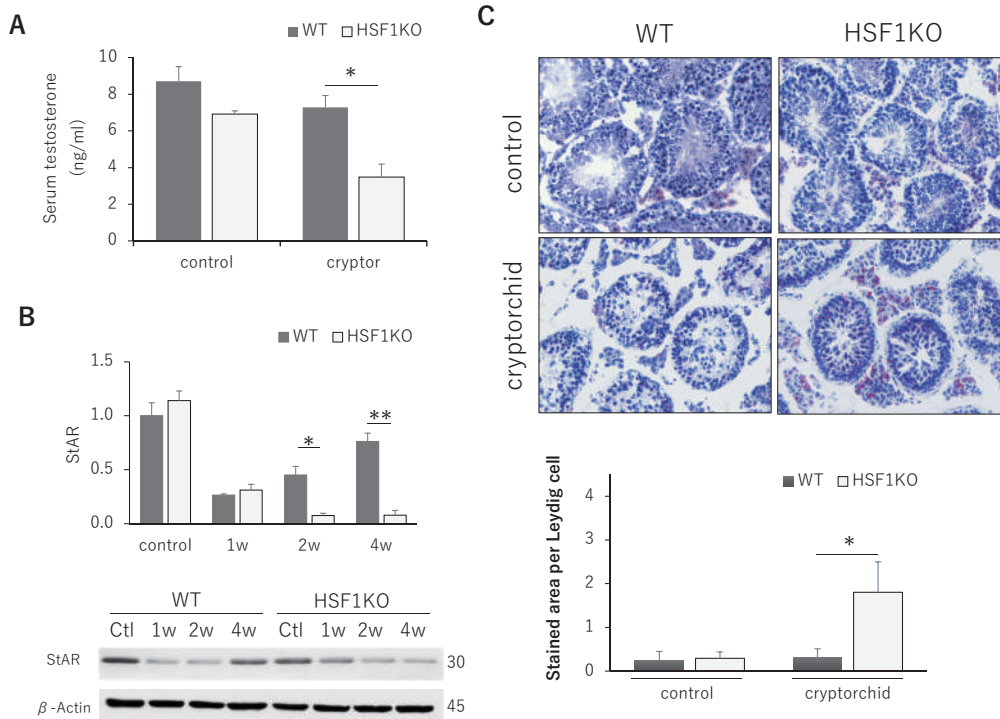


図1 停留精巣モデルにおける StAR の発現変化

すると、WT マウスと HSF1KO マウスの StAR の発現量に差があり、WT マウスの StAR 合成はコントロール群と同等まで改善するが、HSF1KO マウスの StAR は継続的に減少し続け、コントロール群の10%まで低下した。非ストレス下においては、WT マウスと HSF1KO マウス間で StAR の基礎発現量は同等であり、非ストレス下での StAR の安定性に HSF1 は必須ではなかった。熱ストレスモデルによって StAR の転写が抑制されているかを確認するために、リアルタイム PCR 法を用いて mRNA を評価した。WT マウスと HSF1KO マウスの StAR mRNA は1週間でコントロールに比べて約40%減少したが、停留精巣モデル作成2週間後には正常化していた。これらの結果から、停留精巣による転写への影響は限定的であり、HSF1KO マウスでは StAR の翻訳過程または翻訳後修飾が阻害されていることを示している。他のステロイド生成酵素を WT と HSF1KO マウスで比較したが、CYP11A1, 3β -HSD, CYP17A1, 17β -HSD の発現に変化は認められなかった。

オイルレッド O 染色を用いて、Leydig 細胞のコレステロール滴を可視化し、細胞内のコレステロール含有量を比較検討した (図 1C)。コントロールでは、WT マウスと HSF1KO マウス間で脂質滴の含有量に差は認められなかった。HSF1KO マウスは、熱ストレス下において細胞質内のコレステロール含有量が有意に増加して

いた。HSF1KO マウスで観察されたコレステロールの過剰な蓄積は、慢性熱ストレス条件下における StAR の合成異常によるコレステロール輸送障害が原因となり引き起こされたことを示唆する結果であった。

MA-10細胞を用いたステロイド産生と熱ショックタンパク質の発現解析

MA-10細胞は、マウスの精巣から樹立された Leydig 細胞株であり、ステロイド合成能を有する細胞である。MA-10細胞は、StAR を介するコレステロール輸送能を有しており、その最終産物はプロゲステロンとされる。CRISPR/Cas9 法を用いて、マウス HSF1 遺伝子を欠損させた細胞を作成し、2個のクローンを獲得した。細胞を42度に加温した温浴槽内で1時間加温し、6-12時間のリカバリー期間を設けたのち、細胞と培養液を回収した。細胞と培養液を回収する3時間前に1 mM cAMP を添加した。Western Blotting 法を用いて StAR, CYP11A1 および 3β -HSD の発現を確認し、ELISA 法を用いて培養液中のプロゲステロン濃度を測定した。WT 細胞および HSF1KO 細胞におけるプロゲステロン合成量を比較した (図 2A)。非ストレス条件下では、WT 細胞と HSF1KO 細胞のプロゲステロン合成量に差は認められなかったが、熱ストレスを加えた後に比較したところ、

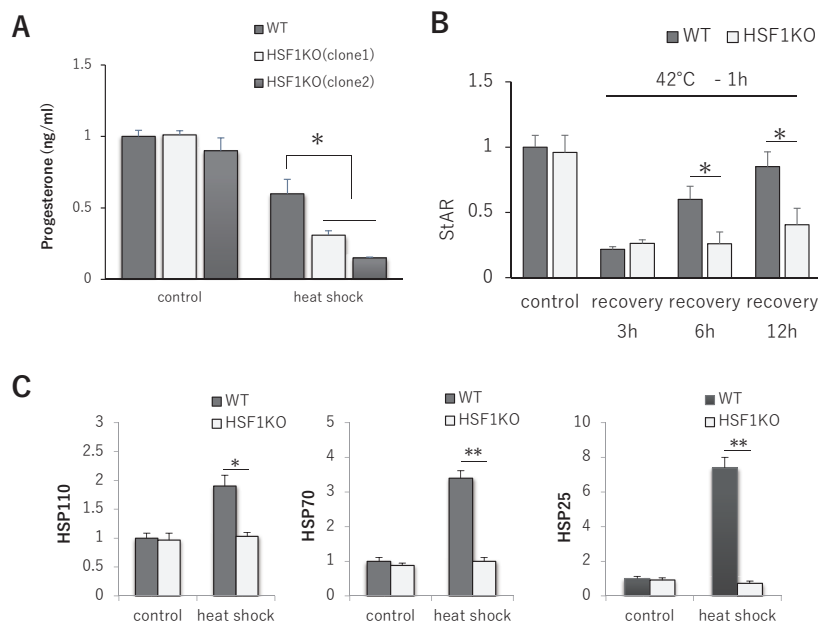


図2 MA-10細胞における StAR と熱ショックタンパク質の変化

WT細胞に比べて HSF1KO細胞 (クローン1) と HSF1KO細胞 (クローン2) のプロゲステロン合成量は有意に減少した (図2A)。WT細胞および HSF1KO細胞における StARの基礎発現量は同等であった。HSF1KO細胞における StARの発現量は、熱ストレスを加えることにより WT細胞と比較して有意に減少した (図2B)。リカバリー時間を設けて StARの発現を比較したところ、WT細胞においては、StARの発現量は6時間後から改善され、12時間後にはコントロールと同じレベルに達した。一方、HSF1KO細胞の StARの発現は12時間まで改善されず、WT細胞よりも有意に低かった。StARの mRNAは、熱ストレス処理直後に WT細胞および HSF1KO細胞で低下し、6時間以降はいずれの細胞もコントロールレベルに改善した。これらの結果は、HSF1KOマウスを用いた解析と同様の結果であった。これらの結果は、HSF1欠損による StARの合成障害がステロイド合成に関連し、熱ストレス応答とステロイド合成の関与を示唆する結果である。

続いて、WT細胞と HSF1KO細胞の熱ショックタンパク質 (heat shock protein; HSP) の発現量を比較した。本研究では、HSP110, HSP70, mitochondria HSP70, HSP60, HSP25を検討対象とした。いずれの熱ショックタンパク質も、定常発現量は同等であった。42度の熱ストレスを加え6時間のリカバリー時間を設けて発現変化を確認したところ、WT細胞では HSP110, HSP70および HSP25が増加した (図2C)。HSF1KO細胞においては、HSP110, HSP70, HSP25の発現量は変化しなかつ

