

であるIL-17の免疫組織染色を施行した。子宮内膜症患者の腹腔内貯留液より、CD14ビーズをもちいてリンパ球系細胞を分離したのちに、フローサイトメーターでCD4陽性かつIL-17陽性のTh17細胞の存在を調べた。つぎに、培養子宮内膜間質細胞を使用してIL-4ならびにIL-17のIL-8産生に対する作用、COX-2発現に対する作用などを検討した。

4. 子宮内膜症におけるTRAIL誘導性アポトーシスの意義を検討した。子宮内膜症間質細胞にツニカマイシン(2ug/ml)を添加し、TRAIL受容体であるDR5 mRNAの経時的発現を定量的PCRにて測定した。子宮内膜症間質細胞および正所性子宮内膜間質細胞にツニカマイシン(2ug/ml)を16時間添加した後、TRAIL(200ng/ml)を24時間添加し、アポトーシスをflow cytometryにて定量した。またTRAIL添加の1時間前にz-VAD-fmk(caspase阻害剤、30uM)を添加して同様の実験を施行した。さらに、DR5 siRNA(50nM)を24時間導入の後、同様の実験を施行した。
5. CD44はヒアルロン酸に結合する膜貫通接着分子で、種々の生理・病理学的現象に関与し、近年、子宮内膜症での重要性もいわれている。このCD44には可溶性のsCD44もあるが、子宮内膜症においての意義は不明な点も多い。子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者の腹腔内貯留液中sCD44濃度をELISAにより測定した。

(倫理面への配慮)

研究は本施設の倫理委員会の承認をうけ、患者検体を使う場合は本人より書面によるインフォームドコンセントを得て行った。

C. 研究結果

1. 術後再発は全体224例中68例に認められ、再発率は30.4%であった。表1に各因子の再発に及ぼす影響についての単変量解析とロジスティック回帰分析の結果を、p値、オッズ比および95%信頼区間の順に示した。単変量解析では、年齢、不妊症、子宮筋腫、子宮腺筋症の有無、子宮内膜症性卵巣嚢胞の手術既往の有無、嚢胞が単数か複数か、片側か両側か、術後薬物治療の有無はいずれも、再発に有意な影響を与えなかった。子宮内膜症に対する薬物療法既往のある症例、最大嚢胞径の大きい症例、rASRMが高得点の症例では、再発を起しやす傾向があり、一方術後妊娠した症例では再発を起しにくい傾向があった。ロジスティック回帰分析では、他の因子と独立して統計学的に有意に再発率を上げる因子として、子宮内膜症に対する薬物既往、大きい最大嚢胞径の2因子があげられた。rASRMスコア得点は再発率に統計学的

に有意な影響は与えなかった。一方術後妊娠は、他の因子と独立して統計学的に再発率を低下させた。

2. ジェノグストは子宮内膜症間質細胞における24時間でのBrdU取り込みを10-7Mで平均7%、10-6Mで平均16%抑制した。48時間においても同様に抑制効果が認められた。メトフォルミンの添加は、子宮内膜症間質細胞培養上清中のIL-8産生量を対照に比べ濃度依存性に67%まで低下させた。また、aromataseの遺伝子発現および活性を濃度依存性に最大58%と66%に抑制した。さらに、metforminの添加は、細胞増殖能を濃度依存性に最大22%に抑制したが、細胞毒性は認められなかった。
3. 子宮内膜症組織の間質にIL-4陽性細胞が認められ、その頻度は約14%であった。これらの細胞はCD3との蛍光2重染色によってTh2細胞であることが確かめられた。一方、子宮内膜症間質細胞にはIL-4受容体の遺伝子発現が確認された。IL-4(0.1-10ng/ml)添加により子宮内膜症間質細胞の細胞数とBrdU取り込みは用量依存性に有意に増加した。IL-4の増殖作用は抗IL-4受容体抗体により抑制された。IL-4はp38MAPK, JNK, ERKの各MAPキナーゼをリン酸化した。また、各MAPキナーゼの阻害剤はIL-4の子宮内膜症間質細胞増殖作用を抑制した。また、子宮内膜症患者腹腔内貯留液中にCD4陽性、CD17陽性のTh17が存在した。IL-17陽性細胞は、正常子宮内膜に比較し子宮内膜症病変に著明に多く存在し、腺上皮の直下に多く局在していた。培養子宮内膜症間質細胞においてIL-17受容体mRNA、IL-17受容体が発現していた。子宮内膜症間質細胞は1ng/ml以上のIL-17刺激により有意にIL-8の産生を亢進した。また、IL-17受容体の中和抗体は、このIL-8産生を抑制した。IL-17刺激は、1ng/ml以上で子宮内膜症間質細胞のBrdUの取り込みを有意に増加させた。
4. 子宮内膜症組織では正所性子宮内膜と比較してDR5の発現が40%程度と有意に低下していた。ツニカマイシンは子宮内膜症間質細胞におけるDR5 mRNAの発現を12時間で対照の3.7倍に増加させた。ツニカマイシンの前処置により子宮内膜症間質細胞におけるTRAIL誘導性アポトーシス(85.2%)は対照(6.1%)に比し著明に増加した。しかし、正所性子宮内膜間質細胞ではこのような増加は認めなかった。子宮内膜症間質細胞で認められた増加はz-VAD-fmk添加により29.8%まで抑制され、caspase依存性と考えられた。また、DR5 siRNA導入によりツニカマイシンによるDR5 mRNA発現の増加が抑制されるとともにTRAIL誘導性アポトーシスも

33.5%まで有意に抑制された。

5. sCD44の濃度は増殖期と分泌期では差を認めなかった。子宮内膜症患者において腹腔内貯留液中sCD44は子宮内膜症でない患者のそれより有意に高値であった。rASRMのスコアと腹腔内貯留液中sCD44値は正の相関を認めており、臨床進行期との関係をみるとIII/IV期でI/II期より有意に高値であった。

D. 考察

子宮内膜症合併不妊の治療は腹腔鏡手術を行った後に、保存的療法ならびに体外受精をおこなうのが妥当と考えられるが、今回の研究結果が示すように子宮内膜症性卵巣嚢胞の摘出後に約3割が再発することを考慮しなくてはならない。すなわち、現在不妊治療中である場合にはできるだけ早期の妊娠を目指して短期間に治療をステップアップする必要があると考えられる。一方で、妊娠を先に延ばしたい場合などは再発を予防する方法が必要となってくる。今回の検討からは術前の薬物療法はむしろ再発率を上げるかも知れないという結果となっており、今後は術後の適切な薬物療法により長期的な管理を目指すべきであると考えられる。ジェノゲストは最近市場に登場した新規のプロゲステン製剤であるが、子宮内膜症細胞に対して直接増殖抑制効果が確認されたことより多様な作用機序が期待される。また、今回の研究で子宮内膜症に対しメトフォルミンが抑制効果を持ち、治療薬となる可能性が示唆された。メトフォルミンは副作用が少なく比較的長期間使える薬物であるため、今後の更なる検討が期待される。さて、子宮内膜症におけるT細胞免疫に関してはこれまでほとんど不明であったが、本研究よりTh2細胞とTh17細胞が子宮内膜症で重要な役割を果たしていることが示唆された。特に、Th2細胞からのIL-4とTh17細胞からのIL-17がともに子宮内膜症の増殖を促進することが示唆されており、これは今後の治療戦略を考える上でも興味深い。すなわち、一部のアレルギー性疾患で試みられているIL-4アンタゴニストの使用のようにIL-4の働きをおさえることが子宮内膜症の治療となる可能性も考えられ、今後の研究の発展が期待される。また、同様に各種MAPキナーゼ阻害剤がIL-4による子宮内膜症間質細胞の増殖を抑制したことより、このような薬剤も今後の治療への応用が考慮される。MAPキナーゼ阻害剤はIL-17による子宮内膜症の促進効果も阻害することが示唆されているので、子宮内膜症を促進する複数の経路を同時に阻害する可能性も期待され一層の研究が期待される。子宮内膜症の発症機序とアポトーシスの関係については、子宮内膜症の組織でDR5の発現低下が示されたことよりTRAIL誘導性アポトーシスに対する抵抗性

