

Blastocyst formation rate depends on oxygen consumption rates.

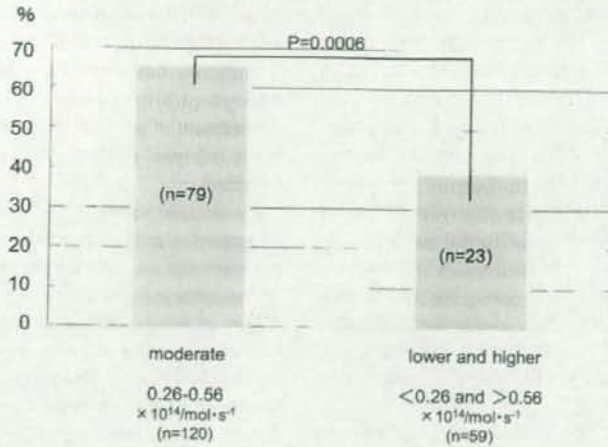


Fig. 3. Embryos with moderate respiration rates showed high developmental rate (65.8%) to the blastocyst. The developmental rate of embryos with lower and higher respiration rates was 39.0%.

Blastocyst formation rate after measurement of oxygen consumption.

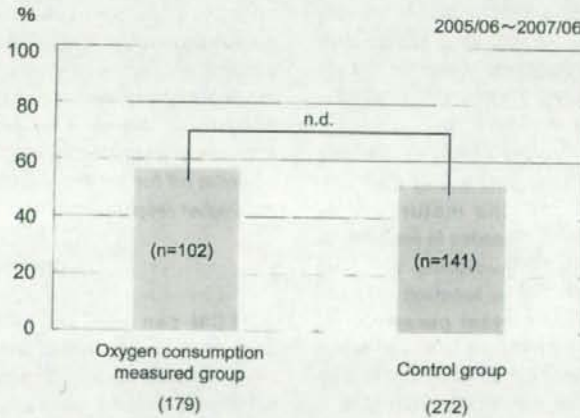


Fig. 4. The safety of SECM is assured as the embryos which were examined by SECM for oxygen consumption showed the same levels of development as the control group.

blastocysts and for implantation [3]. A report on the correlation between pronuclear pattern and pregnancy rate suggested that groups with particular pronuclear patterns tend to provide good results in pregnancy [4].

Morphological evaluation has been widely performed

to assess embryo quality because it is non-invasive and useful in predicting pregnancy rate. Morphological observations have contributed significantly to the great success of ART programs in humans. In some cases, however, even embryos with low quality result in

successful pregnancy, whereas many good embryos, as judged by morphological observation, fail to result in pregnancy. Furthermore, morphological evaluation remains one of the most subjective and least quantitative aspects of embryo transfer, because categorization standards vary among the investigators. Recently, a very interesting study used time-lapse cinematography to morphologically analyze human embryonic development [5]. Numerous excellent findings by this method indicate that the dynamic observation of human gametes during the early stages of embryo development are of paramount interest for clarifying the physiological events during the fertilization process. The authors of that study suggested that there may be some limitations in momentary morphological observations of embryos which are dynamically changing [5].

The blastocyst stage transfer was proposed so that embryos could be evaluated, and some clinicians perform day 5 embryo transfer, even now. The principle idea is that, *in vivo*, cleavage stage embryos reside in the Fallopian tube and not in the uterus. The potential advantages of blastocyst culture and transfer include the synchronization of the embryo with the female tract leading to increased implantation rate and assessment of viability of an embryo before transfer [6]. The theory is sound and acceptable. The results of prospective randomized studies, however, clearly show that there is no advantage of the blastocyst stage transfer over the conventional cleavage stage transfer [7, 8].

Other new methods are needed in ART, especially selection methods to obtain the best quality embryos. Fundamentally, in embryos, the maturation of mitochondria is associated with increases in metabolism reflected by their oxygen consumption and CO<sub>2</sub> production [9]. So, mitochondrial function (oxygen consumption) may be an important parameter of embryo quality [9]. It is well known that metabolic processes change during embryonic development, as indicated by genome activation and large increases in protein synthesis. Oxygen consumption is a parameter used to gain valuable information on metabolic mechanisms. Oxygen consumption of mammalian embryos has been studied with various methods such as Cartesia a diver [9], spectrophotometrics [10–12], fluorescence [13–15] and electrochemical techniques [16–20].

The measurement of oxygen respiration rate (oxygen consumption) of bovine embryos has been employed to investigate the correlation between respiration rate and embryo morphology, diameter and sex, and it has been

shown that the respiration rate is directly influenced by embryo diameter but does not differ between sexes [21]. So, respiration rates are only in partial agreement with embryo morphology, suggesting a slight discrepancy between these two methods of assessing embryo quality, and it is likely that a combined assessment of embryo respiration rate and morphology would improve embryo classification and subsequent selection.

The accuracy and simplicity of a measuring method is an essential and important point. With regard to this, the methods for measuring respiration rate for single bovine embryos were reported [22, 23]. The respiration activity of single bovine embryos entrapped in a cone-shaped microwell was monitored by scanning electrochemical microscopy. Using this method, the results for oxygen consumption rates of embryos of rank A (very good) were significantly higher than those of rank B (good). Furthermore, there were no apparent differences of oxygen consumption rate between male and female embryos [24]. These results indicate that the oxygen consumption rate of individual embryos reflects their quality but does not correlate with the sex ratio of embryos with excellent quality.

From the results of the present study, we deduce the following: 1) embryos have different oxygen consumption rates, even among morphologically similar embryos; 2) there is no correlation between morphological quality and respiration activity in human embryos at the early developmental stage; and 3) embryos with moderate respiration rates have better potential for further development than those with lower and higher respiration rates.

## Conclusion

SECM can be used to measure the oxygen consumption of single human embryos at various developmental stages. The maturation of mitochondria correlates with the increase in oxygen consumption during the development of embryos. The development of mitochondria may be an important factor of embryo quality, because mitochondria provide ATP for embryonic development by metabolism of nutrients in the cytoplasm. The SECM technique may be a valuable tool for accurately assessing mitochondrial function and the quality of human embryos.

There was no correlation between morphological quality and respiration activity in human embryos at the early developmental stage. Embryos with moderate respiration rates had better potential for further

development than those with lower or higher respiration rates. The present results support the hypothesis that measuring embryonic respiration provides additional and valuable information about embryo quality.

## References

- 1) Abe, H., Shiku, H., Aoyagi, S., Matsue, T. and Hoshi, H. (2005): Respiration activity of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing media. *Reprod. Fertil. Develop.*, 17, 205.
- 2) Abe, H. (2007): A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with a scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *J. Mamm. Ova Res.*, 24, 70-78.
- 3) Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Yaman, C., Pfleger, U. and Tews, G. (2002): First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum. Reprod.*, 9, 2415-2418.
- 4) Tesarik, J., Junca, A.M., Hazout, A., Aubriot, F.X., Nathan, C., Cohen-Bacrie, P. and Dumont-Hassan, M. (2000): Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum. Reprod.*, 6, 1396-1399.
- 5) Mio, Y. (2006): Morphological analysis of human embryonic development using time-lapse cinematography. *J. Mamm. Ova Res.*, 23, 27-35.
- 6) Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., Wagley, L., Schlenker, T., Stevens, J. and Hesla, J. (1998): A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, 12, 3434-3440.
- 7) Utsunomiya, T., Naitou, T. and Nagaki, M. (2002): A prospective trial of blastocyst culture and transfer. *Hum. Reprod.*, 7, 1846-1851.
- 8) Utsunomiya, T., Ito, H., Nagaki, M. and Sato, J. (2004): A prospective, randomized study: day 3 versus hatching blastocyst stage. *Hum. Reprod.*, 7, 1598-1603.
- 9) Mills, R.M. and Brinster, R.L. (1967): Oxygen consumption of preimplantation mouse embryos. *Exp. Cell Res.*, 47, 337-344.
- 10) Magnusson, C., Hillensjo, T., Hamberger, L. and Nilsson, L. (1986): Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro. *Hum. Reprod.*, 1, 183-184.
- 11) Magnusson, C., Hillensjo, T., Tsafiri, A., Hultborn, R. and Ahren, K. (1977): Oxygen consumption of maturing rat oocytes. *Biol. Reprod.*, 17, 9-15.
- 12) Nilsson, B., Magnusson, C., Widehn, S. and Hillensjo, T. (1982): Correlation between blastocyst oxygen consumption and trophoblast cytochrome oxidase reaction at initiation of implantation of delayed mouse blastocysts. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 71, 75-82.
- 13) Houghton, F.D., Thompson, J.G., Kennedy, C.J. and Leese, H.J. (1996): Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 44, 476-485.
- 14) Thompson, J.G., Partridge, R.J., Houghton, F.D., Cox, C.I. and Leese, H.J. (1996): Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 106, 299-306.
- 15) Donnay, I. and Leese, H.J. (1999): Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Mol. Reprod. Dev.*, 53, 171-178.
- 16) Overstrom, E.W., Doby, R.T., Dobrinsky, J., Roche, J.F. and Boland, M.P. (1992): Viability and oxidative metabolism of the bovine blastocyst. *Theriogenology*, 37, 269.
- 17) Smith, P.J.S., Hammar, K., Porterfield, D.M., Sanger, R.H. and Trimarchi, J.R. (1999): Self-referencing, non-invasive, ion selective electrode for single cell detection of transplasma membrane calcium flux. *Microsc. Res. Tech.*, 46, 398-417.
- 18) Land, S.C., Porterfield, D.M., Sanger, R.H. and Smith, P.J.S. (1999): The self-referencing oxygen-selective microelectrode: detection of transmembrane oxygen flux from single cells. *J. Exp. Biol.*, 202, 211-218.
- 19) Porterfield, D.M., Trimarchi, J.R., Keefe, D.L. and Smith, P.J.S. (1998): Characterization of oxygen and calcium fluxes from early mouse embryos and oocytes. *Biol. Bull.*, 195, 208-209.
- 20) Trimarchi, J.R., Liu, L., Porterfield, D.M., Smith, P.J.S. and Keefe, D.L. (2000): Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 62, 1866-1874.
- 21) Lopes, A.S., Larsen, L.H., Ramsing, N., Løvendahl, P., Raty, M., Peippo, J., Greve, T. and Callesen, H. (2005): Respiration rates of individual bovine in vitro-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. *Soc. Reprod. Fertil.*, ISSN 1470-1626 (paper), 1741-7899 (online).
- 22) Shiku, H., Shiraishi, T., Ohya, H., Matsue, T., Abe, H., Hoshi, H. and Kobayashi, M. (2001): Oxygen consumption of single bovine embryos probed by scanning electrochemical microscopy. *Anal. Chem.*, 73, 3751-3758.
- 23) Shiku, H., Shiraishi, T., Aoyagi, S., Utsumi, Y., Matsudaira, M., Abe, H., Hoshi, H., Kasai, S., Ohya, H. and Matsue, T. (2004): Respiration activity of single bovine embryos entrapped in a cone-shaped microwell monitored by scanning electrochemical microscopy. *Anal. Chimica Acta*, 522, 51-58.
- 24) Agung, B., Otoi, T., Abe, H., Hoshi, H., Murakami, M., Karja, N.W.K., Murakami, M.K., Wongsrikeao, P., Watari, H. and Suzuki, T. (2005): Relationship between oxygen consumption and sex of bovine in vitro fertilized embryos. *Reprod. Dom. Anim.*, 40, 51-56.

