

200923023A

平成21年度厚生労働科学研究費
(子ども家庭総合研究事業)

報告書

主任研究者 吉野 修

(女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立)

(H20-子ども-若手-011)

目次

I. 総括研究報告書	3
吉野 修	
II. 分担研究報告書	
1. 卵巢予備能の客観的評価に関する基礎的研究	7
吉野 修	
2. 卵巢予備能の客観的評価に関する基礎的研究	12
小辻 文和	
3. 胚・卵子の客観的評価に関する研究	14
阿倍 宏之	
4. 子宮内腔洗浄液を用いた子宮内膜の客観的評価に関する検討	19
浜谷 敏生	
5. 画像による子宮内膜の客観的評価法の開発	24
堀 正明	
6. 子宮内膜評価(腹腔内癒着に関する解析)	28
浅田 弘法	
7. 子宮内膜の客観的評価法の開発を目的とした胚着床に関する基礎的研究	31
大須賀 穰	
III. 主な研究成果の刊行に関する一覧表	36

I. 総括研究報告書

課題番号： H20-子ども-若手-011

課題名： 子ども家庭総合研究事業「女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立」

主任研究者： 吉野 修（東京大学 産婦人科）

研究総括

主任研究者： 吉野 修（東京大学 産婦人科）

(要約) 不妊治療のニーズが高まる中、生殖機能の客観的な評価法が確立しているとは言い難く、このことが不妊治療の方針が定まらない原因と思われる。客観的なスクリーニング法を確立することが効率のよい治療法の提示および妊娠率向上に寄与すると思われる。特に機能評価が確立していない 1). 卵巣機能評価、2). 得られた卵子および胚の評価、3). 子宮内膜の着床能の評価にわけ、各々の分野で精力的に基礎研究を行ってきた研究者と共同研究を開始した。本研究ではできるだけ非侵襲的で簡便な検査法を用いる。今年度は、基礎的な知見を増やすことができ、また今後臨床データを蓄積する環境を整えることができた。

A. 研究目的

女性の加齢に伴い卵巣機能は低下し、子宮筋腫など子宮疾患の合併率が上昇することが知られている。女性の社会進出が進んでいる現代では女性の晩婚化が進んでおり、それに伴い卵巣および子宮機能異常に起因した不妊症患者が増えている。不妊治療を進める上で、正確な卵巣機能評価は治療方針の決定に大切である。また、近年体外受精のニーズは拡大しているが、得られた胚の評価方法も主観による形態的な評価にとどまっている。良好胚の正確な選別は妊娠率の向上のみならず、母子に対するリスクから産科領域で問題となっている多胎の予防にも寄与することから、新たな胚の評価方法が望まれる。また胚の子宮内膜への着床は未だ不明な点が多い。従来の不妊検査では異常が見つからない所謂、原因不明症例は不妊患者の4割を占めると言われている。この中に子宮内膜の機能異常症例が少なからず含まれていると思われるが、これまで子宮内膜機能に対する有効な検査法は全く確立していない。また、子宮筋腫合併症例などに対し、子宮病変の治療もしくは不妊治療のどちらを先行させるべきなの

か明確な方針がない。

本研究では 1).卵巣機能評価方法 2).卵子・胚の評価 3).子宮内膜の評価にわけ、共同研究を通して新たな不妊症検査の確立をめざす。

精度の高い不妊スクリーニング検査の確立は、将来その概念に立脚した治療法の開発も多いに期待することができる。

B. 研究方法(概要のみ。詳細は各分担研究に記載)

1) 卵巣機能評価

(吉野担当)：卵胞に発現する BMP ファミリーサイトカインの分泌異常は卵巣機能不全を引き起こすことから、同サイトカインの測定が卵巣機能の直接評価に繋がると考えられる。今年度は、ヒト卵巣に発現するサイトカイン、BMP-2 に関する基礎的研究を行った。

(小辻担当)：BMP ファミリーサイトカインに属する GDF-9 の卵胞における働きを、甲状腺ホルモンとの関係を含めて検討した。

2) 胚および卵子の評価 (阿部担当)：卵子や卵子-卵丘複合体の酸素消費量について呼吸能測定装置を用いて検討した。

3) 子宮内膜評価：

1. 子宮内腔洗浄液の検討 (浜谷担当分)

胚と子宮内膜は液性因子を介して着床を試みることが知られている。この事実に着目し、不妊症患者より子宮内腔洗浄液を採取し着床に関与する蛋白発現を検討した。子宮内腔洗浄液中に存在する液性因子 matrix metalloproteinase (MMP)、に着目し、それらの分泌量(活性)と妊娠(着床)率との相関を検討した。また、今年度は子宮内膜におけるCD9および胚性着床因子として着床前期・周辺期に胚に特異的に発現する *Hmgpi* に注目した。

2. 画像による子宮内膜の客観的評価法の開発 (堀担当分) 他科領域で使用されている新たな MRI 検査法を用い、不妊症例を対象に検討を行った。

3. 子宮内膜評価 (腹腔内癒着に関する解析; 浅田担当分) 腹腔内の癒着は不妊症の大きな原因となるが、評価にはこれまで外科的侵襲を要していた。今回 Cine MRI 法を用い、腹腔内の癒着の評価を試みた。

4. 着床機転に関与する因子の基礎的研究 (大須賀担当分) 着床時、子宮内膜は脱落膜変化をきたす。今年度、脱落膜化を制御する因子に関する検討を行った。

C. 研究結果 (表1)詳細は分担報告書参照

1). 卵巣機能評価 (吉野) 卵胞に発現するサイトカイン BMP-2 は卵胞発育に関与するゴナドトロピンレセプターを誘導する一方で、卵胞の早期黄体化を抑制することがわかった。また、BMP システムとゴナドトロピンシステムは互いを調節していることを明らかにした。

(小辻) 卵子由来の成長因子である GDF9 が、①卵胞顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制すること、②卵胞莢膜細胞からのアンドロゲン産生を促進することにより、初期の卵胞発育を促進す

るメカニズムが明らかになった。

さらには、不妊臨床において、甲状腺機能異常が高頻度に不妊・排卵障害を来すことに関連し、甲状腺ホルモン (T3) が FSH と協調しながら、①卵子の GDF9 発現、②顆粒膜細胞の FSH 受容体発現を、それぞれ促進することにより、初期の卵胞発育を促進するメカニズムが明らかになった。

2). 胚・卵子の選別法 (阿部) (1) 電気化学計測技術を基盤とする「受精卵呼吸測定装置」を用いることで、単一のウシ未成熟卵子の呼吸測定に成功した。

(2) 「受精卵呼吸測定装置」は、単一細胞 (卵子) レベルでの呼吸活性を高精度でモニタできることが示された。

(3) 呼吸活性を指標とするヒト生殖細胞品質評価システム開発のための基盤構築ができた。

3). 子宮内膜の評価法

1. 子宮内腔洗浄液の検討 (浜谷担当分)

MMP について検討し、MMP の調整には抗生剤とプレドニゾロンによる内服療法が奏功を示し、それが妊娠率の改善に導くことが明らかとなった。さらに、ヒト子宮内腔洗浄液中の CD9 濃度と妊娠率との関係について検討を加えるため、まずはマウスにおける基礎的検討を進めた。その結果、マウスでは CD9 が子宮内腔に分泌されていること、子宮内腔の CD9 濃度が低いと卵管に達する精子数が減少することが明らかとなった。一方、胚性着床因子として着床前期・周辺期に特異的に発現する *Hmgpi* は、胚発育に必須因子であることを見出した。