た。以上の結果から、HSP110, HSP70, HSP25と StAR合成の関連を検討した。

HSF1はミトコンドリア膜電位障害を改善し StAR合成を維持

ステロイド合成の初期段階においてミトコンドリアが不可欠であり、その機能不全は StARの翻訳後調節に影響を与えることが知られている⁵⁾。MA-10細胞における HSF1欠損とミトコンドリア機能の関連を確認するために、mitochondrial membrane potential (MMP), ATP合成、およびミトコンドリア形態異常を評価した。MMPと ATP合成は、42°Cの熱ショック処理から12時間のリカバリー期間を設けて評価した。JC-1染色を用いて、MMPの評価を行った。低MMPでは緑色蛍光を示すモノマーとして存在し、高MMPでは赤色蛍光を示すポリマーとして存在するため、赤/緑の蛍光強度比の減少はMMPの低下を示す。熱ストレス条件下において、HSF1KO細胞はWT細胞に比べてMMPが有意に減少していた (図3A)。また、熱ストレスは HSF1KO細胞の ATP合成を減少させた (図3B)。これらの結果は、HSF1を欠損させると MA-10細胞のミトコンドリア機能障害が誘発されることを示している。MitoBright LT Red染色を用いてミトコンドリアの形態を確認した。非ストレス条件下において、WT細胞と HSF1KO細胞のミトコンドリアは線維状であったのに対し、熱ストレス条件下では HSF1KO細胞において断片化したミトコンドリアの

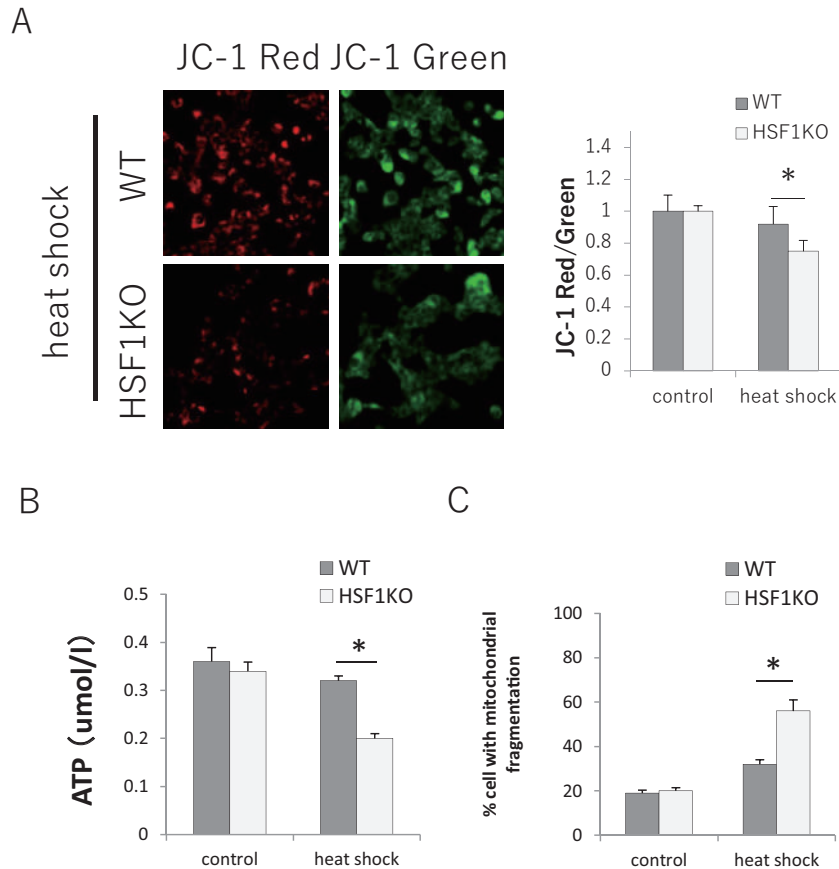


図3 MA-10細胞の熱ストレスによるミトコンドリア機能異常

数が増加していた (図 3 C)。

ミトコンドリア膜電位障害を誘発するため、carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) を添加した培養液で細胞を 3 時間培養し、12 時間のリカバリー時間を設けて細胞を回収した。CCCP 添加により、いずれの細胞も JC1 染色で MMP 低下が確認された。12 時間のリカバリー時間を設けて MMP を比較したところ、WT 細胞では MMP は正常化していたが、HSF1KO 細胞では WT と比べて優位に MMP が低下していた。以上のことから、HSF1 はミトコンドリア膜電位の安定化に関与することが示された。CCCP 添加後に熱ショックタンパク質の変化を調べたところ、HSP25 が強く誘導されていた。以上の結果から、MA-10 細胞のミトコンドリア膜電位の安定化に HSP25 が主に関与することが示唆された。

HSP25 の StAR 合成への関与

熱ストレスに対して HSP25 がミトコンドリア膜電位を安定化させるか確認するため、HSP25 に対する siRNA を使用して MA-10 細胞の HSP25 をノックダウンした。

HSP25KD 細胞では、熱ストレスを加えても HSP25 の発現量は増加せず、HSP25 の発現量は HSF1KO 細胞と同様であった。HSP25KD 細胞における StAR の合成は熱ストレスによって減少した (図 4 A)。また熱ストレスを受けた HSP25KD 細胞における MMP および ATP レベルも、HSF1KO 細胞と同様に減少していた。続いて、HSF1KO 細胞にマウス HSP25 を遺伝子導入して、HSP25 を過剰発現させた細胞を作成した。HSP25 を過剰発現させた細胞では、HSF1KO 細胞と比較して、熱ストレスを加えた 6 時間後からの StAR 発現量が増加した (図 4 B)。これらの結果は、MA-10 細胞において熱ストレス条件下でのミトコンドリア機能の安定化および StAR 合成の維持に HSP25 が重要な役割を担うことを示している。

まとめ

HSF1 が熱ストレスからミトコンドリア機能を保護し、ミトコンドリア膜電位を安定化させることにより StAR 合成を補助することが示された。またその中心的な役割を HSP25 が担っていた (図 4 C)。これはステロ

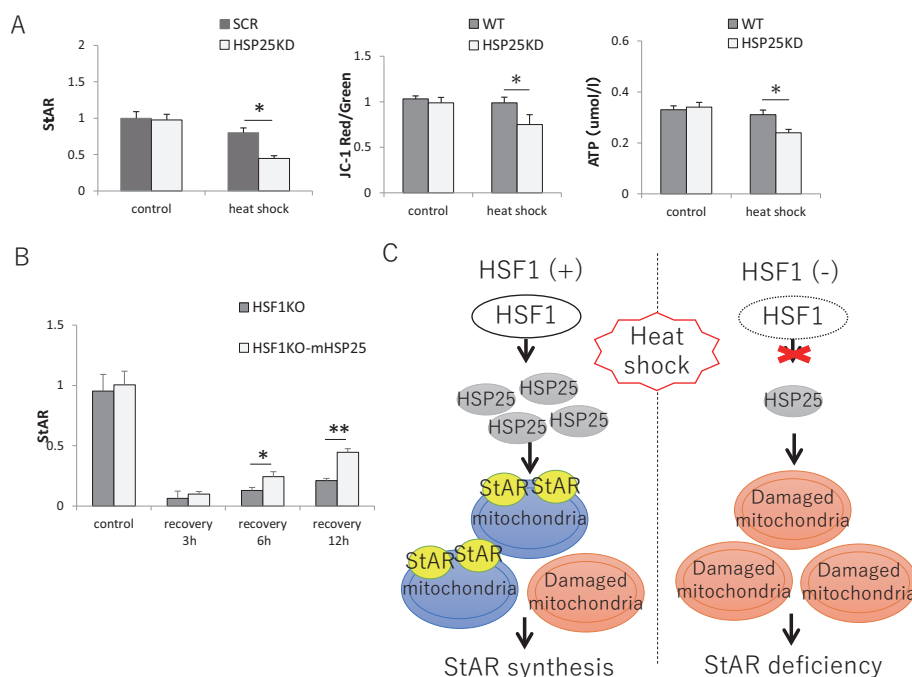


図4 StAR合成におけるHSP25の役割

イド産生細胞における HSF1 および HSP25 を介した熱ストレス応答のメカニズムを解明する新しい知見である。ミトコンドリアの形態変化は、熱ストレスがミトコンドリアの融合と分裂のバランスを崩すことを示している。しかし、マイトファジーを含めたミトコンドリア構造の制御における HSF1 の役割はまだ不明であり、ミトコンドリアの保護メカニズムを示すさらなる研究が必要である。これらの知見はステロイド産生細胞における HSF1 の新しい機能を示し、ステロイド産生細胞のストレス応答の新しい機能を示すものである。

引用文献

1. Liu Z, Stocco DM (1973) Heat shock-induced inhibition of acute steroidogenesis in MA-10 cells is associated with in-

hibition of the synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 138, 2722-2728.