## 臨床 経験

# 電気化学的呼吸計測によるヒト胚の クオリティー評価

那須 恵<sup>\*1</sup> 熊迫 陽子<sup>\*1</sup> 後藤 (平井) 香里<sup>\*1</sup> 宇津宮隆史<sup>\*1</sup>  
荒木 康久<sup>\*2</sup> 横尾 正樹<sup>\*3</sup> 阿部 宏之<sup>\*3</sup>

本研究では、電気化学的計測技術を基盤とする走査型電気化学顕微鏡 (SECM) を用い非侵襲的に単一のヒト胚の呼吸量を測定し、胚の呼吸能と形態的クオリティーとの関係を調べた。その結果、Day 3 胚において割球数を基準とする形態的クオリティーと胚の呼吸能の間には明確な相関は認められなかったが、良好な呼吸能を有する胚は測定後の追加培養により高い確率で胚盤胞に発生することが明らかとなった。SECM を用いた呼吸計測法は、細胞の代謝活性を指標とする新しいヒト胚クオリティー評価法として期待される。

## はじめに

現在、体外受精・胚移植の分野において一般的に、卵巣から多数の卵子を回収し、胚移植の際には、複数の胚のなかから移植する胚を選択している。妊娠率の向上、多胎率・流産率を減少させるためには、より着床しうる能力を持った高品質胚を選択することが不可欠である。現在、胚のクオリティー評価は簡単で非侵襲的な方法である形態的評価法が最も普及している。しかし、形態的評価法は観察者の主観により判定結果に差が生じる可能性があるため、より客観的で精度の高い胚クオリティー評価法の開発が望まれている。

筆者らは形態観察に比べてより客観的な方法

として、細胞呼吸能測定による胚クオリティー評価方法を提案している。これは、高感度で生体反応を検出できる電気化学的計測技術の基盤である走査型電気化学顕微鏡 (SECM) を用いて非侵襲的に胚の呼吸量を測定し、呼吸能を指標に胚のクオリティーを評価する新しい方法である。これまでにウシ胚を用いた研究により、呼吸活性を基準とする胚クオリティー評価法の開発に成功している<sup>1)2)</sup>。さらに、SECM を用いて単一のヒト胚の呼吸量測定に初めて成功している<sup>3)</sup>。そこで本研究では、SECM を用いて Day 2~3 胚 (体外受精: Day 0) の呼吸量を測定し、形態的評価との関係を調べた。さらに、呼吸測定胚の追加培養試験を行い、胚の呼吸能と発生能との関係を検討した。

## 1. 方 法

### 1. 材 料

すべて患者の同意が得られた余剰胚を呼吸量測定に供した。凍結保存余剰胚を融解した後、Sydney IVF Cleavage Medium (Cook 社) を用いて 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> の気相下に 37°C で培養を行った。受精日を Day 0 とし、Day 2

<sup>\*1</sup>Megumi NASU, Yoko KUMASAKO, Kaori GOTO, Takafumi UTSUNOMIYA  
セント・ルカ産婦人科

<sup>\*2</sup>Yasuhisa ARAKI  
高度生殖医療技術研究所

<sup>\*3</sup>Masaki YOKOO, Hiroyuki ABE,  
東北大学先進工学研究機構生命機能科学分野  
〒870-0947 大分県大分市津守富岡5組 (セント・ルカ産婦人科)

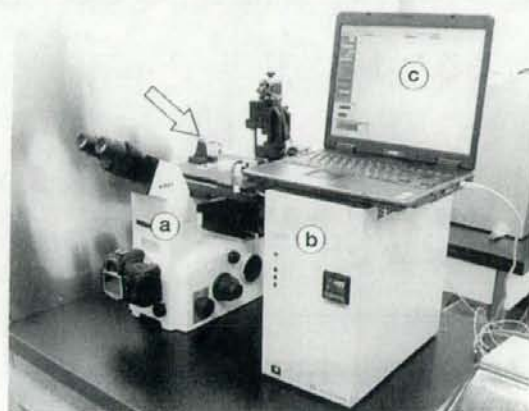


図1 走査型電気化学顕微鏡を改良した「受精卵呼吸測定装置」

① 倒立型顕微鏡 (矢印は測定部を示す)。② ポテンシオスタット。③ ノート型パソコン。

もしくは Day 3 にて 3~10 細胞期胚に発生した胚を Veeck の分類法<sup>4)</sup>を基に、割球数、細胞の均一性、フラグメンテーションの程度を基準に新たに 1~4 の 4 段階のグレードに評価した。胚を形態観察により評価した後、SECM をベースに開発した「受精卵呼吸測定装置」を用いて個々の胚の呼吸量を測定した。呼吸測定後、胚発生能を調べるために個々の胚を Day 3 までは Sydney IVF Cleavage Medium (Cook 社) を用いて培養し、Day 4 以降は Sydney IVF Blastocyst medium (Cook 社) に培地交換を行い、Day 5~7 まで培養し胚盤胞発生率および呼吸量を調べた。

## 2. 呼吸量測定

図1に、「受精卵呼吸測定装置」を示す。装置は、XYZ ステージを備えた倒立型顕微鏡、マイクロ電極の電位を一定に保持するポテンシオスタット、呼吸解析ソフトを内蔵したノートパソコンにより構成されている。呼吸量の測定には、先端径を 2~4  $\mu\text{m}$  にエッチング加工した白金をガラスキャピラリーで封止したディスク型マイクロ電極と底部に円錐形のマイクロウェル 6 個を施した専用の測定プレート (図2) を用いた。測定プレートに 10% synthetic serum substitute (SSS; IS Japan) を添加した modified-

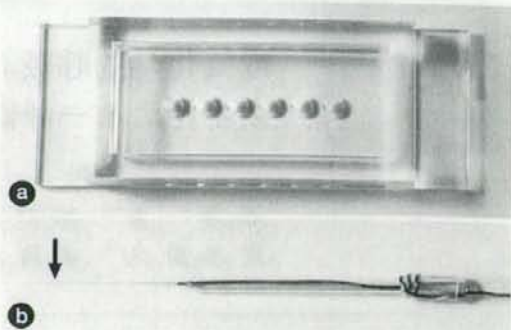


図2 呼吸測定用に開発した多検体測定プレート (a) とマイクロ電極 (b)

