

201018028A

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金
(成育疾患克服等次世代基盤研究事業)

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. 卵巣予備能の客観的評価に関する基礎的研究	7
吉野 修	
2. 卵巣予備能の客観的評価に関する基礎的研究	11
小辻 文和	
3. 胚・卵子の客観的評価に関する研究	13
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	25
堀 正明	
6. 子宮内膜評価(腹腔内癒着に関する解析)	30
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	37
大須賀 穰	
III. 主な研究成果の刊行に関する一覧表	41

I. 総括研究報告書

課題番号: H20-子ども-若手-011

課題名: 成育疾患克服等次世代基盤研究事業「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行ってきた。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、臨床データを蓄積することができた。

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. 研究方法及び C. 研究結果(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。卵巣から分泌される因子を測定することが卵巣の機能評価に繋がることから、卵巣に存在するサイトカインのうち、特に anti mullerian hormone (AMH)の血中濃度がよい指標になることが示唆された。

(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): 胚や卵子の品質は胚移植による妊娠率に大きく影響す

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、電気化学計測技術を応用した非侵襲的呼吸測定装置により胚および卵子の呼吸能を解析し、呼吸活性を指標に妊娠が期待できる高品質胚の効率的選択法の開発を目的とする。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とともに、ヒト胚（余剰胚）や卵子を用いた探索的臨床研究を実施した。

3) 子宮内膜評価：

1. 子宮内腔洗浄液の検討（浜谷担当分）

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して、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、子宮内腔洗浄液に MMP が強陽性の場合には抗生剤とプレドニゾロンによる内服療法による MMP のコントロールが奏功を示し、それが妊娠率の改善に導くことが明らかとなった。次に、子宮内腔内の CD9 濃度と妊娠率との関係について検討を加えた。まず、マウスにおける基礎的検討を進めた結果、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。さらに、ヒト子宮内腔洗浄液中の CD9 濃度をウェスタンブロット解析し、その後の妊娠予後を検討したところ、CD9 濃度は低い方が妊娠に有利であることが示唆された。

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）骨盤内癒着の存在は不妊の原因となりうる。また腹腔鏡手術を行う際にも手術操作を困難にする要因となる。したがって非侵襲的な骨盤内癒着の評価は不妊原因の診断および手術計画の面で有意義である。我々は CINE MRI による骨盤内癒着の評価について検討を行った。FIESTA 法による CINE MRI 撮影を行い、卵巣周囲およびダグラス窩周囲の癒着の評価を行った。卵巣周囲癒着に関しては感度 80%、特異度 85% で癒着の有無を評価することが可能であった。一方、ダグラス窩周囲癒着に関しては感度 80%、特異度 93% で癒着の有無を診断することができた。CINE MRI は非侵襲的で撮影時間の延長があるものの患者に与える負担は軽微であり、骨盤内癒着を客観的に評価できる有用な検査であることがわかった。

4. 着床機転に関与する因子の基礎的研究（大須賀担当分）

C. 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行った。本年度は、臨床データを蓄積することができ、特に子宮内膜に関する検討では論文発表を行うことができた。

D. 結論

3箇年計画の3年目を終えるにあたり、これまで得

られた知見を論文および学会発表を行うことができた。

健康危険情報 なし

E. 研究発表(各分担報告書に記載)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願)

(1) ウェルユニット及び電気化学的分析法(青柳

重夫、内海陽介、末永智一、珠玖仁、阿部宏之、河野浩之、柏崎寿宣、星 宏良、星 翼)2010年9月17日、特願2010-208817号。

II. 分担研究報告書

課題番号: H20-子ども-若手-011

課題名: 成育疾患克服等次世代基盤研究事業「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。

卵巣から分泌される因子を測定することが卵巣の機能評価に繋がることから、卵巣に存在するサイトカインのうち、特に anti mullerian hormone (AMH)の血中濃度がよい指標になることが示唆された。

