

200822003B

厚生労働科学研究費補助金  
子ども家庭総合研究事業

超少子化時代のわが国における新たな不妊症原因の究明と  
社会に即した治療システムの開発

平成18年度－20年度 総合研究報告書

主任研究者 阿久津 英憲

平成 21 (2009) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金  
子ども家庭総合研究事業

超少子化時代のわが国における新たな不妊症原因の究明と  
社会に即した治療システムの開発

平成 18 年度-20 年度 総合研究報告書

主任研究者 阿久津 英憲

平成 21 (2009) 年 4 月

# 目 次

I 総合研究報告書	
超少子化時代のわが国における新たな不妊症原因の究明と社会に即した 治療システムの開発.....	3
阿久津 英憲	
II 分担研究報告書	
1. 子宮・卵巣疾患の不妊症メカニズム解明及び治療体系に関する研究.....	19
佐藤 章	
2. 子宮・卵巣疾患の不妊症メカニズム解明及び治療体系の研究 生殖器疾患の不妊症機序に関する基礎的・臨床的研究.....	21
吉村 泰典 久慈 直昭	
3. 生殖器疾患の不妊症機序に関する基礎的・臨床的研究.....	29
矢野 哲 大須賀 穰	
4. 非閉塞性無精子症感受性遺伝子の集団遺伝学的解析と新規関連遺伝子の探索.....	35
井ノ上 逸朗	
5. 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.....	39
柳田 薫	
6. 卵細胞の質に係わる分子機構の解明に関する研究.....	47
岡部 勝	
III 研究成果に関する一欄表.....	51
IV 研究成果の刊行物・別冊.....	61

I 総合研究報告書

超少子化時代のわが国における新たな不妊症原因の究明と社会に即した  
治療システムの開発

阿久津 英憲

超少子化時代のわが国における新たな不妊症原因の究明と社会に  
即した治療システムの開発（H18-子ども一般-004）

主任研究者 阿久津英憲

国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部生殖技術研究室長

研究要旨：わが国の出生率は人口置換水準を大きく下回る超少子化状態にある。社会においては、女性の就業意欲と労働力率は上昇し、この社会・経済の変化は晩婚化などのライフスタイルの変化を来している。この少子化・晩婚化を社会的背景に、本研究では、社会で活躍する年代の女性が罹患することが多い子宮内膜症等の生殖器疾患を対象に体系的に妊孕性改善に対する治療を検討し治療の最適化・標準化を図ることで生殖補助医療の質を上げることを臨床的な目的とするとともに、子宮内膜症等の生殖器疾患の分子レベルでの挙動を解析し疾患メカニズムを明らかにしていく。加えて、現在の生殖医療において大変重要な課題である、女性の年齢と出生率低下の関係において加齢の卵細胞の質への影響に関して科学的裏付けのある確かなエビデンスを獲得すべく、実験動物マウスを用い、加齢・卵細胞質の発生への影響・胚性幹細胞機能への影響という3つをリンクさせた独自の研究システムにより生殖・再生医療分野に新たな解析方法を提供し新知見を得て世界的な課題である生殖医療における加齢の問題に対応できる基盤を構築する。初年度は、子宮内膜症の病因メカニズムと不妊機序の解明に関して多角的で、新規的なアプローチにより取り組み、得られた成果は将来の治療法に対して新たな可能性を強く示唆するものであり、次年度は、子宮内膜症は、女性ホルモンが強く関与する疾患であるが新たな視点としてステロイドレセプターコファクター（SRC）に着目し、SRC Family の Type-1 が卵巣性子宮内膜症に強発現していることを突き止めるとともに、子宮内膜症組織と正常内膜組織とで異なる発現形式を取る関連遺伝子を突き止め国際学会誌等に報告してきた。これらの成果は、新たな治療法を展開する重要な基盤研究となっている。本年度は、免疫学的新知見を子宮内膜症の病態メカニズム解明に取り入れ病態進展機序を解明する新知見を得た。順次すすめる基礎研究成果を実際の臨床応用に反映するため、子宮内膜症の不妊症治療の最適化・標準化を平行して進め、ガイドラインとして報告していった。もう一つの課題として、生殖と加齢の問題がある。特に卵の質の低下に関して社会の中で理解の混乱があるため、まずは卵細胞の加齢への影響を示すエビデンスが必要とされている。加齢と卵細胞の質における基礎研究では、加齢卵が分化多能性へ影響を及ぼすことが実験動物マウスを使い提示でき今後この領域の研究を展開するために重要な研究ツールを提供可能となった。ライフスタイルの変化により出産時年齢は高齢化し生殖と加齢との関連性に係わる疾患や現象に対して、科学に基づいたエビデンスを与えこの社会に即した生殖医療システムを構築し国民に提供することを目指す。尚、各施設において行う臨床研究は機関内倫理審査委員会での承認の下に行う。ヒト細胞を使用した研究は倫理審査を受け、確認を受け遂行している。「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。