がより明確となった。そこで、アポトーシス抵抗性を改善させる方法としてツニカマイシンの影響を見たわけであるが、ツニカマイシンはDR5の発現を増加させるとともに、TRAIL誘導性アポトーシスを著明に増加させた。別の見方をすると、ツニカマイシン以外のDR5を誘導する物質も同様の効果を発揮する可能性があり、新たな治療法の展開が期待される。最後に、子宮内膜症患者の腹腔内貯留液中sCD44の上昇は腹腔内の子宮内膜細胞からの炎症などによる遊離と考えることもできる。子宮内膜に発現するCD44は腹膜中皮細胞のヒアルロン酸との接着を介して子宮内膜症発症に寄与すると考えられており、実際にヒアルロン酸をもちいた動物実験ではこの接着の抑制が子宮内膜症の進行を抑制するデータが得られている。CD44を標的とした治療も今後検討されるべき課題の1つである。

E. 結論

子宮内膜症による不妊治療に手術療法と体外受精は有効であるが、いまだ効果は十分でなく更なる妊娠率向上のためには手術療法の限界まで踏まえた管理が必要である。子宮内膜症卵巣嚢胞の保存手術では約3割の再発があり、再発率をあげる要因として嚢胞の大きさなどがあつて。今後は再発まで考えた長期管理の指針を検討していく必要がある。新規の治療薬としてジェノゲストがあげられるが、その作用機序が中枢のみにとどまらず、病巣局所に作用することがわかったため、今後は局所療法も含めた治療法の拡大が期待される。また、既に他領域で広く使用されているメトフォルミンが今後の治療法の選択肢の一つとなる可能性が示された。また、子宮内膜症の病態にはT細胞が深く関与しており、Th2およびTh17細胞の分泌するサイトカインが子宮内膜症を進展させると考えられる。よって、今後はT細胞免疫を考慮した治療戦略を考える必要がある。一方、子宮内膜症の病態としてアポトーシス抵抗性はやはり重要な概念であることが再認識されたが、アポトーシス誘導因子の受容体を誘導することにより子宮内膜症を治療しえるという新たな概念が本研究により提唱できたことは大きな前進と考える。さらに、CD44という新たな治療標的が示唆されたことも意義深い。

以上、本研究は今後の子宮内膜症治療に大きく寄与するとともに、同疾患を合併する多くの不妊症患者の治療に新たな道しるべを樹立した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirata T, Osuga Y, Fujimoto A, Oishi H, Hiroi H, Fujiwara T, Yano T, Taketani Y. Conjoined twins in a triplet pregnancy after ICSI and blastocyst transfer: Case report and review of the literature. *Fertil Steril* 91:e9-12, 2009

Fu L, Osuga Y, Yano T, Takemura Y, Morimoto C, Hirota Y, Schally AV, Taketani Y. Expression and possible implication of GHRH receptor splice variant 1 (SV1) in endometriosis. *Fertil Steril* (in press)

Hasegawa A, Osuga Y, Hirota Y, Hamasaki K, Kodama A, Harada M, Tajima T, Takemura Y, Hirata T, Yoshino O, Koga K, Yano T, Taketani Y. Tunicamycin enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand (TRAIL)-induced apoptosis in endometriotic stromal cells. *Hum Reprod* 24:408-14, 2009

Hirota Y, Osuga Y, Hasegawa A, Kodama A, Tajima T, Hamasaki K, Kogah K, Yoshino O, Hirata T, Harada M, Takemura Y, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. IL-1 β stimulates migration and survival of first trimester villous cytotrophoblast cells through endometrial epithelial cell-derived IL-8. *Endocrinology* 150:350-6, 2009

OuYang Z, Hirota Y, Osuga Y, Hamasaki K, Hasegawa A, Tajima T, Hirata T, Koga K, Yoshino O, Harada M, Takemura Y, Nose E, Yano T, Taketani Y. Interleukin-4 stimulates proliferation of endometriotic stromal cells. *Am J Pathol* 173: 463-9, 2008

Yanai Y, Hiroi H, Osuga Y, Fujimoto A, Momoeda M, Yano T, Taketani Y. Androgen insensitivity syndrome with serous gonadal cyst. *Fertil Steril* 90:2018, 2008

Hirota Y, Tranguch S, Daikoku T, Hasegawa A, Osuga Y, Taketani Y, Dey SK. Deficiency of Immunophilin FKBP52 Promotes Endometriosis. *Am J Pathol* 173:1747-57, 2008

Osuga Y. Novel therapeutic strategies for endometriosis: a pathophysiological perspective. *Gynecol Obstet Invest*. 66 Suppl 1:3-9, 2008

Osuga Y, Hirota Y, Taketani Y. Basic and translational research on proteinase-activated receptors: proteinase-activated receptors in female reproductive tissues and endometriosis. *J Pharmacol Sci*. 108:422-5, 2008

Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Yoshino O, Ito M, Hasegawa A, Takemura Y, Hirota Y, Nose E, Morimoto C, Harada M, Koga K, Tajima T, Saito S, Yano T, Taketani Y. Interleukin (IL)-17A Stimulates IL-8 Secretion, Cyclooxygenase-2 Expression, and Cell Proliferation of Endometriotic Stromal Cells. *Endocrinology*. 149: 1260-1267, 2008.

Fu L, Osuga Y, Morimoto C, Hirata T, Hirota Y, Yano T, Taketani Y. Dienogest inhibits BrdU

uptake with G(0)/G(1) arrest in cultured endometriotic stromal cells. *Fertil Steril*. 89:1344-7, 2008

Hasegawa A, Yoshino O, Osuga Y, Hirata T, Yano T, Taketani Y. High soluble CD44 concentration in peritoneal fluid in endometriosis. *Fertil Steril*. 89:1267-8, 2008

Osuga Y, Koga K, Hirata T, Hiroi H, Taketani Y. A case of hydrosalpinx associated with the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 90:199, 2008

2. 学会発表

欧陽卓, 廣田泰, 大須賀稔, 濱崎かほり, 長谷川亜希子, 田島敏樹, 平田哲也, 甲賀かをり, 吉野修, 原田美由紀, 竹村由里, 矢野哲, 武谷雄二, 子宮内膜症におけるTh2細胞とIL-4の意義について, 第53回日本生殖医学会

藤本晃久, 大石元, 平田哲也, 原田美由紀, 廣井久彦, 大須賀稔, 矢野哲, 武谷雄二, 40歳以上で不妊治療を開始した症例の成績と治療方針に関する検討, 第53回日本生殖医学会

平田哲也, 大須賀稔, 濱崎かほり, 吉野修, 伊藤実香, 長谷川亜希子, 竹村由里, 廣田泰, 能瀬栄美, 森本千恵子, 原田美由紀, 甲賀かをり, 齋藤滋, 矢野哲, 武谷雄二, 子宮内膜症の発症, 進展におけるIL-17の意義, 第53回日本生殖医学会

吉野修, 施佳, 大須賀稔, 矢野哲, 西井修, 武谷雄二, ヒト卵巣におけるbone morphogenetic protein(BMP)-6の発現と機能に関する検討, 第53回日本生殖医学会

