



行し、多層化した顆粒膜細胞に囲まれた二次卵胞となる。その後、二次卵胞は外側を莢膜細胞に包まれて前胞状卵胞となり、前胞状卵胞の中に卵胞腔という空間が現れた胞状卵胞へと成長する。胞状卵胞は、性腺刺激ホルモンの制御により成熟卵胞となり、後に排卵される。

卵巣老化が進むメカニズムとして、酸化ストレス、ミトコンドリア機能不全、炎症、テロメア短縮がある。それらの中でもフリーラジカルにより生じる酸化ストレスは、卵巣老化を引き起こす上記に挙げたミトコンドリア機能不全、炎症やテロメア短縮の全てを促進する。そのため、卵巣における酸化ストレスを低減することは、卵巣老化を遅らせるために必須である。近年、酸化ストレスを抑制する方法として、食品由来の抗酸化物質が注目されており、卵巣老化に対する食品成分の効果に関する報告が増加している。そこで、本稿では酸化ストレス、ミトコンドリア機能不全、炎症やテロメア短縮が卵巣老化を誘発するメカニズムと卵巣老化に対する食品成分の保護メカニズムについて紹介する。

### 酸化ストレスが卵巣老化へ及ぼす影響

細胞が持つ抗酸化能力を上回る高レベルの活性酸素種 (ROS) は、酸化ストレスをもたらしたタンパク質、脂質や DNA などの生体分子に酸化障害を与え、老化を引き起こす。動物モデルとしては、ローダミン B などの酸化ストレス誘導剤や D-ガラクトースを用いて卵巣老化や卵巣機能不全モデルを作製することができる<sup>4)5)</sup>。卵巣に蓄積した ROS は卵母細胞の質を低下させ、酸化ストレスに対する感受性が高い顆粒膜細胞のアポトーシスを誘導する。顆粒膜細胞は、卵母細胞に栄養や成熟可能因子を与えることで卵母細胞の正常な成熟を可能にするだけでなく、細胞固有の抗酸化システムにより酸化ストレスから卵母細胞を保護する役割がある。したがって、顆粒膜細胞での過剰なアポトーシスは卵母細胞の成熟および生死に影響する。アポトーシスによる顆粒膜細胞の減少は、加齢により増加する<sup>6)</sup>。最近の研究において、酸化ストレス誘導性の顆粒膜細胞のアポトーシスは、JNK/p53/Puma 経路を介していることが示されている<sup>7)</sup>。

卵巣内環境における抗酸化酵素の量は年齢とともに減少するため、ROS を除去する能力が低下する。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) とカタラーゼは、ROS に対する内因性の抗酸化システムを形成する因子である。排卵前の卵母細胞を囲む卵丘細胞での SOD 活性は成人後に年齢とともに減少し、SOD の活性は体

外受精の成否にも影響する<sup>8)</sup>。酸化と抗酸化のバランスの調節には、転写因子 NF-E2 related factor 2 (Nrf2) による抗酸化関連遺伝子の発現制御が関与する。Nrf2 は通常 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) と結合して細胞質に存在しているが、酸化ストレスを受けると Keap1 と解離して核に移行し、標的遺伝子である SOD1, SOD2, カタラーゼや heme oxygenase-1 (HO-1) の発現を誘導する。ROS と抗酸化の平衡失調は卵母細胞の成熟を阻害し、体外受精の成否および卵巣老化にも悪影響を与える。