① 多検体プレート底面には円錐形のマイクロウェルが施されている。ディスク型白金マイクロ電極。先端部 (矢印) が直径 2~4  $\mu\text{m}$  にエッチング加工された白金線がガラスキャピラリー先端部に封止されている。

human follicle fluid (m-HFF: 扶桑薬品工業株式会社) を 5 ml 入れ、液温が 37°C になるように保温プレートの温度を調節した。マイクロウェルのなかにミネラルオイルが混入しないように胚を 10% SSS 添加 m-HFF で洗浄した後、マイクロウェルの底部中心に胚を静置した。参照電極を測定プレートの端に設置した後、マイクロ電極を透明帯の間近に移動させた。ポテンシオスタットの電位を酸素が還元可能な -0.6 V vs. Ag/AgCl (参照電極) に保持した後、移動速度 30  $\mu\text{m}/\text{sec}$ 、走査距離 160  $\mu\text{m}$  の条件で透明帯に対して鉛直方向 (Z 軸方向) に掃引した。

## 3. 胚の呼吸量

Day 2~3 における 3~10 細胞期胚 ( $n=70$ ) の呼吸量を測定した。各分割期の酸素消費 (呼吸) 量を表1に示す。呼吸量 ( $F \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$ ) の平均値は、0.33~0.53 であり各分割期間に顕著な差はなかった。一方、同一分割期において、それぞれの胚の呼吸能に顕著な違いが認められた。例えば、Veeck の分類によって 3 分割グレード 3 と形態的に同じクオリティーと評価された胚の呼吸量を比較した結果、呼吸測定値はそれぞれ 0.94, 0.68, 0.61, 0.19, 0.18 であり胚によって顕著な違いがあった。他の分割期におい

表 1 異なる分割期におけるヒト胚の酸素消費量 (呼吸量)

分割期	測定胚数	酸素消費量 ( $\times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ )
3細胞	5	$0.52 \pm 0.33$
4細胞	3	$0.33 \pm 0.06$
5細胞	6	$0.50 \pm 0.21$
6細胞	13	$0.38 \pm 0.15$
7細胞	15	$0.37 \pm 0.21$
8細胞	20	$0.37 \pm 0.21$
9細胞	4	$0.35 \pm 0.11$
10細胞	4	$0.53 \pm 0.37$

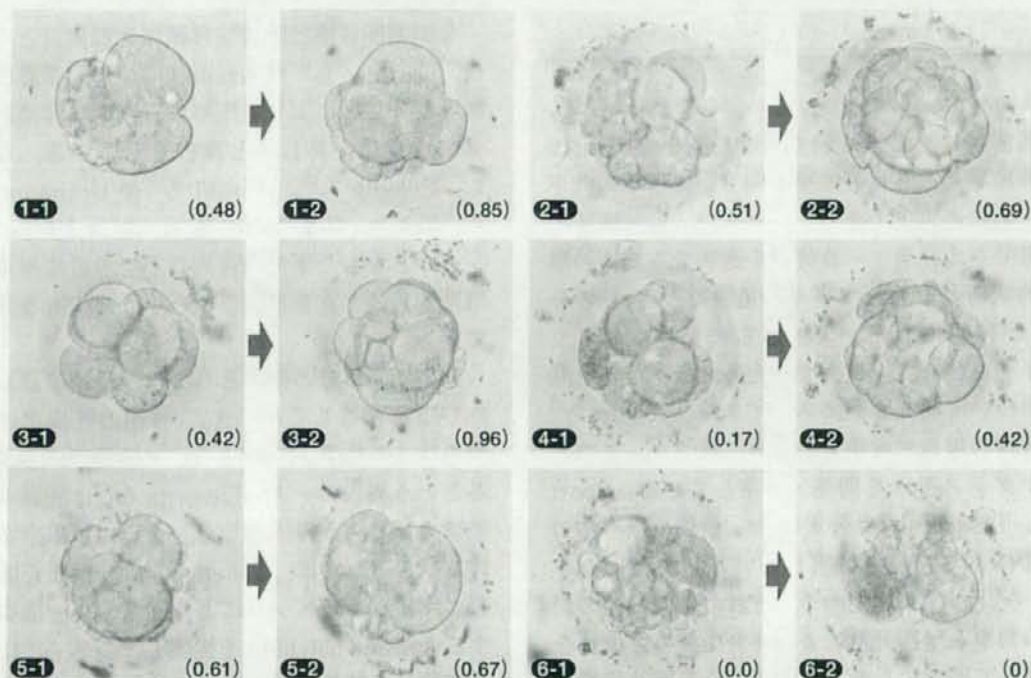


図 3 ヒト体外受精胚の形態と呼吸量

受精後3日目のヒト胚 (Day 3 胚: 1-1, 2-1, 3-1, 4-1, 5-1, 6-1) と呼吸測定後に1日間個別培養したヒト胚 (Day 4 胚: 1-2, 2-2, 3-2, 4-2, 5-2, 6-2) のそれぞれの光学顕微鏡像と呼吸量 (括弧内の数字:  $F \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$ ) を示す。

でも同様の傾向が観察された。このように本研究では、Veeck の分類法による形態的評価と胚の呼吸能には明確な相関は認められなかった。

胚発生と呼吸能の関係を調べるために呼吸測定後の胚 (Day 3) を個別に培養し、胚の呼吸量変化を調べた。その結果、培養前に比較的高い呼吸能を有する胚の多くは、培養1日後に発生

の進行が観察され呼吸量の増加も認められた (図 3)。一方、呼吸能の高い胚の一部や呼吸活性がほとんど検出できない胚では、発生の進行や呼吸量の増加は起こらなかった。次に、Day 3 胚を呼吸測定後2日間個別に培養し、呼吸能と胚盤胞発生率の関係を調べた。その結果、Day 3 において呼吸量が  $0.26 \sim 0.56 \times 10^{14}/\text{mol}$

表2 ヒト胚の呼吸能と胚盤胞発生率の関係

酸素消費量 ( $F \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$ )	測定胚数	胚盤胞に発生した胚数 (%)
$F > 0.56$	14	5 (35.7)
$0.26 \leq F \leq 0.56$	65	41 (63.1)
$F < 0.26$	26	11 (42.3)

$s^{-1}$ であった胚は60%以上が胚盤胞に発生した(表2)。一方、呼吸量が $0.26 \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$ 以下および $0.56 \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$ 以上であった胚の胚盤胞発生率は、それぞれ35.7%、42.3%であった。

## II. 考 察

胚移植にあたり、最も良好な胚を選別し、1個移植することは妊娠率の向上、流産率の低下のために不可欠である。これまで、分割期胚の段階でクオリティー良好胚を選別するための形態的判断基準として多くの施設でVeeckの分類<sup>4)</sup>が使用されている。さらに、よりクオリティー良好な胚を選択するために様々な判定基準について研究が進められてきた。Zollnerら<sup>5)</sup>は前核の接着や前核数の評価に基づく、スコアリングシステムを開発・提案している。Scottら<sup>6)</sup>、Tesarikら<sup>7)</sup>や公文ら<sup>8)</sup>は、前核や核小体の形態による判定を提案している。また、Haydarら<sup>9)</sup>は、2細胞期のそれぞれの細胞の核の局在の判定と早期分割による胚発生能の評価法を提案している。しかし、いずれも形態的特徴の観察による評価法であるため、判定結果が観察者の主観によって影響を受ける可能性は否定できない。

1998年頃からは、胚盤胞期用の培養液の作成に成功したことにより胚の成長段階と子宮内の環境を同期化できること、培養期間が長くなることにより移植胚の選別が容易になり、1個か2個の胚を移植することで多胎を防ぐことができるという理由から、胚盤胞期移植が広まった。しかし、一卵性双胎が増加することや、培養期間が長くなるため、胚盤胞まで発育できず発育停止による理由から、胚移植キャンセルになる

可能性が高くなるという欠点も持ち合わせている。そのため、大多数の施設ではDAY2もしくはDAY3の分割期胚を移植しているのが現状である。

分割期胚移植と胚盤胞移植の比較検討としては、Gardnerら<sup>10)</sup>やScholtesら<sup>11)</sup>が、胚盤胞移植を行うことにより着床率は分割期胚移植に比べて有意に上昇したと報告をしている。しかし、Coskunら<sup>12)</sup>、Karakiら<sup>13)</sup>やUtsunomiyaら<sup>14)</sup>により、胚盤胞まで発育が進まず移植キャンセルとなった症例を含めた上での妊娠率は分割期胚移植と有意差はないという報告もなされている。

分割期胚移植の検討としては、受精確認からDAY2移植もしくはDAY3移植の妊娠率の比較を行った結果、Carilloら<sup>15)</sup>の妊娠率に差があるという報告の一方、Lavergeら<sup>16)</sup>は妊娠率に差はないという報告をした。また、着床率を上げる試みとしては、Cohenら<sup>17)</sup>は分割胚を固定し、マイクロピペットにより透明帯を一部切開するassisted hatchingを提案し、長木ら<sup>18)</sup>により当院における臨床応用の可能性を検討している。また、Munneら<sup>19)20)</sup>は分割胚の状態で割球をFISH法にて染色体を調べた結果、胚の染色体異常はモザイクである頻度が高く、また割球の形が不均等でフラグメンテーションを有している場合、diploidのモザイク、異数性、多数性の頻度が増加すると報告している。また、大津ら<sup>21)</sup>は分割胚の割球大小不同と染色体異常の関係についてFISHを用いて検討を行った結果、バイオプシーを行う細胞サイズによって異なる判定が得られる可能性があるということを報告している。染色体がモザイクである割球は発育停止する可能性があり、割球の染色体異常が胚