2. Murphy BD, Lalli E, Walsh LP, Liu Z, Soh J, Stocco DM, Sassone-Corsi P (2001) Heat shock interferes with steroidogenesis by reducing transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Mol Endocrinol* 15, 1255-1263.

3. Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Thiele DJ (2018) Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 14-19.

4. Oka S, Shiraishi K, Fujimoto M, Katiyar A, Takii R, Nakai A, Matsuyama H (2017) Role of Heat Shock Factor 1 in Conserving Cholesterol Transportation in Leydig Cell Steroidogenesis via Steroidogenic Acute Regulatory Protein. *Endocrinology* 158, 2648-2658.

5. Allen JA, Shankara T, Janus P, Buck S, Diemer T, Hales KH, Hales DB (2006) Energized, polarized, and actively respiring mitochondria are required for acute Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 147, 3924-3935.

オキシトシンと漢方治療

昭和大学 医学部生理学講座 生体制御学部門
砂川 正隆

はじめに

オキシトシンの作用として子宮収縮作用や射乳作用は古くから知られているが、近年、ほかにもさまざまな作用を有することが報告されている。脳内に分泌されたオキシトシンの作用としては、抗不安・抗ストレス作用、母性行動の形成や信頼・絆形成の促進作用、自閉症スペクトラム障害の改善作用はじめ、多くの作用が報告されている。しかし、オキシトシンは血液脳関門をほとんど通過しないことから、薬剤として投与してもこれら中枢性の作用は期待できない。

われわれは、加味帰脾湯に着目し、間接的にオキシトシンの分泌を促進することができないか、基礎研究にて検討した。加味帰脾湯は14種類の生薬から構成される漢方薬であり、臨床では、不眠症、精神不安、神経症などに適応されている。われわれは動物実験にて、加味帰脾湯の抗不安・抗ストレス作用ならびに、作用機序としてオキシトシンの関与を検討したので紹介する。

1. オキシトシン

オキシトシンは9個のアミノ酸残基からなる神経ペプチドで、古くより子宮収縮や射乳を誘導する下垂体後葉ホルモンとして知られているが、近年、オキシトシンの中枢への作用が注目されている。オキシトシンニューロンは視床下部の室傍核 (paraventricular nucleus; PVN) と視索上核 (supraoptic nucleus; SON) とに存在する。PVN と SON には大細胞性ニューロンが存在し、ここで産生されたオキシトシンは下垂体後葉に投射した軸索の終末より血中に分泌されホルモンとして末梢組織に作用するとともに、細胞体および樹状突起からも分泌され(細胞体樹状突起分泌)、脳内での生理活性に関与している。さらには、PVNで産生されたオキシトシンは、軸索を介して中枢神経系の各所に作用する(図1)。脳脊髄液

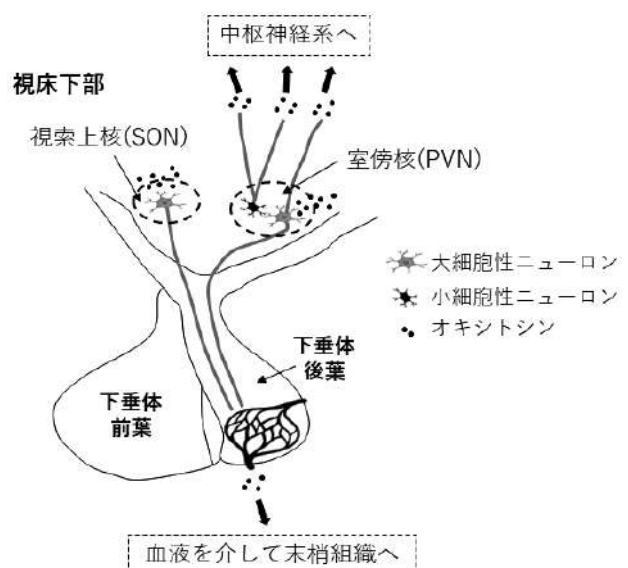


図1 視床下部におけるオキシトシンの分泌

と血漿オキシトシン濃度は必ずしも相関していないという報告もあり¹⁾、中枢への分泌と末梢への分泌メカニズムは異なると考えられる。オキシトシンは血液脳関門の透過性が低いため、下垂体後葉から血中に分泌されたオキシトシンや末梢へ投与されたオキシトシンは中枢神経系へ移行しない。しかし、経鼻投与では中枢神経系へ移行することが動物実験では確認されている²⁾。オキシトシン受容体はクラスIのGタンパク質共役受容体ファミリーに属し、末梢組織では子宮、乳腺、卵巣、陰、胎盤、精巣、腎臓、心臓、消化管などに存在し³⁾、中枢神経系では、嗅覚路、大脳皮質、基底核、扁桃体、海馬、分界条床核、視床、視床下部、中心灰白質、縫線核、青斑核、脊髄などに広く存在している⁴⁾。また、オキシトシンニューロンそのものにもオキシトシン受容体があり、自己調節能も有している。

オキシトシンの中枢性作用として、母性行動の形成(母子間の絆の形成)⁵⁾、社会的行動促進作用⁶⁾、信頼関係の

図2 オキシトシンの生理作用

<p>オキシトシンの中枢性作用</p> <ul style="list-style-type: none"> ・母性行動の形成 ・社会行動促進作用 ・信頼・絆形成 ・抗不安・抗ストレス作用 ・生殖行動 ・鎮痛作用 ・自閉症スペクトラム障害の改善 ・統合失調症の改善 ・学習および記憶 ・循環器系の調節 ・免疫調節 ・摂食（食欲）抑制 ・アルコール摂取抑制 ・ミクログリアの活性化抑制 	<p>オキシトシンの末梢性作用</p> <ul style="list-style-type: none"> ・子宮収縮 ・射乳 ・射精、精子輸送、勃起 ・腸管運動抑制 ・抗炎症作用 ・骨形成 ・骨格筋維持 ・ナトリウム利尿 ・味蕾の修飾
---	--

形成⁷⁾、鎮痛作用⁸⁾、抗炎症作用⁹⁾のほか抗不安・抗ストレス作用¹⁰⁻¹⁴⁾も報告されている（図2）。動物実験において、ストレス誘発性の副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）や糖質コルチコイド（コルチコステロン；CORT）の分泌亢進はオキシトシン投与により抑制され^{10,11)}、また、脳内へのオキシトシン受容体の拮抗薬の投与により、視床下部—下垂体—副腎皮質系（HPA axis）は活性化され、ACTHやCORTの分泌が増加し¹²⁾、さらには、オキシトシン欠損マウスを用いた研究では、精神的なストレス負荷を与えると、野生型マウスに比べると強い不安行動を示したが、オキシトシンの脳室内投与により、その行動は抑制された¹³⁾。これらの報告より、オキシトシンはHPA axisの制御を介してストレスレベルの調整を行っていると考えられる。オキシトシンはGABAニューロンに作用し、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRF）神経細胞上にあるGABA_A受容体を介して、CRFの分泌を抑制し、HPA axisのストレス反応を抑制するとも報告されている¹⁴⁾。

2. 加味帰脾湯

加味帰脾湯は、14種類の生薬（茯苓・甘草・大棗・生姜・人参・蒼朮あるいは白朮・黄耆・酸棗仁・竜眼肉・遠志・当帰・木香・柴胡・山梔子）から構成され（メーカーによっては牡丹皮を加えて15種類）、貧血、不眠症、精神不安、神経症に適応されている。加味帰脾湯のベースになっている四君子湯（茯苓・甘草・大棗・生姜・人参・蒼朮）は消化機能を高め、気を高める作用を有し、黄耆・人参・蒼朮は体力低下、易疲労を改善し、酸棗仁・竜眼肉・遠志は精神安定作用を有する。また、当帰・竜