分担研究者

- |                               |                                       |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| (1) 福島県立医科大学・産科婦人科学<br>佐藤 章   | (5) 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室<br>久慈 直昭         |
| (2) 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室<br>吉村 泰典 | (6) 東海大学医学部・基礎医学系分子生命<br>科学<br>井ノ上 逸朗 |
| (3) 東京大学医学部産科婦人科学教室<br>矢野 哲   | (7) 国際医療福祉大学臨床医学研究セン<br>ター<br>柳田 薫    |
| (4) 東京大学医学部産科婦人科学教室<br>大須賀 稔  | (8) 大阪大学微生物病研究所<br>岡部 勝               |

## A. 研究目的

女性の生殖適齢期間は、より高齢へとシフトするわけではなく、出生数割合の年齢分布が30歳代半ばへとシフトし晩婚化により妊娠が可能である期間はより限られた短い期間となっている。社会で活躍する年代の女性に好発する子宮内膜症、多嚢胞性卵巣症候群等が、出産時年齢の上昇とともに不妊症の原因としても大きな割合を占めるにいたっている。わが国における体外受精を中心とした生殖補助医療（ART）の利用は50,000例に達し、またARTを享受した出生児は全出生の1.5%以上を占めるようになっており、出生率（合計特殊出生率）が低下し続けている。現在、国民の多くが医学的、社会的、経済的にも何らかの形で不妊症と関連していると認識できる。晩婚化・出産時年齢の上昇にともない生殖年齢の期間に好発する生殖器疾患が不妊症の原因となりこれらの合併不妊症の基礎的・臨床的研究と生殖補助医療の適正な供給体制に関する臨床的研究は急務の課題である。本研究では、生殖器疾患のなかでも発症頻度高く不妊症女性の30%以上でその原因となっている子宮内膜症の合併不妊症に対し、挙児に至ることを目的とした治療の最適化・標準化を図る。同時に、病態機序解明と不妊症にいたる機序を解析しその分子メカニズムを明らかにしていくとともに新たな治療法の展開につなげることを目的とする。

出産年齢が上昇していることより加齢

と卵細胞の質への影響は早急に解明しなければならない問題である。実験モデルマウスを用いて、加齢モデル由来の胚より胚性幹（ES）細胞を樹立することに初めて成功し、幹細胞機能維持機能及び分化機能への影響を解析したところ加齢卵子が分化動態へ影響を及ぼすことを突き止めた。これら、卵細胞質の加齢化を評価するあらたな体外培養評価系であり、新知見を得るシステムを構築、評価し加齢と卵の質そしてES細胞の質をリンクさせてわが国の生殖医療と再生医療を結び付ける基盤研究である。

## B. 研究方法

### I. ヒト疾患を対象

#### 1) 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

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  
子宮内膜症は経年的に進行し、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不妊を惹起する。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。子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な生殖補助

医療の治療体系について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作成してきたことを背景に、臨床データをまとめ治療ストラテジーの検定を行った。更に、子宮内膜症が胚発生に及ぼす影響を検定した。

## 2) 生殖器疾患の不妊症機序に関する基礎的・臨床的研究

子宮内膜症組織を用いて解析を行う。本研究においては、各施設の倫理委員会の承認を受け、適切なインフォームドコンセント手続きを経て遂行している。

子宮内膜症はエストロゲン依存性疾患である。エストロゲン受容体には転写活性化を行うため steroid receptor

coactivator (SRC) などの共役因子が必要とされているが、本研究において卵巣性子宮内膜症におけるSRCの発現様式を検討した。子宮内膜症患者の子宮内膜組織を対象とし、卵巣性子宮内膜症また子宮内膜症を有する正所性子宮内膜がSRC familyを発現しているかをRT-PCRとHScoreにより半定量化し解析した。

### 子宮内膜症発症分子メカニズム

子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者の腹腔鏡手術施行時に腹腔内貯留液を採取して、サイトカインの解析と免疫系細胞に関する生化学的解析を行った。体外顆粒膜細胞培養系ではミドカインの BrdU 取り込みに与える作用を調べた。

子宮内膜症ではアレルギー性の疾患が合併しやすいことなどから、Th2 細胞の関与が示唆されているものの、これまで詳細は不明

であった。インフォームドコンセントのもと、腹腔鏡手術時に卵巣子宮内膜症検体を採取し、凍結切片を作成による IL-4 の免疫組織染色を行った。他は、組織より子宮内膜症間質細胞を分離培養し、IL-4 の細胞増殖に与える影響について検討した。また、IL-4 受容体発現を RT-PCR にて調べた。