の発生へ及ぼす影響、およびモザイク胚が奇であるかはまだわからないのが現状である。

Abeらは、胚のクオリティーに関連する微細構造の解析を行い、ミトコンドリアが胚のクオリティーに密接に関係していることを発見して<sup>22)</sup>。ミトコンドリアは酸化リン酸化反応(呼吸)により細胞活動に必要なエネルギー(ATP)を産生することから、ミトコンドリアを達している胚は呼吸活性が高く、一方の不妊ではミトコンドリアの呼吸代謝能が低いととられる。この研究成果を基にAbeらは、侵襲・非侵襲的に細胞の呼吸を検出できる電気化学計測技術に着目し、この計測技術の中心となるSECMをベースとする受精卵呼吸測定装置を開発している<sup>1)23)24)</sup>。これまでに、ウシ、マウスの単一胚の無侵襲的呼吸能解析に成功しており、呼吸能を指標とする胚クオリティー評価法の有効性を示している<sup>2)</sup>。最近、電気化学的呼吸計測技術のヒト胚への応用を目指し、単一ヒト余剰胚の呼吸量測定を行っている。体外受精後のすべての発生ステージにおいて単一胚の呼吸量測定に成功するとともに、ミトコンドリアの発達と呼吸量の増加が一致する事を明らかにしている<sup>3)</sup>。

本研究ではヒト胚の形態と呼吸能との関連性を調べた結果、胚の呼吸能とVeeckの分類法による形態的評価は完全に一致しなかった。しかしながら電気化学計測法は、形態観察では評価できない胚の呼吸能を正確にモニターすることができることから、細胞代謝活性能(ミトコンドリア機能)を指標とする新しい胚クオリティー評価法の基盤技術になると期待される。

## おわりに

本研究では、電気化学的呼吸測定技術を応用した新しいヒト胚クオリティー評価の可能性が示された。胚の呼吸測定と形態的評価を併用することで、より厳密に胚のクオリティーを評価する可能性がある。今後、胚のクオリティー

と呼吸能との関係を詳しく調べるとともに、呼吸測定の有効性と安全性を検討し、呼吸測定技術および装置の臨床応用を目指したい。

## 文 献

- 1) Abe H, Shiku H, Aoyagi S, et al: *In vitro* culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos, *J Mamm Ova Res*, **21**: 22-30, 2004.
- 2) Abe H, Shiku H, Aoyagi S, et al: Evaluating the quality of individual embryos with a non-invasive and highly sensitive measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy, *J Reprod Dev*, **52**(Suppl): S55-S64, 2006.
- 3) 阿部宏之, 横尾正樹, 荒木康久, 他: 電気化学的イメージング法を応用した単一ヒト胚の呼吸能解析, 産婦の実際, **56**: 2053-2057, 2007.
- 4) Veeck LL: *Atlas of the Human Oocyte and Early Conceptus*, Vol. 2, Willams & Wilkins, Baltimore, 1991.
- 5) Zollner U, Zollner KP, Hartl G, et al: The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum. Reprod*, **17**: 1327-1333, 2002.
- 6) Scott L, Alvero R, Leondires M, et al: The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod*, **15**: 2394-2403, 2000.
- 7) Tesarik J, and Greco E: The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod*, **14**: 1318-1323, 1999.
- 8) 公文麻美, 大津英子, 長木美幸, 他: 前核期胚における形態的評価の検討, 第58回日本不妊学会九州支部会抄録集, 2001.
- 9) Haydar NC, Levent K, Ulun U, et al: Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil Steril*, **85**: 358-365, 2006.
- 10) Gardner DK, Schoolcraft WB, Wargley L, et al: A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in *in-vitro* fertilization. *Fertil Steril*, **13**: 3434-3440, 1998.
- 11) Scholtes MC, Zeilmaker GH: Blastocyst transfer in day-5 embryo transfer depends primarily on the number of oocytes retrieved and not on age. *Fertil Steril*, **69**: 78-83, 1998.
- 12) Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S, et al: Day-5



- versus day-3 embryo transfer ; a controlled randomized trial. Hum Reprod, 15 : 1947-1952, 2000.
- 13) Karaki RZ, Samarraie SS, Younis NA, et al : Blastocyst culture and transfer ; a step toward improved *in vitro* fertilization outcome. Fertil Steril, 77 : 114-118, 2002.
  - 14) Utsunomiya T, Ito H, Nagaki M, et al : A Prospective, Randomized Study : Day-3 versus Hatching Blastocyst Stage. Hum Reprod, 19 : 1598-1603, 2004
  - 15) Carillo AJ, Lane B, Pridham DD, et al : Improved clinical outcomes for *in vitro* fertilization with delay of embryo transfer from 48 to 72 hours after oocyte retrieval ; use of glucose-and phosphate-free media. Fertil Steril, 69 : 329-334, 1998.
  - 16) Laverge H, De Sutter P, Van der Elst J, et al : A prospective, randomized study comparing day 2 and day 3 embryo transfer in human IVF. Hum Reprod, 16 : 476-480, 2001.
  - 17) Cohen J, Elsner C, Kort H, et al : Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. Hum Reprod, 5 : 7-13, 1990.
  - 18) 長木美幸, 佐藤真紀, 広津留恵子, 他 : 当院における凍結・融解胚移植の成績, 第53回日本不妊学会九州支部会抄録集, 1999.
  - 19) Munne S, Alikani M, Tomkin G, et al : Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. Fertil Steril, 64 : 382-391, 1995.
  - 20) Munne S, Cohen J : Chromosome abnormalities in human embryos. Hum Reprod Update, 4 : 842-855, 1998.
  - 21) 大津英子, 佐藤晶子, 長木美幸, 他 : ヒト胚における割球大小不同と染色体異常の関係, 日受精着床会誌, 24 : 34-37, 2007.
  - 22) Abe H, Matsuzaki S, Hoshi H : Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. Theriogenology, 57 : 1273-1283, 2002.
  - 23) Shiku H, Shiraishi T, Ohya H, et al : Oxygen consumption of single bovine embryos probed with scanning electrochemical microscopy, Anal Chem, 73 : 3751-3758, 2001
  - 24) Shiku H, Shiraishi T, Aoyagi S, et al : Respiration activity of single bovine embryos entrapped in a cone-shaped microwell monitored by scanning electrochemical microscopy, Anal Chim Acta, 522 : 51-58, 2004.

お詫びと訂正\*\*\*\*\*

『産婦人科の実際』57巻1号, 原著欄「子宮内膜症と子宮筋腫に対する偽閉経療法としての酢酸リニュープロレリン, 酢酸ゴセレリン, 酢酸プセレリンのランダム化試験(中間報告)」中に誤りがございました。下記のように訂正させていただきますとともに, お詫び申し上げます。

109頁右段下から7行目

誤

正

2003年4月～2005年9月

2003年4月～2006年9月

\*\*\*\*\*

(1) 卵胞発育および卵子成熟に関する各種生理活性物質の意義

東京大学医学部産科婦人科学教室

医員 吉野 修

**The Role of Biologically Active Agents in Folliculogenesis and Oocyte Maturation**

Osamu YOSHINO

*Department of Obstetrics and Gynecology, Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine,  
the University of Tokyo, Tokyo*

第 60 回日本産科婦人科学会・学術講演会

## シンポジウム 2 「卵の発育・成熟・老化機構の解明と臨床応用」

### (1) 卵胞発育および卵子成熟に関する各種生理活性物質の意義

東京大学医学部産科婦人科学教室

医員 吉野 修

## The Role of Biologically Active Agents in Folliculogenesis and Oocyte Maturation

Osamu YOSHINO

Department of Obstetrics and Gynecology, Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine,  
the University of Tokyo, Tokyo

### 目 的

質の高い多数の卵を安定して得ることが現代の生殖医療の進歩には必須の課題である。なかでも卵胞発育と卵子成熟は、卵の数と質を決める主要な因子である。このため、ヒトにおける卵胞発育から卵子成熟・排卵・黄体形成にいたる生理と病理のメカニズムを解明することが、より高度かつ有効な生殖医療に求められている。原始卵胞から排卵へといたる卵胞発育の過程は、初期の卵胞刺激ホルモン(FSH)に依存しない時期とその後のFSH依存性の時期に分けられる。初期のFSHに依存しない卵胞発育は卵子のみに発現するBone Morphogenetic Protein-15(BMP-15)やGrowth Differentiation Factor-9(GDF-9)などに依存しており、これらの遺伝子異常はヒトの早発卵巣不全(POF)の原因となることが知られている<sup>1)</sup>。FSH依存性となった卵胞は、月経周期はじめのFSH上昇に刺激され急速に増大するが、健全な卵胞発育には血管新生による栄養血管網の発達が不可欠である。一方、排卵・黄体形成の過程では適切な組織構築変化のために種々の生理活性物質の作用