### ミトコンドリア機能不全が卵巣老化へ及ぼす影響

ミトコンドリアは細胞のエネルギー産生のものであり、好気性呼吸を通してエネルギーを供給し、卵巣の成熟、受精、そして胚発生を制御する。高齢マウスの卵母細胞あたりのミトコンドリア DNA (mtDNA) コピー数は、若齢時と比べて減少する<sup>9)</sup>。卵母細胞と顆粒膜細胞のミトコンドリア量の減少は、遺伝子の変異により卵巣機能が低下する脆弱 X 関連早期卵巣不全モデルマウスにおいても認められている<sup>10)</sup>。したがって、卵母細胞、顆粒膜細胞、そして卵丘細胞の mtDNA コピー数は、卵母細胞の質や胚の生存率の予測に使用されている。さらに、ミトコンドリアの量だけではなく質も卵巣老化に関係する。高齢マウスは、若齢マウスと比較して卵母細胞の mtDNA の点変異の発生が高い。老化の過程で起こる mtDNA 変異を模倣した *PolgA*<sup>Mut/Mut</sup> マウスでは、野生型マウスと比較して卵胞の mtDNA 点変異の発生が高く、卵母細胞の NADH/NAD<sup>+</sup> 比が有意に低い<sup>11)</sup>。以上より、卵母細胞、顆粒膜細胞と卵丘細胞のミトコンドリア量の減少および質の低下は、卵巣老化を進展させると考えられている。

### 炎症が卵巣老化へ及ぼす影響

炎症は老化の一因であり、卵巣老化との関係も見いだされている。高齢マウスの卵巣では、若齢マウスの卵巣と比較して、炎症誘発性サイトカインである *Tnfa*, *Il-6*, *Il-1α*, *Il-1β* の発現レベルが有意に高い<sup>12)</sup>。*Tnfa* ノックアウトマウスは、野生型マウスと比較して顆粒膜細胞の増殖能が高く、出生率が高い<sup>13)</sup>。ヒト臨床試験において、早期閉経の女性は健康な女性に比べ腫瘍壊死因子受容体 2 (TNFR2) の発現レベルが高いことが判明している<sup>14)</sup>。これらの結果より、TNFα/TNFR2 シグナル伝達経路の抑制は卵巣老化の予防において重要であると考えられる。

炎症誘導因子 NLRP3 インフラマソームは、老化の過

程で増加する障害やストレスシグナルにより活性化される。高齢マウスは若齢マウスと比較して卵巣の NLRP3 の発現レベルが高く、活性型 caspase-1 および IL-1 $\beta$  の発現レベルも高い<sup>15)</sup>。NLRP3、活性型 caspase-1 および IL-1 $\beta$  の増加は、卵巣予備能が低下した女性の顆粒膜細胞においても報告されている。さらに *Nlrp3* をノックアウトした高齢マウスでは、野生型の高齢マウスと比較して卵巣での IL-1 $\beta$  および IL-18 の発現レベルが低く、妊娠率および出生率が有意に高い<sup>15)</sup>。これらの結果より、NLRP3 インフラマソームによる炎症誘導も卵巣老化を惹起する一因となりうる。

### テロメア短縮が卵巣老化へ及ぼす影響

ヒトの卵母細胞のテロメアの長さは年齢には相関しないが、卵母細胞のテロメアが長い女性のほうが、テロメアが短い女性よりも妊娠率が高いと言われている<sup>16)</sup>。テロメアの長さとお卵巣老化の逆相関の関係は、受精能を有する第二減数分裂中期(MII)で停止した卵母細胞(MII 卵母細胞)でも示されている。高齢マウスでは、MII 卵母細胞のテロメラーゼの発現レベルが低く、テロメアも短い<sup>17)</sup>。卵母細胞だけではなく、顆粒膜細胞のテロメアの短縮も卵巣老化を早める。卵巣機能不全のひとつである原発性卵巣機能不全の患者では、健康な女性と比較して顆粒膜細胞のテロメラーゼ活性が低く、テロメアが短い<sup>18)</sup>。テロメアは酸化ストレスに対する感度が高いため、酸化ストレスはテロメア短縮の主な原因になる。外因性の酸化促進剤であるタバコ濃縮物をマウスの胚に暴露するとテロメア短縮が起こるが、抗酸化物質である *N*-アセチル-L-システインはタバコ濃縮物によるテロメア短縮を低減する<sup>19)</sup>。これらの結果から、酸化ストレスはテロメア短縮を引き起こして卵巣老化を進展させるが、抗酸化物質は酸化ストレスによるテロメア短縮を介した卵巣老化を抑制することが推測される。