子宮内膜症における TRAIL 誘導性アポトーシスの意義についての検討をおこなった。子宮内膜症の発症機序として子宮内膜細胞ならびに子宮内膜症細胞のアポトーシス抵抗性が示唆されている。Tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand (TRAIL) はアポトーシスを誘導する代表的なサイトカインであり、腹腔内貯留液中にもその存在が認められている。アポトーシスを惹起する TRAIL 受容体である DR5 の発現を検討するとともに、一部の腫瘍細胞で DR5 発現を促進することが知られているツニカマイシンの子宮内膜症細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスに対する作用を検討した。適切なインフォームドコンセント手続きのもと手術で得られた子宮内膜症組織と正所性子宮内膜より子宮内膜症間質細胞と正所性子宮内膜間質細胞を分離培養して実験に供した。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, 30 $\mu$ M) 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。

#### 子宮内膜症の新規治療薬への展開

メトホルミンの子宮内膜症細胞に与える影響についての検討。AMPK を活性化するメトホルミンが子宮内膜症細胞で、培養上清中の IL-8 産生、細胞内での aromatase の遺伝子発現および活性、さらに、細胞増殖能を濃度依存性に抑制することを示すことで本剤の臨床応用を考えて正所性子宮内膜に対する作用を異所性子宮内膜に対する作用と比較検討した。

子宮内膜症に対する新規治療薬ジェノゲストの子宮内膜症細胞に対する直接作用の検討。ジェノゲストは新しいタイプの 19 ノルプロゲステンでプロゲステン作用とともに抗アンドロゲン作用を持ち、子宮内膜症細胞に直接作用することが最近示唆されるようになってきたので、培養子宮内膜間質細胞を使用して本剤の子宮内膜症への直接作用を検討した。

#### 3) 子宮内膜症における新たなエビデンスの創出にむけて

遺伝子多型腹腔鏡下手術を施行する際に同意を得られた患者において、子宮内膜症の病巣が確認された症例群と、子宮内膜症を発症していない健常群において、特定遺伝子の多型ハプロタイプ解析を行った。なお子宮内膜症および子宮筋腫などのリプロダクテ

ィブヘルスに関連する疾患と特定遺伝子との関連性について検討を行う研究については、課題名「子宮内膜症および子宮筋腫の遺伝子診断・発症予測に関する研究」として、慶應義塾大学医学部倫理委員会にて承認済みである。このときに承認された患者説明書および同意書を用いて、同意をえられた患者の検体のみから遺伝子研究を行った。

子宮内膜症の発症部位は、卵巣・子宮・腹膜をはじめとして多岐にわたるが、主たる病変存在部位は腹腔内である。子宮内膜症が進展する環境である腹腔内環境に注目し、その進展や発症に関わる低分子化合物を探索した。低分子物質を網羅的に解析できるキャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析装置を用いて、子宮内膜症患者腹水と非子宮内膜症患者腹水の比較検討を行った。

#### 4) PCOS における子宮内膜のメトホルミン投与による変化

PCOS におけるインスリン抵抗性と高アンドロゲン血症に着目し、PCOS 患者へのメトホルミン投与前後において a) 血中内分泌・糖代謝パラメーター b) 子宮内膜性ステロイドレセプター及び性ステロイドに制御されていることが報告されている着床関連分子発現の変化について検討する。倫理委員会の承認を得、PCOS 患者のメトホルミン投与前後の検体を採取した。ER $\alpha$ 、AR、 $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin、HOXA10 について免疫染色法を用い解析した。

## II. モデル動物を対象



## 1) 卵細胞の質に係わる分子機構の解明に関する研究

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、実験動物マウスを用い以下の実験を行った。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の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。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 を精巢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ティングによって調べた。

## 2) 加齢化モデル由来胚の多分化能性解析

実験動物マウスを用いて行う。個体加齢と卵細胞質との慣例性について新たな評

価系の構築と、卵細胞機能に関する新たな分子メカニズムの解明を行う。加齢モデルを構築し、卵細胞への影響を観察する実験システムは個体あるいはそれより得られるサンプルの希少性よりこれまで世界的にも十分な解析システムが構築されず、極限られた知見が得られるのみであった。本研究では、胚盤胞期胚の将来胎児となる内部細胞塊から樹立される ES 細胞を加齢化モデルの胚より樹立しその特性解析から加齢化卵の多分化能性へ寄与する性質を体外培養系で探る実験系を構築する。未だ試みられていない方法であったが、私たちは 72 週齢という非常に高齢なマウスより卵を採取し、顕微授精を行い最終的に加齢卵由来の ES 細胞を複数株樹立することに成功した。この加齢 ES 細胞に対して行った網羅的遺伝子解析や分化挙動解析から、通常の ES 細胞と異なる遺伝子発現動態と分化傾向の変化を突き止めることが出来た。加齢卵子の卵細胞本来の性質、全能性、について初めてアプローチ出来るシステムが構築でき、精力的に解析をおこなっている。バイオインフォマティクス解析により加齢卵由来の ES 細胞細胞特異的な分子の挙動を明らかにしていく。