が必要である。本研究では、BMPサイトカインファミリーの卵胞発育における役割、卵胞発育における血管新生因子の制御機構、ならびに、排卵期および黄体形成における生理活性物質の作用機序の解明を目指した。

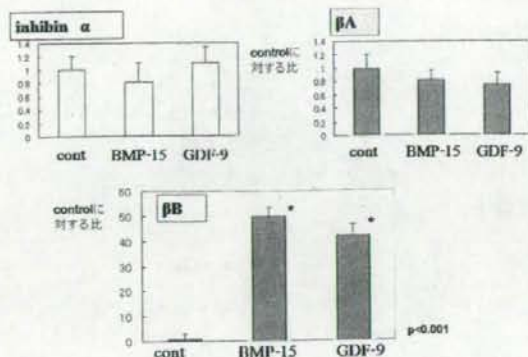
### 1. 卵胞発育

卵胞発育に関する項では、①卵胞におけるFSH受容体の誘導、②FSH受容体誘導後の卵胞発育、③血管新生について検討を行った。

#### 1-①卵胞におけるFSH受容体の誘導

初期の卵胞において、activin Bが顆粒膜細胞の増殖および、FSH受容体を誘導することが知られているが、activin Bの誘導因子はよくわかっていない<sup>2)</sup>。我々はまず、activin Bの誘導因子に関する探索を行った。とくに、卵子から産生されるサイトカインである、GDF-9およびGDF-9に高い相同性を示すBMP-15(GDF-9B)に注目した。同サイトカインは、TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属し、卵胞発育の初期から卵子においてのみ発現することが知られている。また、同遺伝子異常によりヒトを含め多くの動物において卵胞発育が初期で停止

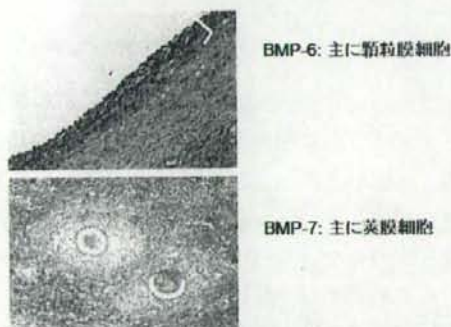
Key Words: BMP, Folliculogenesis, Ovulation, Angiogenesis



BMP-15, GDF-9 はinhibin/activin  $\beta$ B subunitを著増させた。

【図1】 ヒト顆粒膜細胞における BMP-15, GDF-9 の作用 (real-time PCR にて解析)

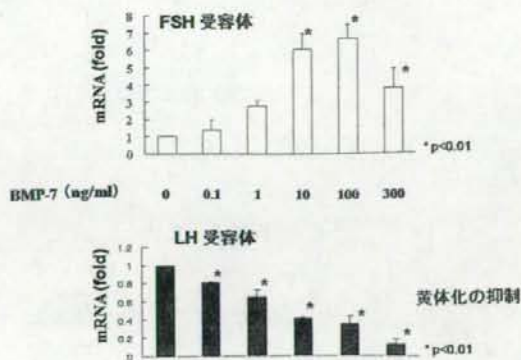
#### BMP-6, BMP-7 ヒト卵胞における発現部位



【図2】 正常卵巣における BMP-6, BMP-7 の発現 (免疫染色法)

することが報告されているが、その詳しいメカニズムはわかっていない<sup>1)</sup>。そこで、我々はヒト顆粒膜細胞を用いて、リコンビナント BMP-15 および GDF-9 (100ng/ml) を添加し、8 時間後の mRNA 発現を real-time PCR にて測定した。ヒト顆粒膜細胞は、患者の同意のもと、体外受精採卵時に得られたものを使用した。

BMP-15 および GDF-9 は inhibin  $\alpha$  subunit, および inhibin/activin  $\beta$  A subunit の発現量を変化させなかったが、inhibin/activin  $\beta$  B subunit の発現量を 40~50 倍と著増させた (図 1)。初期の卵胞では inhibin  $\alpha$  subunit が発現していないため、BMP-15, GDF-9 により  $\beta$  B subunit が誘導される



\* BMP-6も同様の作用を有した。

【図3】 ヒト顆粒膜細胞における BMP-6, BMP-7 の作用 (real-time PCR にて解析)

と  $\beta$  B subunit がホモダイマーを形成し、activin B が産生されることが予想される。activin B は顆粒膜細胞の増殖作用および FSH 受容体の誘導作用を有するため、初期卵胞は FSH 受容体を誘導するまで成長が可能となる<sup>2)</sup>。このことから、BMP-15 および GDF-9 はヒト初期卵胞において activin B の誘導を介して卵胞発育を促進していることが示唆された。

#### 1-② FSH 受容体の誘導後の卵胞発育

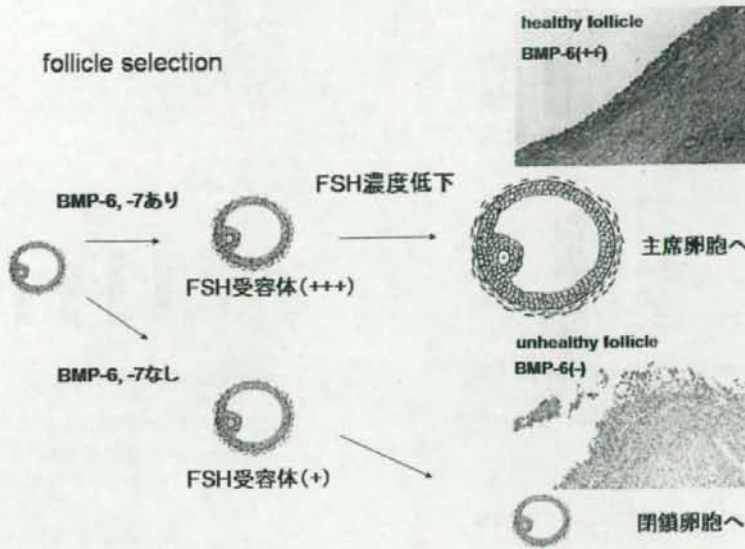
・ BMP-15, GDF-9

卵胞が FSH 受容体を獲得すると FSH 刺激により顆粒膜細胞に inhibin  $\alpha$  subunit の発現が増加する。BMP-15, GDF-9 により inhibin/activin  $\beta$  B subunit が誘導されれば、inhibin  $\alpha$  subunit とヘテロダイマー形成をして inhibin B が増加すると考えられる。これまで、inhibin B の調節因子はよくわかっていないが、今回の検討により卵子から分泌される BMP-15, GDF-9 により inhibin B の産生が調節を受けていることが示唆された。

・ BMP-6, BMP-7

この時期に発現してくる BMP サイトカインとして、BMP-6 および BMP-7 が挙げられる。

これまで、ラット、ヒツジにおいて顆粒膜細胞由来の BMP-6 および theca 細胞由来の BMP-7 が二次卵胞以降より発現し、卵胞の黄体化を抑制する因子として卵胞発育に関与していることが報告さ



【図4】 follicle selection への BMP-6, BMP-7 の作用(仮説)

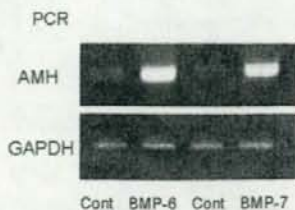
れている<sup>1)</sup>。我々はヒトにおいて他の動物と同様に、BMP-6 が主に顆粒膜細胞に BMP-7 が主に茨膜細胞に発現していることを認め、これらの発現は卵胞の増大に伴って増強することを認めた(図2)。ヒト顆粒膜細胞において BMP-6, BMP-7 は FSH 受容体の発現を誘導する一方で、LH 受容体の発現が濃度依存性に減少することを認めた。すなわちヒトにおいてもラット、ヒツジと同様に BMP-6, BMP-7 が黄体化抑制作用を有すること考えられた(図3)。卵胞が増大するにつれ BMP-6 および BMP-7 発現が増加することから、その作用として卵胞における FSH 受容体をさらに誘導することが考えられる。さて、卵胞期中期より inhibin B の作用により血中 FSH 濃度が低下することが知られている。その意義として FSH 受容体発現が少ない卵胞は、血中 FSH 濃度の低下に対応できずに閉鎖卵胞となる一方で、FSH 受容体を多く発現する卵胞は生存することができ、このことが単一排卵にむけての follicle selection のメカニズムであると考えられている。卵胞において BMP-6, BMP-7 が存在すると、FSH 受容体がさらに発現することで、血中 FSH 濃度低下に対応することができ、主席卵胞へさらに成長することができるが、BMP-6, BMP-7 が発現しないと、FSH 受容体