大須賀稔, 子宮内膜症の診断・治療における腹腔鏡の意義, 子宮内膜症合併不妊における腹腔鏡の適応と意義についての諸問題, 第48回日本産科婦人科内視鏡学会

平田哲也, 大須賀稔, 濱崎かほり, 吉野修, 原田美由紀, 長谷川亜希子, 田島敏樹, 児玉亜子, 伊藤実香, 齋藤滋, 矢野哲, 武谷雄二, 子宮内膜症におけるTh17の発現とその意義, 第60回日本産科婦人科学会

大須賀稔, 子宮内膜症, 第60回日本産科婦人科学会

Osuga Y. Current understanding of the pathogenesis of endometriosis, 13th Seoul International Symposium

Osuga Y. Progress in the management of endometriosis, 94th Annual Meeting of the Korean Society of Obstetrics and Gynecology

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

非閉塞性無精子症関連遺伝子の探索

分担研究者 井ノ上逸朗 東海大学医学部 教授

研究要旨

我々は、非閉塞性無精子症の遺伝要因を探るため、Y染色体の微小ゲノム構造異常をAgilent社のCGH (Comparative Genomic Hybridization)アレイを用いて、網羅的に検出する方法を確立した。その結果、数 kb 程度の微小欠失を精度よく検出することができた。更に、Multiplex PCR法で、患者及び対照由来のDNAより、微小欠失の有無を確認し、頻度を算定した。その結果、非閉塞性無精子症(NOA)患者群では406人中18人(4.43%)の欠失、対照群では571人中11人の欠失(1.93%)が観察された。関連解析の結果、オッズ比が2.30(95%信頼区間1.05-5.60)、p-valueが 3.35×10^{-2} であり、微小欠失は患者群で有意に多かった。

A. 研究目的

不妊症の原因究明に関し、女性側要因のみでなく男性側要因へのアプローチも重要である。もとより、不妊の原因として男性要因が25%程度を占めるといわれている。Okadaらにより、ADP-ribosyltransferase 3 (*ART3*) 遺伝子が男性不妊症に関連する遺伝子であることが同定された。

本研究では、*ART3*遺伝子の人類集団における遺伝的多様性および集団構造を明らかにする目的で、疾患感受性SNPのリスクアレル頻度やハプロタイプの頻度分布を調べた。

次に、我々はAgilent社のCGH (Comparative Genomic Hybridization)アレイを用いて、Y染色体転写領域における構造異常の網羅的な検出方法を確立した。病態の詳細に迫るため新たなCGHデザインにより微小構造異常解析を行い、男性不妊症原因解明を目指す。

B. 研究方法

1. 男性不妊症感受性遺伝子*ART3*の集団遺伝学的解析

1-1. 対象

アフリカ3集団、ユーラシア6集団、東アジア2集団からなる合計11の男女混成一般集団(567人)のゲノムDNA。

1-2. ヒト*ART3*遺伝子を含む48kbにわたる領域のSNPのタイピング。

データベース上のヒトのこの領域の塩基配列を基に、必要なPCRおよびシークエンスプライマーを作成した。ゲノムDNAをPCRで増幅し、自動シークエンス解析装置(ABI PRISM 3700)を用いたダイレクトシークエンス法、または、TaqMan® SNP Genotyping Assaysにて、SNPのタイピングを行った。

1-3. 解析ツール

AMOVA (Analysis of molecular variance)により、集団構造の地理的階層性を分析した。ハプロタイプの推定には、PHASE v2.1を用いた。

2.Y染色体を中心とした微小構造異常解析

2-1. DNA検体

検体に関しては、子供を持ち精子数及び運動能が正常な男性と、非閉塞性無精子症患者男性を、それぞれ約650人を揃えた。

2-2.アソシエーション・スタディ

検出された微小構造異常に関しては、PCR法によるバリデーション法を確立し、構造異常の存在をCGH法とは異なる手法で確認した。すべての検体においてPCR法によるタイピングを行った。欠失に関してはmultiplex PCR、増幅に関しては定量PCRを行った。患者及び対照における微小構造異常頻度の違いをカイ検定で検定した。初期有意水準は <0.05 に規定した。

(倫理面への配慮)

本研究は新潟大学医学部倫理審査委員会承認を得ている(2006年10月24日付け)。かつ東海大学医学部医の倫理委員会でも承認を受けている(2006年10月27日付け)。今回の研究は不妊治療というかなりプライバシーと関連しているため、個人情報管理には当初より特別な配慮がなされている。各協力施設で収集された検体は新潟大学医学部産婦人科で通常の匿名化される。個人情報は新潟大学の個人情報管理者のスタンドアロンコンピュータに保管されている。そして匿名化された検体のすべてが東海大学に送られ、東海大学で再符号化した検体を東海大学、新潟大学(再送付)で研究に用いている。ここで2重に匿名化されているので、研究結果に伴う個人情報が漏れることはないと考えて良い。

C. 研究結果

1. 男性不妊症感受性遺伝子ART3の集団遺伝学的解析

分析した15個の感受性SNPのうち14個において、11集団間における有意な遺伝的分化を認めた。地理的階層性に関する分析から、各地域集団内の遺伝的分化は顕著ではなく、人類集団内の集団構造は、主として、地域集団間の違いに基づくことが明らかになった。他方、ユーラシア、東アジア集団における疾患感受性ハプロタイプの頻度は4.9%~29.5%と推定されたものの、アフリカ人集団における推定頻度は2.3%であり、ハプロタイプレベルでの集団分化も認めた。

2.Y染色体を中心とした微小構造異常解析

我々はプローブデザインアルゴリズム(CGH probes via eArray online microarray design tool, Agilent社提供)を用いて、NCBI database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>)に登録されているY染色体の477転写領域(短腕も含む)にprobeを配置して4×44kカスタムCGHアレイを作成し、微小構造異常を検出できるかどうかを検討した。その結果、数kb程度の数微小欠失を精度よく検出できることが確認された。Multiplex PCR法で、患者及び対照由来のDNAより、微小欠失の有無を確認し、微小欠失の有無を確認し、頻度を算定した。その結果、NOA患者群では406人中18人(4.43%)の欠失、対照群では571人中11人の欠失(1.93%)が観察された。関連解析の結果、オッズ比が2.30(95%信頼

区間1.05-5.60、p-valueが 3.35×10^{-2} であり、微小欠失は患者群で有意に多かった。

D. 考察

1. 男性不妊症感受性遺伝子 $ART3$ の集団遺伝学的解析

$ART3$ 遺伝子と非閉塞性無精子症との関連追試において、東アジア集団では日本人での疾患感受性SNPやハプロタイプを用いた関連解析が可能であるが、ユーラシアやアフリカの集団では遺伝子レベルでの追試を行う必要があることが示唆された。

2. Y染色体を中心とした微小構造異常解析

我々は、CGHアレイを用いて、Y染色体転写領域における構造異常の網羅的な検出法を確立した。その結果、非閉塞性無精子症 (NOA)患者でAZF領域の構造異常を確認でき、Y染色体微小構造異常を検出することが可能になった。発見された微小欠失の患者及び対照群解析を行った結果、AZFaとAZFbの間に存在する微小欠失は患者群で有意に多かった。更に、検出されたゲノム構造異常とMean germinal epithelium score (Johnsen's score)との関連を調べることにより、男性不妊症の原因解析を試み、そこから得られる病態解明から男性不妊症への新たな治療法開発を探ることが期待される。