眼肉は貧血を補い、木香は気を巡らせ、気分をすっきりさせる。以上の生薬で構成される帰脾湯にイライラ、怒りを鎮める柴胡・山梔子を加えたものが加味帰脾湯である。つまり、疲労や精神的ストレスによる消化機能低下が背景にある諸症状に対して加味帰脾湯は用いられる。

Maejimaら¹⁵⁾は、ラットへの加味帰脾湯の経口ならびに腹腔内投与により、PVNのオキシトシンニューロンが活性化することを報告している。われわれは、ストレスモデル動物を用い、加味帰脾湯の抗不安・抗ストレス作用ならびに、その作用機序としてオキシトシンの関与を検討した。

3. 加味帰脾湯の抗不安・抗ストレス作用とオキシトシン

われわれはまず初めに加味帰脾湯を7日間、健常な動物（Wistar系雄性ラット）に投与し、血漿中のACTH、CORT、オキシトシン濃度を測定したところ、加味帰脾湯を投与していない対象動物と比較しても、有意な変化は見られなかった¹⁶⁾。

次に、ラット急性ストレスモデル（90分間の拘束ストレス）を用い、加味帰脾湯の抗不安・抗ストレス作用を検討した¹⁶⁾。動物を狭い部屋に拘束することによって排便が誘発され、本モデル動物は下痢型過敏性腸症候群モデルとしても用いられている¹⁷⁾。90分間、ラットを透明のプラスチックボックスに拘束し、拘束中の排便量を測定したところ、加味帰脾湯を前投与した動物は、加味帰脾湯を投与していない動物と比較して、有意に排便量が減少した。しかし、拘束前にオキシトシン受容体の拮抗薬を投与すると、加味帰脾湯の効果が一部拮抗された。

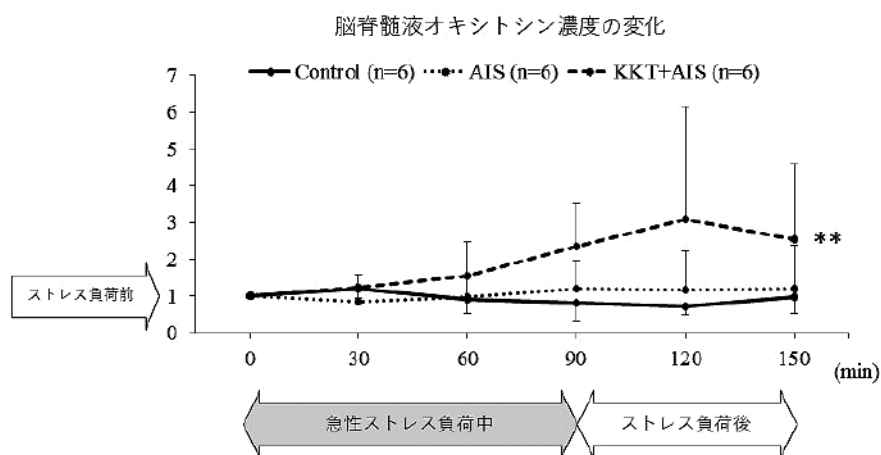


図3 拘束ストレス負荷と脳脊髄液中オキシトシン分泌の変化
AIS群；急性拘束ストレス群，KKT+AIS群；KKT投与を行ったAIS群。

続いて、90分の拘束後の血漿ACTH、CORT、オキシトシン濃度を測定した。加味帰脾湯を前投与してから拘束した群において、血漿ACTHならびにCORT濃度の有意な上昇が認められた。ストレス反応は、動物が緊急事態に面した際に闘うあるいは逃避するために適した状態にする適応反応であり、急性ストレス時には元来必要な反応である。加味帰脾湯の前投与により血漿ACTHならびにCORT濃度の有意な上昇、つまりHPA axisの亢進が見られたことから、加味帰脾湯は急性ストレスに対する抵抗性を高めるのではないかと考えられる。

一方、血漿オキシトシン濃度は上記の実験では有意な変化は見られなかった。上述のとおり、オキシトシンの分泌の仕組みは末梢と中枢では異なっており、脳内と血漿オキシトシン濃度は必ずしも相関しないこともある¹⁾。本研究では、オキシトシンの中枢性作用をターゲットとしているため、マイクロダイアリス法にて脳脊髄液を回収し、経時的に脳脊髄液中のオキシトシン濃度の変化を調べた。加味帰脾湯投与群では拘束開始から徐々に、脳脊髄液中オキシトシン濃度の上昇が認められ、興味深いことに90分間の拘束から解放してから30分後と60分後にもその有意な上昇は続いていた(図3)。

緊急事態にストレス反応が生じ、その後すぐに元の状態に回復すれば生体に大きな問題は生じないが、ヒトは嫌な出来事があった場合、すぐに忘れることができず、それを思い悩み、引きずってしまう。つまり、脳内ではストレス反応が継続する。ストレスからの回復状況を評価するため、拘束終了直後から5分間、オープンフィールドテストを行った。オープンフィールドテストは、新

奇環境における自発運動量や活動性を評価する試験で、動物の不安や恐怖などの情動機能を評価する試験系としても汎用されている。90分間の拘束ストレス負荷によって、オープンフィールドテストでの総走行距離は対象群と比較し有意に減少したが、加味帰脾湯を前投与した群では、その減少を有意に抑制した。またこの効果は、オキシトシン受容体拮抗薬の投与により減弱した(図4)。オキシトシンの脳内投与により、オープンフィールドテストにおける自発運動量が増加することが報告されている¹⁸⁾。加味帰脾湯の投与によりオキシトシンの分泌が亢進し、その結果、早期にストレスからの回復が見られたと考えられる。

以上の結果をまとめると、加味帰脾湯はストレスに対する抵抗性を高めるとともに、ストレスからの回復を早めること、またこれらの効果の一端に、オキシトシンの分泌促進作用が関与していることが示唆された。

終わりに

オキシトシンは抗ストレス作用以外にも、数多くの作用を有していることから(図2)、加味帰脾湯はストレス反応の制御のみならず、オキシトシン分泌低下に起因する症状に幅広く使用できると考えられる。また、Maejimaら¹⁵⁾によると、加味帰脾湯のオキシトシンニューロン活性化には、構成生薬の中でも大棗、当帰、生姜が重要な役割を担っている。加味帰脾湯以外にも、これらの3生薬を含む漢方薬として、当帰四逆加呉茱萸生姜湯、当帰建中湯、補中益気湯などが挙げられる。よって、これらの漢方薬にもオキシトシンの分泌を促す可能性があ

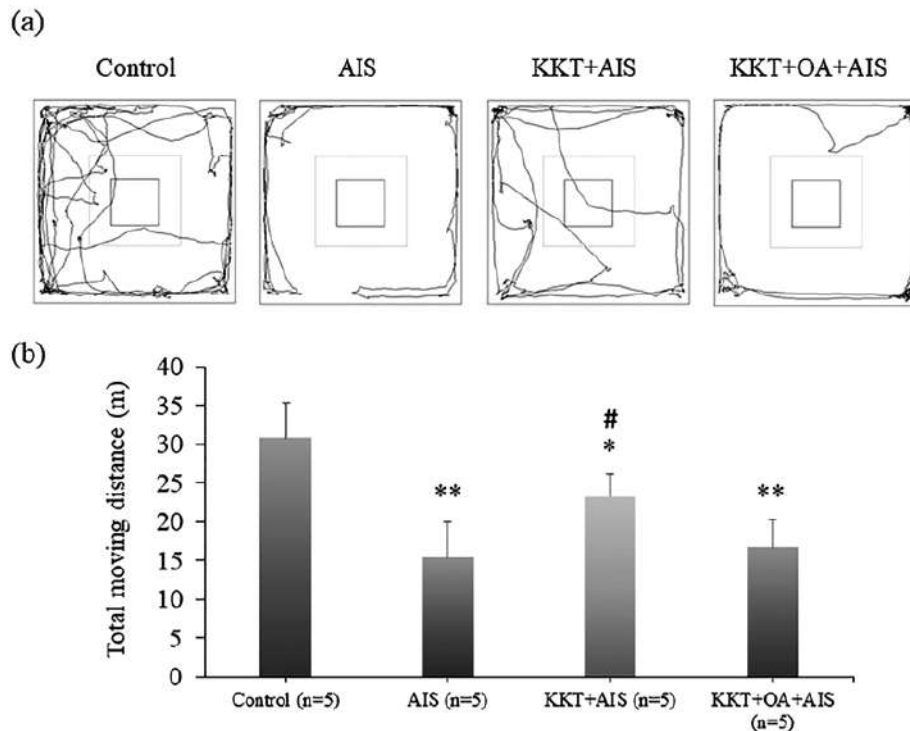


図4 拘束ストレス負荷後のオープンフィールドテスト

(a) 走行の軌跡例, (b) 走行距離. AIS群;急性拘束ストレス群, KKT+AIS群;KKT投与を行ったAIS群, KKT+OA+AIS群;オキシトシン受容体拮抗薬(OA)を投与したKKT+AIS群.