の発現が弱く、血中 FSH 濃度低下に対応することができずに閉鎖卵胞へ陥ることが考えられる。事実、healthy follicle では BMP-6 の発現を顆粒膜細胞に認めたが、unhealthy follicle では BMP-6 の発現を認めなかった(図4)。

また、我々は BMP-6 および BMP-7 が顆粒膜細胞における AMH (anti-Müllerian hormone) mRNA を増加させることを認めた(図5)。AMH は顆粒膜細胞から産生され、初期卵胞の活性化、すなわち卵胞の recruitment を抑制することが知られている。また血中 AMH 値は卵巣の予備能力を反映することから、近年注目を集めている物質であるが<sup>2)</sup>、AMH の発現調節因子に関してほとんど報告がない。BMP-6 および BMP-7 は顆粒膜細胞における AMH の誘導を介して、周囲に存在する初期卵胞の活性化を抑制させることが考えられる。その意義として、初期卵胞の活性化を調節することで、卵子の急激な枯渇化を防いでいる可能性が推測された。

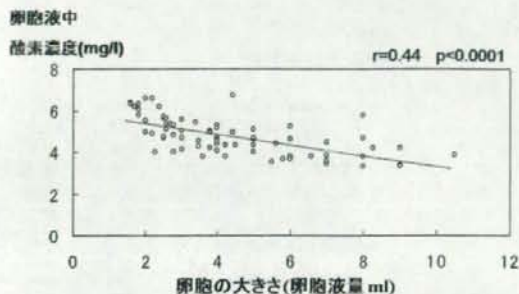
### 1-③血管新生誘導

二次卵胞から血管が誘導されるが、血管は茨膜細胞層にのみ存在することから、酸素やホルモンが顆粒膜細胞に到達しやすくなるために、血管網の発達が良好な卵胞形成に重要である。IVF 症例



【図5】ヒト顆粒膜細胞におけるBMP-6, BMP-7の作用(PCRにて解析)

卵胞の大きさ(卵胞液量)と卵胞液中の酸素濃度の関係(IVF症例)



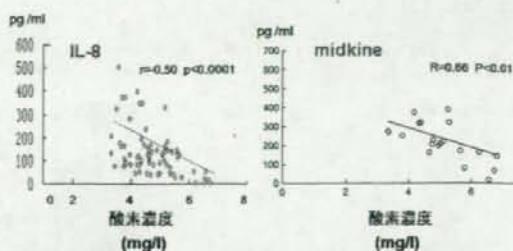
【図6】卵胞の大きさ(卵胞液量)と卵胞液中の酸素濃度の関係(IVF症例)

を用いて卵胞ごとの大きさと卵胞液中の酸素濃度を調べると、卵胞が大きくなるに従い、卵胞液中の酸素濃度が低下することを認めた(図6)<sup>9)</sup>。さて、種々の組織において低酸素刺激が血管新生因子の誘導に関与していることが知られている。そこで、卵胞発育に関与する血管新生因子(IL-8, midkine, angiogenin)と酸素濃度の関係を調べた。in vivoの検討でIL-8, midkine濃度と卵胞液中酸素濃度には負の相関を認め(図7)<sup>10)</sup>、またin vitroの系で、低酸素刺激により、顆粒膜細胞からのangiogenin産生が亢進することを認めた(図8)<sup>6)</sup>。すなわち、卵胞は体積の増大という構造的変化に伴う低酸素状態を利用して、血管新生因子を誘導している可能性が考えられた<sup>9)</sup>。

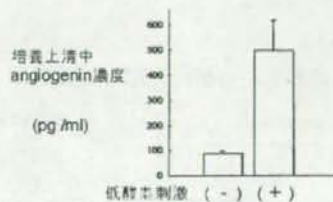
## 2. 排卵について

LHサーージ後に①卵胞周囲の毛細血管内に血栓が形成されること、および②卵丘顆粒膜細胞が膨化することが知られている。

卵胞ごとの酸素濃度とサイトカイン濃度(IVF症例)



【図7】卵胞ごとの酸素濃度とサイトカイン濃度(IVF症例)



顆粒膜細胞において低酸素刺激により発現が亢進した。

【図8】ヒト顆粒膜細胞における低酸素刺激の作用(ELISA法による解析)

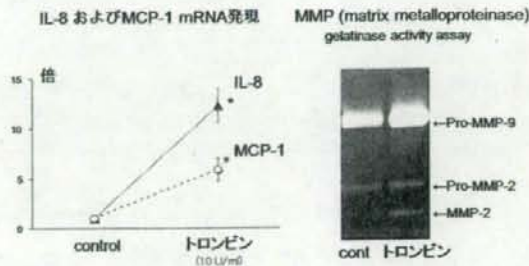
### 2-①卵胞周囲の毛細血管内における血栓形成

血管網の発達した卵胞で、LHサーージにより毛細血管内で血栓の形成、つまりトロンビンが産生される。トロンビン産生の意義を調べるため、我々はヒト顆粒膜細胞にトロンビン添加実験を行った。トロンビン(10 IU/ml)添加により炎症性サイトカインIL-8, MCP-1 mRNA および組織のリモデリングに重要であるMMP(matrix metalloproteinase)が誘導されることを認めた(図9)<sup>7)</sup>。これらのことからLHサーージにより産生されたトロンビンにより、炎症が惹起され、卵胞壁の破綻すなわち排卵が起こると考えられた。

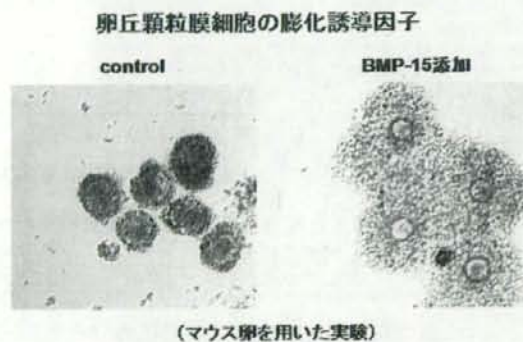
### 2-②卵丘顆粒膜細胞の膨化

卵丘膨化の意義として、膨化により卵-卵丘細胞複合体の体積が増大することで、排卵しやすくなり、また正常な精子との受精が促進されることが知られている。しかし、卵丘膨化の調節因子はよくわかっていない。そこで我々は特に卵子の存在に注目し、卵性因子BMP-15の膨化作用を調べ

排卵に関連する因子  
トロンピン



【図9】 ヒト顆粒膜細胞におけるトロンピンの作用 (real time PCR および gelatinase activity assay による解析)



- ・卵丘細胞の膨化
- ・卵核崩壊 (GVBD) を誘導した。

【図10】 マウス卵子—卵丘細胞複合体における BMP-15 の作用

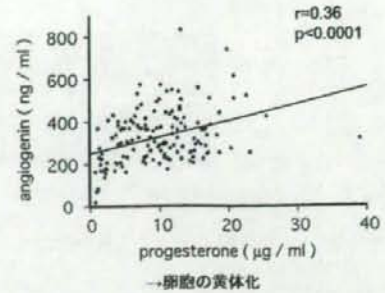
た、マウス卵—卵丘細胞複合体において、BMP-15 蛋白添加により卵丘細胞の膨化および卵核崩壊 (GVBD) が誘導されることを認めた(図10)<sup>9)</sup>。

### 3. 黄体形成における血管新生

#### 3—①血管新生因子 angiogenin

黄体形成時、毛細血管は基底膜を貫通することから血管新生が重要であることが知られている。

血管新生因子 angiogenin は顆粒膜細胞において hCG 刺激によっても発現が亢進することを認めている<sup>9)</sup>。IVF 症例における卵胞ごとのプロゲステロン濃度と angiogenin 濃度の関係を調べた



【図11】 卵胞ごとのプロゲステロンと血管新生因子 angiogenin 濃度の関係 (IVF 症例)

#### micro RNA と黄体形成



黄体における血管新生が不良のため不妊を呈する。

- ・黄体形成における血管新生の重要性
- ・micro RNA が血管新生に関与している

【図12】 Dicer-1 低発現マウスにおける黄体形成

ところ、正の相関を示すことを見出した(図11)<sup>9)</sup>。

#### 3—②micro RNA と黄体形成

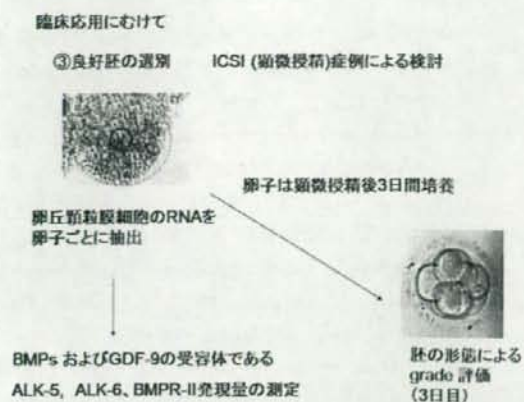
micro RNA とは Dicer-1 という酵素によりプロセシングを受けて産生される 20~25 塩基ほどの 1 本鎖 RNA で他の遺伝子発現を調節する機能を有することが知られている。