### 卵巣老化を低減させる食品成分

最近の研究で、抗酸化能を有する食品成分の卵巣老化への効果が注目されている。本稿ではビタミン C と E、レスベラトロール、クルクミンそしてモグロシド V について紹介する。ビタミン C は ROS を消去し、ビタミン E は脂質過酸化反応を防ぐ抗酸化物質である。150 mg/kg のビタミン C をマウスに与えると、老化による卵巣重量の減少が抑制される<sup>20)</sup>。さらに、コントロール群では老化とともに原子卵胞数、一次卵胞数、二次卵胞数そして胞状卵胞数が減少するが、ビタミン C 摂取群ではそれらの減少が抑制される。ローダ

ミン B により酸化ストレスを誘導したラットに、ビタミン C とビタミン E を 36 日間経口投与すると、ローダミン B による卵巣における SOD 活性の低下とマロンジアルデヒドレベルの上昇が抑制される<sup>4)</sup>。これらの結果から、卵巣老化を遅らせるために、ビタミン C とビタミン E の抗酸化作用が有効であると考えられる。

レスベラトロールは天然の抗酸化ポリフェノールであり、ブドウ (*Vitis species.*) やイタドリ (*Reynoutria japonica*) に豊富に含まれている。レスベラトロールを 12 か月摂取した高齢マウスは、非摂取群の高齢マウスと比較して腹子数が有意に多い<sup>21)</sup>。このとき、レスベラトロールを摂取したマウスの卵巣ではテロメアが長い。レスベラトロールについては、卵母細胞への直接的な効果も明らかにされている。具体的には、凍結融解した卵母細胞を 1  $\mu$ M のレスベラトロール存在下で培養すると、mtDNA コピー数が有意に増加する。さらに、レスベラトロールは、ミトコンドリア生合成に関与する遺伝子である *PGC-1 $\alpha$* 、*TFAM*、*POLG* の発現レベルを有意に上昇させる<sup>22)</sup>。以上より、レスベラトロールは直接的に卵母細胞に作用し、卵巣老化を予防する可能性がある。

クルクミンはウコン (*Curcuma longa*) の根茎に含まれるポリフェノールである。D-ガラクトースにより誘発した早発卵巣不全 (POI) モデルマウスの卵胞数の減少が、42 日間のクルクミン摂取により抑制される<sup>5)</sup>。このとき、クルクミンを摂取した POI モデルマウスの卵巣では、SOD 活性が高くマロンジアルデヒドレベルが低い。さらに、クルクミンの摂取は、POI モデルマウスで上昇した卵巣の cleaved caspase-3 および cleaved caspase-9 の発現レベルを低下させ、抗酸化に寄与する Nrf2 および HO-1 の発現レベルを上昇させる。以上より、クルクミンは Nrf2/HO-1 経路を活性化することにより、D-ガラクトース誘導性の卵巣での酸化ストレスおよびアポトーシスを抑制することが考えられる。

モグロシド V はラカンカ (*Siraitia grosvenorii*) に最も多く含まれるトリテルペノイド配糖体である。モグロシド V はスクロースの 380 倍もの甘味を呈するため、甘味料として利用されている。モグロシド V を含むモグロシド類は、腸管内において消化酵素や腸内細菌による脱糖化を受け、アグリコンであるモグロールに代謝される。モグロシド V を豊富に含む抽出物を 44 週間摂取した高齢マウスの卵巣では、炎症性サイトカイン (*Tnfa* や *Il-6* など) の発現レベルが低く、卵胞数が多い<sup>23)</sup>。モグロシド V の一部は体内に取り込まれるため<sup>24)</sup><sup>25)</sup>、モグロシド V 自身が腸管内で作用するか、モ