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。本研究を通して、我々はヒト卵巣における BMP-2, 6, 7 の発現が良好な卵胞発育に重要であることを示してきた。本年度は臨床応用を目指して、これら BMP を含めた卵巣に存在するサイトカインの不妊症患者血清中を検討を行った。

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) 不妊症患者血清中の BMP-2, 6, 7 15 および anti mullerian hormone (AMH) 濃度に関する検討

BMP-2, 6, 7 15 および AMH は卵巣に存在する TGF- β スーパーファミリーサイトカインである。不妊症患者血清中 (25 名) におけるこれらサイトカイン濃度に関して ELISA (BMP-2, 6, 7), EIA (AMH) およびウェスタンブロッティング法 (BMP-15)を用いて検討を行った。

実験 2) ヒト培養顆粒膜細胞同培養系における AMH mRNA の発現調節因子に関する検討
体外受精時に得られるヒト卵巣顆粒膜細胞を培養し、同培養系に BMP-2, 6, 7 15, アクチビン-A, GDF-9 を 24 時間添加し、AMH mRNA 発現を定量的 PCR にて検討を行った。

C. 研究結果

実験1. 不妊症患者血清中の BMP-2, 6, 7, 15 および AMH 濃度に関する検討

表1に結果を示す。BMP-2, -6, -7のELISAキットの感度はそれぞれ10 pg/ml, 80 pg/ml, 10 pg/mlであるが血清25検体中、陽性症例数はそれぞれ8, 3, 12例であった。一方でAMHの感度は2 pmol/lであるが、陽性症例は24例であった。BMP-15はウェスタンブロット法にて検討を行ったが、血清中BMP-15は感度以下であった。

実験2. ヒト培養顆粒膜細胞同培養系におけるAMH mRNAの発現調節因子に関する検討

ヒト顆粒膜細胞におけるAMH mRNAを誘導する因子を検討したところ、BMP-2, -6, -7, -15の順でAMH mRNA発現を誘導した。アクチビン-AおよびGDF-9はAMH mRNA誘導作用を有していなかった。

D. 考察

これまで、我々は卵巣に存在するTGF- β スーパーファミリーサイトカインに属するBMP-2, 6, 7がヒト卵巣機能に重要な作用を示すことを示してきた。(J. Shi, O. Yoshino et al. *Fertil & Steril* 2009, 2010, *Am J Reprod Immunol* 2011) また、BMP-6がTGF- β スーパーファミリーサイトカインに属するAMHを誘導することも示してきた(J. Shi, O. Yoshino et al. *Fertil & Steril* 2010)。これまで実地臨床で多く用いられている卵巣機能評価法として、脳下垂体から分泌されるFSHの血中濃度を測定しているが、同物質は卵巣から直接分泌される因子でないため、正確に卵巣機能进行评估できないことが知られている。今回、BMPサイトカインおよびAMHの血清中濃度について不妊症患者を対象に測定した。BMP-2, 6, 7, 15は血清中での陽性率は症例の半分以下であった。一方でAMHは不妊症症例の殆どで測定が可能であった。

これまで、AMHが何によって制御されている

か殆ど知られていない。そこで卵巣に存在するBMPサイトカイン、アクチビン-A, GDF-9によりヒト顆粒膜細胞刺激を行ったところ、BMP-2, 6, 7, 15は有意にAMHを誘導することが分かった。一方でアクチビンAやGDF-9はAMH誘導作用を有していなかった。

AMHは女性において顆粒膜細胞にのみ発現することから、卵巣機能の正確な評価法に成り得ると考えられる。また、今回の検討で、AMHはBMPサイトカイン下流に存在することが明らかとなった。これまで我々は卵巣に存在する複数のBMPサイトカインそれぞれが卵巣機能に重要な作用を示すことを発表してきたが、BMPサイトカインは局所因子であり、血清中での評価には適さないことが判明した。しかし、BMPサイトカインの下流にAMHが存在することから、血中AMHを測定することで、複数のBMPサイトカインの総合的な影響を評価することができることが判明した。今後は、卵巣機能評価には主にAMHを測定することが重要であると思われる。

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、実地臨床において卵巣機能評価法としては、BMPサイトカインの下流に位置するAMHの血中濃度を測定することが妥当だと思われる。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

<論文>

1: Yoshino O, Hori M, Osuga Y, Hayashi T, Sadoshima Y, Tsuchiya H, Nishii O, Taketani Y. Myomectomy reduces endometrial T2 relaxation times. *Fertil Steril.* 2011 Feb 10.