## C. 研究結果

### I. ヒト疾患を対象

#### 1) 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

子宮内膜症が妊孕能に及ぼす影響は以下

にまとめられる。

- a. 卵管周囲間の病巣による機能低下
- b. 具体的には卵子の捕獲障害や輸送障害
- c. 卵巣機能への影響
- d. 腹腔内の炎症に關与するサイトカインによる受精、着床障害

これらの事項以外に、免疫系の異常による場合には流産や着床不全が起こることもあると考えられる。

本研究項目について、治療体系を明確にした。

#### 卵管因子存在

子宮内膜症は卵巣機能が活動性である間は経年的に病態が増悪していくため、種々の障害因子の存在で妊孕能が低下する。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。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。腹腔鏡手術の後は、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。

#### 男性因子例および受精障害例

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。

## 2) 生殖器疾患の不孕症機序に関する基礎的・臨床的研究

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り、臨床進行期と相關していた。

CD4 陽性、CD17 陽性の Th17 が子宮内膜症患者に存在していた。Th17 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、培養子宮内膜間質細胞においては IL-17 受容体が発現していた。子宮内膜症間質細胞は IL-17 刺激により有意に IL-8 の産生を亢進した。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。

ミドカインのウエスタンブロット解析では、卵胞液中にミドカインが存在することが明らかとなった。ミドカインとその受容体の遺伝子発現が顆粒膜細胞にも認められ、in situ hybridization では顆粒膜細胞、莖膜細胞ともにミドカインを発現していることが明らかにされた。

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。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。

メトフォルミンは 10-1000 mM の濃度で子宮内膜症間質細胞における IL-8 産生を用量依存性に抑制したが、正所性子宮内膜の間質細胞では効果は認められなかった。

ジェノゲストは子宮内膜症間質細胞における BrdU 取り込みを抑制した。

G0/G1 期の細胞を増加させる一方、S 期、G2/M 期の細胞を減少させた。

### 3) 子宮内膜症における新たなエビデンスの創出にむけて

子宮内膜症の有無と、AHR (SNP ID: rs2292596) の各遺伝子型で統計学的有意差を認めず、進行度にも関連性はなかった。30 歳以下の子宮内膜症発症群と子宮内膜症非発症群を比較した場合、前者で有意に GG ホモ接合体を多く認めた (カイ二乗検定  $p=0.012$  Fisher の直接確率検定  $p=0.019$ )。子宮内膜症を有する患者のうち 30 歳以下の群と 31 歳以上の群を比較した場合、30 歳以下の群で有意に GG ホモ接合体を多く認めた (カイ二乗検定  $p=0.017$  Fisher の直接確率検定  $p=0.029$ )。

子宮内膜症のある患者腹水と子宮内膜症のない患者腹水のキャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析装置解析によって、合計 485 のピークが検出された。その中で、27 個が子宮内膜症特異的分子であると推定された。差が検出されたピークのなかで、子宮内膜症患者の方が濃度の高かったの

は2ピークであり、子宮内膜症患者の方が低かったのは25ピークであった。これらのピークでは、子宮内膜症患者の腹水中よりも子宮内膜症がない患者腹水の方がピークが大きい傾向が認められた。

#### 4) PCOS における子宮内膜のメトホルミン投与による変化

PCOS 子宮内膜では、正常周期子宮内膜に比べ、ER $\alpha$ 、AR の発現が亢進し $\alpha v \beta$ 3integrin、HOXA10 の発現は低下していた。PCOS に対しメトホルミンを3ヶ月投与した時点では、内分泌的・糖代謝的パラメーターについて、投与前と比較し有意差は認められなかったが、子宮内膜に関しては、メトホルミン投与後に ER $\alpha$ 、AR の発現低下、 $\alpha v \beta$ 3integrin、HOXA10 の発現増加が認められた。

## II. モデル動物を対象

### 1) 卵細胞の質に係わる分子機構の解明に関する研究

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。

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巢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。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 の精子のウエ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。

### 2) 加齢化モデル由来胚の多分化能性解析

実験動物マウスを用いて行う。個体加齢と卵細胞質との慣例性について新たな評価系の構築と、卵細胞機能に関する新たな分子メカニズムの解明を行う。加齢モデルを構築し、卵細胞への影響を観察する実験システムは個体あるいはそれより得られるサンプルの希少性よりこれまで世界的にも十分な解析システムが構築されず、極限られた知見が得られるのみであった。本研究では、胚盤胞期胚の将来胎児となる内部細胞塊から樹立される ES 細胞を加齢化モデルの胚より樹立しその特性解析から