グロールに代謝された後に生体内に取り込まれて作用する可能性が考えられる。

### おわりに

本稿では、卵巣老化を引き起こすメカニズムと卵巣老化の予防に寄与する食品成分について紹介した。酸化ストレスは卵巣老化を引き起こし、さらに卵巣老化に関連するミトコンドリア機能不全、炎症およびテロメア短縮の全てを促進する。そのため、卵巣での酸化ストレスを低減することは、卵巣老化の予防に有効であり、抗酸化能を有する食品成分による卵巣老化への効果に期待が寄せられる。抗酸化成分を含む食品は、主に高齢者が対象とされているが、若年女性の卵母細胞の質の維持にも寄与する可能性がある。今後は、ヒトにおいても食品成分が卵巣老化を低減するかについて研究を行う必要がある。研究の発展により、卵巣老化の予防が妊娠可能期間の延長と寿命の延伸を実現させることを期待したい。

**Key words** :ovarian aging, oxidative stress, vitamin and food factor, oocyte, female life span

<sup>1</sup>Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University

<sup>2</sup>Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University

Chisato Tanaka<sup>1</sup>, Tomoya Kitakaze<sup>1,2</sup>, Naoki Harada<sup>1,2</sup>, Ryoichi Yamaji<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻

<sup>2</sup> 大阪公立大学大学院農学研究科生命機能化学専攻

田中 千智<sup>1</sup>, 北風 智也<sup>1,2</sup>, 原田 直樹<sup>1,2</sup>, 山地 亮一<sup>1,2</sup>

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2022.11.2 受付)

## 文 献

- 1) Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC (2009) Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev* **30**, 465–493
- 2) Li CJ, Lin LT, Tsai HW, Chern CU, Wen ZH, Wang PH, Tsui KH (2021) The molecular regulation in the pathophysiology in ovarian aging. *Aging Dis* **12**, 934–949
- 3) Mason JB, Cargill SL, Anderson GB, Carey JR (2009) Transplantation of young ovaries to old mice increased life span in transplant recipients. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **64**, 1207–1211
- 4) Laili AN, Ananingsih I, Wiyasa IWA, Indrawan IWA, Barlianto W, Yueniwati Y (2015) Protective effect of combined vitamin C and E against ovarian and endometrial toxicity in rats that receiving oral rhodamine B. *Biomarker Genom Med* **7**, 154–158
- 5) Yan Z, Dai Y, Fu H, Zheng Y, Bao D, Yin Y, Chen Q, Nie X, Hao Q, Hou D, Cui Y (2018) Curcumin exerts a protective effect against premature ovarian failure in mice. *J Mol Endocrinol* **60**, 261–271
- 6) Wu YG, Barad DH, Kushnir VA, Lazzaroni E, Wang Q, Albertini DF, Gleicher N (2015) Aging-related premature luteinization of granulosa cells is avoided by early oocyte retrieval. *J Endocrinol* **226**, 167–180
- 7) Yang H, Xie Y, Yang D, Ren D (2017) Oxidative stress-induced apoptosis in granulosa cells involves JNK, p53 and Puma. *Oncotarget* **8**, 25310–25322
- 8) Matos L, Stevenson D, Gomes F, Silva-Carvalho JL, Almeida H (2009) Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Mol Hum Reprod* **15**, 411–419
- 9) Pasquariello R, Ermisch AF, Silva E, McCormick S, Logsdon D, Barfield JP, Schoolcraft WB, Krisher RL (2019) Alterations in oocyte mitochondrial number and function are related to spindle defects and occur with maternal aging in mice and humans. *Biol Reprod* **100**, 971–981
- 10) Conca Dioguardi C, Uslu B, Haynes M, Kurus M, Gul M, Miao DQ, De Santis L, Ferrari M, Bellone S, Santin A, Giulivi C, Hoffman G, Usdin K, Johnson J (2016) Granulosa cell and oocyte mitochondrial abnormalities in a mouse model of fragile X primary ovarian insufficiency. *Mol Hum Reprod* **22**, 384–396
- 11) Yang L, Lin X, Tang H, Fan Y, Zeng S, Jia L, Li Y, Shi Y, He S, Wang H, Hu Z, Gong X, Liang X, Yang Y, Liu X (2020) Mitochondrial DNA mutation exacerbates female reproductive aging via impairment of the NADH/NAD<sup>+</sup> redox. *Aging Cell* **19**, e13206
- 12) Lliberos C, Liew SH, Zareie P, La Gruta NL, Mansell A, Hutt K (2021) Evaluation of inflammation and follicle depletion during ovarian aging in mice. *Sci Rep* **11**, 278
- 13) Cui LL, Yang G, Pan J, Zhang C (2011) Tumor necrosis factor  $\alpha$  knockout increases fertility of mice. *Theriogenology* **75**, 867–876
- 14) Bertone-Johnson ER, Manson JE, Purdue-Smithe AC, Hankinson SE, Rosner BA, Whitcomb BW (2019) A prospective study of inflammatory biomarker levels and risk of early menopause. *Menopause* **26**, 32–38
- 15) Navarro-Pando JM, Alcocer-Gómez E, Castejón-Vega B, Navarro-Villarán E, Condés-Hervás M, Mundi-Roldan M, Muntané J, Pérez-Pulido AJ, Bullon P, Wang C, Hoffman HM, Sanz A, Mbalaviele G, Ryffel B, Cordero MD (2021) Inhibition of the NLRP3 inflammasome prevents ovarian aging. *Sci Adv* **7**, eabc7409
- 16) Keefe DL, Liu L, Marquard K (2007) Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women. *Cell Mol Life Sci* **64**, 139–143