- 2: Wang B, Koga K, Osuga Y, Hirata T, Saito A, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Takemura Y, Fujii T, Taketani Y. High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Levels in the Placenta and in Serum in Preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2011 Jan 18.
- 3: Harada M, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Takemura Y, Hirata T, Yoshino O, Koga K, Yano T, Taketani Y. Dienogest, a new conservative strategy for extragenital endometriosis: a pilot study. *Gynecol Endocrinol.* 2010 Dec 15.
- 4: Hirata T, Osuga Y, Takamura M, Kodama A, Hirota Y, Koga K, Yoshino O, Harada M, Takemura Y, Yano T, Taketani Y. Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL 20 secreted from IL-1 beta-, TNF-alpha-, and IL-17A-stimulated endometriotic stromal cells. *Endocrinology.* 2010 Nov;151(11):5468-76.
- 5: Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Nose E, Nishii O, Yano T, Taketani Y. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) increases gene expression of FSH receptor and aromatase and decreases gene expression of LH receptor and StAR in human granulosa cells. *Am J Reprod Immunol.* 2011 Apr;65(4):421-7.
- 6: Yoshino O, Hayashi T, Osuga Y, Orisaka M, Asada H, Okuda S, Hori M, Furuya M, Onuki H, Sadoshima Y, Hiroi H, Fujiwara T, Kotsuji F, Yoshimura Y, Nishii O, Taketani Y. Decreased pregnancy rate is linked to abnormal uterine peristalsis caused by intramural fibroids. *Hum Reprod.* 2010 Oct;25(10):2475-9.
- 7: Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Taketani Y. Lymphocytes in endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2011 Jan;65(1):1-10.
- 8: 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.* 2010 May 15;93(8):2757-9.
- 9: 吉野 修、大須賀 稜
 卵胞発育と血管新生
 ホルモンフロンティア、メディカルレヴィー社編、
 2010 VOL. 17, No. 3:227-235.
- <学会発表>
 第6 2回日本産科婦人科学会総会（東京）
吉野 修、大須賀稜、矢野 哲、西井 修、武谷雄二
 ヒト卵巣における bone morphogenetic protein 2 (BMP2) の役割に関する検討
- 第6 2回日本産科婦人科学会総会（東京）
 児玉亜子、大須賀稜、吉野 修、泉玄太郎、高村将司、長谷川亜希子、竹村由里、平田哲也、甲賀かをり、矢野 哲、武谷雄二
 TGF β は子宮内膜症細胞において PAR 2 の発現ならびに機能を増強する（高得点演題）
- 第6 2回日本産科婦人科学会総会（東京）
 高村将司、甲賀かをり、泉玄太郎、児玉亜子、田島敏樹、長谷川亜希子、竹村由里、原田美由紀、吉野 修、大須賀稜、武谷雄二

腹腔鏡下子宮内膜症性卵巣嚢胞摘出術後の再発
率低下に低用量ピル (OC) は有益である

第 55 回日本生殖医学会総会 (徳島)

吉野 修、大須賀 稔、折坂 誠、浅田 弘法、
古谷 正敬、大貫 裕子、廣井 久彦、
藤原 敏博、小辻 文和、吉村 泰典、西井 修、
武谷 雄二

子宮筋腫により誘導される子宮内膜の異常蠕動は
妊娠率を低下させる。

第 32 回 エンドメトリオーシス学会 (東京)

吉野 修、泉玄太郎、施佳、大須賀稔、浦田陽子、
高村将司、甲賀かをり、西井 修、武谷雄二
子宮内膜症におけるアクチビンAの発現調節
と機能に関する検討

第 9 2 回米国内分泌会議 (サンディエゴ)、
Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)
increases gene expression of FSH
receptor and aromatase and decreases gene
expression of LH receptor and StAR in
human granulosa cells.