る。以上2点について、引き続き検討していきたい。

本内容要旨は、第28回 日本生殖内分泌学会学術集会(2024年11月18日)のランチョンセミナー(後援:(株)ツムラ)にて発表した。また本研究は、(株)ツムラとの間で共同研究契約を締結し、同社より研究資金の提供を受けて実施した。

引用文献

- Martin J, Kagerbauer SM, Gempt J, Podtschaske A, Hapfelmeier A, Schneider G (2018) Oxytocin levels in saliva correlate better than plasma levels with concentrations in the cerebrospinal fluid of patients in neurocritical care. *J Neuroendocrinol* e12596.
- Tzabazis A, Kori S, Mechanic J, Miller J, Pascual C, Manering N, Carson D, Klukinov M, Spierings E, Jacobs D, Cuellar J, Frey 2nd WH, Hanson L, Angst M, Yeomans DC (2017) Oxytocin and Migraine Headache. *Headache* 57, 64-75.
- Gimpl G, Fahrenholz F (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81, 629-683.
- Gould BR, Zingg HH (2003) Mapping oxytocin receptor gene expression in the mouse brain and mammary gland using an oxytocin receptor-LacZ reporter mouse. *Neuroscience* 122, 155-167.
- Takayanagi Y, Yoshida M, Bielsky IF, Ross HE, Kawamata M, Onaka T, Yanagisawa T, Kimura T, Matzuk MM, Young LJ, Nishimori K (2005) Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 16096-16101.
- Pobbe RLH, Pearson BL, Defensor EB, Bolivar VJ, W Scott Young 3rd, Lee H-J, Blanchard DC, Blanchard RJ (2012) Oxytocin receptor knockout mice display deficits in the expression of autism-related behaviors. *Horm Behav* 61, 436-444.
- Van IJzendoorn MH, Bakermans-Kranenburg MJ (2012) A sniff of trust: meta-analysis of the effects of intranasal oxytocin administration on face recognition, trust to in-group, and trust to out-group. *Psychoneuroendocrinology* 37, 438-443.
- DeLaTorre S, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J, Villanueva L, Condés-Lara (2009) Paraventricular oxytocinergic hypothalamic prevention or interruption of long-term potentiation in dorsal horn nociceptive neurons: electrophysiological and behavioral evidence. *Pain* 144, 320-328.
- Petersson M, Wiberg U, Lundberg T, Uvnäs-Moberg K (2001) Oxytocin decreases carrageenan induced inflammation.

- tion in rats. *Peptides* 22, 1479–1484.
10. Parker KJ, Buckmaster CL, Schatzberg AF, Lyons DM (2005) Intranasal oxytocin administration attenuates the ACTH stress response in monkeys. *Psychoneuroendocrinology* 30, 924–929.
 11. Windle RJ, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD (1997) Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology* 138, 2829–2834.
 12. Neumann ID, Wigger A, Torner L, Holsboer F, Landgraf R (2000) Brain oxytocin inhibits basal and stress-induced activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male and female rats: partial action within the paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 12, 235–243.
 13. Mantella RC, Vollmer RR, Li X, Amico JA (2003) Female oxytocin-deficient mice display enhanced anxiety-related behavior. *Endocrinology* 14, 2291–2296.
 14. Bülbül M, Babygirija R, Cerjak D, Yoshimoto S, Ludwig K, Takahashi T (2011) Hypothalamic oxytocin attenuates CRF expression via GABA (A) receptors in rats. *Brain Res* 1387, 39–45.
 15. Maejima Y, Horita S, Yokota S, Ono T, Proks P, Yoshida-Komiya H, Ueta Y, Nishimori K, Misaka S, Shimomura K (2021) Identification of oxytocin receptor activating chemical components from traditional Japanese medicines. *J Food Drug Anal* 29, 653–675.
 16. Tsukada M, Ikemoto H, Lee XP, Takaki T, Tsuchiya N, Mizuno K, Inoue T, Tsunokawa Y, Okumo T, Matsuyama T, Sunagawa M (2021) Kamikihito, a traditional Japanese Kampo medicine, increases the secretion of oxytocin in rats with acute stress. *J Ethnopharmacol* 276, 114218.
 17. Bradesi S, Eutamene H, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L (2002) Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats. *Neurogastroenterol Motil* 14, 75–82.
 18. Sakamoto T, Sugimoto S, Uekita T (2019) Effects of intraperitoneal and intracerebroventricular injections of oxytocin on social and emotional behaviors in pubertal male mice. *Physiol Behav* 212, 112701.

胎盤特異的遺伝子操作法を用いた 栄養膜細胞の機能解析

滋賀医科大学 動物生命科学研究センター
武藤 真長

はじめに

個々の遺伝子機能を生体レベルで明らかにすることができる遺伝子改変動物は、胎盤形成機構や胎盤を起因とする妊娠疾患の原因解明などに非常に有用である。そのため外来遺伝子を過剰発現させるトランスジェニック (Tg) マウスや、内在遺伝子を破壊したノックアウト (KO) マウスが汎用されている。特にノックアウトマウスでは胚性致死となる表現型が数多く報告されており、それらの系統のほとんどに胎盤形成異常が認められる。さらに表現型として胎盤異常が認められる KO マウスでは、胎仔における心臓形成異常も多く見られることが報告されており¹⁾、胎仔と胎盤の両方のゲノムが操作されてしまう通常の KO 法では、妊娠期の表現型について胎仔と胎盤のいずれに起因するのかを解析することが困難となる。2007年にレンチウイルスベクターをマウスの胚盤胞期胚に感染させることで、胎盤特異的に遺伝子操作を可能にする系が確立した²⁾。これにより KO マウスの胎生致死の原因解明と治療、さらに胎盤に起因する疾患モデルの開発にも応用が可能となった。本トピックスでは、胎盤特異的遺伝子操作法を用いた疾患モデル動物の開発だけでなく、臨床応用への可能性についても概説する。

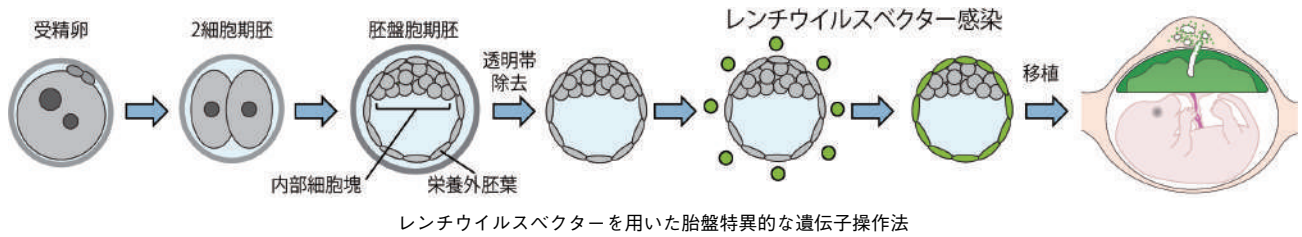
レンチウイルスベクターを用いた 胎盤特異的遺伝子操作

遺伝子導入のために広く使われているレンチウイルスベクターはヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) をベースに作製されたレトロウイルスベクターであるが、ウイルス粒子の構成に必要な要素が数種類のプラスミドに分割されたシステムで作製できる³⁾。3'-LTR プロモーター部分を削除することにより、目的遺伝子が染色体に組み込まれた後にウイルスゲノムが転写されない self-inactivat-

ing (SIN) タイプとなり P2A 実験として実施できるため⁴⁾、トランスジェニック (Tg) 動物作製に広く利用されるようになった。哺乳類の卵は透明帯と呼ばれる細胞外マトリクスに覆われているため、ウイルスは感染できない。そこで酸性タイロド処理や Pronase 処理により透明帯を溶解させたり、透明帯と卵との隙間である囲卵腔にウイルス液を注入するなどして受精卵にウイルスベクターを感染させて行うことができる。