加齢化卵の多分化能性へ寄与する性質を体外培養系で探る実験系を構築する。未だ試みられていない方法であったが、私たちは72週齢という非常に高齢なマウスより卵を採取し、顕微授精を行い最終的に加齢卵由来のES細胞を複数株樹立することに成功した。この加齢ES細胞に対して行った網羅的遺伝子解析や分化挙動解析から、通常のES細胞と異なる遺伝子発現動態と分化傾向の変化を突き止めることが出来た。加齢卵子の卵細胞本来の性質、全能性、について初めてアプローチ出来るシステムが構築でき、精力的に解析をおこなっている。卵細胞機能に関する分子メカニズムを解明し、加齢に伴う卵細胞内での分子レベルでの変化を解析し、確かな科学的データに基づくエビデンスを社会に提供していく。

加齢卵由来のマウスES細胞を樹立し網羅的遺伝子発現解析を行った結果、通常のES細胞に比し、約1000の遺伝子に有意差が認められた。階層性解析から加齢卵由来マウスES細胞が特徴にグルーピングされることから、それを規定する遺伝子群の同定が行えることが示唆された。

#### D. 考察

作成した子宮内膜症合併不妊症に対する治療指針が合理的かつ有効なものを、実際の臨床成績から検証した。腹腔鏡手術時に確認された子宮内膜症の主体となる病変、子宮内膜症の広がりやを評価する revised-American Society for

Reproductive Medicine classification (r-ASRM) 重症度分類、手術後のART治療の有無、腹腔鏡後の妊娠までの期間などを調査し、それぞれの調査項目から、子宮内膜症の臨床的な特徴と体外受精を実施した時の子宮内膜症からの影響について調査・検討を加えた。作成した指標との整合性を整えて最終的なガイドラインを作成した(柳田)。子宮内膜症では妊娠能が低下し、時間経過とともに子宮内膜症が増悪すること、また卵巣(卵子)が加齢することから、よりテンポの早い治療計画が必要である。子宮内膜症の低下している妊娠能は腹腔鏡検査(手術)によって改善が期待できることから、まず腹腔鏡検査を計画することが望ましい。腹腔鏡手術とARTの必要性とタイミングを考慮しテンポアップし治療を行っていく(詳細は、分担研究者柳田の報告)。

子宮内膜症におけるTRAIL誘導性アポトーシスの意義についての検討した結果、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。子宮内膜症の発症・進展におけるTRAIL誘導性アポトーシスの意義を明らかにするとともに、

DR5 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を提唱できた（詳細は、分担研究者矢野・大須賀の報告）。

子宮内膜症患者のプロテオーム解析から子宮内膜症患者腹水中で減少していることが示された分子群は、血液中でも解析を行う必要がある。血液中でも変化が認められる分子が同定されることにより、疾患進行と治療のマーカーになる可能性があり、従来の CA125 と異なった指標が得られる可能性がある。また、これまでの子宮内膜症患者腹水に関する研究においては、IL-13 などの一部のケミカルメディエーターは減少しているとの報告もあるが、子宮内膜症患者の腹水中のケミカルメディエーターは、患者において増加しているという報告が多くを占めている。本研究においては、子宮内膜症患者に減少している分子が多いことが示された。疾患特異的分子を探索する際には、特異的現症によって増加する物質に注目しがちであるが、抑制系が減少することや、一定の代謝経路が活性化することによる一部の分子の減少もあることが明らかとなった。今回検出された低分子分子のなかから、発症予防につながる分子を同定・機能解析を進めることにより、外科的治療後の再発抑制に貢献できる可能性があると考えられた。

本研究によって検出された分子は、腹腔内の子宮内膜症の進展にともなって現れた変化なのか、あるいは、子宮内膜症を誘発・維持することに関わっている分子なの

かは明らかではない。今後、子宮内膜症の発症予測に使用できる分子が、今回検出されたピーク中に存在するかどうか、プロスペクティブな検討を施行していくことが必要であると考えられた（詳細は、分担研究者吉村・久慈の報告）。