E. 結論

本研究では、男性不妊症の疾患感受性遺伝子として同定された、 $ART3$ 遺伝子領域における世界の多様な集団における詳細な

遺伝子多型の検討を行った。今後、この見地をもとに男性不妊症の感受性遺伝子の同定を効率よく進めていくことが可能であると考えられる。

更に、カスタム CGH アレイを作成して Y 染色体の欠失を網羅的に検出し、Y 染色体の微小欠失を検出することを可能とした。更に、検出された微小欠失と非閉塞性無精子症との関連を検討した。今後、この見地をもとに精巣組織の遺伝子発現プロファイル、細胞・組織レベルでの機能解析、非閉塞性無精子症患者における CGH 解析を乏精子症患者へと拡張し乏精子症における射出精子での de novo 微小欠失の検出を検討しており、微小欠失と非閉塞性無精子症 (NOA)との関連を効率よく調べていくことが可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) A. Tajima, H. Okada, M. Sekine, K. Shichiri, A. Tanaka, K. Tanaka, I. Inoue, Candidate-gene association study of non-obstructive azoospermia (NOA): $ART3$ as a genetic susceptibility to NOA, ASHG meeting, 2007, October, San Diego
- 2) 井ノ上 逸朗 (シンポジウム)「男性不妊症解明に向けたゲノム医学からのアプローチ」日本人類遺伝学会第53回大会(横

浜) 2008年9月

- 3) 高橋 朋子、田嶋 敦、井ノ上 逸朗(口頭発表)「男性不妊症感受性遺伝子 ART3 の人類遺伝学的解析」日本人類遺伝学会第53回大会(横浜)2008年9月
- 4) 秋山 康一、塚本 秀雄、田嶋 敦、井ノ上 逸朗、田中 憲一、井ノ上 逸朗(ポスター発表)「二次元電気泳動法を用いた精子無力症関連遺伝子の探索」第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会 合同大会(神戸)2008年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

卵細胞の質に係わる分子機構の解明に関する研究

研究分担者 岡部 勝 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨

平成19年度は染色体異常の仔が生まれやすかったり、産仔数が少なかったりする表現形を持つXY型性転換雌マウスの卵子を老齢卵子モデルとして、卵細胞の「質」について研究を行った。平成20年度は受精時に卵子と密接に関係する因子として、精子側からのアプローチを我々が同定したIZUMOに注目し、IZUMOのN結合型付加糖鎖の役割について明らかにした。

A. 研究目的

我が国において少子化が問題となっているが、生殖研究は不妊の原因を突き止め、解決法を探るために欠かすことができない。平成19年度は不妊の原因の一つに妊娠する女性の高齢化に伴う妊娠率の低下を挙げ、卵細胞の「質」が受精後の発生・分化に影響を与えるのではないかと考え、マウスを材料に研究を行うことにした。直接老齢マウスを使用した実験では材料の調整と実験の円滑な遂行が難しいため、人工的に細胞質に問題があると考えられるマウスの実験系を作出したうえで、卵細胞の質にかかわる分子機構の解明を目指した。

卵子の質の評価は、卵子が成熟し、精子と受精して、個体として発生・誕生するまでが対象になると考えられる。平成20年度は特に受精時の卵子の質に密接に関わる精子側の因子を明らかにしようと試みた。受精は卵子と精子が融合して初めて成立するが、その融合メカニズムはほとんど分かっていない。我々は生体内でさまざまな細胞間相互作用において重要な役割を持つことが知られている糖鎖修飾に着目し、受精時に卵子と精子の相互作用への役割を明らかにすることを目指した。

B. 研究方法

平成19年度は、老齢卵子のモデルとして、XY型卵子を用いて、研究を行った。Y染色体上のSry遺伝子を欠損したY染色体であるY^{tdym1}をもつXY^{tdym1}型のマウスは性分化に異常をきたし雌となる。この性転換雌マウスは生殖能力を持つがこのXY^{tdym1}型雌マウスから生まれてくる仔にはXO型やXXY型、XYY型と言った性染色体の異常が頻りにみられることが報告されている。またこのマウスは野生型の雌マウスに比べ産仔数が少ないばかりでなく、生殖期間も短くなると報告されていることから、XY^{tdym1}雌マウスの卵子は老齢卵子に代えて、卵細胞の「質」を研究するための材料として適していると考えた。

XY^{tdym1}雌マウスはX染色体上にGFP遺伝子が挿入されたX^{GFP}トランスジェニックマウスを利用し、これをY^{tdym1}のSry欠損をトランスジェニックSryでレスキューしたマウスと交配させたものを野生型の雌と交配させることによって得た。この方法を用いることにより、目的とするXY型性転換雌マウスを容易に選別できるように工夫した。また、XY^{tdym1}雌マウ

スから得られる産仔の性染色体の組合せをPCR法で容易に検出できるようにX染色体上の系統間の多型を利用したプライマー設計を行い、性染色体異常の検出に用いた。

マウスの選別が簡便になることから、これまでの報告を再確認するとともに、3週齢で過排卵処理を行ったXY^{tdym1}雌マウスと野生型のXX雌マウスを野生型の雄マウスと交配させ、2細胞期胚を回収して、初期発生の比較解析を行った。

平成20年度は卵子との融合に重要な精子上に存在する分子であるIZUMOに注目して、研究を行った。細胞間の相互作用に重要と言われている糖鎖がIZUMOに付加しているかどうかを知るために、*in silico*で予測される糖鎖付加配列を検索した。実際、精子上のIZUMOに糖鎖が付加しているかどうかを調べるために、グルコシダーゼ処理した後、ウエスタンブロットで分子量の変化を調べた。グルコシダーゼによりタンパク質に付加している糖鎖は外れるので、IZUMOに糖鎖が付加されていれば、野生型に比べ低分子量にバンドがシフトするという手法である。

また、IZUMOにおける糖鎖の役割を調べるために、糖鎖付加配列を欠損したミュータントIZUMOを精巣特異的なカルメジンプロモーターで発現するトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスの遺伝的背景をIzumoノックアウトにすることで、糖鎖修飾をうけないIZUMO精子が作られる。このマウスを用いて交配実験を行い、妊孕性を調べた。さらに、膜透過性のHoechst33342を卵子に封入して、糖鎖欠損IZUMOをもつ精子を媒精し、卵子と融合するかどうかを検討した。

また、IZUMOのモノクローン抗体を作製し、糖鎖の付加がなくなったとき蛋白質質量や分子量に変化が無いかどうかをウエスタンブロットングによって調べた。

(倫理面への配慮)

マウスを使用する実験であるので倫理面での配慮は動物実験を適正に行っていることに限定することができる。本研究では大阪大学に動物実験計画書を提出し、その審査を経たうえで実験を行っており、倫理的な問題をクリアしている。

C. 研究結果

卵細胞の質を調べる研究で用いたXY^{tdym1}雌マウスはC3H系統の雌とB6系統のコンジュニックのX^{GFP}Y^{tdym1}Sryトランスジェニックマウスから誕生させた。このXY^{tdym1}雌マウスはこれまでの報告と同様にXO型、XXY型、XXYY型の性染色体の組合せを持つ仔を生み、産仔数も約半数であった。

3週齢で過排卵処理を行った場合の排卵数はXY^{tdym1}雌とXX雌マウスで著しい違いは認められなかった。しかし、XX雌由来の胚では80%以上が胚盤胞になる培養条件下でXY^{tdym1}雌由来の胚は55%以上が2細胞期で発生を停止し、胚盤胞期まで発生したものは15%未満と低率になることがわかった(図1)。

