

体外受精胚培養における顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）

Sarah A Robertson PhD

はじめに

生殖補助医療技術（ART）において未だ達成されていない最大の課題の一つは、自然受精の環境を正確に再現した体外受精（IVF）胚培養液の開発です。体内には存在するものの、大半の市販培養液には含まれていない成分として、ポリペプチドサイトカイン、すなわちサイトカインが挙げられます。顆粒球単球コロニー刺激因子（GM-CSF）は、前臨床及び臨床の幅広い研究において、健康なヒト胚の発生を促進することが実証されているサイトカインです。体内での自然受精後、GM-CSFは卵管及び子宮内に分泌され、発生中の胚を浸す液中に存在しています。GM-CSFの受容体は、接合子期から着床前の胚盤胞期にかけて胚の表面に発現し、着床後は栄養芽層の細胞にも発現します。臨床試験の結果、一部の患者グループで、GM-CSFによって胚盤胞発生の促進や着床率の改善がされる可能性があることが示唆されています。

サイトカイン：胚発生の生理的調節因子

体内での自然受精時には、胚は卵管の中を移動し、子宮に入って着床するまで、移り変わるサイトカインの混合物にさらされています。サイトカインは、胚と母体組織間の情報伝達を媒介するシグナル伝達因子として作用しており、双方の発生が同期するよう調節するとともに、着床が成功する可能性を最大限に高めています。体外では、単純な培養液中でも胚は発生可能ですが、自然受精の環境下では、各種のサイトカインに胚を曝露すると、発生能が改善されるという確かなエビデンスがあります^{1,2}。

これらのサイトカインは、遺伝子の発現を微調整し、細胞ストレスから胚を守ることで、細胞の生存と適時発生を促しています。その結果、着床能が向上し、丈夫な胎盤が形成されます^{1,3,4}。

さまざまなサイトカインが着床前の胚発生を促進していますが、その多くは、互いに一部重複したシグナル経路を刺激しています。少量の培養液中でまとめて培養したIVF胚は成長が良くなりますが、これは、こうしたいわゆる「自己分泌」サイトカインによるものです（図1）。

サイトカインは、有糸分裂細胞周期を刺激することはありません。むしろ、p53誘導アポトーシスによる構成性の細胞死経路を妨げる生存因子として作用しています⁵。

ただし、サイトカインが発生中の胚のアポトーシスを完全に抑制することはありません⁶。体内発生胚、体外発生胚の双方で、ある程度のアポトーシスが胚盤胞で生じるのは正常だと考えられています。これは、アポトーシスが、発生時に異常な細胞や不要な細胞を排除するために必要な生物学的機構であるためです⁷。サイトカインが異常な細胞を救済するというエビデンスはなく、また、他の種類の細胞でもサイトカインにこうした機能は認められないことから、こうした作用がある可能性は低いと考えられます。

最良の条件下で最善を尽くして自己分泌サイトカインの作用を促しても、体外発生胚は体内発生胚よりも発生速度が遅く、また細胞数も少なくなります²。このことから、母体組織から通常分泌される傍分泌因子役割が非常に重要であることが分かります（図1）。体内の場合、発生中の胚は、着床に至るまでに生殖器官内を移動していく際、卵管及び子宮の細胞から放出される各種のサイトカインを浴びます。母体由来の傍分泌因子、自己分泌サイトカインと連携して作用し、内在性の発生プログラムを調節しています¹。

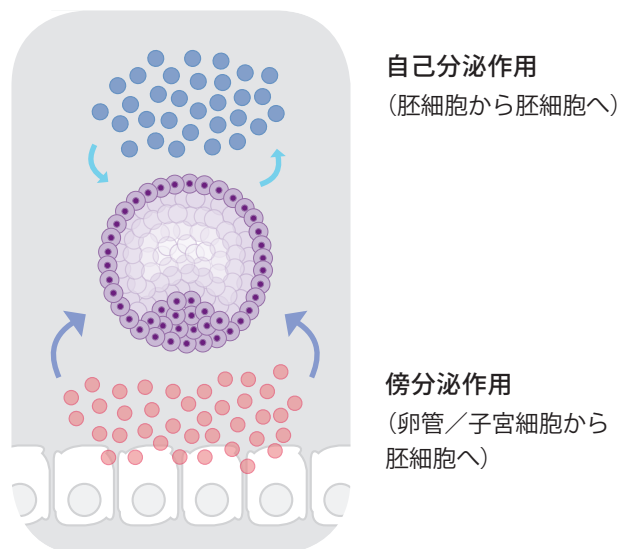


図1：生殖器官におけるサイトカインの自己分泌作用及び傍分泌作用

GM-CSF: 鍵となる胚が自己分泌できないサイトカイン

胚が自己分泌することができないサイトカインが一つあります。それが、顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF、別名CSF2) です。女性では、GM-CSF は卵管及び子宮の上皮細胞から分泌され、その量は黄体期中期に最も多くなります^{8,9}。