共同研究者である東京大学の太塚基之らによって作成された Dicer-1 の低発現マウスでは、黄体における血管新生不良により完全不妊を呈した。これらの知見により、黄体形成における血管新生の重要性が再認識され、また micro RNA が血管新生に関与することを認めた(図12)<sup>9)</sup>。

#### 4. 臨床応用に向けて

##### 4—①卵巣機能評価について

卵胞期早期の血中 inhibin B や血中 AMH 濃度が卵巣予備能評価の指標とすることが支持されている<sup>3)</sup>。今回、ヒト顆粒膜細胞において inhibin B



【図13】 ヒト卵丘細胞における BMP 受容体発現と胚の  
質の関係

と AMH 産生がそれぞれ BMP-15・GDF-9 および BMP-6/7 により調節を受けている可能性を示した。今後 BMP サイトカインの測定により卵巣予備能評価をより正確に行える可能性がある。

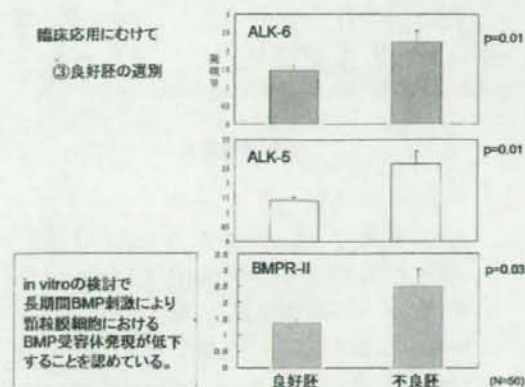
#### 4-②卵胞発育促進作用について

現在、不妊治療において FSH 製剤が汎用されているが同薬剤に反応の悪い、いわゆる poor responder が問題となっている。BMP サイトカインは顆粒膜細胞における FSH 受容体を誘導することから、BMP サイトカインを投与することで、卵胞の FSH 製剤に対する感受性をあげる可能性がある。

#### 4-③良好胚の選別

BMP サイトカインの受容体は主に顆粒膜細胞に存在することが知られている<sup>1)</sup>。また、in vitro の検討で長期間の BMP 刺激により、顆粒膜細胞における BMP 受容体の発現が低下することを認めている(自験例)。そこで顆粒膜細胞における BMP 受容体の発現量測定により良好な卵子や胚を選別できないかとの仮説をたて、ICSI 症例を用いて検討を行った(図13)。卵丘顆粒膜細胞の RNA を卵子ごとに抽出し、BMP および GDF-9 の受容体である activin receptor-like kinase (ALK)-5, ALK-6, BMP receptor-II mRNA 発現量の測定を real-time PCR にて行い、GAPDH にて補正を行った。

また卵子は ICSI 後 3 日間培養し、胚の形態によ



【図14】 ヒト卵丘細胞における BMP 受容体発現と胚の  
質の関係

る grade 評価を行い、受容体発現量との関係調べた。良好胚では不良胚と比して BMP サイトカインの受容体である ALK-5, ALK-6, BMPR-II の発現が有意に低いことを認めた(図14)。すなわち、良好胚群の顆粒膜細胞は十分な量の BMP に曝露されていたことが推測された。

#### まとめ

卵胞は、初期には卵子と顆粒膜細胞で構成される微小環境であったものが、卵子から分泌される因子が引き金となり、遂には莢膜細胞や血管網を発達させた卵胞にまで成長する。卵胞は FSH 受容体を獲得する一方で、周囲に血管網を誘導することで、FSH などを含めた多くの因子により調節を受けられるようになる。そして血管網の発達は卵胞発育のみならず、その後の排卵、黄体形成にまで関与していることを示した。この一連の流れのなかで、BMP サイトカインファミリーが、重要な役割を担っていることが明らかになってきた。同ファミリーの更なる理解により、卵巣および胚の新たなクオリティー評価法のみならず、新たな不妊治療の開発が期待される。

#### 謝辞

本シンポジウムでの発表の機会を与えて下さいました岡村州博学会長ならびに座長の労をお執り頂きました吉村榮典教授、杉野法広教授に深甚の謝意を表します。



また、本研究をご指導頂きました武谷雄二教授、堤治教授、UCSD大学 島崎俊一教授、東京大学産婦人科学教室員の方々に深く感謝いたします。

#### 共同研究者

東京大学産婦人科

大須賀稔、施佳、能瀬栄美、甲賀かをり、広田泰、平田哲也、森本千恵子、原田美由紀、竹村由里、北麻里子、田島敏樹、長谷川亜希子、浜崎かほり、児玉亜子、藤原敏博、藤本晃久、大井なぎさ、矢野哲、久具宏司、塩津英美

帝京大学溝口病院

西井修

東京大学消化器内科

大塚基之

University California San Diego

Heather McMahon, Shweta Sharma, Helene Maclaren and Vincent Maclaren

#### 文献

- 1) Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Elickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 72—101
- 2) Minegishi T. *The Ovary*, p79—92, Elsevier, Academic Press, 2004 Regulation of Gonadotropin Receptor in the Ovary
- 3) Visser JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 29: 81—86
- 4) Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Yano T, Tsutsumi O, Fujimoto A, Kugu K, Momoeda M, Fujiwara T, Taketani Y. Upregulation of interleukin-8 by hypoxia in human ovaries. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 286—290
- 5) Hirota Y, Osuga Y, Nose E, Koga K, Yoshino O, Yano T, Tsutsumi O, Sakuma S, Muramatsu T, Taketani Y. The presence of midkine and its possible implication in human ovarian follicles. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58: 367—373
- 6) Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, Momoeda M, Suenaga A, Kugu K, Fujiwara T, Takai Y, Yano T, Taketani Y. Evidence for the presence of angiogenin in human follicular fluid and the up-regulation of its production by human chorionic gonadotropin and hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3352—3355
- 7) Hirota Y, Osuga Y, Yoshino O, Koga K, Yano T, Nose E, Ayabe T, Namba A, Tsutsumi O, Taketani Y. Possible roles of thrombin-induced activation of protease-activated receptor 1 in human luteinized granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3952—3957
- 8) Yoshino O, McMahon HE, Sharma S, Shimasaki S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 10678—10683
- 9) Otsuka M, Zheng M, Hayashi M, Lee JD, Yoshino O, Lin S, Han J. Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 1944—1954

## Synopsis

To know the mechanism of folliculogenesis, ovulation and formation of corpus luteum is essential for the advance of reproductive medicine.

1. Folliculogenesis: in the early stage, follicles do not express FSH receptor. Thus, follicle growth is independent of FSH action. We checked the mechanism of FSH receptor induction. We found that oocyte derived factor, Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15) and Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) induce inhibin/activin  $\beta$  B subunit in human granulosa cells. At this stage, follicles do not express inhibin  $\alpha$  subunit. Namely, BMP-15 and GDF-9 might induce activin B which has strong potential to induce FSH receptor. We also found that BMP-6 and BMP-7 could also induce FSH receptor.

Once follicles gain FSH receptor, follicles can be dependent on FSH. At this stage, angiogenesis around follicle is important. We found that hypoxic milieu is induced as the follicles grow, and hypoxia can induce angiogenic factors.

2. Ovulation: ovulation is known as an inflammatory response. We found that thrombin, which is induced by LH surge can increase the inflammatory cytokines and MMP production. Also we found oocyte factor BMP-15 plays a role in ovulation.

3. Formation of corpus luteum: we found that hypoxia and micro RNA are related to angiogenesis, which leads to formation of corpus luteum.

We have shown that many factors, especially BMP family cytokines play important roles in ovarian physiology. To better understanding of BMP cytokine family might open new insights for new therapy of infertility.

---

# Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells

Jia Shi, M.D.,<sup>a</sup> Osamu Yoshino, M.D., Ph.D.,<sup>a,b</sup> Yutaka Osuga, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup> Osamu Nishii, M.D., Ph.D.,<sup>b</sup> Tetsu Yano, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup> and Yuji Taketani, M.D., Ph.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, University of Tokyo, Tokyo; and <sup>b</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Mizonokuchi Hospital, Teikyo University, Kawasaki, Japan

**Objective:** To examine the effect of bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) on FSH receptor (FSHR) expression in human granulosa cells.

**Design:** Laboratory study using human samples.

**Setting:** University hospital.

**Patient(s):** Human granulosa cells were obtained from 60 women undergoing oocyte retrieval for IVF.

**Intervention(s):** Human granulosa cells (GCs) were cultured with recombinant BMP-7, followed by RNA extraction.

**Main Outcome Measure(s):** mRNA levels of GCs were measured by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.

**Result(s):** Bone morphogenetic protein 7 increased FSHR gene expression in human luteinized granulosa cells, whereas it decreased LH receptor gene expression. Bone morphogenetic protein 7 also increased FSH-induced cyclic adenosine monophosphate production in GCs, indicating up-regulation of the cellular response to FSH. Although BMP-7 increased gene expression of activin- $\beta$ A and - $\beta$ B in GCs, inhibition of activin function did not affect the BMP-7-induced FSHR gene expression.