マウス受精卵は卵割を繰り返すことで2細胞期胚、4細胞期胚となり、最終的には胚盤胞期胚となる。また胚盤胞期胚では将来胎児になる内部細胞塊と、将来胎盤になる栄養外胚葉と大きく分けて2つの細胞が存在し、この時点で細胞の分化運命が定まっている。例えば透明帯を除去したマウス受精卵に GFP を発現するレンチウイルスベクターを感染させて胚盤胞期まで培養すると、内部細胞塊と栄養外胚葉の両方に GFP の発現が確認できる。またレンチウイルスベクターを胚盤胞期に感染させれば、外側の栄養外胚葉の細胞にのみウイルスが感染し遺伝子導入が可能となる²⁾。つまり胚盤胞の内部細胞塊には目的遺伝子が発現せず、将来胎盤となる栄養外胚葉にのみ GFP が発現する胚を作製可能となる。

GFP を発現するレンチウイルスベクターを感染させた胚を偽妊娠マウスの子宮に移植して、胎仔と胎盤を採取すると、受精卵時に感染させた場合は胎仔と胎盤の両方に発現が見られるのに対して、胚盤胞期胚に感染させた場合は GFP の発現が胎盤組織にのみ認められる²⁾。つまり内部細胞塊およびその後発生する胎仔組織には一切ウイルス感染は起こらず、胎盤にのみ目的遺伝子を導入することが可能である。遺伝子導入された胎盤切片を観察すると、マウス胎盤の3つの主要な細胞層を構成する栄養膜巨細胞層 (trophoblast giant cells)、海綿状栄養膜層 (spongiotrophoblast)、迷路層 (labyrinth layer) のすべてに遺伝子導入されていると同時に、全妊娠期間を



通して安定的に遺伝子発現ができる²⁾。

胎盤特異的な遺伝子発現補完/ 遺伝子機能喪失モデル

前述したように遺伝子機能を解析するために作製された KO マウスでは胎仔と胎盤の両方のゲノムが操作されているため、胚性致死という表現型を呈した場合、胎仔と胎盤のどちらで遺伝子欠損が起きたから致死となったのかが不明のままである。これまで作製された KO マウスの中で胎盤形成異常により胚性致死を呈するものは *Mapk1* (*Erk2*), *Mapk14* (p38alpha), *Ets2* など数多く存在するが、レンチウイルスベクターを用いた胎盤特異的な遺伝子補完の実験によりそれぞれ責任遺伝子を発現させると、胎盤が正常化し、自然交配では決して得られない KO マウス新生児を得ることが可能となったことが報告された²⁾。また著書らはクローンマウスの過形成胎盤において発現異常が見られる *Plac1* (Placental specific protein 1) 遺伝子の KO マウスを作製し、胎盤のサイズが劇的に増加したことを見だし、さらに栄養交換機能の低下が起これ、大部分が胎生致死となることを見いだした。そこで、著者らは *Plac1* を発現するレンチウイルスベクターを *Plac1* KO マウスの胚盤胞に感染させて胎盤特異的な遺伝子発現によるレスキュー実験を試みたところ、*Plac1* KO マウス胎盤の栄養交換機能が改善し胎生致死の表現型がレスキューされることを明らかにした⁵⁾。このことから、これら KO マウスの胚性致死の原因は胎盤異常による表現型であることが明らかになり、胎盤特異的な遺伝子発現補完による KO マウス胎仔の遺伝子治療が可能となることがわかった。

またレンチウイルスベクターを用いて胎盤特異的に遺伝子機能欠損を導入する手法も存在する。あらかじめ目的遺伝子領域を loxP サイトで挟んでおいたマウス胚盤胞に、Cre リコンビナーゼを発現するレンチウイルスベクターを感染させることで、胚移植後に採取した胎仔では遺伝子欠損が起これず、胎盤にのみ遺伝子欠損を導入

することができる⁶⁾。これにより、Cre を発現させた胚盤胞と発現させていない胚盤胞を同時に偽妊娠マウスに移植することで同じ妊娠時における表現型を比較して解析することができる。この技術の注意点は、Cre リコンビナーゼは細胞毒性が高いため、インテグラーゼを不活性にしたレンチウイルスベクター (integrase defective lentiviral vector; IDLV) により逆転写されたウイルスゲノムを宿主ゲノムに組み込ませず、一過性発現させる必要があることである。これにより胎盤特異的なコンディショナル KO マウスの作製が可能である。一方で特定の遺伝子に対する short hairpin RNA (shRNA) を発現するレンチウイルスベクターを用いることで胎盤特異的な遺伝子ノックダウンも導入できる。この系では野生型の胚盤胞にウイルスを感染させるだけで行えるため、胚盤胞への感染から移植後の胎盤の表現型をワンステップで行うことが可能である⁷⁻⁹⁾。

胎盤特異的遺伝子操作による 栄養膜細胞の浸潤能解析

妊娠20週以降に高血圧を認める妊娠高血圧症候群は、胎盤の機能不全に起因する妊娠疾患の一つである。発症機序として胎盤内の浸潤性栄養膜細胞の不適切な分化や母体への浸潤不全が挙げられる。これにより子宮らせん動脈の拡張が不十分となり、胎盤内が低酸素状態になることで血管増殖因子受容体 VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) の可溶性 (sFLT1) が産生され、母体の血管内皮障害が起こることが発症の原因と考えられつつある¹⁰⁾。しかしながら患者における栄養膜細胞の浸潤不全の原因は不明であり、適切な実験動物モデルがないためにそもそも正常な栄養膜細胞の分化・浸潤における詳細な分子機構の全容も明らかとなっていない。実験動物モデルとしてマウスは非常に有用であり、2011年には、ヒト sFLT1 をマウスの胎盤特異的に過剰発現させたモデルが作製され、妊娠後期の血圧上昇、尿タンパクの増加が認められた妊娠高血圧症候群モデルとして報

告された¹¹⁾。また別の報告では、*Atg7*というオートファジーに必須の遺伝子に対し、前述のCreリコンビナーゼを使った胎盤特異的コンディショナルKOモデルを作製したところ妊娠時の高血圧を呈し、オートファジー欠損による胎盤形成不全が妊娠時の高血圧を引き起こす原因の一つであることが示唆された¹²⁾。これらのことから、妊娠時の高血圧に関する表現型に関してはマウスモデルを用いて研究を行うことが可能である。しかしマウス胎盤では浸潤性栄養膜細胞が少なく、母体側組織へ浸潤する細胞もヒトに比べて限られているため、栄養膜細胞の浸潤に焦点を当てた研究を行うことは難しい¹³⁾。一方で同じげっ歯類であるラットは、栄養膜細胞の浸潤がより起こりやすく、子宮らせん動脈のリモデリングが顕著に見られる¹³⁾。そのためレンチウイルスベクターをラット胎盤に応用して、栄養膜細胞の浸潤性に焦点を当てた研究が行われている。著者らは浸潤性栄養膜細胞において抗血液凝固因子群が強く発現することを見だし、なかでも特に強い発現を示した*Tfpi* (tissue factor pathway inhibitor)に着目した。ラット胎盤における*Tfpi*の機能解析を行うため、shRNAを発現するレンチウイルスベクターを胚盤胞に導入することで、胎盤特異的*Tfpi*ノックダウンモデルを作製した。*Tfpi*ノックダウン群ではコントロール群に比べて胎仔と胎盤の重量が低下した。さらに栄養膜細胞の浸潤能を解析するため、*Tfpi*ノックダウン胎盤の免疫組織学的解析を行ったところ、サイトケラチン陽性の栄養膜細胞が子宮壁側まで到達できず、浸潤率が顕著に低下することがわかった¹⁴⁾。ところで過去に*Tfpi*KOマウスは胎齢9.5-11.5日程度で致死となる表現型が報告されており、著者らも以前から*Tfpi*KOラットを作製していたが、やはりラットでも胎齢10.5-12.5日頃に致死となることがわかった¹⁴⁾。ラット胎盤における栄養膜細胞の浸潤は胎齢14.5日頃から起こるため、それより前に致死となってしまうと栄養膜細胞の浸潤について解析を行うことができなくなる。今回の胎盤特異的な*Tfpi*ノックダウンモデルでは、胎仔側に表現型が現れず致死とならなかったため、胎盤にのみ焦点を当てて*Tfpi*が栄養膜細胞浸潤に機能することを明らかにできた。つまり通常であれば着床後早期に致死となる全身性KO個体では不可能であった栄養膜細胞の浸潤能における表現型解析が可能になったといえる。