GM-CSF は、胚内では生存因子として作用し、正常なグルコース取り込みを促進するとともに¹⁰、サイトカインの非存在下で生じるストレス応答とアポトーシスのデフォルト経路から胚を保護します¹¹ (表 1 及び図 2)。

GM-CSF の生理的作用	変化
接合子期から胚盤胞期への進行	促進
胚盤胞発生までの時間	短縮
細胞数と内部細胞塊 (ICM) 及び栄養外胚葉 (TE) への分化	正常化
細胞生存及びアポトーシス	正常化
遺伝子発現プロファイル	正常化
グルコース取り込み	促進
ストレス応答	抑制
着床及び発生成	促進

表 1

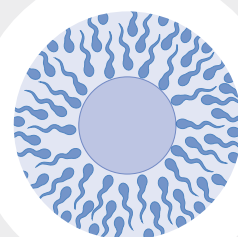
こうした GM-CSF の応答は、環境ストレス因子と相互に作用している可能性があります。というのも、GM-CSF は、培養液にヒト血清アルブミン (HSA) を添加しないことによってストレスが誘導された際に、胚盤胞を維持する効果を最も示すためです¹²。アルブミンの役割の一つは、胚の発生を維持する自己分泌サイトカインの担体として作用することです。

ヒト IVF 胚では、体外培養によって細胞分裂の停止や遅延、あるいは異常が生じ得ることから、多くの場合、胚盤胞期に到達する胚の割合は 50 %未満です。ヒトの胚では、GM-CSF に胚への栄養作用が認められており¹³、GM-CSF を添加すると、凍結融解胚が胚盤胞へと発生する割合が大きく上昇します^{6,13}。孵化した胚盤胞を細胞外マトリックスでコーティングした培養皿に付着させ、その発生成を評価した場合にも、GM-CSF への曝露後に改善が認められています¹³。他のサイトカインの存在下でも、GM-CSF は重要な役割を果たしています。ヒト IVF 胚を自己子宮内膜細胞と共培養したところ、GM-CSF の産生量は、胚移植後に妊娠が成功する可能性と相関していました¹⁴。

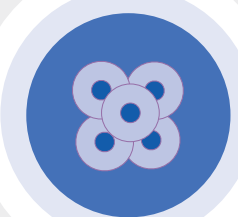
受精時に女性の生殖器官によって整えられるこうしたサイトカインの環境は、その後の胎児及び胎盤発生のプログラミングにおける主な要因となる可能性があります。割球数や、胚盤胞の内部細胞塊/栄養外胚葉への分化にわずかな変動が生じただけで、胎児や出生児の成長軌跡に影響が生じます¹⁵。

GM-CSF

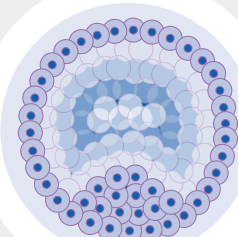
遺伝子発現
代謝
細胞ストレスとアポトーシス



胚盤胞の生存能
着床能
胚プログラミング



受胎産物の生存
胎盤の発生
胎児の成長



胎児の成長



図 2: 女性の生殖器官におけるサイトカイン発現は、卵巣ステロイドホルモンとさまざまな内因性及び外因性因子によって調節されています。

妊娠前後のサイトカイン環境では、胚栄養性(抗アポトーシス)因子と胚毒性(アポトーシス)因子が平衡状態にあります。これらの因子は共に、着床前の胚における遺伝子発現、代謝、細胞ストレス、及びアポトーシスの経路に影響しており、下流イベントの契機となって、着床、胎盤発生、胎児の成長、さらには出生後の表現型や健康にも影響を与えます。

IVF胚発生におけるGM-CSFの臨床試験

ドナー卵母細胞由来のヒト IVF 胚を用いたある試験により、GM-CSF の存在下で培養した胚で、染色体異常の増加は認められないことが確認されました¹⁶。GM-CSF 存在下での培養時には、均一に正常な胚の割合は 34.8 %でした。一方、サイトカイン非存在下では、均一に正常な胚の割合は 33.3 %でした。したがって、染色体異常を有する割合又は胚が、GM-CSF によって「救済」される可能性はごく低いと考えられます。