PCOS における子宮内膜の性ステロイドホルモン環境とメトホルミン投与による変化について、PCOS 子宮に対してはメトホルミンが子宮血流の増加、子宮内膜厚改善、子宮内膜組織所見の改善、流産率の低下などに関与している報告がある。しかしながら、その分子生物学的検討は十分に行われていない。PCOS 子宮内膜では、正常周期子宮内膜に比べ、ER $\alpha$ 、AR の発現が亢進し  $\alpha v \beta 3$  integrin、HOXA10 の発現は低下していた。PCOS に対しメトホルミンを 3 ヶ月投与した時点では、内分泌的・糖代謝的パラメーターについて、投与前と比較し有意差は認められなかった。子宮内膜に関しては、メトホルミン投与後に ER $\alpha$ 、AR の発現低下、 $\alpha v \beta 3$  integrin、HOXA10 の発現増加が認められた。メトホルミンは直接作用及びインスリン抵抗性改善を介した間接作用により、高アンドロゲン血症を改善し、排卵周期を改善することが報告されており、これらの作用が子宮内膜における ER $\alpha$ 、AR 発現及び着床関連分子発現の変化をもたらしている可能性が示唆された（詳細は、分担研究者佐藤の報告）。

卵細胞の質に係わる分子機構の解明に関する研究について、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（詳細は、分担研究者岡部の報告）。

受精障害卵に対する発生補助の可能性に関する検討について、ヒト ICSI 後受精障害に関する研究において、その原因が卵活性化障害によると報告されている。しかし、受精障害卵を正常に発生させるための発生補助療法は確立されていない。実験動物マウスを用いて人為的卵活性化のタイミングなど臨床応用する場合に向けた基盤研究の展開を詳細にする必要性が示され、今後の課題と認識される（詳細は、分担研究者佐藤の報告）。

わが国において、出生率は人口置換水準を大きく下回る超少子化社会と認識されている。その中生殖補助医療（ART）を享受し、妊娠・出産に至る数は1万を超え、全体の1.5%を以上に達する。しかし、ARTは万能ではなく、数々の問題点が指摘され

てきた。ヨーロッパ生殖医学会では、加齢に対する対応が今後の大きな課題であるとされている。少子化・晩婚化の中、わが国でも何らかの形で産婦人科医などの医療関係者、生命学者、あるいは国がこの問題に対応していることを示すことは社会に対してきわめて重要である。米国 NIH では、卵子の質に関する研究を大規模な国際プロジェクトとして遂行させている。先を見据えた基礎研究も重要である。超少子化時代となり社会の様々な方面に切実な問題を投げかけているが、その中でも生殖医療が関連する事象は重要であるが解明されていなかったり、国民への適切な啓蒙が不足している現状がある。例えば、卵子の質の低下に関しても、広く認識されていないが故に国民の一部に大きな誤解を招いている。基盤的、科学的データの裏付けのある誠実な情報を提示することは我々研究者が社会に対して行うべき責務である。

## E. 結 論

女性のライフスタイルに合わせ、これまでの社会的 QOL を減ずるような治療法にとってかわる新規治療薬・法の臨床研究を行ってきた。分子レベルで子宮内膜症の一端を明らかにし、科学的エビデンスを構築し現在の社会に即した治療法を構築していく。さらなるデータの検討には、症例の積み重ねとメタ解析が必要となる。目的であった生殖器疾患合併不妊症の治療法の最適化・標準化に向けて、明確な治療スト

ラテージを提示することができ、生殖医療ガイドラインとして提示できたことは社会に対しての大きな貢献と認識できる。本研究班により子宮内膜症に関して新たな分子メカニズムが解明でき、今後は更に基礎的研究を推進するとともに、臨床研究を治療法の最適化・標準化の確立に向け展開していく基盤が確立できた。

これまで、世界的にみても加齢と卵子の質に関する適切な実験系が存在しないためにその領域の研究が遅々としてすすまなかったが、本研究において、基盤となる研究システムの構築が整ってきた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 倫理面への配慮

##### 1. 臨床研究に対する倫理面への配慮

各機関において、ヒト組織及び細胞を取り扱う際には、慶應義塾大学、東京大学、福島県立医科大学、東海大学医学部において、機関内倫理委員会にて承認済みである。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないよう、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行った。

##### 2. 実験動物に対する倫理

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施した（承認番号

2003-002, 2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめ、またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなった。

#### H. 研究発表

##### 論文発表

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*. 2009; 4(2): 103-106.

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*. 2008; 16(1):41-50.

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*. 2008;75(1):150-155.

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*. 2008;135(5):581-592.

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. 2008;105(35):12921-6.

なし

Sullivan, S. Egli, D. Akutsu, H. Melton, D. Eggan, K. Cowan, CA.: Derivation of human ES cells. Human Embryonic Stem Cells: A Practical Handbook 2007.

Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu H. Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K and Kiyokawa N. Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 364(4):838-843.

阿久津英憲、梅澤明弘、アメリカでのヒト胚性幹細胞。医学のあゆみ、2007; 217: 582-586.

阿久津英憲、梅澤明弘、核移植による多能性誘導。医学のあゆみ、2007; 25: 468-473.