2. 画像による子宮内膜の客観的評価法の開発 (堀担当分) おもに子宮筋腫を有する不妊症症例を対象として、あらたな MRI 撮影法の開発を試みた。

子宮全体の三次元ボリューム撮像、子宮の連続的時間差撮像、いわゆるシネ MRI 撮像、子宮内膜の T2 値測定を試み、今年度はMRIの条

件を設定することができ、今後、データを蓄積する

3. 卵巣周囲癒着の cine MRI による診断は、感度 78%、特異度 80%で検出が可能であった。癒着の重症度に関しても評価を行った。cineMRI にて癒着なしと判断された症例で卵巣周囲癒着は検出されなかった。また、MRI における癒着スコアが高いものほど、実際の手術時に付属器周囲癒着スコアが高くなる傾向が認められた

4. 着床機転に関与する因子の基礎的研究(大須賀担当分) 子宮内膜は胚の着床および妊娠の維持のために、分化と増殖を同時に行わなくてはならない。一般的に2つの事象は相反するものと考えられていることから、子宮内膜は特殊な組織と考えられる。BMP-7 (bone morphogenetic protein-7)は着目し、子宮内膜における分化および増殖両方に関与する因子であることを見出した。

D. 考察(詳細は各分担者分を参照)

客観的なスクリーニング法を確立することが効率のよい治療法の提示および妊娠率向上に寄与すると思われる。特に機能評価が確立していない 1). 卵巣機能評価、2). 卵子および胚の評価、3). 子宮内膜の着床能の評価にわけ、各々の分野で精力的に基礎および臨床研究を行ってきた研究者と共同研究を開始した。本年度は、すべての領域において基礎的データを得ることができ、また不妊症患者を対象とした画像検査では、非侵襲的検査法による癒着の評価等が可能であることを示すことができた。

E. 結論

3箇年計画の二年目を終えるにあたり、基礎的知見を加えることができた。また同時に来年度以降

のデータを蓄積することができる研究環境も整えることができた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表(各分担報告書に記載)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願)

(1) 哺乳動物受精卵の呼吸活性測定方法及びその電気化学デバイス(珠玖仁、末永智一、高野真一郎、伊達安基、齋藤剛史、横尾正樹、伊藤隆広、阿部宏之)特願 2008-293117、2008年11月。

II. 分担研究報告書

課題番号： H20-子ども-若手-011

課題名： 子ども家庭総合研究事業「女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立」

主任研究者： 吉野 修（東京大学 産婦人科）

分担課題： 卵巣機能の評価

分担研究者： 吉野 修（東京大学産科婦人科教室 特任研究員）

(要約) 卵胞発育のメカニズムを解明することが、正確な卵巣機能評価法の開発に有用である。

今年度は、卵巣に発現する BMP (bone morphogenetic protein) サイトカインに着目し、その発現および卵胞発育における作用についての検討を行った。

A. 研究目的

女性の社会進出が進んでいる現代では女性の晩婚化が進んでおり、それに伴い卵巣機能低下に起因した不妊症患者が増えている。不妊治療を進める上で、正確な卵巣機能評価はその後の治療方針の決定に大切である。なかでも卵胞発育は、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、また不妊症のスクリーニングへの応用が可能になると思われる。

卵胞発育は脳下垂体より分泌される卵胞刺激ホルモン FSH により調節を受けていることから、卵巣顆粒膜細胞における FSH 受容体の発現誘導のメカニズムを知ることは大変意義がある。近年、TGF- β スーパーファミリーメンバーに属するサイトカイン Bone Morphogenetic Protein (BMP) ファミリーが卵胞発育に重要な役割を担っていることが知られており、BMP-15 や類似蛋白である Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9)の遺伝子異常はヒトを含めた種々の動物において早発卵巣不全 (POF) の原因となることが報告されている (Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Elickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews* 2004; 25 (1):72-101)。

BMP リガンドの卵巣での発現は、前述の BMP-15 や GDF-9 以外に BMP-2, -3, -3b, -4, -6, -7 が現在

までに報告されているが、主にラットおよびヒツジを用いた検討が多く、ヒト検体を用いたものは殆どない。昨年度の研究で我々はヒト卵巣における BMP-6 および BMP-7 の機能に関して報告を行った。今回、我々は、ヒト検体を用いて BMP-2 の発現およびその機能に関する検討を行った。

B. 研究方法

患者の同意のもと、検体を採取し以下の実験を行った。

実験 1) BMP-2 の卵巣における局在

子宮頸癌手術患者の卵巣切片を用いて、BMP-2 の発現を *in situ hybridization* 法にて検討した。

実験 2) BMP-2 の顆粒膜細胞における機能解析実験 (*in vitro* 実験)

体外受精の採卵時に得られたヒト顆粒膜細胞培養系にリコンビナント BMP-2 (R&D 社製 0-300 ng/ml) を添加し、卵胞発育に関与する物質の mRNA 発現変化を定量的 PCR にて検討した。

実験 3) 同培養系に hCG (10 IU/ml) を 24 時間添加し BMP-2 の発現量および BMP サイトカインの阻害作用を有する BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI) の発現を mRNA level で検討した。

C. 研究結果

実験1. BMP-2 の発現に関する検討

ヒト正常卵巣を用い、BMP-2 発現の検討を行った。BMP-2 は卵胞を構成する成分のうち、主に顆粒膜細胞に発現を認めた。BMP-2 は初期卵胞には発現が殆ど見られなかったが、三次卵胞の顆粒膜細胞にて発現を認めた。一方、黄体顆粒膜細胞での発現は見られなかった。

実験2. BMP-2 の機能に関する検討

BMP-2 が顆粒膜細胞における FSH 受容体 mRNA を誘導することを認めた。一方、卵胞の黄体化を制御する LH 受容体および StAR mRNA の発現を減少させることを認めた(図2)。

実験3. 実験1にて、BMP-2 は排卵後の黄体ではその発現が減少していることから、hCG 刺激により BMP-2 の減少が起こるかを *in vitro* の系で検討した。hCG 刺激により BMP-2 mRNA の発現は 1/10 に減少し、一方で BMP の阻害因子である BAMBI の発現は 3 倍程度上昇した。

D. 考察

卵胞の発育のために、顆粒膜細胞は FSH 受容体を獲得、維持しなくてはならない。また、生体内(*in vivo*)において卵胞はある程度その黄体化が抑制されている。もし黄体化が抑制されなければ、卵胞は早期に過熟・排卵してしまう。これまで *in vitro* の実験において FSH 自身が顆粒膜細胞での FSH 受容体を誘導するが、同時に顆粒膜細胞の黄体化も起こってしまうことが分かっている。FSH が卵胞発育に重要な因子であることは明らかであるが、*in vivo* と *in vitro* では黄体化という観点では乖離が見られていた。我々が明らかにしてきた BMP-6,-7 のヒト卵巣での作用 (J. Shi, O.Yoshino et al. *Fertil & Steril* 2009, 2010) および今回の BMP-2 の機能解析