図.1 XXとXY^{tdym1}雌マウス由来胚の初期発生における発生率の比較

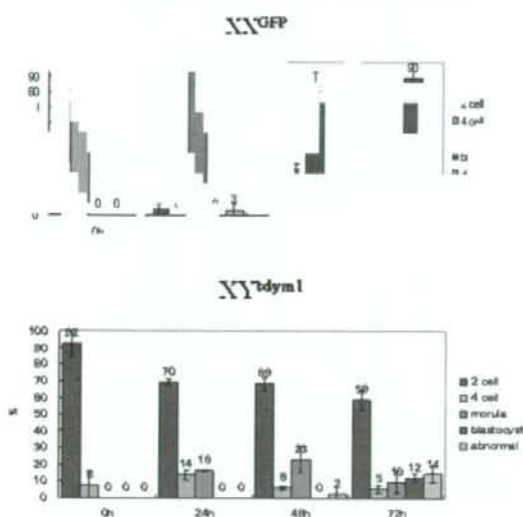
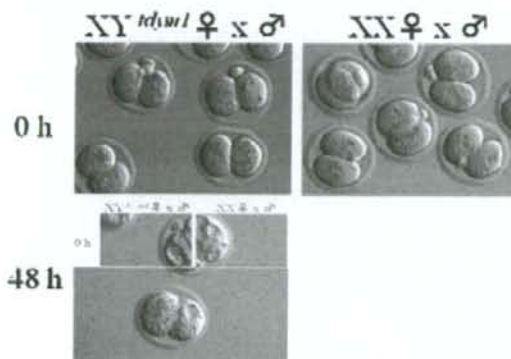


図.2 XY^{tdym1}雌マウス由来胚の脆弱性



精子に存在し卵子との融合に密接にかかわる分子であるIZUMOには4か所のO結合型糖鎖付加配列の存在が予測された。しかし、O結合型グリコシダーゼ処理を行っても、分子量に変化がなかったことから、O結合型糖鎖は付加されていないことが示された。また、免疫グロブリン様ドメイン内には、動

物種間で高度に保存されているN結合型糖鎖付加配列が存在し、N結合型グリコシダーゼ処理によって、分子量が減少し、N結合型糖鎖が付加されていることが明らかになった(図3)。

次に、IZUMOのN結合型糖鎖の役割を調べるために、204番目のアスパラギンをグルタミンに変異させたミュータントを精巣特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、これらマウスをIzumoノックアウトバックグラウンドに置き換えることで、精子上に存在するIZUMOのN結合型糖鎖を完全に欠失させた(N204Q-IZUMO)。

N204Q-IZUMOの雄からの妊孕性は野性型の約30%であった(図4)。この原因を探るために精子-卵子の融合解析を行ったところ、N204Q-IZUMOの精子はほとんど融合が成立していないことが分かった。

また、モノクローン抗体を用いてN204Q-IZUMOの精子のウェスタンブロット解析を行うと、野性型に比べ有意にタンパク質量が減少していることに加え、30 kDaと35 kDaのフラグメント化したバンドが検出された。

図.3 グリコシダーゼ処理後のIZUMO

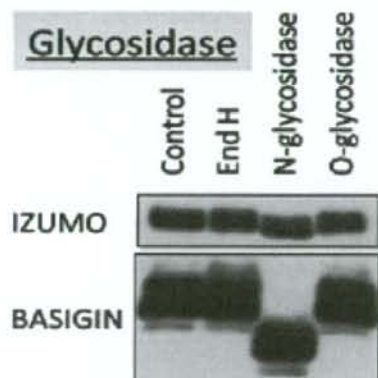
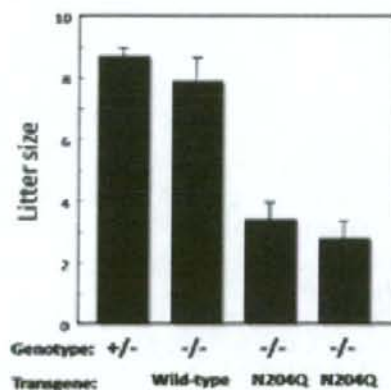


図.4 N204Q-IZUMOの妊孕性への影響



D. 考察

これまで、XY^{AKR}やXY^{TIR}などY染色体以外をB6のコンジェニックにするとXY型性転換になり、雌性不妊になるという報告があるが、本研究によりXY^{tdym1}雌マウスにおける、少ない産仔数や産仔の染色体異常といった表現形は遺伝的なバックグラウンドに依存せず、より直接的に性染色体に依存していることが示された。

また、本研究ではXY^{tdym1}雌由来の胚の発生率が著しく悪いということだけでなく、その差が産仔数の差よりも大きいことが示された。このことは過排卵処理によって、強制的に成熟させたXY^{tdym1}卵子のほとんどが個体として発生する能力を有していないことを示した。

細胞融合には糖鎖修飾が重要な役割を担っていることが報告されている。卵子との融合に必要な精子側の分子であるIZUMOの糖鎖について調べたところ、N結合型糖鎖が精子上のIZUMOに存在しており、これを欠損させると受精能や融合能に影響することが示された。しかし、糖鎖をなくした精子上のIZUMOは精巣上体尾部において、一部がフラグメント化され、機能するIZUMOの絶対量が減少するために受精能や融合能に影響したと考えられた。すなわち、IZUMOのN結合型糖鎖の役割は精巣上体尾部でIZUMOをプロテアーゼ等から保護し、安定化することであり、膜融合機構に直接関与しているわけではないことが示唆された。

E. 結論

XY^{tdym1}雌マウス由来の卵子について、これまでの報告と同様に系統に関係なくXO型やXXY型、XYY型の産仔が得られることを確認した。また、過排卵処置をしたXY^{tdym1}卵子は受精もでき、2細胞期胚までは野生型と一見区別できない(図2)が、ほとんどは胚盤胞にまで発生できず、卵細胞そのものの「質」は見た目だけの判断では難しいことが分かった。

糖鎖をもたないN204Q-IZUMOの精子の解析により、IZUMOの卵子との膜融合機構に糖鎖修飾は直接関与しているわけではないことが明らかになった。また、糖鎖をもたないIZUMOは精巣上体にて、一部がフラグメント化していたことから、IZUMOのN結合型糖鎖修飾は精巣上体尾部で精子が成熟していく過程で、IZUMOをプロテアーゼ等から保護し、安定化する役割をもつことが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

X. Sun, H. Wang, M. Okabe, K. Mackie, P. J. Kingsley, L. Marnett, B. Cravatt and S. K. Dey, Genetic Loss of Faah Compromises Male Fertility in Mice, *Biol Reprod*, 2008, (in press)

N. Inoue, M. Ikawa and M. Okabe, Putative sperm fusion protein IZUMO and the role of N-glycosylation, *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(3), (910-4)

R. Yamaguchi, K. Yamagata, H. Hasuwa, E. Inano, M.

Ikawa and M. Okabe, Cd52, known as a major maturation-associated sperm membrane antigen secreted from the epididymis, is not required for fertilization in the mouse, *Genes Cells*, 2008, 13(8), (851-61)

D. Y. Youn, D. H. Lee, M. H. Lim, J. S. Yoon, J. H. Lim, S. E. Jung, C. E. Yeum, C. W. Park, H. J. Youn, J. S. Lee, S. B. Lee, M. Ikawa, M. Okabe, Y. Tsujimoto and J. H. Lee, Bis deficiency results in early lethality with metabolic deterioration and involution of the spleen and thymus, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295(6), (E1349-57)

K. Tokuhira, M. Hirose, Y. Miyagawa, A. Tsujimura, S. Irie, A. Isotani, M. Okabe, Y. Toyama, C. Ito, K. Toshimori, K. Takeda, S. Oshio, H. Tainaka, J. Tsuchida, A. Okuyama, Y. Nishimune and H. Tanaka, Meichroacidin containing the membrane occupation and recognition nexus motif is essential for spermatozoa morphogenesis, *J Biol Chem*, 2008, 283(27), (19039-48)