阿久津英憲、核移植クローニング技術の進歩。産婦人科の世界、2007; 59: 9-14.

Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Tanaka, TS. Lopez de Silanes, I. Sharova, LV. Akutsu, H. Yoshikawa, T. Amano, H. Yamanaka, S. Gorospe, M. Ko, MS.: Esg1, expressed exclusively in preimplantation embryos, germline, and embryonic stem cells, is a putative RNA-binding protein with broad RNA targets. Dev Growth Differ. 48:381-90. 2006.

Akutsu, H. Cowan, CA. and Melton, D.: Human embryonic stem cells. Methods Enzymol. 418:78-92. 2006.

## I. 知的財産権の出願・登録状況

### 1) 特許取得

なし

### 2) 実用新案登録

なし

### 3) その他

## II 分担研究報告書

1. 子宮・卵巣疾患の不妊症メカニズム解明及び治療体系に関する研究  
佐藤 章
2. 子宮・卵巣疾患の不妊症メカニズム解明及び治療体系の研究  
生殖器疾患の不妊症機序に関する基礎的・臨床的研究  
吉村 泰典  
久慈 直昭
3. 生殖器疾患の不妊症機序に関する基礎的・臨床的研究  
矢野 哲  
大須賀 穰
4. 非閉塞性無精子症感受性遺伝子の集団遺伝学的解析と新規関連遺伝子の探索  
井ノ上 逸朗
5. 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  
柳田 薫
6. 卵細胞の質に係わる分子機構の解明に関する研究  
岡部 勝

子宮・卵巣疾患の不妊症メカニズム解明及び治療体系に関する研究

（主任又は分担）研究者 佐藤 章 福島県立医科大学産婦人科教授

研究結果の概要

難治性不妊症例に対する研究として、平成 18-19 年度報告分【研究①：子宮内膜症における不妊症メカニズムの解明及び治療体系に関する研究】、及び、平成 20 年度報告分【研究②：卵細胞質内精子注入法（Intracytoplasmic sperm injection:ICSI）後受精障害卵の早期診断法 及び 発生補助療法に関する研究】を行った。

【研究①】子宮内膜症はエストロゲン依存性疾患であり、エストロゲン受容体には転写活性化を行うため steroid receptor coactivator(SRC)などの共役因子が必要である。本研究において卵巣性子宮内膜症における SRC の発現様式を検討し、SRC family のなかで SRC-1 が卵巣性子宮内膜症に強発現していた。また、子宮内膜症を有する患者の正所性子宮内膜でも正常子宮内膜と比較し分泌期の低下を認めず正常子宮内膜と発現パターンが異なることを明らかにした。本研究から子宮内膜症の進展に steroid receptor の共役因子が関与している可能性が示唆された。

【研究②】不妊マウス(アルキル化イミノシュガー摂取後)を用いた動物実験において ICSI 後受精障害卵中での経時的な精子核の変化、卵活性化刺激のタイミングによる胚発生違いから、受精判定時では卵活性化刺激による発生補助の時期として遅すぎると考えられた。第 2 極体放出判定時に卵活性化刺激を加えることにより、その後の受精・発生障害を回避可能であり、その後受精障害となる ICSI 卵を正常受精へと救出できる可能性が示唆された。また、ヒト ICSI における第 2 極体放出判定時期についての検討を行い、2~4 時間の妥当性が示された。

A. 研究により得られた成果の今後の活用・提供

【研究①】

子宮内膜症は若年婦人に認められ、月経痛、不妊をひきおこす代表的疾患である。現在まで、エストロゲン依存性に発症、進展することが多数報告されている。本研究において、1) 卵巣性子宮内膜症また子宮内膜症を有する正所性子宮内膜が SRC family を発現しているか。2) SRC 遺伝子改変マウスを用い子宮内膜症進展が SRC と関与しているかどうか直接的役割を解明することを検討した。

本研究はエストロゲン依存性である子宮内膜症に対し共役因子である SRC の発現を解析したはじめての報告である。本研究結果は、卵巣性子宮内膜症においてエストロゲンだけでなく、SRC-1 が強く発現しているという共役因子もその進展に関与している可能性を示唆するものであった。今後このようにリガンド依存性疾患に対し共役因子を解析することが重要になると考える。子宮内膜症についても現在 GnRH アゴニスト、ダナゾール、低容量ピルなどが治療薬として用いられているが、共役因子の重要性が確認されればこれを抑制するような創薬にも貢献できるであろう。

卵巣性子宮内膜症に SRC-1 が強く発現していた。子宮内膜症を有する正所性子宮内膜は SRC-1 の発現において正常子宮内膜で認められるような発現低下を認めなかった。その病理学的意義を解析するため今後 SRC-1 ノックアウトマウスを用い子宮内膜の腹腔内移植実験を行う予定である。