終わりに

ゲノム編集技術により簡便に遺伝子機能欠失モデル動物を作製することが可能になっているが、作製した動物が妊娠時の胎盤形成以前に致死となってしまうと、胎盤機能に焦点を当てた研究を行うことが難しくなる。これは胎仔側の遺伝子機能破綻が原因で起こるが、胎盤特異的な遺伝子機能喪失モデルを用いることで胎仔側の致死性を回避しながら胎盤機能に関する表現型を解析することも可能になっている。近年発達が目覚ましいCRISPR/Cas9システムなどのゲノム編集技術は人工制限酵素が起こすDouble strand Breakによるものであり、リファレンスとなるオリゴDNAなどと同時に導入することで点変異を引き起こすことができる。本トピックスで紹介した研究で主に用いられているレンチウイルスベクターは人工制限酵素を発現させることもできるため、妊娠疾患患者において発見されている遺伝子変異を胎盤特異的に導入した動物モデルの作製も可能となり、今後の研究が期待される。

引用文献

1. Perez-Garcia V, Fineberg E, Wilson R (2018) Placentation defects are highly prevalent in embryonic lethal mouse mutants. *Nature* 555 (7697), 463-468.
2. Okada Y, Ueshin Y, Isotani A, Saito-Fujita T, Nakashima H, Kimura K, Mizoguchi A, Oh-Hora M, Mori Y, Ogata M, Oshima RG, Okabe M, Ikawa M (2007) Complementation of placental defects and embryonic lethality by trophoblast-specific lentiviral gene transfer. *Nat Biotechnol* 25 (2), 233-237.
3. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, 72 (11), 8463-8471.
4. Miyoshi H, Blömer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM (1998) Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72 (10), 8150-8157.
5. Muto M, Fujihara Y, Tobita T, Kiyozumi D, Ikawa M (2016) Lentiviral Vector-Mediated Complementation Restored Fetal Viability but Not Placental Hyperplasia in Plac 1-Deficient Mice. *Biol Reprod* 94 (1), 6.
6. Morioka Y, Isotani A, Oshima RG, Okabe M, Ikawa M (2009) Placenta-specific gene activation and inactivation using integrase-defective lentiviral vectors with the Cre/LoxP system. *Genesis* 47 (12), 793-798.
7. Zhou Z, Zhang Q, Lu X, Wang R, Wang H, Wang YL, Zhu C, Lin HY, Wang H (2013) The proprotein convertase furin is required for trophoblast syncytialization. *Cell*

TOPICS

- Death Dis 4 (4), e593.
8. Zhang Q, Yu S, Huang X, Tan Y, Zhu C, Wang YL, Wang H, Lin HY, Fu J, Wang H (2015) New insights into the function of Cullin 3 in trophoblast invasion and migration. *Reproduction* 150 (2), 139–149.
 9. Lee DS, Rumi MAK, Konno T, Soares MJ (2009) In vivo genetic manipulation of the rat trophoblast cell lineage using lentiviral vector delivery. *Genesis* 47 (7), 433–439.
 10. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA (2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1(sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 111 (5), 649–658.
 11. Kumasawa K, Ikawa M, Kidoya H, Hasuwa H, Saito-Fujita T, Morioka Y, Takakura N, Kimura T, Okabe M (2011) Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (4), 1451–1455.
 12. Aoki A, Nakashima A, Kusabiraki T, Ono Y, Yoshino O, Muto M, Kumasawa K, Yoshimori T, Ikawa M, Saito S (2018) Trophoblast-specific conditional Atg7 knockout mice develop gestational hypertension. *Am J Pathol* 188 (11), 2474–2486.
 13. Ain R, Canham LN, Soares MJ (2003) Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev Biol* 260 (1), 176–190.
 14. Muto M, Chakraborty D, Varberg KM, Moreno-Irusta A, Iqbal K, Scott RL, McNally RP, Choudhury RH, Aplin JD, Okae H, Arima T, Matsumoto S, Ema M, Mast AE, Grundberg E, Soares MJ (2021) Intersection of regulatory pathways controlling hemostasis and hemochorial placenta-tion. *Proc Natl Acad Sci USA* 118 (50), e2111267118.

研究室紹介

徳島大学大学院

医歯薬学研究部
産科婦人科学分野
生殖・内分泌研究室



教授 岩佐 武



はじめに

徳島大学産科婦人科は、これまで生殖内分泌に関する研究を一貫して行ってきました。第7代教授の青野敏博先生は、ダイエットや摂食障害に伴う排卵障害の発症メカニズムを解明するため、中枢・末梢の摂食促進因子とGnRHの関連性に着目した研究に力を注がれました。また、第8代教授の苛原稔先生は、GnRH制御因子のキスペプチン・GnIH（Gonadotrophin-Inhibitory Hormone）が排卵障害の病態にどのように関わるかについて研究を進められました。先輩諸氏の血の滲むような努力の甲斐あって、徳島大学産科婦人科は中枢生殖内分泌に強い教室として知られるようになりました。これら先達が築いた伝統のもと、現在では生殖行動の制御メカニズムや性腺ホルモンが栄養代謝状態に及ぼす影響に主眼を置いた研究を行っています。

臨床系の教室で基礎研究を行うことに疑問を持つ方もいるかもしれませんが、研究活動を通じて得た知識や経験は臨床を行う上でも大いに役立つことを実感しています。できるだけ多くの方々に、一定期間だけでも研究活動に携わって欲しいと考えています。研究室の規模は大きくはありませんが、このような考えのもと教員と大学院生が一丸となって、楽しみながら研究を続けています。

生殖行動に関する研究

これまでの中枢生殖内分泌学の研究では、主に視床下部-下垂体-性腺系（HPG系）の解明に重点が置かれてきました。一連の研究によって、HPG系の上位に位置するGnRHの分泌動態、GnRHをさらに上位から制御するキスペプチン・GnIHの役割、およびGnRHと他の生理機能を介在する中枢・末梢因子の存在などが明らかとなりました。このように、排卵調節機構や排卵障害の病態が次々と解明される一方で、もう一つの重要事項である生殖行動がどのように制御されているかという点については、これまでほとんど検討されてきませんでした。われわれは現在、「GnRH促進因子のキスペプチンがHPG系と生殖行動の両者を制御する」との仮説を立て、これを実証すべく研究を進めています。これまでの検討から、キスペプチンが生殖行動の一部を促進すること、これは性腺ホルモンとは独立した作用であること、およびキスペプチンの作用が低下すると生殖行動が低下することを明らかにしました。以上の結果から、排卵期におけるキスペプチン分泌の増加が、GnRHサージを誘起すると同時に生殖行動を促進し、これらが協調的に作用することで妊娠の可能性を高めていることが想定され

ます。まだ道半ばの状況ですが、今後も熱意ある若手研究者と検討を進めて行きたいと思います。

余談ですが、われわれは実験動物としてラットを使用していますが、彼らの生殖行動を正確に把握するには相応の経験が必要となります。本研究において中心的役割を果たしている者によれば、「200組の性行動（1組あたり20分前後）を観察したあたりから、各行動の意味が理解できるようになる」そうです。気の遠くなるような話ですが、生命の根幹に関わる研究ということで、今後も多くの若手に気概を持って取り組み続けて欲しいと考えています。