K. Miyado, K. Yoshida, K. Yamagata, K. Sakakibara, M. Okabe, X. Wang, K. Miyamoto, H. Akutsu, T. Kondo, Y. Takahashi, T. Ban, C. Ito, K. Toshimori, A. Nakamura, M. Ito, M. Miyado, E. Mekada and A. Umezawa, The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(35), (12921-6)

S. Kuramochi-Miyagawa, T. Watanabe, K. Gotoh, Y. Totoki, A. Toyoda, M. Ikawa, N. Asada, K. Kojima, Y. Yamaguchi, T. W. Ijiri, K. Hata, E. Li, Y. Matsuda, T. Kimura, M. Okabe, Y. Sakaki, H. Sasaki and T. Nakano, DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MIL1 and MIWI2 in murine fetal testes, *Genes Dev*, 2008, 22(7), (908-17)

M. Ikawa, N. Inoue and M. Okabe, Mechanisms of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals, *Int J Dev Biol*, 2008, 52(5-6), (657-64)

N. Inoue and M. Okabe, Sperm-egg fusion assay in mammals, *Methods Mol Biol*, 2008, 475, (335-45)

T. Sato, M. Kurokawa, Y. Nakashima, T. Ida, T. Takahashi, Y. Fukue, M. Ikawa, M. Okabe, K. Kangawa and M. Kojima, Ghrelin deficiency does not influence feeding performance, *Regul Pept*, 2008, 145(1-3), (7-11)

Y. Ueda, R. Yamaguchi, M. Ikawa, M. Okabe, E. Morii, Y. Maeda and T. Kinoshita, PGAP1 knock-out mice show otocephaly and male infertility, *J Biol Chem*, 2007, 282(42), (30373-80)

H. Umehara, T. Kimura, S. Ohtsuka, T. Nakamura, K. Kitajima, M. Ikawa, M. Okabe, H. Niwa and T. Nakano, Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase-3, *Stem Cells*, 2007, 25(11), (2705-11)

M. Okabe and J. M. Cummins, Mechanisms of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals, *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(15), (1945-58)

磯谷綾子, 岡部 勝, X-linked GFPマウスを用いた雌雄別と生殖細胞の動態, 蛋白質 核酸 酵素, 2007, 52(16), (2060-66)

2. 学会発表

岡部 勝, 平成20年度日本生殖医学会中部支部学術集会, 遺伝子操作動物を通してみる受精のメカニズム, 名古屋(2008)

岡部 勝, 特定領域研究「性分化機構の解明」(第5回)「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク

ーク」(第1回)合同領域会議,精子の機能不全にかかわる種々因子とそれらの相互作用, 熊本(2008)

岡部 勝, 第13回日本生殖内分泌学会学術集会, 遺伝子操作動物を通してみる受精のメカニズム, 大阪(2008)

磯谷 綾子、中西 友子、小林 慎、李 知英、中馬新一郎、中辻 憲夫、石野 史敏、岡部 勝 第54回日本実験動物学会総会 雌雄キメラマウス用いた生殖細胞における性分化の解析, 横浜(2007)

Masaru Okabe, Factors Involved in Sperm-Egg Interactions Examined by Gene-manipulated Animals. The 32nd ASA Annual Meeting Tampa, Florida, USA

(2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当事項なし
2. 実用新案登録
該当事項なし
3. その他
該当事項なし

子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な 生殖補助医療の治療体系に関する研究

分担研究者 柳田薫 国際医療福祉大学
臨床医学研究センター 教授

研究要旨

子宮内膜症は生殖年齢層の女性の10%に認められる。子宮内膜症女性の30%に不妊症が合併し、原因不明不妊症の50%に子宮内膜症が存在する。子宮内膜症は経年的に進行し、妊娠を望む夫婦において、婦人の卵管障害、卵巣障害、腹膜障害などの原因により不妊症の原因として問題を提起する。生殖医療は卵巣機能が重要であり、子宮内膜症の治療は卵巣機能を低下させることにあり、相反する事態に治療に苦慮するところとなる。子宮内膜症を合併する不妊症例では、腹腔鏡検査(手術)を積極的に選択し、病変の確定とIVFなどの治療法選択をより適切に行う。IVFの適応でない場合も、テンポのよい治療と治療成績の評価により、経年的なageingの影響も加味して柔軟な治療法選択の姿勢が重要で、妊娠に至らない場合には早期にIVFの適応として考慮する必要がある。治療としてIVFを選択した場合、期待される妊娠率は通常のIVFの成績と同等である。

○研究協力者

片寄治男 国際医療福祉大学病院
リプロダクションセンター

A. 研究目的

子宮内膜症は生殖年齢層の女性の10%に認められる。子宮内膜症女性の30%に不妊症が合併し、原因不明不妊症の50%に子宮内膜症が存在する。そして経年的に進行し¹⁾、妊娠を望む夫婦において、婦人の卵管障害、卵巣障害、腹膜障害などの原因により不妊症の原因として問題を提起する。生殖医療は卵巣機能が重要であり、子宮内膜症の治療は卵巣機能を低下させることにあり、相反する事態に治療に苦慮するところとなる。子宮内膜症を合併する不妊症例では、治療法として体外受精を採択することが多々あり、ここでは子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な生殖補助医療の治療の流れをチャート化することとした。

B. 研究方法

検索論文によるエビデンスから子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な治療指針を平成19年度に検討した。さらに、生殖補助医療への子宮内膜症の影響を自施設の治療成績と文献を調査し、その結果を治療

指針に加味してチャートを作成した。

自施設の治療調査については、平成17年4月から平成20年12月までの期間に国際医療福祉大学病院リプロダクションセンターで加療を行った不妊症夫婦を対象として調査した。治療を受けた夫婦は897組であった。この中で不妊症の検査の目的や手術治療目的で腹腔鏡手術を行った婦人が84例であった。手術所見に子宮内膜症を認めたのが20例存在した。20例中7例が生殖補助医療(体外受精)を選択され、治療を受けていた。さらにその7例中4例に妊娠が得られた。臨床的背景、腹腔鏡手術の有無、手術時の子宮内膜症所見を調査した。また、体外受精(IVF)を実施した症例では、controlled ovarian stimulationの種類、採卵数、成熟卵子数、受精卵子数、day3での胚数、day3での形態良好胚数の割合などを調査した。

C. 研究結果および考察

1. 自施設での子宮内膜症を合併する不妊症例の治療成績の結果

治療を受けた夫婦897組中、不妊症の検査の目的や手術治療目的で腹腔鏡手術を行った婦人が84例あった。腹腔鏡手術例の中で20例に子宮内膜症病変が

確認できた(表1)。これは84例の24%にあたる。20例の平均年齢は 33.4 ± 3.8 歳、IVF実施例7例の平均年齢は 34.1 ± 4.8 歳、非実施例13例の平均年齢は 33.0 ± 3.3 歳であった。主病変はほとんどが子宮内膜症性卵巣嚢胞(チョコレート嚢胞)であった(85%)。他はblue berry spotなどの腹膜病変であった。re-ASRM分類ではほとんどが3および4と判断された。2は2例のみであった。当センターでの治療経過からは現在のところ3例が妊娠を得た。この3例はいずれもIVFが実施され、IVFによって妊娠したものである。IVFは20例中7例に実施され、3例に妊娠が成立した(妊娠率43%)。腹腔鏡手術後、妊娠までの月数は9ヶ月から12ヶ月であり、総じて1年以内であった。IVFを実施していない13例は、タイミング法、人工授精(AIH)を実施しているところである。術後1年未満の経過の症例が6例存在する。また、術後24ヶ月を越える症例は6例存在するが、これらの症例についてはIVFのよい適応と考えられる。実際の治療選択の観点から考えると、腹腔鏡手術後12ヶ月を経過した時点で妊娠が得られなかった場合には、ステップアップとしてIVFを選択すべきと考えられる。