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: 成育疾患克服等次世代基盤研究事業「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

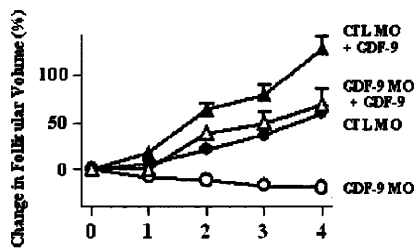
筆者らは、卵子由来の成長因子である growth differentiation factor 9 (GDF9) に注目し、「卵子局所での GDF9 遺伝子の発現を、アンチセンス・オリゴ (GDF9 MO) を用いてノックダウンすると、顆粒膜細胞にアポトーシスが誘導され、卵胞が閉鎖に陥る」ことを初めて明らかにしている (Orisaka 2006 Mol Endocrinol)。

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: 成育疾患克服等次世代基盤研究事業「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) 胚や卵子の品質は胚移植による妊娠率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、電気化学計測技術を応用した非侵襲的呼吸測定装置により胚および卵子の呼吸能を解析し、呼吸活性を指標に妊娠が期待できる高品質胚の効率的選択法を開発を目的とする。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とともに、ヒト胚(余剰胚)や卵子を用いた探索的臨床研究を実施した。

A. 研究目的

胚や卵子の品質(クオリティ)は胚移植後の妊娠率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リンク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。さらに、受精卵と異なり形態的指標による品質評価が困難である卵子の品質評価法の構築を試みるためにウシ卵子の呼吸能解析を行った。本年度は、ヒト卵子の呼吸能を指標とする品質評価システムの構築を目的に、卵子成熟における呼吸量変化の解析を試みた。

B. 研究方法

(a) 材料

不妊治療の終了により余剰となり、学術研究への使用に対して患者の同意が得られた卵子及び卵丘細胞-卵子複合体(Cumulus-oocyte complex: COC)を呼吸量測定に供した。

(b) 呼吸量測定

COCの呼吸量は、走査型電気化学顕微鏡(SECM)をベースに開発した「受精卵呼吸測定装置」を用いて測定した。個々のCOCを測定専用プレートのマイクロウェル底部中心に静置した後、酸素の還元電位を検出する微小電極を透明帯近傍に移動した。本測定に用いたマイクロ電極は、計測感度を上げるために先端径2~5 μm にエッチ

ングした白金電極をガラスキャピラリーに封止したディスク型電極を使用した。マイクロ電極は、酸素が還元可能な -0.6V vs. Ag/AgCl に保持し、鉛直方向に移動速度 $31 \mu\text{m}/\text{sec}$ 、走査距離 $160 \mu\text{m}$ の条件で試料近傍を走査し酸素還元電流を測定した。胚の酸素消費量は、球面拡散理論式に基づいた専用の解析ソフトを用いて算出した。

(c) 微細構造解析

各グレードのCOCにおいてミトコンドリアを中心とする細胞小器官の微細構造を電子顕微鏡により観察した。呼吸測定したCOCの一部をグルタルアルデヒドおよびオスミック酸で固定した後、定法に従いエポキシ樹脂に包埋し超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡で微細構造観察を行った。

(d) 卵子の成熟培養

各グレードのCOCを成熟培養し、卵子の成熟能にグレード間の違いがあるのか検討した。COCをTCM199培地に10%患者血清(Patient's serum)、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(Human chorionic gonadotropin: HCG) 100 IU/ml、卵胞刺激ホルモン(Follicle stimulating hormone: FSH) 75 IU/mlを加えた培養液を用いて 37°C 、5% CO_2 in airの条件で26時間、成熟培養を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では不妊治療が終了した患者の同意(インフォームド・コンセント)が得られた卵子及び卵子-卵丘細胞複合体を用いた。卵子は短期間の培養に限定し、実験終了後は速やかに所定の方法で廃棄する。体外受精及び顕微授精により生じた余剰胚は着床以前の胚盤胞(受精後4-5日)までに限定することで日本産婦人科学会及び日本不妊学会で定めている生殖医療技術ガイドラインには抵触しない。