から、BMP サイトカインは FSH 受容体を誘導しつつ、LH 受容体の発現を抑制する黄体化抑制因子としての作用を有すると考えられるため、この *in vitro* と *in vivo* の乖離を埋める物質として、BMP サイトカインが重要な役割を果たすと考える。すなわち、卵胞期において BMP サイトカインは FSH 受容体を誘導し、一方で LH 受容体の発現を抑制することで、卵胞発育を促進させつつ早期の黄体化を抑制する(図4)。ある程度 FSH 受容体が発現されると、FSH 刺激により LH 受容体も誘導されるようになり、卵胞は排卵にむけて成熟する。排卵後、卵胞は黄体になるが、この時期には積極的な黄体化が起こらなければならない。排卵時の hCG 刺激により BMP-2 の発現は減少し、また BAMBI の上昇により BMP-2 の作用は更に減少する(図3)。BMP-2 は排卵後にその作用が減弱することで、LH 受容体および StAR を誘導し、黄体化を促進することが考えられた。また、排卵することで、卵子から分泌される BMP サイトカイン (BMP-6, -15, GDF-9) は卵胞に存在しなくなり、また hCG により発現が上昇した BAMBI は卵胞に存在する BMP の作用を抑制することが予想される(図5)。排卵後に黄体化抑制因子である BMP が減少する機構は多岐にわたることが考えられる。

今回の検討で、ヒト卵巣生理において BMP はゴナドトロピンシステムを誘導しつつ、同システムが発達すると BMP システムを抑制させるという機構が備わっていることが示唆された。

E. 結論

BMP サイトカインファミリーが、卵胞発育に重要な役割を担っていることが知られてきているが、そのメカニズムはまだ不明な点が多い。今年度の検討により、BMP サイトカインの卵胞における機能に関する一端を示すことができた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

<学会発表>

第61回日本産科婦人科学会総会（京都）
子宮内膜症における接着因子 CD44 の役割

第91回米国内分泌会議（ワシントン）

BMP-6 stimulates gene expression of follicle stimulating hormone receptor, inhibin/activin b subunits and anti-mullerian hormone in human granulosa cells

<論文発表>

1: Hasegawa A, Yoshino O, Osuga Y, Kodama A, Takamura M, Nishii O, Taketani Y.
Hyaluronic acid reagent suppressed endometriotic lesion formation in a mouse model. *Fertil Steril.* (in press)

2: Kodama A, Yoshino O, Osuga Y, Harada M, Hasegawa A, Hamasaki K, Takamura M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Takemura Y, Yano T, Taketani Y. Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells. *Hum Reprod.* 2010 Mar;25(3):751-6.

3: Takamura M, Koga K, Osuga Y, Takemura Y, Hamasaki K, Hirota Y, Yoshino O, Taketani Y. Post-operative oral contraceptive use reduces the risk of ovarian endometrioma recurrence after laparoscopic excision. *Hum Reprod.* 2009 Dec;24(12):3042-8.

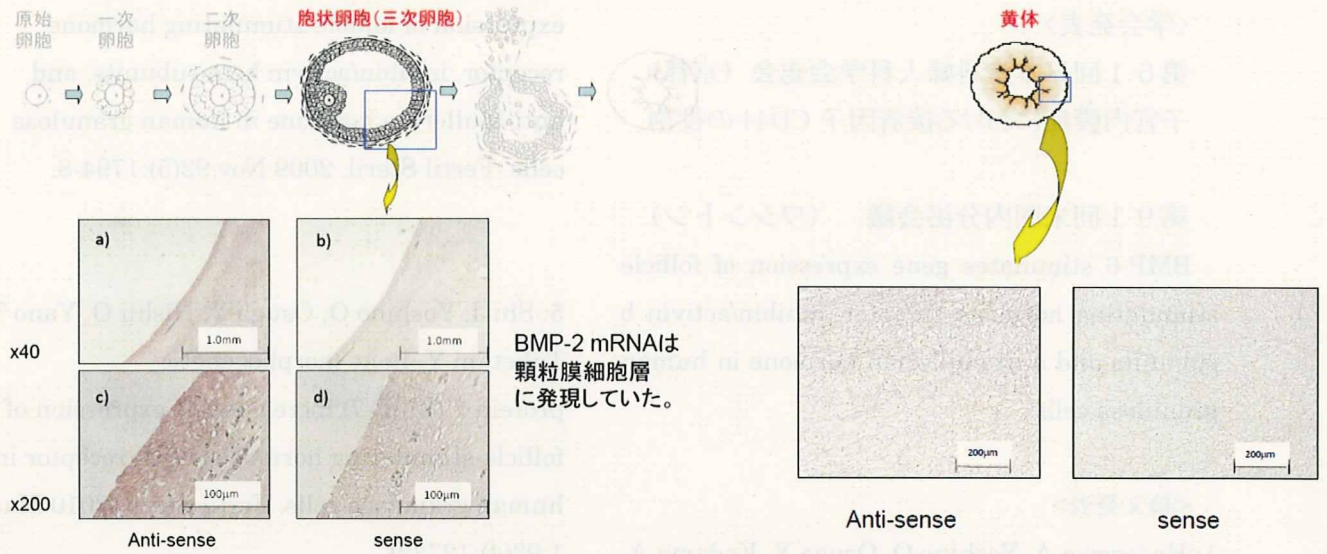
4: Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yano T, Nishii O, Taketani Y.

Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin beta subunits, and anti-Müllerian hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2009 Nov;92(5):1794-8.

5: Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Nishii O, Yano T, Taketani Y. Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2010 Mar 1;93(4):1273-9.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

図1 正常卵巣における BMP-2 (in situ hybridization 法)



ヒト正常卵巣において Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) は顆粒膜細胞に発現していたが、黄体での発現は減少していた。

図2 ヒト顆粒膜細胞における BMP-2 の FSH 受容体および LH 受容体誘導作用

(real-time PCR にて解析)