【研究②】

動物モデル(マウス)を用いた研究結果から、ICSI

後受精障害卵中に長時間曝された精子核は染色体分離することが確認されたが、それ以前に卵活性化刺激を加えれば、(精子の遺伝性が正常に保持されている限り)その後正常発生が期待できることが示された。また、第 2 極体の放出をもって ICSI 卵の細胞分裂再開(活性化)を判断した場合 Piezo-ICSI (Piezo micro manipulator を用いた ICSI)において、マウスでは 2 時間でほぼ 100%、ヒトでは 4 時間の時点で約 90%、ICSI 卵の活性化が診断可能であることを示した。今後、この結果をもとにヒト ICSI 卵でのデータの蓄積を継続していく。また、当大学の倫理委員会の承認のもと、書面での同意を得たのち、人為的卵活性化併用 ICSI 卵の染色体検査等を行うことにより、臨床応用に向けた更なる安全性の確認を行っていき、将来的に胚移植に結びつけられるよう基礎的検討を継続して行っていく、最終的には貴重な生殖資源であるヒト ICSI 後受精障害卵の治療を目標としていく。

B. 研究実施経過

【研究①】

研究方法：インフォームドコンセントを得た患者より、正常子宮内膜 9 名、卵巣性子宮内膜症 21 名、子宮内膜症を有する正所性子宮内膜 9 名から手術時検体を採取、これを 10% のホルマリン液にて固定し SRC-1, SRC-2, SRC-3 の免疫染色に供した。半定量化を客観的に評価するため HScore を用い検討した。また卵巣性子宮内膜症において SRC-1 mRNA を検出するため RT-PCR 法を用いた。

研究結果：卵巣性子宮内膜症に SRC-1 が強く発現を認めた。HScore では正常子宮内膜増殖期に比較し

分泌期では低下していた。卵巣性子宮内膜症では増殖期、分泌期とも正常子宮内膜増殖期に比較して有意にそのスコアが上昇していた。子宮内膜症を有する正所性子宮内膜の増殖期に比較し正常子宮内膜で認められたような分泌期の低下を認めなかった。RT-PCR法でも卵巣性子宮内膜症においてSRC-1 mRNAがSRC-2, SRC-3に比較し強いシグナルを認めた。

#### 【研究②】

研究方法：動物モデル(アルキル化イミノシュガー摂取マウス=摂取後約3週間で一過性の不妊マウスとなる)を用いて、ICSI後受精障害卵中での精子核の状態を経時的に観察し、精子頭部の変化とそれぞれの時期に卵活性化刺激を加えた場合の、精子染色体に及ぼす影響、その後の受精・発生過程に及ぼす影響について検討を行った。同検討において、ICSI後受精障害の診断時期、卵活性化併用の最適時期についての考察を行った。また動物実験の結果をもとに、ヒトICSIにおけるICSI後受精障害の診断時期、卵活性化併用の最適時期についての検討を行った。

研究結果：動物実験において、受精判定時(ICSI後6時間)では受精障害卵中で精子核の染色体分離を認め、そのタイミングで活性化刺激を加えると異常受精、その後の発生障害が高頻度に観察された。よって受精判定時では、卵活性化刺激によって受精障害卵の発生を補助するには遅すぎると考えられた。第2極体放出判定時(ICSI後2時間程度)までに活性化刺激を加えることにより、その後の受精・発生障害を回避でき、その後受精障害となるICSI卵を正常受精へと救出できる可能性が示唆された。

上記結果をもとに、ヒトICSIにおける第2極体放出判定時期についての検討を行い、少数症例における予備実験的結果ではあるが、ヒトにおいては2～4時間程度、という結果を得た。

(倫理面への配慮) ※研究①②とも共通

本研究に関しては、当大学の倫理委員会の承認のもと、患者様に本研究の必要性の十分な理解を求めた。また、検体採取および研究的治療を行うにあたり同意書を患者から書面で頂いた。個人情報については漏洩のないようにすること、個人を特定出来な

いようにすることを厳守した。

#### C. 健康危険情報

特になし

#### D. 研究発表

1. 論文発表  
現在、論文投稿準備中

#### 2. 学会発表

##### 【研究①】

第58回 日本産婦人科学会学術講演会

第51回 日本生殖医学会学術講演会

Kumagami A., Ito A., Takayama T., Morozumi K., Komiya H., Sato A  
Expression of steroid receptor coactivator-1 is elevated in human ovarian endometrisos  
(The XXth Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology  
Tokyo 2007.9.21-9.25)

##### 【研究②】

第59回 日本産婦人科学会学術講演会

第52回 日本生殖医学会学術講演会

#### E. 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  
特になし