C. 研究結果

(a) 卵丘細胞-卵子複合体の呼吸量

不妊治療において採取されたCOCを卵丘細胞層と卵子の形態的特徴を基準に次の5つのグレードに分類した(図1)。卵丘細胞が4層以上に密に付着しているCOCをグレード1、卵丘細胞が1~3層付着しているCOCをグレード2、卵丘細胞に覆われる領域が1/2以下のCOCをグレード3のカテゴリーに分類した。一方、卵丘細胞が全く付着していない完全裸化卵子をグレード4、卵丘細胞が少数付着し卵子が変形しているものをグレード5のカテゴリーとした。

各グレードのCOCの酸素消費量を「受精卵呼吸測定装置」を用いて測定した結果、卵丘細胞が最も多く付着しているグレード1の平均酸素消費量($\times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)は7.79と最大を示した(表1)。一方、グレード2およびグレード3の酸素消費量は、それぞれ1.46および1.26と卵丘細胞の減少に伴い酸素消費量が低下し、グレード4とグレード5ではさらに少ない酸素消費量が計測された。このように、COCの呼吸活性は卵子の付着している卵丘細胞の数に大きく影響することが示された。

(b) 卵丘細胞-卵子複合体の超微細形態

グレード1のCOCでは、卵丘細胞において拡張したクリステをもつミトコンドリアが多数存在し、卵丘細胞と卵子の間には典型的なギャップ結合が数多く観察された(図2 a, b)。卵子には、円形で小型のミトコンドリアが多数存在し、それらの多くはクラスターを形成し細胞質にほぼ均一に分布していた(図2 c)。一方、グレード2およびグレード3のCOCでは、卵丘細胞内のミトコンドリアはグレード1のCOCと比べて小型で数も少なく、また、多くのミトコンドリアはクリステが未発達であった(図2 d, e)。グレード1で観察された卵丘細胞と卵子とのギャップ結合は、グレード2およびグレード3のCOCではほとんど認められなかった。卵子のミトコンドリアについては、数や形態、分布様式などグレード間での顕著な違いは認められなかった。

(c) 卵丘細胞-卵子複合体の形態と卵子成熟率の関係

ヒトのCOCは、卵丘細胞の付着状態を基準に分類したグレードによって、呼吸量やミトコンドリアの微細形態が顕著に異なることが明らかとなった。ミトコンドリアやギャップ結合は卵子の成長や成熟に重要な役割を果たしていると考えられることから、本研究では各グレードのCOCを成熟培養し、卵子の成熟能にグレード間の違いがあるのか検討した。その結果、卵子成熟率はグレード1で70.0%、グレード2で63.3%、グレード3で20.0%、グレード4で33.3%、グレード5で0%でありグレード間に卵子成熟率の違いが認

められた(図3)。

D. 考察

卵子は単一細胞であるため、胚のように割球数やその形態を基準にクオリティーを評価することは困難である。しかしながら、卵子のクオリティーを卵丘細胞の状態から評価しようとする試みが行われてきた。例えば、採卵時に回収された顆粒膜細胞のアポトーシス小体の出現率が低い卵胞から得られた卵ほどクオリティーが良好であるという報告がある。また筆者らは、IVM-IVF (in vitro maturation and in vitro fertilization) 施行時に、COCにおいて卵子面積(oocyte-area)、卵子円形率(oocyte-circularity)、卵丘細胞の多層形成(cumulus-layer)、卵丘細胞-卵子面積比(C-ratio)などを画像解析ソフト(NIH Image)により解析し、これら計測値を指標にCOCの段階で卵子成熟能の予測が可能かどうか検討してきた。これまでに、成熟培養26時間前後においてC-ratioが大きい、即ち卵丘細胞が多く付着しているCOCは高い卵子成熟率を示すことが明らかになっている。このように、卵丘/顆粒膜細胞のクオリティー評価は卵子のクオリティー評価にも有効であることが示唆されている。