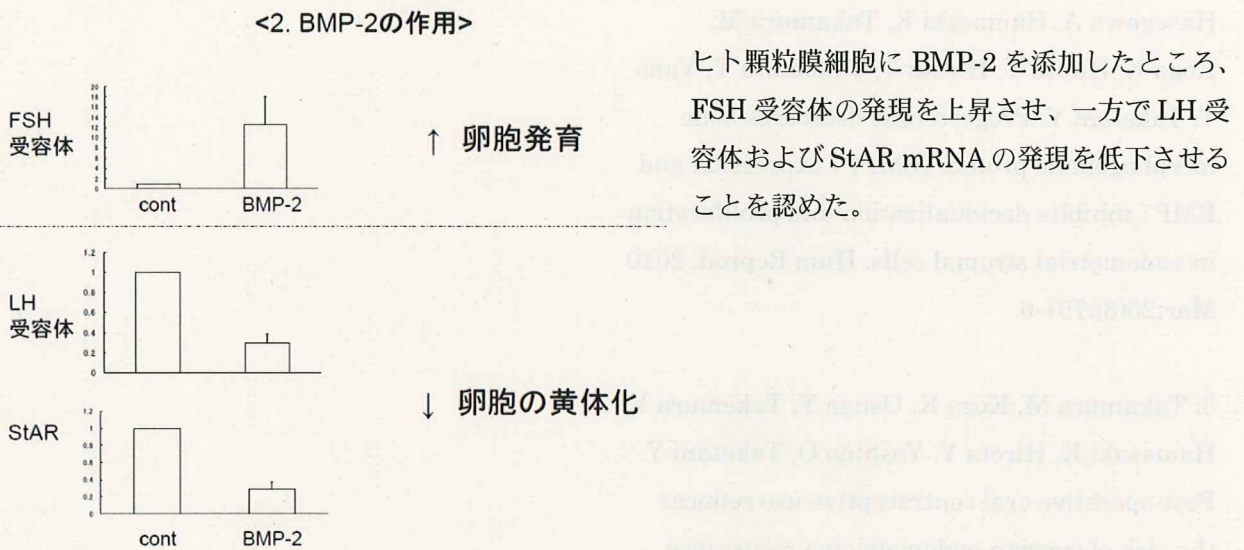


図3

ヒト顆粒膜細胞に hCG を添加し、BMP-2 および BAMBI の発現を mRNA レベルにて検討した。

体外受精患者から採取した培養ヒト顆粒膜細胞に hCG(10 IU/ml)を24時間添加し

BMP-2mRNAの発現を検討した。

BMP and activin membrane-bound inhibitor

BMPsやアクチビンの作用を阻害す

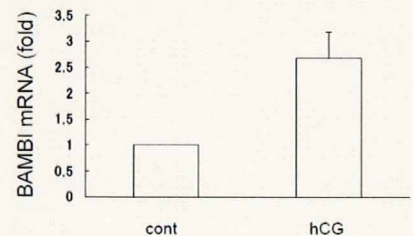
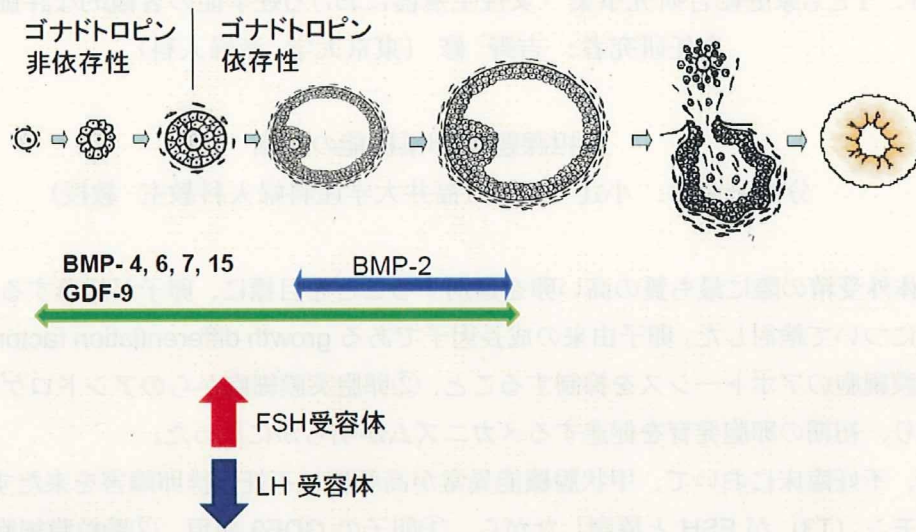
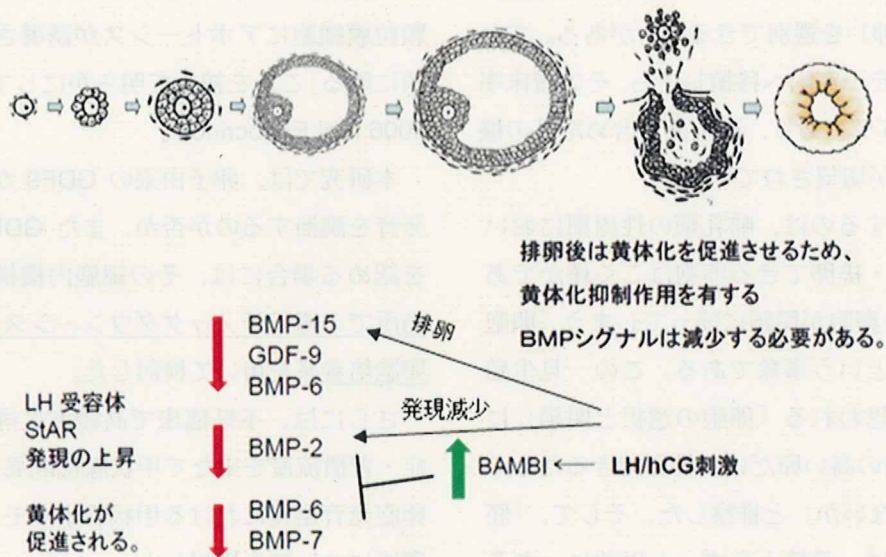


図4 卵胞発育の段階での BMP の役割



BMPsはFSH受容体を誘導することで、ゴナドトロピン非依存性からゴナドトロピン依存性へ移行させる。その際、LH受容体発現を抑制し、早期黄体化を起こさせない。

図5 排卵、黄体期の BMP の役割



課題番号: H20-子ども-若手-011

課題名: 子ども家庭総合研究事業「女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立」

主任研究者: 吉野 修 (東京大学 産婦人科)

分担課題: 卵巣機能の評価

分担研究者: 小辻 文和 (福井大学産科婦人科教室 教授)

(要約) 体外受精の際に最も質の高い卵を選別することを目標に、卵子が誘導する初期卵胞の発育メカニズムについて検討した。卵子由来の成長因子である growth differentiation factor 9 (GDF9) が、①卵胞顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制すること、②卵胞莢膜細胞からのアンドロゲン産生を促進することにより、初期の卵胞発育を促進するメカニズムが明らかになった。

さらには、不妊臨床において、甲状腺機能異常が高頻度に不妊・排卵障害を来すことに関連し、甲状腺ホルモン (T3) が FSH と協調しながら、①卵子の GDF9 発現、②顆粒膜細胞の FSH 受容体発現を、それぞれ促進することにより、初期の卵胞発育を促進するメカニズムが明らかになった。

A. 研究の背景

近年の深刻な超少子化社会において、不妊治療とくに体外受精や顕微授精などの高度生殖医療 (ART) に寄せられる期待は極めて大きい。ART における火急の課題に、「いかにして着床する可能性の高い胚 (受精卵) を選別できるか」がある。すなわち形態良好胚を子宮内へ移植しても、その着床率はわずか 10~15% であり、着床能を含めた胚の機能評価マーカーが切望されている。

筆者らが着目するのは、哺乳類の性周期において、実際に発育・排卵できる卵胞はごく僅かであり、99% 以上の卵胞が閉鎖に陥ってしまう「卵胞の選択と閉鎖」という事象である。この一見生殖細胞のロスとも思われる「卵胞の選択と閉鎖」について、「最も質の高い卵だけが排卵できるためのメカニズムではないか」と推察した。そして、「胚の質やその予後は、受精よりずっと以前に、おそらく卵胞発育中の卵の段階で既に決まっており、初期卵胞の選択・発育機構の解明が、卵そして胚の機能評価に繋がる可能性が高いのではないかと仮説している。