**Conclusion(s):** These findings provide new insight into the biologic function of BMP-7 in the human ovary and demonstrate its unique mechanism of regulating FSHR action. (Fertil Steril® 2009; ■: ■-■. ©2009 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** BMP, FSH receptor, ovary, folliculogenesis, female fertility

The pituitary gonadotropin FSH is a key hormone in the regulation of folliculogenesis and female fertility (1, 2). In the ovary, FSH triggers cytodifferentiation and proliferation of granulosa cells (GCs), ultimately resulting in the development of preovulatory follicles (3, 4).

Because FSH acts on the ovary in an endocrine manner, the expression of FSH receptor (FSHR) on target cells is essential for modulation of ovarian function by FSH. It is well known that FSHR is not expressed until midway through follicle development. In mature follicles, maintenance of FSHR expression is required to avoid death by atresia (5–7). Therefore, it is important to elucidate the mechanism responsible for regulation of FSHR expression to better understand the process of folliculogenesis.

Several factors, such as activins (8, 9), FSH (10), cyclic adenosine monophosphate (cAMP) stimulants and cAMP an-

alogues (11), are known to modulate the synthesis of FSHR mRNA in GCs. Recently, the bone morphogenetic proteins (BMPs), which are members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily, have emerged as important players in ovarian physiology and female fertility (12, 13). There is growing evidence that BMP-7 can modulate steroidogenesis in a way that promotes estrogen production while inhibiting progesterone biosynthesis in many species (14–16). Bone morphogenetic protein 7 increases FSH mRNA levels in cultured mouse ovaries (18). However, no information is available on the effect of BMP-7 on human primary GCs, although Abir et al. (17) reported that BMP-7 and its receptors are expressed in human ovarian follicles. In view of the finding that BMP-7 is expressed from small follicles (17), we hypothesized that BMP-7 might increase FSHR mRNA levels in human ovarian follicles. In this study, we investigated the effect of BMP-7 on FSHR expression using cultured human luteinized granulosa cells (LGCs), aiming to elucidate possible roles of BMP-7 in the human ovary.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents and Materials

Hyaluronidase, fetal bovine serum (FBS), DMEM/F12, and antibiotics (mixture of penicillin, streptomycin, and amphotericin B) were purchased from Sigma (St. Louis, MO), recombinant human BMP-7 was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN), and SB-431542 was from Calbiochem (La Jolla,

Received May 12, 2008; revised October 10, 2008; accepted November 11, 2008.

J.S. has nothing to disclose. O.Y. has nothing to disclose. Y.O. has nothing to disclose. O.N. has nothing to disclose. T.Y. has nothing to disclose. Y.T. has nothing to disclose.

Supported in part by Health and Labor Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan, Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Kowa Life Science Foundation, and Kanzawa Science Foundation.

Reprint requests: Yutaka Osuga, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655, Japan (FAX: +81-3-3816-2017; E-mail: yutakaos-ky@umin.ac.jp).

CA). Recombinant human FSH and activin-A were kindly provided by Nippon Organon (Tokyo, Japan) and Dr. Shunichi Shimasaki (University of California, San Diego), respectively.

#### Cell Culture of Human Luteinized Granulosa Cells

The method to obtain and culture human LGCs was described previously (19–21). Briefly, follicular fluid with LGCs was aspirated from 60 patients undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF). The clinical reasons for IVF in these patients were primarily male factor or tubal factor infertility. Patients with ovarian dysfunction were excluded from the study. The experimental procedures were approved by the institutional review board, and signed informed consent for use of LGCs was obtained from each patient. All of the follicular aspirates from each patient were pooled and centrifuged at 200g for 5 min, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.2% hyaluronidase, and incubated at 37°C for 30 min. The suspension was layered onto Ficoll-Paque and centrifuged at 150g for 20 min. The LGCs were collected from the interphase, washed with PBS, and cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 5% FBS and antibiotics (100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, and 250 ng/mL amphotericin B) for 15 min at 37°C to remove contaminating macrophage cells from LGCs. Using this procedure, LGCs were isolated in the supernatant and macrophages were attached to the culture dish. The collected human LGCs were cultured in DMEM/F12 containing 5% FBS and antibiotics in 12-well plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells/mL and kept at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air environment for 5 days. With this method, the contamination of monocyte/macrophages and endothelial cells were less than 1% judged by immunohistochemistry for CD68 and von Willebrand factor, respectively (data not shown). All of the LGCs used for the experiments were precultured for 5 days before treatment to allow the LGCs to regain sensitivity to FSH stimulation (22). The media were changed at 48 hr intervals. To evaluate the effects of BMP-7, human LGCs were cultured with or without BMP-7 (100 ng/mL) for 24 hr. In a dose-response study, LGCs were cultured with increasing concentrations of BMP-7 (0–300 ng/mL) for 24 hr. In the time course experiments, LGCs were incubated with or without BMP-7 (100 ng/mL) for 3, 8, 24, and 48 h. To investigate which BMP receptor was used for induction of FSHR by BMP-7, activin receptor-like kinase (ALK) 4, 5, and 7 inhibitor SB-431542 was used before stimulation with BMP-7 or activin-A. Recombinant BMP-7 was dissolved in 0.1% BSA + 4 mmol/L HCl, and SB-431542 was dissolved in dimethylsulfoxide as vehicle. The same amount of vehicle was used for control.

#### Reverse Transcription and Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis

Total RNA was extracted from LGCs using the RNeasy minikit (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription (RT) was performed using Rever Tra Dash (Toyobo, Tokyo, Japan). One microgram of total RNA was reverse transcribed in a 20- $\mu$ L volume. For the quantification of various mRNA levels, real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using LightCycler (Roche Diagnostic, Mannheim,

Germany) according to the manufacturer's instructions. The PCR primers were selected from different exons of the corresponding genes to discriminate PCR products that might arise from possible chromosomal DNA contaminants. The primer sequences were as follows, FSHR (NM\_000145: 174–196 and 510–492), inhibin- $\alpha$  (NM\_002191: 369–388 and 602–582), inhibin/activin- $\beta$ A (NM\_002192: 505–526 and 673–653), inhibin/activin- $\beta$ B (NM\_002193: 1184–1204 and 1325–1305), LH receptor (LHR) (NM\_000233: 747–767 and 981–962), ALK-6 (NM\_001203: 356–375 and 761–742), BMPR-II (NM\_001204: 647–666 and 1075–1054), and GAPDH (NM\_002046: 628–648 and 1079–1060) (21). The PCR conditions for FSHR, inhibin- $\alpha$ , and inhibin/activin- $\beta$ A and - $\beta$ B consisted of 40 cycles at 95°C for 10 s, 55°C for 10 s, and 72°C for 14 s, followed by melting curve analysis. The PCR conditions for LHR consisted of 40 cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 10 s, and 72°C for 9 s, followed by melting curve analysis. The PCR conditions for GAPDH consisted of 35 cycles at 95°C for 10 s, 64°C for 10 s, and 72°C for 18 s, followed by melting curve analysis. Expression of each mRNA was normalized by GAPDH mRNA. The temperature condition for regular PCR was 94°C for 10 s, 55°C for 4 s, and 72°C for 30 s. The number of PCR cycles was 22 for GAPDH, 25 for inhibin- $\alpha$  and inhibin/activin- $\beta$ A, 30 for ALK-6 and BMPR-II, and 33 for inhibin/activin- $\beta$ B, FSHR, and LHR. The PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide.

#### Measurement of cAMP Levels

To assess the level of cAMP synthesis, LGCs were cultured in 48-well plates with DMEM/F12 containing 1% FBS and antibiotics with or without BMP-7 (100 ng/mL) for 24 h. Then cells were cultured with 0.1 mmol/L IBMX, a phosphodiesterase inhibitor, in the presence or absence of FSH (0.5 IU/mL) for 2 h. Conditioned medium was collected and the extracellular content of cAMP was determined using a cAMP enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan).

#### Statistical Analysis

All results are shown as mean  $\pm$  SD of data from at least three separate experiments, each performed with triplicate samples. Data were analyzed by Student *t* test for paired comparison and one-way analysis of variance with post hoc test for multiple comparisons using Statview software (SAS Institute, Cary, NC). A *P* value of < .05 was considered to be statistically significant.

## RESULTS

#### Effect of BMP-7 on FSHR and LHR mRNA levels in LGCs

The gene expression of receptor for BMP-7, ALK-6, and BMPR-II was confirmed in LGCs by PCR (Fig. 1A). To investigate the effects of BMP-7 on FSHR mRNA induction in human GCs, the cells were cultured with BMP-7 (100 ng/mL) for 24 h (Fig. 1B). Notably, BMP-7 significantly increased FSHR mRNA levels. On the other hand, BMP-7 significantly suppressed LHR mRNA expression (Fig. 1C). In