性腺ホルモンの作用に関する研究

これまでわれわれは中枢生殖内分泌に関する研究をメインテーマとしてきましたが、一連の研究を続ける中で「性腺ホルモンが栄養代謝機能に大きな影響を及ぼすのではないかと」の印象を持つようになりました。そこで、中枢生殖内分泌の研究を続ける傍ら、性腺ホルモンのエストロゲンとアンドロゲンが栄養代謝機能に及ぼす影響とその機序について研究を行うことにしました。初期に行った検討から、エストロゲンの欠乏は摂餌量を著増させ高度の肥満を引き起こすこと、このようなエストロゲン欠乏の影響は高脂肪食負荷による影響を遥かに凌ぐこと、一方エストロゲン欠乏による肥満は寿命には影響しないことを明らかにしました。その後行った検討から、雌においてアンドロゲン過剰が高度の肥満を引き起こすこと、これらの作用はエストロゲン非存在下では認められないこと、ラットに対するアンドロゲンの慢性投与によってPCOSと類似した表現型を再現できることを明らかにしました。このような基礎検討を下地として、現在では臨床への応用を目的とした研究を行っています。近年、オキシトシンの多彩な生理作用に注目が集まっていますが、われわれはエストロゲンの栄養代謝に対する作用の一部がオキシトシンによって介在されていることを明らかにしました。閉経後のエストロゲン欠乏に伴う栄養代謝機能の悪化に対して、病態の中心に関わるオキシトシンが安全かつ有効な薬剤になり得るのではないかと期待しているところです。また、われわれはアンドロゲンの投与方法を工夫することで、PCOSの表現型を高

度に再現した動物モデルを作製することに成功しています。PCOSの病因・病態についてはいまだ不明な点が多く、それらについて現在もさまざまな視点から検討が行われています。動物モデルを用いることで種々の組織採取や介入実験が可能となり、さらなる病態の解明と新規治療法の提唱へとつながるものと期待しています。

またも余談ですが、われわれの提唱する新規PCOSモデルは、手製のアンドロゲン含有チューブを皮下留置することで作製しています。市販のアンドロゲン含有ペレットは非常に高価とされていますが、われわれの方法であればステロイド原末の購入以外にコストはほとんどかかりません。ご入用の際は遠慮なくお声がけください。

終わりに

以上、徳島大学産科婦人科の研究室について紹介致しましたが、最後に「研究室」について私の考えを述べさせていただきます。私自身、学生時代から研究というものに漠然とした興味を抱いていましたが、それを実践できたのは歴代の教室員が築いてきた「研究室」があったからに他なりません。また、現在に至るまで研究を続けられたのは、「研究室」に所属する多くの方々の支えがあったことと感謝しています。研究をはじめに当たり、当時教授であった苛原稔先生からは「研究には良い時期も悪い時期もあるけれど続けることが大事」「徳島大学は中枢生殖内分泌をメインにしてきたのでそれを続けなさい」とのお言葉をいただきました。また、長きにわたりご指導いただいた松崎利也先生からは「自分達が行ってきたことをただ引き継ぐのではなく、それを超えるような研究を目指しなさい」とのご助言をいただきました。このような意志を引き継ぎ、後世に伝えていくのが「研究室」の役割であり、そこに所属する者の使命であると感じています。研究には苦勞がつきものですが、良い結果にめぐり会えた時にはそれを遥かに上回る達成感が得られます。多くの若い方々が、研究活動を通じてさらなる飛躍を遂げることを願っています。

末尾にはなりますが、このたび研究室紹介のご機会をいただいた日本生殖内分泌学会の会員の皆様に厚く御礼申し上げます。

研究室紹介

奈良県立医科大学

産婦人科学講座

教授 木村 文則



奈良県立医科大学産婦人科学講座は、初代教授 足高善雄先生が、1945（昭和20）年に就任され開講されました。私が8代目となります。奈良県立医科大学附属病院では、20年以上前に体外受精を含む高度生殖医療が実施されていましたが、その後、行われなくなっていました。私が奈良県立医科大学に着任したのは、2021年9月1日ですが、その時は、生殖補助医療の実施や妊孕性を改善する腹腔鏡下手術なども実施されておりました。着任後少しずつ準備をして、2024年4月1日に生殖補助医療を実施する高度生殖医療センターがオープンしました。まだ症例数は少ないのですが、体外受精を希望される患者も集まってくるようになりました。このようにしてやっと周産期、婦人科、生殖医学の3つの部門の診療体制が整うとともに、これら各々に対して研究体制を整えられるようになったと思っています。前任の小林教授が卵巣がんの研究を主にされておられましたので、その流れをくむ研究を残すことを考えつつ、私が前任地で行ってきた子宮内炎症や細菌叢の着床や妊娠予後に与える研究、妊孕性温存に関わる研究を立ち上げることにしました。私の立ち上げている研究は、生殖医療に関係するものですが、生殖内分泌学とは間接的にかかわるような内容であると考えます。

子宮内炎症・細菌叢の着床や妊娠予後に与える影響に関する研究

子宮内は無菌ではなく、細菌叢が存在することが明らかとなってきていますが、その子宮内細菌叢を構成している細菌は、どのようにして形成されているかは明らかになっていません。一方、子宮内および腔内細菌叢の乱れ（dysbiosis）が、着床や妊娠予後に影響すると考えられています。私は、子宮内の慢性炎症である慢性子宮内膜炎（chronic endometritis; CE）は、着床障害となる



とともに妊娠予後に影響することを明らかとしてきました。CEは、主に子宮内に存在する細菌への免疫反応による炎症と考えられていますが、dysbiosisとなってもCEでない患者も認められ、子宮内細菌叢とCEの関連についても納得のいく答えは得られていません。すなわち、子宮内細菌叢の妊娠成立および妊娠継続に及ぼす影響については未だ明らかになっていないといえます。これらの問題を解決するために次世代シーケンサーを用いて、細菌の同定を属 (Genus) のみではなく、種 (Species) レベルまで行い、子宮腔内や子宮内膜組織のみではなく、口腔内、腔内、腸内の細菌叢も同時に調べ関連性を調べる、CEが認められた場合にその治療を行い、子宮、口腔内、腔内、腸内の細菌叢などの変動を追跡する研究を立ち上げました。さらにこの研究では、細菌種による着床や妊娠予後への影響を検討することとしています。また、妊娠予後不良例についても分娩直後より同様に細菌叢を追跡し、対照群と比較することにより妊娠予後への影響と細菌叢などとの関連についても検討しています。前任地である滋賀医科大学産婦人科時代にCEにより子宮内膜がプロゲステロン抵抗性を示すことを示しました。生殖内分泌の観点から細菌種の違いによっても、プロゲステロン抵抗性を示すかどうか、プロゲステロン受容体の構造や機能に影響を及ぼすかどうか



についての検討も行いたいと考えています。

抗がん剤暴露による原始卵胞の活性化の制御方法の開発

私は、これまでにフォリスタチン関連タンパク遺伝子改変マウスを用いてアクチビン過剰が、oocyte nest breakdownを遅延させることや早発卵巣不全を示すこと、第4世代プロゲステロンが、抗アンドロゲン作用によりマウスの原始卵胞の活性化を制御することなどを明らかとしてきました。また、実臨床では数多くの卵巣組織凍結保存を実施してきました。これらの研究の最終的な目的は、ともに抗がん剤などの薬物の影響から卵巣を保護することです。抗がん剤として用いるアルキル化剤や白金製剤は卵巣毒性が極めて強く、不可逆的な不妊症を引き起こしますが、その機序の一つとして、抗がん剤による原始卵胞の活性化を起点とした卵子数の減少、Burn out theoryが提唱されています。原始卵胞活性化を阻害する薬剤はマウスの動物実験でその有効性は示されてきていますが、臨床応用には至っていません。今回、抗がん剤による原始卵胞の活性化を阻害するとの報告がある薬剤の単独または併用による卵巣予備能に及ぼす効果を検証することとしています。また、これらの種々の薬物投与下の卵子内の卵母細胞、前顆粒膜細胞、顆粒膜細胞を単一細胞レベルで単離し、空間的トランスクリプトーム、シングルセルトランスクリプトーム解析を行うことで、原始卵胞活性化の制御機構をより詳細に検討し、これらを通し薬物による新たな妊孕性温存療法を開発したいと考えています。

最後に

このように婦人科腫瘍ただ一つ研究を行ってきたといってもよい奈良県立医科大学ですが、ここに周産期、生殖医学の研究を立ち上げつつあります。どの分野の臨床を行うにしてもリサーチマインドの醸成は必要であると考えます。新たな知見の発見により医学会に貢献するとともに研究を通してより良い臨床医を育ててまいりたいと思っています。