B. 研究の目的と方法

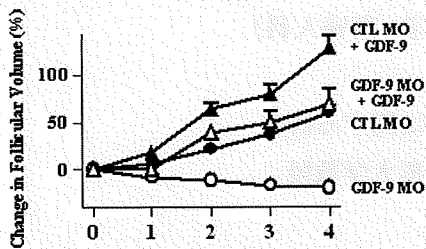
筆者らは、卵子由来の成長因子である growth differentiation factor 9 (GDF9) に注目し、「卵子局所での GDF9 遺伝子の発現を、アンチセンス・オリゴ (GDF9 MO) を用いてノックダウンすると、顆粒膜細胞にアポトーシスが誘導され、卵胞が閉鎖に陥る」ことを初めて明らかにしている (Orisaka 2006 Mol Endocrinol)。

本研究では、卵子由来の GDF9 が、初期の卵胞発育を調節するのか否か、また GDF9 による調節を認める場合には、その細胞内機構について、卵局所での遺伝子ノックダウン・システムと in vitro 卵胞培養系を用いて検討した。

さらには、不妊臨床で高頻度に排卵障害・不妊症・習慣流産を来す甲状腺機能異常症に着目し、卵胞発育過程における甲状腺ホルモンと GDF9 の関連についても検討した。

C. 研究結果

実験1. GDF9による卵胞発育の促進メカニズム



- ①GDF9はラット前胞状卵胞の発育を促進するが、GDF9 MOでGDF9発現をノックダウンすると卵胞発育は抑制された。
- ②GDF9は前胞状卵胞のアンドロゲン産生を促進するが、GDF9をノックダウンするとアンドロゲン産生は抑制された。
- ③GDF9は莢膜細胞におけるCYP17A1(アンドロゲン産生のkey enzyme)mRNA発現を促進するが、GDF9をノックダウンするとCYP17A1 mRNA発現は抑制された。
- ④GDF9誘導性の卵胞発育におけるアンドロゲンの役割を検討する目的で、卵胞培養系にアンドロゲン受容体の特異的阻害剤(フルタミド)を添加したところ、GDF9誘導性の卵胞発育は抑制された。

実験2. 甲状腺ホルモン(T3)とGDF9との関連

- ① T3は、FSHが誘導する卵胞発育を、有意に促進する。
- ② T3はFSHと協調して、GDF9 mRNA発現を促進する。
- ③ GDF9をノックダウンすると、T3とFSHが誘導する卵胞発育は抑制される。
- ④ T3はFSHと協調して、FSH受容体のmRNA発現を促進する
- ⑤ GDF9をノックダウンすると、卵胞内のFSH受容体mRNA発現は抑制されるが、この抑制はGDF9を添加するとレスキューされる。

D. 考察と結論

実験1の結果より、卵子由来のGDF-9は、①顆粒膜細胞のアポトーシスを抑制することに加えて、②莢膜細胞からのアンドロゲン産生を促進することにより、初期の卵胞発育を促進するメカニズムが初めて明らかになった。

また実験2からは、甲状腺ホルモンはFSHと協調して、①卵子のGDF9発現、および②顆粒膜細胞のFSH受容体発現を誘導することにより、初期の卵胞発育を促進するというメカニズムが初めて明らかになった。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

<論文発表>

1. Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. Orisaka M, Jiang JY, Orisaka S, **Kotsuji E**, Tsang BK. *Endocrinology*. 2009 Jun;150(6):2740-8.
2. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, **Kotsuji F**. *J Ovarian Res*. 2009 Jul 9;2(1):9.
3. Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells. Fukuda S, Orisaka M, Tajima K, Hattori K, **Kotsuji F**. *J Ovarian Res*. 2009 Nov 16;2(1):17.
4. Growth differentiation factor-9 mediates follicle-stimulating hormone-thyroid hormone interaction in the regulation of rat preantral follicular development. Kobayashi N, Orisaka M, Cao M, **Kotsuji F**, Leader A, Sakuragi N, Tsang BK. *Endocrinology*. 2009 Dec;150(12):5566-74.

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

課題番号： H20-子ども-若手-011

課題名： 子ども家庭総合研究事業「女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立」

主任研究者： 吉野 修（東京大学 産婦人科）

分担課題： 胚および卵子の評価に関する研究

分担研究者： 阿部 宏之 山形大学教授

(要約) 胚や卵子の品質は着床能に大きく影響することから、不妊治療における治療成績の向上には精度の高い生殖細胞の品質評価技術の開発が不可欠である。本研究では、非侵襲的電気化学計測技術を応用した受精卵呼吸測定装置により胚および卵子の呼吸能を解析し、妊娠が期待できる高品質胚の効率的選択法開発のための基盤構築を目的とする。電気化学計測技術と生物学的解析技術を駆使し、細胞呼吸活性を指標とする胚品質評価法の有効性と安全性を検証する。

A. 研究目的

胚や卵子の品質(クオリティー)は着床能に大きく影響することから、不妊治療の成功率向上のためには精度の高い胚品質診断法の開発が不可欠である。現在、胚の品質は形態観察による選択が一般に行われているが、形態的評価法は判定基準が客観性に欠けることから精度の面での問題が指摘されている。最近の研究より、ミトコンドリアの呼吸機能と胚の品質が相関していることが明らかにされたことから、胚の呼吸活性を指標とする新しい胚品質評価法が注目されている。昨年度までの研究によって、マウス胚及びヒト胚(余剰胚)の呼吸量を測定した結果、胚の呼吸活性はミトコンドリアの微細形態や品質と密接に関連していることが明らかになった。一方、卵子は受精卵と異なり単一の細胞であるため形態的指標による品質評価は困難である。そこで本年度は、マウスやヒトと比べて体外成熟培養技術が進んでいるウシ卵子を研究材料に用い、卵子成熟過程における呼吸量変化を解析するとともに、呼吸活性を指標とする新しい卵子クオリティー評価法の基盤構築を試みた。

B. 研究方法

屠体雌牛卵巢より卵胞吸引により未成熟卵子を回収した。卵丘細胞が付着した未成熟卵子(卵丘細胞-卵子複合体: COC)をIVMD101培地(機能性ペプチド研製: 修正TCM199培地にTGF- α 、インシュリンなどを含む)で体外培養した後、種々の実験に用いた。COC及び卵子の呼吸量は、走査型電気化学顕微鏡(SECM)を改良した「受精卵呼吸測定装置」を用いて測定した。呼吸測定装置専用開発した測定プレートに施した円錐形マイクロウエルの底部中心に試料を静置させた後、微小電極を試料近傍に移動した後、微小電極をZ軸方向に(31.0 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 、160 μm)3回走査し試料の酸素消費量(呼吸量)を測定した。測定には、「受精

卵呼吸測定液: ERAM-2」(機能性ペプチド研製)を用いた。COCの呼吸量を測定した後、卵子の呼吸量を測定するためにCOCを0.5%プロナーゼで処理し、卵丘細胞及び透明帯を完全に除去することで卵子を単離した。単離した卵子の近傍をマイクロ電極で走査し呼吸量を測定した。