- 17) Yamada-Fukunaga T, Yamada M, Hamatani T, Chikazawa N, Ogawa S, Akutsu H, Miura T, Miyado K, Tarín JJ, Kuji N, Umezawa A, Yoshimura Y (2013) Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol* **11**, 108
- 18) Butts S, Riethman H, Ratcliffe S, Shaunik A, Coutifaris C, Barnhart K (2009) Correlation of telomere length and telomerase activity with occult ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 4835–4843
- 19) Huang J, Okuka M, McLean M, Keefe DL, Liu L (2010) Telomere susceptibility to cigarette smoke-induced oxidative damage and chromosomal instability of mouse embryos in vitro. *Free Radic Biol Med* **48**, 1663–1676
- 20) Abdollahifar MA, Azad N, Sajadi E, Shams Mofarahe Z, Zare F, Moradi A, Rezaee F, Gholamin M, Abdi S (2019) Vitamin C restores ovarian follicular reservation in a mouse model of aging. *Anat Cell Biol* **52**, 196–203
- 21) Liu M, Yin Y, Ye X, Zeng M, Zhao Q, Keefe DL, Liu L (2013) Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Hum Reprod* **28**, 707–717
- 22) Ito J, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H (2020) Resveratrol treatment increases mitochondrial biogenesis and improves viability of porcine germinal-vesicle stage vitrified-warmed oocytes. *Cryobiology* **93**, 37–43
- 23) Du Y, Liu J, Liu S, Hu J, Wang S, Cui K, Yan K, Liu X, Wu NR, Yang X, Liang X (2022) Mogroside-rich extract from *Siraitia grosvenorii* fruits protects against the depletion of ovarian reserves in aging mice by ameliorating inflammatory stress. *Food Funct* **13**, 121–130
- 24) Murata Y, Ogawa T, Suzuki YA, Yoshikawa S, Inui H, Sugiura M, Nakano Y (2010) Digestion and absorption of *Siraitia grosvenori* triterpenoids in the rat. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 673–676
- 25) Xu F, Li DP, Huang ZC, Lu FL, Wang L, Huang YL, Wang RF, Liu GX, Shang MY, Cai SQ (2015) Exploring in vitro, in vivo metabolism of mogroside V and distribution of its metabolites in rats by HPLC-ESI-IT-TOF-MS<sup>n</sup>. *J Pharm Biomed Anal* **115**, 418–430