ヒト IVF 胚への GM-CSF 添加が着床率に及ぼす影響を評価するため、多施設共同、ランダム化、プラセボ対照、二重盲検、前向き試験が実施され、2007 年に完了しました。本試験の対象は、14 の不妊治療施設で登録されたデンマーク人及びスウェーデン人の患者 1,332 名でした。

受精、3 日目までの胚培養、及び胚移植を、対照培養液又は 2 ng/mL の GM-CSF を添加した培養液を用いて実施したところ、GM-CSF 群では妊娠第 12 週の着床率が顕著に高く、着床継続率（移植胚の数に対する胎児心拍ありの数の割合）が 23.0 %であったのに対し、対照群では 18.7 %でした¹⁷。その結果、出生の可能性が高くなり、死産、周産期死亡、又は胎児異常に対する GM-CSF の有害作用は認められませんでした。また、妊娠期間や出生時体重に変化はありませんでした¹⁷。

最初に治療を受けた女性 620 名では、2 mg/mL の HSA を含むコントロール培養液が用いられました。中間審査を経て、続く 529 名の女性では、5 mg/mL の HSA を含むコントロール培養液に変更されました。基本培養液と相互に作用する GM-CSF がその効果を顕著に示したのは、HSA の含有量が少ない場合のみでした。HSA タンパク質が少ないことは顕著なストレス因子であるため、この所見は、培養によるストレスから胚を保護する GM-CSF の作用と一致しています。

GM-CSF の効果が最も大きかったのは、IVF 又は自然受精後に流産した経験のある女性 327 名のサブグループでした。このサブグループにおける第 12 週の着床継続率は、対照培養液では 16.5 %であったのに対し、GM-CSF の添加時には 23.2 %となり、40 %上昇しました。完了した本試験での出生児の追跡調査によると、GM-CSF の添加時には、流産歴ありのサブグループで生児を出産した女性の割合は 23.1 %から 29.6 %へと 28 %上昇し、この効果は培養液の HSA 含有量とは無関係でした（図 3）。

注目すべきことに、試験全体の生化学的妊娠率は、GM-CSF を添加しても変化しませんでした。むしろ、GM-CSF の添加は、着床継続率の維持や第 12 週までの胎児喪失率の低下と関連しており、第 12 週までの胎児喪失率は、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)が陽性であった女性全体の 33.5 %から 22.9 %に低下しました。

この大規模な臨床試験により、ある状況下では、IVF 胚培養液への GM-CSF 添加は、妊娠成功と健児の正期出生に有用であるというエビデンスが得られました。一部の女性では、生殖器官の胚発生支持能が低いか、あるいは胚が培養によるストレスをより受けやすいと考えられます。重要なことに、GM-CSF 群での有害な転帰を示すエビデンスは得られておらず、安心できる結果となっています。

まとめ

GM-CSF は、ヒト IVF での有用性が実証された最初のサイトカインです。今後、ART で各種のサイトカインが用いられる可能性があります。その作用の自然な生物学的メカニズムを理解し、臨床での使用根拠となる確かなエビデンスを得るには、適切にデザインされた研究と臨床試験が必要です。

利益相反の声明： Sarah Robertson PhD は、IVF 培養液における GM-CSF の有用性に関する特許の創案者であり、CooperSurgical 社から特許権使用料を得ています。

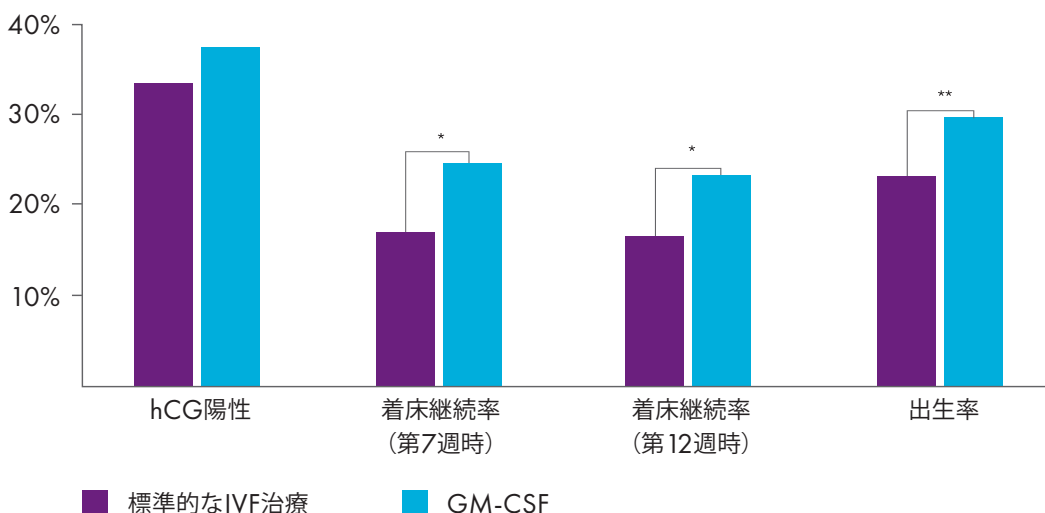


図 3：流産歴のある患者のサブグループ解析 (289 名、胚移植周期)、14 の施設から 1300 名超の患者を登録した多施設共同、ランダム化、対照並行群間、二重盲検試験による。