細胞小器官などの超微細形態を観察するために一部のCOC及び卵子は、2.5%グルタルアルデヒドで4 $^{\circ}\text{C}$ 、1-2時間固定した。0.1Mリン酸緩衝液で洗浄後、1%オスミック酸で4 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間固定した。固定液は全て0.1Mリン酸緩衝液で使用濃度に調製した。COC及び卵子はエタノールで脱水した後、プロピレンオキシドで置換し、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片は酢酸ウラン及び硝酸鉛で染色した後、透過型電子顕微鏡(日本電子JEM-1210)で観察した。

(倫理面への配慮)

本研究では家畜など動物由来の卵子及び胚を主な研究材料として用いるため、倫理的な問題は発生しない。

C. 研究結果

(a)採取直後のCOC及び卵子の呼吸量

細胞呼吸測定装置を用いて採取直後のCOC及び卵子の呼吸量を測定した。その結果、COCの呼吸量は試料間で大きく異なることが示された(0.30-16.50 $\times 10^{-14}$ mol \cdot s $^{-1}$)。特に、呼吸量の大きいCOCから単離した卵子は比較的高い呼吸活性を示したのに対して、卵丘細胞の膨潤や剥離が認められたCOC及び卵子の呼吸量は非常に低かった(図1)。

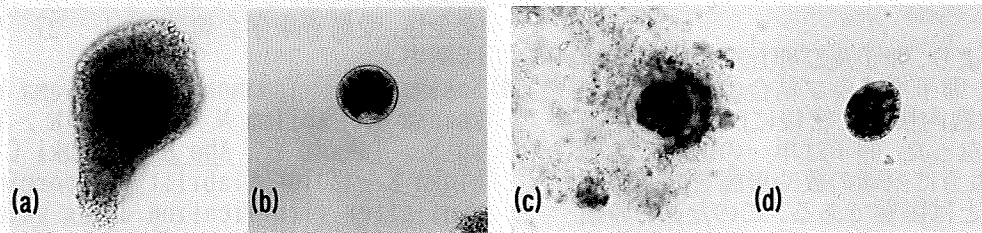
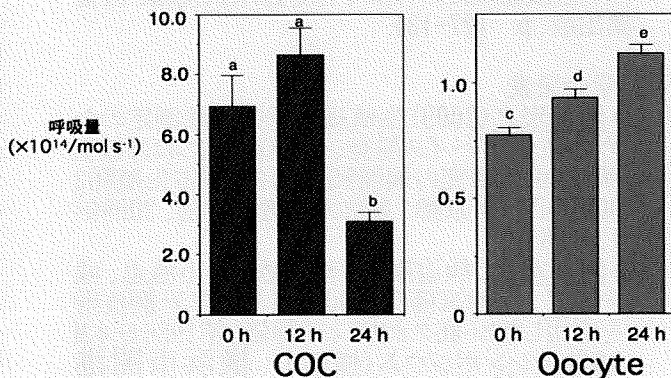


図1. ウシ卵巣から採取した直後の卵丘細胞-卵子複合体(COC)及び卵子の形態。(a, b) 卵丘細胞が密に多層付着しているCOC (a) と、それから単離した未成熟卵子 (b)。(c, d) 卵丘細胞層が膨潤し、一部細胞が剥離しているCOC (c) と、それから単離した未成熟卵子 (d)。COC及び未成熟卵子の酸素消費量 ($\times 10^{-14} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$) は、それぞれa:11.80, b:0.61, c:0.30, d:0.19であった。

(b) 体外成熟培養過程における COC 及び卵子の形態及び呼吸量変化

無血清培養液IVMD101を用いて卵子の成熟培養を行い、COC及び卵子の形態と呼吸量の変化を調べた。その結果、成熟培養によって卵丘細胞の顕著な膨潤が起こったが、卵子では顕著な形態変化は認められなかった。「受精卵呼吸測定装置」を用いて成熟培養したCOC及び卵子の呼吸量を測定した結果、COCの呼吸量は成熟培養24時間で有意に低下したが、卵子の呼吸量は成熟培養により有意に増加した (図2)。

図2. 成熟培養を行った卵丘細胞-卵子複合体 (COC) 及び卵子 (Oocyte) の酸素消費量 (呼吸量)。異符号間で有意差 ($P < 0.05$) 有り。



(c) 体外成熟培養過程における COC 及び卵子の超微細形態変化

無血清培養液IVMD101を用いて成熟培養を行ったCOC及び卵子の超微細形態を観察した。卵巣から採取した直後の未成熟卵子では、卵丘細胞の突起と卵子との間にギャップ結合が観察され、卵子表面にはミトコンドリアと表層顆粒のクラスターが多く観察された (図3a)。一方、成熟培養24時間のCOCでは卵丘細胞と卵子間のギャップ結合のほとんどは消失し、表層顆粒は卵細胞膜直下にはほぼ均等に分布していた (図3b)。また、ミトコンドリアの多くは卵表面部から核周辺部に移動し、未成熟卵子で観察されたクラスターはほとんど観察されなかった。

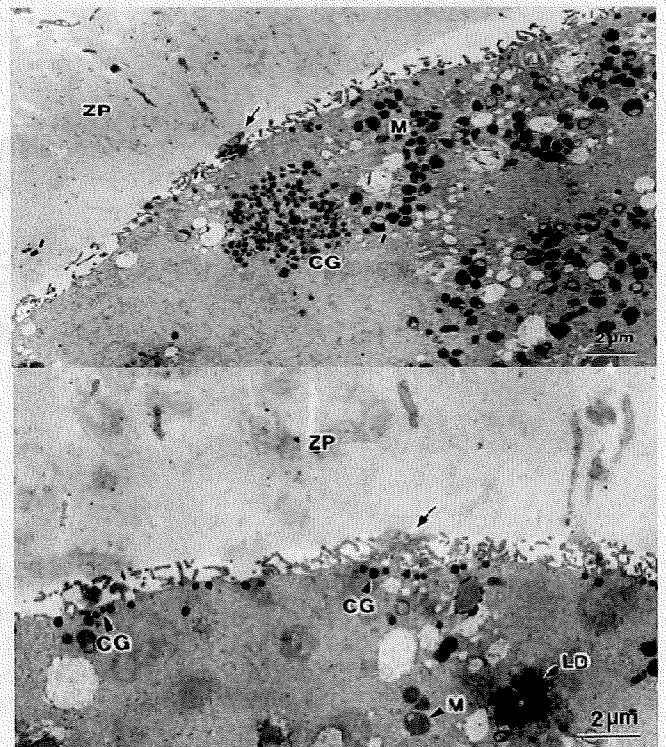


図3. ウシ卵子の超微細構造観察。(a) 卵巣から採取した直後の未成熟卵子。卵丘細胞の突起と卵子間にはギャップ結合が観察される (矢印)。(b) 成熟培養24時間を行った卵子。卵細胞膜直下には表層顆粒(CG)が分布している。COC-卵子間のギャップ結合は消失している (矢印)。LD: 脂肪滴、M: ミトコンド