本研究では、「受精卵呼吸測定装置」を用いて初めて単一ヒトCOCの呼吸量測定に成功するとともに、COCの呼吸量活性と卵子成熟能の関係を示唆する結果が得られた。卵丘細胞の数及びその付着状態とCOCの呼吸活性及び卵子成熟率の関係を調べた結果、卵子成熟率と呼吸量は付着している卵丘細胞の数にほぼ比例すること、卵子成熟率と呼吸活性が両方とも最も高いグレード1では卵子と卵丘細胞間のギャップ結合の発達が非常に顕著であり、他のグレードのCOCと比べて卵丘細胞内のミトコンドリアも良く発達していることが明らかになった。これらの結果から、卵丘細胞の呼吸活性は卵子のクオリティーと密接に関連しており、COCの呼吸測定はこれまで困難であったCOC内の卵子のクオリティーを非侵襲的に評価できる画期的な方法となる可能性が示唆された。

E. 結論

今年度の研究により以下の結論に達した。

- (1) SECMを用いた電気化学計測技術は、ヒトCOCのミトコンドリアの呼吸機能解析に有効である。
- (2) これまで困難であったCOC内の卵子の品質を、呼吸活性を指標に評価できる可能性が示された。

本研究事業により、電気化学計測技術を応用した細胞呼吸計測技術及び「受精卵呼吸測定装置」は非侵襲・高感度測定法であることから、不妊治療において胚や卵子の品質評価での臨床応用が十分に期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kurotani R., Okumura S., Matsubara T., Yokoyama U., Buckley J.R., Tomita T., Kezuka K., Nagano T., Esposito D., Taylor T. E., Gillette W.K., Ishikawa Y., Abe H., Ward J.M., Kimura S. (2011) Secretoglobin 3A2 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by TGFbeta signaling down-regulation. *J. Biol. Chem.*, in press.
- (2) Hirobe T., Yoshihara C., Takeuchi S., Wakamatsu K., Ito S., Abe H., Kawa Y., Soma Y. (2011) A novel deletion mutation of mouse ruby-eye 2 named ru2d/Hps5ru2-d inhibits melanocyte differentiation and its impaired differentiation is rescued by L-tyrosine. *Zool. Sci.*, 28, in press.
- (3) 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*, 12 (4):463-474.
- (4) 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. *Mol. Human Reprod.*, 16:441-451.
- (5) 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, 27 (1), 53-58.
- (6) 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 pullulan films. *J. Reprod. Dev.*, 56 (2):279-284.
- (7) 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.
- (8) 阿部宏之, 吉田仁秋 (2011) 電気化学計測技術を応用したヒト卵丘細胞-卵子複合体の呼吸能解析, *産婦人科の実際*, 印刷中。
- (9) 阿部宏之 (2011) 卵子・胚のクオリティー評価, 産科と婦人科, 京都大学学術出版会, 印刷中。
- (10) 阿部宏之 (2011) 走査型電気化学顕微鏡を用いた胚の評価法, 卵子学, 診断と治療社, 印刷中。
- (11) 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.
- (12) 阿部宏之 (2010) 電気化学計測技術を応用したシングルセル呼吸機能解析と応用, シングルセル解析の最前線, 監修: 神原秀記, 松永是, 植田充美, シーエムシー出版, 103-111.
- (13) 横尾正樹, 伊藤-佐々木隆広, 珠玖 仁, 末永智一, 阿部宏之 (2010) 呼吸活性を指標とした胚の品質評価 - マウス胚移植試験の成績と産子の正常性について, *産婦人科の実際*, 59 (9):1375-1379.
- (14) 後藤香里, 小池 恵, 熊迫陽子, 宇津宮隆史, 阿部宏之 (2010) 選択的単一胚移植 (eSET) における移植胚選別困難例に対する呼吸量測定の有用性, *産婦人科の実際*, 59 (8):1277-1281.