IVFを実施した7例について、IVFでの卵子・胚の状態について調査した(表2)。4症例は2回ずつ実施していた。採卵数をみると、平均 2.8 ± 1.8 個であり、成熟卵子は27個であった。成熟率は87.1%であり、通常成熟率は85%といわれているので²⁾、成熟性については子宮内膜症の影響はないものと思われる。しかし、採卵数が少なく、いわゆる poor responder がほとんどであることがわかる。これらの症例の平均年齢は34歳であったので、年連的な要因はないものと思われる。IVFの施術前に antral

follicle 数を検査して controlled ovarian stimulation を計画するが、その時に antral follicle が少ないために、clomid を用いた卵巣刺激を採用されることも多いことがわかった。Ovarian reserve の現象は外科的な治療(腹腔鏡下子宮内膜症性卵巣嚢胞核出術など)の結果ともとれる。IVFを実施した症例はすべて腹腔鏡下子宮内膜症性卵巣嚢胞核出術を受けていた。7個採卵された症例3は片側だけの核出術を受けていた。採卵周期中31%がclomidを採用していた。媒精卵子に対する受精卵をみると、81.5%の受精率で、良好な数値であり、子宮内膜症の影響はないように思われる。またday3での胚数も22個と良好であった。Day3において、7-9細胞で細胞質の断片化の割合が10%以下の場合を形態良好胚と定義すると、その割合は0-100%であり、受精卵の50%であった。この数値に関しても、通常のケースと同レベルの割合と考えられ、子宮内膜症の影響はないと思われる。

2. 子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な生殖補助医療の治療体系のチャート作成

平成19年度の研究成果をふまえて治療体系を図式化した。

1) 卵管因子例(図1)

子宮内膜症例では経年的に病勢が進行し、種々の障害因子の存在で、いわゆる妊孕能が低下する。さらに生理的な変化としての ageing の影響もあるので、よりテンポの早い治療計画が必要である。早期の腹腔鏡検査(手術)を行い、原因の確認と外科的治療を実施する。IVFの成績を低下させる卵管水腫があれば卵管開口術や状況によっては卵管切除術を行うこともある³⁾。卵巣子宮内膜症性嚢胞が存在すればチョコレート嚢胞核出術を行う。腹腔鏡手術後は、その所見よりIVFの適応であれば、

IVFを選択する。IVFの選択がなければ、6ヶ月間のタイミング法および人工授精(AIH)を主とした治療を行い、妊娠しない場合にはIVFにステップアップする。IVFの実施で妊娠が得られなかった場合や、早急な薬物療法が望ましい場合には、IVFの前治療としてGnRHagonistなどの投与を考える⁴⁾。

2) 男性因子例および受精障害例(図2)

子宮内膜症を合併しているのであれば、腹腔鏡検査を実施する。ARTはIVFで受精障害が起こることが予測される場合にはICSIを予定する。症例によっては、ART実施の前に薬物療法を少なくとも2ヶ月間実施する。

D. 結論

経年的に子宮内膜症は増悪し、女性のovarian reserveは低下する。子宮内膜症の薬物療法では卵巣機能の抑制が必要であり、不妊治療と相反するスタンスである。これらのことから、子宮内膜症を合併している不妊症例に対して、腹腔鏡による原因検索および外科的治療は、適切な治療選択の判断に必要である。また、子宮内膜症の薬物療法は生殖補助医療の成績を向上させる点でも有益である。腹腔鏡手術の所見により体外受精の適応がないと判断した場合には、術後に積極的な不妊治療を行う。タイミング法や人工授精の有効な治療期間(治療周期数)を考慮して、術後6ヶ月以内で妊娠に至らない場合には、体外受精の適応と考えて治療に望むことが有用である。

症例	年齢	r-ASRM 分類	主病変	ARTの 実施	妊娠 の有 無	腹腔鏡手 術後妊娠 までの経 過月数	腹腔鏡後 の経過月 数(非妊 娠例)
1	39	4	chocolate cyst	IVF	-	-	44
2	37	3	chocolate cyst	IVF	-	-	39
3	26	3	chocolate cyst	IVF	+	12	-
4	30	3	chocolate cyst	IVF	+	9	-
5	29	3	chocolate cyst	-	-	-	36
6	30	3	chocolate cyst	-	-	-	35
7	32	3	chocolate cyst	-	-	-	30
8	35	2	腹膜病変	IVF	-	-	-
9	32	3	chocolate cyst	-	-	-	29
10	33	4	chocolate cyst	IVF	-	-	-
11	35	2	卵巣周囲癒着	-	-	-	18
12	35	2	腹膜病変	-	-	-	16
13	39	4	chocolate cyst	IVF	+	10	-
14	32	3	chocolate cyst	-	-	-	14
15	36	4	chocolate cyst	-	-	-	11
16	32	3	chocolate cyst	-	-	-	10
17	27	4	chocolate cyst	-	-	-	8
18	33	3	chocolate cyst	-	-	-	6
19	37	3	chocolate cyst	-	-	-	5
20	39	4	chocolate cyst	-	-	-	3

表1 腹腔鏡手術で子宮内膜症を認めた20例の臨床的背景

症例番号	ARTの種類	r-ASRM分類	COS ¹⁾	採卵数	成熟卵数	受精卵数	day3胚数	移植胚数	妊娠の有無	良好胚数 (day3)	良好胚 ¹⁾ の割合 (day3) %
1	IVF	4	clomid	2	2	2	2	2	-	1	50
1	IVF	4	long ²⁾	2	2	2	2	2	-	1	50
2	IVF	3	long	3	3	2	2	2	-	0	0
2	IVF	3	Antagonist ³⁾	4	4	0	0	0	-	0	0
3	IVF	3	long	7	6	6	6	2	妊娠	5	83
3	IVF	3	clomid	1	1	1	1	1	-	0	0
4	IVF	3	clomid	4	4	4	4	1	妊娠	1	25
8	IVF	2	long	4	2	2	1	1	-	1	100
10	IVF	4	long	1	1	1	1	1	-	1	100
10	IVF	4	clomid	1	1	1	1	1	-	0	0
13	IVF	4	long	2	1	1	1	1	妊娠	1	100

表2 腹腔鏡手術後の子宮内膜症例で IVF を実施したケースの結果

1) COS: controlled ovarian stimulation

2) long: long protocol

3) antagonist: antagonist 法

4) 7-9 細胞で細胞質の断片化の割合が 10%以下の胚を形態良好胚とした。

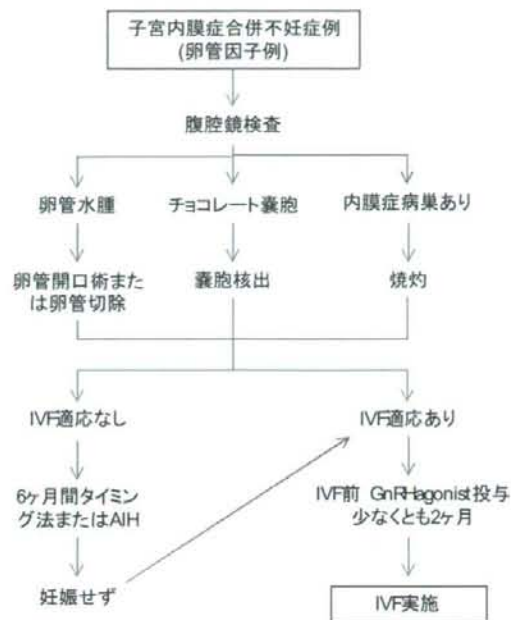


図1.子宮内膜症合併不妊症例の卵管因子での治療指針

図2.子宮内膜症合併不妊症例の男性因子・受精障害例での治療指針

(参考文献)

1) Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997; 24:235-258.
 2) 柳田 薫、藤倉洋子: 不妊・生殖医療のインフォームド・コンセント 体外受精・顕微授精。産婦人科の実際: 54: 1805-1816、2005
 3) Ozmen B, Diedrich K, Al-Hasani S: Hydrosalpinx and IVF: assessment of treatments implemented prior to IVF. *Reprod Biomed Online*, 14: 235-241, 2007
 4) Hart R, Hickey M, Maouris P, Buckett W, Garry R. : Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata: a Cochrane Review. *Hum Reprod.* 2005, 20:3000-3007.