リア、ZP：透明帯。

D. 考察

今回の検討により、卵子及び卵丘細胞の呼吸活性は、卵丘細胞-卵子ギャップ結合の消失やミトコンドリアの細胞内移動に密接に関連していることが明らかになった。卵子は単一の細胞であるため、受精卵のように割球の数や形態を基準に品質を評価することは困難である。このため、卵細胞質の状態（透明度や細胞内顆粒の分布状態など）や卵丘細胞の付着状態を指標に品質が評価されてきた。一般に、卵丘細胞が密にほぼ均一に付着し、卵丘細胞とのギャップ結合が正常に発達している卵子は、成熟率が高く品質良好胚へ発生する割合も高い傾向にあり、また細胞表層から核周辺部へのミトコンドリアの移動は卵成熟の重要な指標の一つとなっている。このように、細胞呼吸測定装置を用いた呼吸量測定は、卵子成熟過程におけるミトコンドリア呼吸機能の解析や卵子のクオリティー評価に極めて有効な手法になると考えられる。

今年度までの研究成果を踏まえ、「受精卵呼吸測定装置」を用いたヒト胚及び卵子の品質評価法を開発するためには、(1) 生物学的解析による呼吸計測の有効性検証、(2) 胚の培養試験等による有効性・安全性の検証、(3) 異なる培養条件で発生した胚の呼吸能解析と培養液の性能評価試験、などの課題解決が必要である。

E. 結論

今年度の研究により以下の結論に達した。

- (1) 電気化学計測技術を基盤とする「受精卵呼吸測定装置」を用いることで、単一のウシ未成熟卵子の呼吸測定に成功した。
- (2) 「受精卵呼吸測定装置」は、単一細胞（卵子）レベルでの呼吸活性を高精度でモニタできることが示された。
- (3) 呼吸活性を指標とするヒト生殖細胞品質評価システム開発のための基盤構築ができた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sugimura S., Yokoo M., Yamanaka K., Kawahara M., Wakai T., Nagai T., Abe H., Sato E. (2010) Anomalous oxygen consumption in porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cellular Reprogramming*, in press.
- (2) Kimura N., Tsunoda T., Iuchi Y., Abe H., Totsukawa K., Fujii J. (2010) Intrinsic oxidative stress causes either two-cell arrest or cell death depending on developing stages of the embryos from SOD1-deficient mice. *Molecular Human Reproduction*, in press.

- (3) 後藤香里、小池恵、熊迫陽子、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之 (2010) 電気化学的呼吸計測技術におけるヒト胚クオリティー評価と安全性、受精着床学会雑誌、Vol. 27, No. 1, 印刷中
- (4) Sakagami N., Yamamoto T., Akiyama K., Nakazawa Y., Kojima N., Nishida K., Yokomizo S., Takagi Y., Abe H., Suzuki C., Yoshioka K. (2010) Viability of porcine embryos after vitrification using water-soluble pullulanfins. *J. Reprod. Dev., in press.*
- (5) Yamashiro H., Toyomizu M., Kikusato M., Toyama N., Sugimura S., Hoshino Y., Abe H., Moisyadi S., Sato E. (2010) Lactate and adenosine triphosphate in extender enhance the cryosurvival of rat epididymal sperm. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 49:160-166.
- (6) Kyono K., Nakajo Y., Nishinaka C., Hattori H., Kyoya T., Ishikawa T., Abe H., Arai Y. (2009) A birth from the transfer of a single vitrified-warmed blastocyst using ICSI with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient. *Fertil. Steril.*, 91: e7-e11.
- (7) Shiku H., Yamakawa T., Nashimoto Y., Takahashi Y., Torisawa Y., Yasukawa T., Ito-Sasaki T., Yokoo M., Abe H., Kambara H., Matsue T. (2009) A microfluidic dual capillary probe to collect messenger RNA from adherent cells and spheroids. *Anal. Biochem.*, 385: 138-142.
- (8) Murakawa H., Aono N., Tanaka T., Kikuchi H., Yoshida H., Yoshida H., Yokoo M., Abe H. (2009) Morphological evaluation and measurement of the respiration activity of cumulus-oocyte complexes to assess oocyte quality. *J. Mamm. Ova Res.*, 26: 32-41.
- (9) 阿部宏之 (2010) 胚の機能検定法、カラーアトラス不妊治療のための卵子学、鈴木秋悦編、医歯薬出版、p. 127-131.

2. 学会発表

- (1) 阿部宏之 (2009) 生殖細胞呼吸活性測定のための新規デバイス開発、宇宙環境における生殖・継世代研究の展開WG談話会(宇宙生殖WG2009年会)(東京都、東京大学教養学部、2009年12月26日)
- (2) 阿部宏之、熊迫陽子、後藤香里、小池恵、城戸京子、宇津宮隆史(2009) 電気化学計測技術を応用したヒト胚クオリティー評価、第19回日本MRS学術シンポジウム(横浜市、横浜市開港記念会館、2009年12月7-9日)
- (3) 高野真一郎、伊達安基、伊藤-佐々木隆広、横尾正樹、伊野浩介、珠玖仁、阿部宏之、末永智一(2009) マウス胚呼吸活性評価のための電気化学マイクロデバイスの開発、第19回日本MRS学術シンポジウム(横浜市、横浜市開港記

念会館、2009年12月7-9日)