* p < 0.01、** p < 0.05¹⁷

参考文献

1. Hardy K, Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J Endocrinol* 2002; 172:221-236.
2. Richter KS. The importance of growth factors for preimplantation embryo development and in-vitro culture. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20:292-304.
3. O'Neill C. The potential roles for embryotrophic ligands in preimplantation embryo development. *Hum Reprod Update* 2008; 14:275-288.
4. Bromfield JJ, Schjenken JE, Chin PY, Care AS, Jasper MJ, Robertson SA. Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111:2200-2205.
5. O'Neill C, Li Y, Jin XL. Survival signaling in the preimplantation embryo. *Theriogenology* 2012; 77:773-784.
6. Sjoblom C, Wikland M, Robertson SA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. *Biol Reprod* 2002; 67:1817-1823.
7. Hardy K. Apoptosis in the human embryo. *Rev Reprod* 1999; 4:125-134.
8. Giacomini G, Tabibzadeh SS, Satyaswaroop PG, Bonsi L, Vitale L, Bagnara GP, Strippoli P, Jasonni VM. Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human endometrium. *Human Reproduction* 1995; 10:3259-3263.
9. Zhao Y, Chegini N, Flanders KC. Human fallopian tube expresses transforming growth factor (TGF beta) isoforms, TGF beta type I-III receptor messenger ribonucleic acid and protein, and contains [125I] TGF beta-binding sites. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1177-1184.
10. Robertson SA, Sjoblom C, Jasper MJ, Norman RJ, Seamark RF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2001; 64:1206-1215.
11. Chin PY, Macpherson AM, Thompson JG, Lane M, Robertson SA. Stress response genes are suppressed in mouse preimplantation embryos by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Human Reprod* 2009; 24:2997-3009.
12. Karagenc L, Lane M, Gardner DK. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates mouse blastocyst inner cell mass development only when media lack human serum albumin. *Reprod Biomed Online* 2005; 10:511-518.
13. Sjoblom C, Wikland M, Robertson SA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. *Hum Reprod* 1999; 14:3069-3076.
14. Spandorfer SD, Barmat LI, Liu HC, Mele C, Veeck L, Rosenwaks Z. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor production by autologous endometrial co-culture is associated with outcome for in vitro fertilization patients with a history of multiple implantation failures. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40:377-381.
15. Thompson JG, Kind KL, Roberts CT, Robertson SA, Robinson JS. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: short and long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: more reason for caution? *Hum Reprod* 2002; 17:2783-2786.
16. Agerholm I, Loft A, Hald F, Lemmen JG, Munding B, Sorensen PD, Ziebe S. Culture of human oocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has no effect on embryonic chromosomal constitution. *Reprod Biomed Online* 2010; 20:477-484.
17. Ziebe S, Loft A, Povlsen BB, Erb K, Agerholm I, Aasted M, Gabrielsen A, Hnida C, Zobel DP, Munding B, Bendz SH, Robertson SA. A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2013; 99:1600-1609.



Sarah A Robertson PhD FAA FAHMS

Sarah Robertson 教授は、1993 年にアデレード大学で生殖免疫学の博士号を取得しました。1996 年から 2013 年にかけて国立健康医学研究会議 (NHMRC) で研究員を務め、2013 年からアデレード大学の Robinson Research Institute の所長を務めています。

Sarah の研究テーマは、受精及び胚着床の免疫的調節と、生殖成功及び出生児の健康への影響です。NHMRC、オーストラリア研究会議 (ARC)、カナダ保健研究機構 (CIHR)、及びビル&メリンダ・ゲイツ財団から資金提供を受けており、査読付きの学術雑誌に 180 報を超える論文及びレビューが掲載されています。

Australian Academy of Science (オーストラリア科学アカデミー) 及び Australian Academy for Health and Medical Sciences (オーストラリア保健医学アカデミー) の選出フェローであり、Society for Reproductive Biology (生殖生物学会) のフェローです。

2009 年から 2013 年にかけて *Journal of Reproductive Immunology* の編集長を務めました。現在、Sarah は Editorial Boards of *Endocrinology* 及び *Journal of Clinical Investigation* で勤務しています。