

氏名	山本輝
(ふりがな)	(やまもと ひかる)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 号
学位審査年月日	平成30年1月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Lower FOXO3 mRNA expression in granulosa cells is involved in unexplained infertility (原因不明不妊と FOXO 遺伝子の関係について)
論文審査委員	(主) 教授 高 井 真 司 教授 玉 井 浩 教授 近 藤 洋 一

学位論文内容の要旨

《目的》

原因不明不妊は、最終的に assisted reproductive technology (ART) に至ることが多い。原因不明不妊患者のなかには血清 anti-Müllerian hormone (AMH) 値が正常にも関わらず、採卵数が少ないケースもある。最近では、Forkhead transcription family の一つである Forkhead box O (FOXO) が細胞周期やアポトーシス、代謝、ストレス耐性に関与し、かつ顆粒膜細胞に発現することが報告されている。特に FOXO1、FOXO3 が卵胞形成や卵子の成熟化に関わっており、FOXO1 は顆粒膜細胞の G1/S 移行の key regulator であり、follicle stimulating hormone (FSH) の制御下にあることが報告されている。また FOXO3 は原始卵胞や卵母細胞の活性化、その後の卵胞発育に関与し、FOXO3 変異マウスで不妊になることが報告されている。しかし、ヒトでは FOXO1、FOXO3 と卵胞発育の因果関係

は未だに不明である。

今回、in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) 周期で過排卵誘発を施行した原因不明不妊症例において、顆粒膜細胞に発現する FOXO1、FOXO3 の mRNA 発現量が臨床的パラメータとどのような相関性を持つのか検討を行った。

《対象》

2012年6月～2013年10月に当院で採卵を施行した31症例（原因不明群：13例、男性因子群：18例）であり、American Society for Reproductive Medicine (ASRM) guideline に沿ったスクリーニング検査で異常がなかった不妊症例を原因不明群とした。適応条件は、①規則的な月経を有する23-39歳、②血清AMH値>0.5ng/ml、③内分泌疾患を有さないこととした。また、閉経前を示唆するような血清FSH高値や卵巣器質疾患は除外した。

《方法》

月経初日から gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH agonist) 600 µg/日点鼻、月経3日目から human menopausal gonadotropin (hMG)を150-300単位/日開始。卵胞径が18mmに達した時点で human chorionic gonadotropin (hCG) 10000単位を投与、その36時間後に採卵を施行した。主席卵胞液中の顆粒膜細胞に発現している FOXO1、FOXO3 の mRNA 発現量を real-time PCR で定量化した。検討項目は、①顆粒膜細胞における FOXO1、FOXO3 の mRNA 発現量と臨床的パラメータの相関性、②原因不明不妊群とコントロール群（男性因子群）の比較である。良好胚の基準は Veeck 分類 grade2 以上の初期胚（受精3日目）とし、妊娠の定義は子宮内の胎嚢確認とした。

《結果》

FOXO1、FOXO3 ともに mRNA 発現量は、高齢であるほど低いことがわかった。FOXO3 mRNA 発現量は採卵数と血清 AMH 値に正の相関を認めた。FOXO1 mRNA 発現量は採卵数、血清 AMH 値とは相関を認めなかったが、hMG 総投与量と相関を認めた。原因不明不

妊群とコントロール群（男性因子群）の比較では、原因不明不妊群で有意に FOXO3 mRNA 発現量が低下していたが、FOXO1 mRNA 発現量には差を認めなかった。また妊娠群と非妊娠群の比較では、FOXO1、FOXO3 ともに mRNA 発現量に有意差を認めなかった。

重回帰分析では、FOXO1 mRNA 発現量は hMG 総投与量に対して、FOXO3 mRNA 発現量は採卵数に対して影響があると考えられた。

《考察》

過剰な酸化ストレスで FOXO1 は活性化され、顆粒膜細胞のアポトーシスを惹起するという報告がある。FOXO1 mRNA 発現量が高いほど hMG の必要量が増加したという結果は、上記報告に矛盾しないものと考えられるが、FOXO1 がどのように卵胞発育に関与しているのかまでは究明できなかった。FOXO3 は原始卵胞活性化のサプレッサーである以外にも卵胞発育にも関与している。今回の研究での、FOXO3 mRNA 発現量が原因不明不妊患者の採卵数と相関するという結果から、FOXO3 が新たな卵巣予備能の指標となりうる可能性が示唆された。

今回の検討では、卵巣予備能の評価項目である antral follicle count (AFC) を測定していないこと、自然周期採卵でないこと、メカニズムに関する分子生物学的検討ができていないことといった限界があり、今後の課題として更なる研究が必要である。

《結論》

ヒト顆粒膜細胞に発現する FOXO1、FOXO3 は卵胞形成期に影響を与えている可能性がある。IVF-ET における原因不明不妊患者の治療反応性には、FOXO3 の関与が示唆され、卵胞発育や採卵数の予測因子となりうる可能性がある。

(様式 甲 6)

論文審査結果の要旨

原因不明不妊は、最終的に assisted reproductive technology (ART) に至ることが多く、血清 anti-Müllerian hormone (AMH) 値が正常値にも関わらず、採卵でわずかの成熟卵しか獲得できない事例もある。本研究では、卵胞発育に関与している Forkhead box O (FOXO) の subtype である FOXO1 と FOXO3 が原因不明不妊と関与しているのではないかと考え、in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) 周期の原因不明不妊症例において、顆粒膜細胞に発現する FOXO1、FOXO3 mRNA 発現量を定量的に評価し、臨床的パラメータとの関係について検討したものである。

申請者は、体外治療を受けた 31 症例 (原因不明群 : 13 例、男性因子群 : 18 例) を対象に検討を行った。検討項目は、①顆粒膜細胞における FOXO1、FOXO3 の mRNA 発現量と臨床的パラメータの相関性、②原因不明不妊群とコントロール群 (男性因子群) での FOXO1、FOXO3 mRNA 発現量の比較検討、である。FOXO3 mRNA 発現量は採卵数と血清 AMH 値に正の相関を認めた。原因不明群とコントロール群 (男性因子群) の比較では、原因不明群で有意に FOXO3 mRNA 発現量が低下していた。また妊娠群と非妊娠群の比較では差を認めなかった。重回帰分析では FOXO3 mRNA 発現量は採卵数に対して影響があると考えられたが、血清 AMH 値とは有意な関係ではなかった。

本研究では、卵胞発育の機序と FOXO1 との関係は究明できなかったが、ヒト顆粒膜細胞の FOXO3 mRNA 発現量の上昇が採卵数に影響を与えることがわかった。このことから FOXO3 は不妊治療施行時の治療反応性を予測する因子となりうることが示唆された。また原因不明不妊群では、FOXO3 mRNA 発現量が有意に低下していたことから、既存の不妊原因に該当するものがない不妊症例では、FOXO3 mRNA 発現量低下が関与している可能性が示唆された。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Obstetrics and Gynaecology Research 43(6): 1021-1028, 2017