- (4) 後藤香里、熊迫陽子、小池恵、城戸京子、佐藤晶子、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之(2009)選択的単一胚移植(eSET)において移植胚選別困難例に対する呼吸量測定の有用性、第54回日本生殖医学会総会・学術講演会(金沢市、石川県立音楽堂・ANAクラウンプラザホテル金沢、2009年11月22-23日)
- (5) Utsunomita T., Kumasako Y., Goto K., Koike M., Araki Y., Abe H. (2009) Clinical efficacy of a novel evaluation method with measurement of embryo respiration activity using a scanning electrochemical microscopy. The 65th Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine (Atlanta, USA, October 17-21, 2009)
- (6) Tanaka T., Aono N., Yokoo M., Abe H., Yoshida H. (2009) Effect of vitrification on metabolism of human embryo. The 65th Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine (Atlanta, USA, October 17-21, 2009)
- (7) 阿部宏之、横尾正樹、熊迫陽子、後藤香里、小池恵、宇津宮隆史(2009)電気化学計測技術を応用したヒト胚クオリティー評価、第47回日本生殖医学会東北支部総会学術講演会(山形市、山形大学医学部・山形医学交流会館、2009年10月10日)
- (8) 阿部宏之、齋藤剛史、横尾正樹、珠玖仁、末永智一(2009)超高感度細胞呼吸計測技術を応用した単一卵子呼吸能解析、第80回日本動物学会(静岡市、静岡コンベンションアーツセンターグランシップ、2009年9月17-20日)
- (9) 阿部宏之(2009)電気化学計測技術を応用した受精卵品質評価システムの開発と医療応用、産学連携交流会(山形市、山形国際ホテル、2009年9月17日)
- (10) 田中俊幸、青野展也、岩佐由紀、加茂野倫子、菊地裕幸、鈴木麻美、村川晴生、吉田英宗、横尾正樹、阿部宏之、吉田仁秋(2009)呼吸量測定による凍結・融解胚のQuality評価、第12回日本IVF学会(仙台市、仙台江陽グランドホテル、2009年9月12-13日)
- (11) 阿部宏之(2009)電気化学計測技術を応用した受精卵品質評価システムの開発と医療応用、山形大学工学部100周年記念フォーラム(米沢市、伝国の杜、2009年9月4日)
- (12) 熊迫陽子、後藤香里、小池恵、城戸京子、佐藤晶子、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之(2009)走査型電気化学顕微鏡を用いた胚品質評価の選択的単一胚移植(eSET)への臨床的有用性、第27回日本受精着床学会総会・学術講演会(京都市、国立京都国際会館、2009年8月6-7日)
- (13) 阿部宏之(2009)呼吸活性から見た胚の選別、第27回日本受精着床学会総会・学術講演会(京都市、国立京都国際会館、2009年8月6-7日)
- (14) 田中俊幸、青野展也、岩佐由紀、加茂野倫子、菊地裕幸、鈴木麻美、村川晴生、吉田英宗、横尾正樹、阿部宏之、吉田仁秋(2009)多前核胚の呼吸能解析、第27回日本受精着床学会総会・学術講演会(京都市、国立京都国際会館、2009年8月6-7日)
- (15) 横尾正樹、伊藤-佐々木隆広、珠玖仁、末永智一、阿部宏之(2009)呼吸活性を指標とした胚の品質評価:マウス胚着床試験の成績と産子の正常性について、第27回日本受精着床学会総会・学術講演会(京都市、国立京都国際会館、2009年8月6-7日)
- (16) 阿部宏之(2009)ヒト胚を用いた走査型電気化学顕微鏡(SECM)による呼吸測定の臨床的有用性、第6回A-PART日本支部・第3回Minimal Stimulation研究会合同学術講演会(東京都、都市センターホテル、2009年5月30-31日)
- (17) 阿部宏之(2009)超高感度細胞呼吸測定装置の開発と医療応用、第7回ミキシングコンファレンス in 米沢(米沢市、伝国の杜、2009年5月29日)
- (18) Kasai S., Numata T., Shiku H., Abe H., Matsue T., Niizeki Y. (2009) Real-time monitoring of oxygen consumption during differentiation of human monocyte cell lines (THP-1) by scanning electrochemical microscopy. 215th The Electrochemical Society Meeting (San Francisco, USA, May 24-29, 2009)
- (19) 阿部宏之、珠玖仁、青柳重夫、宇津宮隆史、末永智一、星宏良(2009)電気化学計測技術を応用した超高感度細胞呼吸計測装置の開発と医療応用、日本組織培養学会第82回大会(栃木県下都賀郡、獨協医科大学、2009年5月18-19日)
- (20) 熊迫陽子、後藤香里、小池恵、城戸京子、佐藤晶子、宇津宮隆史、荒木康久、横尾正樹、阿部宏之(2009)走査型電気化学顕微鏡を用いた胚品質評価の選択的単一胚移植(eSET)への臨床的有用性、第50回日本哺乳動物卵子学会(東京都、都市センターホテル、2009年5月8-9日)
- (21) 横尾正樹、木村直子、珠玖仁、末永智一、阿部宏之(2009)母体の加齢が卵子のミトコンドリア機能に及ぼす影響、第50回日本哺乳動物卵子学会(東京都、都市センターホテル、2009年5月8-9日)
- (22) 角田智志、木村直子、阿部宏之、戸津川清、藤井順逸(2009)SOD1欠損マウス胚では内因性酸化ストレスがミトコンドリア機能障害を伴わない2細胞期発生停止を引き起こす、第50回日本哺乳動物卵子学会(東京都、都市センターホテル、2009年5月8-9日)
- (23) Abe H., Yamashita S., Hoshi H. (2009) Respiratory activity and ultrastructural features of bovine embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. 15th World Congress on In Vitro Fertilization, Geneva, Switzerland, April 19-22, 2009.

(24) Utsunomiya T., Kumasako Y., Goto K., Koike M., Yokoo M., Abe H. (2009) Clinical efficacy of a novel evaluation method with measurement of embryo respiration activity using a scanning electrochemical microscopy. 15th World Congress on In Vitro Fertilization, Geneva,

Switzerland, April 19-22, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）

課題番号: H20-子ども-若手-011

課題名: 子ども家庭総合研究事業「女性生殖器における妊孕能の客観的な評価法の確立」

主任研究者: 吉野 修 (東京大学 産婦人科)

分担課題: 子宮内膜・胚の評価

分担研究者: 浜谷 敏生 (慶應義塾大学医学部 産婦人科 専任講師)

(要約)今日の生殖医療において、良好な胚を胚移植しているにもかかわらず反復着床不全となる例に対する治療法の開発は急務である。まず我々は、子宮内腔着床環境の評価法開発を目指した。子宮内腔洗浄液中に存在する matrix metalloproteinase (MMP)、CD9、HB-EGF などの内膜由来の液性因子に注目し、それらの分泌量(活性)と妊娠(着床)率との相関を検討することにより、着床因子のバイオマーカーとしての有用性を探索する。まず、MMP について検討し、MMP のコントロールには抗生剤とプレドニゾロンによる内服療法が奏功を示し、それが妊娠率の改善に導くことが明らかとなった。さらに、ヒト子宮内腔洗浄液中の CD9 濃度と妊娠率との関係について検討を加えるため、まずはマウスにおける基礎的検討を進めた。その結果、マウスでは CD9 が子宮内腔に分泌されていること、子宮内腔の CD9 濃度が低いと卵管に達する精子数が減少することが明らかとなった。一方、胚性着床因子として着床前期・周辺期に特異的に発現する *Hmgpi* に注目した。

A. 研究目的

着床に影響を与える内膜由来因子の検索を目的として、これまでに多数の研究者が着床期特異的に子宮内膜に発現する分子の発見を報告している。しかし、子宮内腔に存在する液性因子を検討した報告は非常に少ない。そこで、着床に向けた子宮内腔環境を評価するために、我々は子宮内腔洗浄液中に含まれる子宮内膜由来の液性因子の有用性に注目した。Inagaki らは、16 例の反復着床不全例に対し、子宮内腔洗浄液中の MMPs 活性が高いことを報告している(Inagaki N et al, Hum Reprod 2003;18(3):608-615)。そこで、まず MMPs(MMP2 および MMP9)活性と妊娠率について、症例数を増やして検討を加えた。次に、CD9 について、それらの分泌量と妊娠率について検討を進める。

一方、胚性着床因子についても検討を加える。マウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング・データの *in silico* 解析から着床前期特異的遺伝子を抽出し、胚の質的診断に有用なバイオマーカーを

探索する。

B. 研究方法

(1) MMP

平成 16 年 1 月から平成 20 年 6 月までの 5 年間で、体外受精あるいは顕微受精とそれに続く胚移植を行い、形態良好胚(採卵後培養 3 日目に 6 細胞以上に分割しており Veeck 分類で G1~G2、あるいは 5 日目に Gardner 分類 3BB 以上)を 2 回以上移植しても妊娠に至らなかった症例で、子宮内腔環境を評価するため子宮内腔洗浄液を採取した症例は 642 例であった。そのうち、他院から子宮内腔環境検査目的で来院され、その後の妊娠予後が不明である症例、子宮内腔環境検査後に胚移植を未施行あるいは 1 回しか施行していない症例を除外した 549 例を対象とした。本研究では、凍結保存していた子宮内腔洗浄液を分析するとともに、その後の胚移植(2 回以上)における妊娠率を検討した。

子宮内腔洗浄液の採取に際しては、非刺激周期の黄体中期に、腔内消毒後子宮頸部より 10Fr 吸