Yanagida K, Fujikura Y, Katayose H, The present status of artificial oocyte activation in assisted reproductive technology. *Reprod. Med. Biol.* 2008, 7:133-142.

柳田薫、猪鼻達仁、藤倉洋子、片寄治男、エキスパートに学ぶ体外受精実践講座・顕微授精、臨床婦人科産科。2008, 62:951-966.

柳田薫, 体外受精・顕微授精, 日本医師会雑誌. 2008, 137: 31-34.

柳田薫、高田智美, 顕微授精での受精障害、不妊症-臨床と研究の最前線, 医学のあゆみ. 2008, 別冊: 85-89.

柳田薫, ICSIの位置づけ, 日産婦誌. 2008, 60: 377-381.

片寄治男、岩本晃明、柳田薫, ARTにおける受精・発生障害、産科と婦人科. 2008, 75: 1242-1250.

2. 学会発表
なし

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録

なし
3.その他
なし

III 研究成果に関する一欄表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
柳田薫	無月経の検査・治療法	鈴木光明	産婦人科診療指針第2版	中外医学社版	東京	2008	380-93
柳田薫	卵細胞質内精子注入法(ICSI)	鈴木光明	産婦人科診療指針第2版	中外医学社版	東京	2008	539-46

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Chen AE, Egli D, Niakan K, Deng J, Akutsu H, Yamaki M, Cowan C, Fitz-Gerald C, Zhang K, Melton DA, Eggan K.	Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines.	Cell Stem Cell.	4	103-6	2009
Asai S, Asada H, Furuya M, Ishimoto H, Tanaka M, Yoshimura Y.	Pseudoaneurysm of uterine artery after laparoscopic myomectomy.	Fertil Steril.	91	929.e1-3	2009
Hirata T., Osuga Y., Fujimoto A., Oishi H., Hiroi H., Fujiwara T., Yano T., Taketani Y.	Conjoined twins in a triplet pregnancy after ICSI and blastocyst transfer: Case report and review of the literature.	Fertil Steril.	91	e9-12	2009
Hasegawa A., Osuga Y., Hirota Y., Hamasaki K., Kodama A., Harada M., Tajima T., Takemura Y., Hirata T., Yoshino O., Koga K., Yano T., Taketani Y.	Tunicamycin enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand (TRAIL)-induced apoptosis in endometrial stromal cells.	Hum Reprod.	24	408-14	2009
Hirota Y., Osuga Y., Hasegawa A., Kodama A., Tajima T., Hamasaki K., Koga K., Yoshino O., Hirata T., Harada M., Takemura Y., Yano T., Tsutsumi O., Taketani Y.	IL-1 β stimulates migration and survival of first trimester villous cytotrophoblast cells through endometrial epithelial cell-derived IL-8.	Endocrinology	150	350-6	2009
X. Sun, H. Wang, M. Okabe, K. Mackie, P. J. Kingsley, L. Marnett, B. Cravatt and S. K. Dey	Genetic Loss of Faah Compromises Male Fertility in Mice	Biol Reprod	80	235-42	2009
Fu L., Osuga Y., Yano T., Takemura Y., Morimoto C., Hirota Y., Schally AV., Taketani Y.	Expression and possible implication of GHRH receptor splice variant 1 (SV1) in endometriosis.	Fertil Steril.			(in press)
Sullivan S, Ichida JK, Umezawa A, Akutsu H.	Nuclear reprogramming and the control of differentiation in mammalian embryos. Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach.	Reprod Biomed Online.	16	41-50	2008

Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, Akutsu H, Okabe M, Mekada E, Sakakibara K, Miyado M, Umezawa A, Miyado K.	Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice.	Mol Reprod Dev.	75	150-5	2008
Hamatani T, Yamada M, Akutsu H, Kuji N, Mochimaru Y, Takano M, Toyoda M, Miyado K, Umezawa A, Yoshimura Y.	What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes?	Reproduction.	135	581-92	2008
Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A.	The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice.	Proc Natl Acad Sci U S A.	105	12921-6	2008
Maruyama T, Yoshimura Y.	Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium.	Endocr J.	55	795-810	2008
Masuda H, Okano HJ, Maruyama T, Yoshimura Y, Okano H, Matsuzaki Y.	In vivo imaging in humanized mice.	Curr Top Microbiol Immunol	324	179-96	2008
Ohta K, Maruyama T, Uchida H, Ono M, Nagashima T, Arase T, Kajitani T, Oda H, Morita M, Yoshimura Y.	Glycodelin blocks progression to S phase and inhibits cell growth: a possible progesterone-induced regulator for endometrial epithelial cell growth.	Mol Hum Reprod.	14	17-22	2008
浅田弘法、古谷正敬、西尾浩、升田博隆、内田浩、丸山哲夫、梶谷宇、木挽貞慈、吉村泰典	異所性子宮内膜症	産婦人科治療	96	241-7	2008
丸山哲夫、梶谷宇、小田英之、西川明花、荒瀬透、内田浩、浅田弘法、吉村泰典	子宮内膜症関連遺伝子同定のための新しいアプローチ	エンドメトリシオロジー学会誌	29	42	2008
OuYang Z., Hirota Y., Osuga Y., Hamasaki K., Hasegawa A., Tajima T., Hirata T., Koga K., Yoshino O., Harada M., Takemura Y., Nose E., Yano T., Taketani Y.	Interleukin-4 stimulates proliferation of endometriotic stromal cells.	Am J Pathol.	173	463-9	2008
Yanai Y., Hiroi H., Osuga Y., Fujimoto A., Momoeda M., Yano T., Taketani Y.	Androgen insensitivity syndrome with serous gonadal cyst.	Fertil Steril.	90	2018	2008
Hirota Y., Tranguch S., Daikoku T., Hasegawa A., Osuga Y., Taketani Y.	Deficiency of Immunophilin FKBP52 Promotes Endometriosis.	Am J Pathol.	173	1747-57	2008
Osuga Y.	Novel therapeutic strategies for endometriosis: a pathophysiological perspective.	Gynecol Obstet Invest.	66 Suppl 1	3-9	2008
Osuga Y, Hirota Y, Taketani Y.	Basic and translational research on proteinase-activated receptors: proteinase-activated receptors in female reproductive tissues and endometriosis.	J Pharmacol Sci.	108	422-5	2008
Hirata T., Osuga Y., Hamasaki K., Yoshino O., Ito M., Hasegawa A., Takemura Y., Hirota Y., Nose E., Morimoto C., Harada M., Koga K., Tajima T., Saito S., Yano T.	Interleukin (IL)-17A Stimulates IL-8 Secretion, Cyclooxygenase-2 Expression, and Cell Proliferation of Endometriotic Stromal Cells.	Endocrinology	149	1260-7	2008