2. 学会発表

- (1) 坂上信忠, 西田浩司, 山本禎, 秋山清, 阿部宏之, 星宏良, 鈴木千恵, 吉岡耕治 (2011) プラ体内発育胚の輸送条件の検討, 第26回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 (盛岡市, 盛岡市民文化ホール・小ホール, 2011年1月25-26日)
- (2) 角田夢人, 小川 拓, 阿部靖之, 黒谷玲子, 阿部宏之 (2011) 長期保存されたウシ卵巣におけるアポトーシス細胞の組織学的検出, 第26回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 (盛岡市, 盛岡市民文化ホール・小ホール, 2011年1月25-26日)
- (3) 海藤康平, 高倉啓, 阿部靖之, 阿部宏之 (2011) 単一卵子培養システムにより生産したウシ胚の呼吸能解析, 第26回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 (盛岡市, 盛岡市民文化ホール・小ホール, 2011年1月25-26日)
- (4) Abe H., Shiku H., Matsue T. (2010) Analysis of respiratory activity of single oocytes and embryos with a noninvasive and highly sensitive measurement using scanning electrochemical microscopy. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20, 2010)
- (5) 広部知久, 吉原千尋, 竹内栄, 阿部宏之, 若松一雅, 伊藤祥輔, 河陽子, 相馬良直 (2010) ルビーアイ2の新規突然変異遺伝子 (*ru2d/Hps5d*) はマウスのメラノサイトの分化を抑制し毛色を薄くするが, L-チロシンはその分化抑制を回復させる, 第23回日本色素細胞学会学術大会 (東京都, 東京慈恵会医科大学, 2010年11月27-28日)
- (6) 小池恵, 佐藤晶子, 城戸京子, 熊迫陽子, 宇津宮隆史, 荒木康久, 阿部宏之 (2010) 選択的単一胚移植 (e-SET) におけるday3胚の呼吸量測定の試み, 第55回日本生殖医学会総会・学術講演会 (徳島市, あわぎんホール (徳島郷土文化会館), 2010年11月11-13日)
- (7) 坂上信忠, 阿部宏之, 高木優二, 秋山清 (2010) 水溶性プルランフィルムを用いて超急速ガラ

- ス化保存したウシ体外生産胚のストロー内一段階希釈法の検討、第65回関東畜産学会大会(神奈川県海老名市、海老名市民文化会館、2010年11月5日)
- (8) Koike M., Kumasako Y., Goto K., Ito H., Utsunomiya T., Abe H. (2010) Measurement of oxygen consumption rate of embryos to select the best embryo for e-SET. The 66th Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine (Denver, USA, October 23-27, 2010)
- (9) 阿部宏之(2010)装置の開発の経緯と基礎データ、第1回細胞呼吸測定研究会産婦人科部会(仙台市、東北大学未来医工学治療開発センター、2010年10月12日)
- (10) 阿部宏之、横尾正樹、伊藤(佐々木)隆広、山下祥子、珠玖仁、星宏良、末永智一(2010)電気化学計測技術を応用した受精卵ミトコンドリア呼吸機能解析、日本動物学会第81回大会(東京都、東京大学教養学部、2010年9月23-25日)
- (11) 阿部宏之(2010)高感度呼吸計測による胚・卵の品質評価、第13回日本IVF学会(大阪市、大阪国際会議場・グランキューブ大阪、2010年9月18-19日)
- (12) Kumasako Y., Goto K., Koike M., Araki Y., Utsunomiya T., Abe H. (2010) Measuring the oxygen consumption of individual human embryos by a scanning electrochemical microscopy. 5th International Symposium on Chemical-Environmental-Biomedical Technology for Young Researchers (isCEBT), Tohoku University, Sendai, September 5-8, 2010)
- (13) Nagahata H., Ooe M., Kayamoto R., Abe Y., Abe H. (2010) Time-lapse analysis of mouse embryo development with real-time cultured cell monitoring system. 5th International Symposium on Chemical-Environmental-Biomedical Technology for Young Researchers (isCEBT), Tohoku University, Sendai, September 5-8, 2010)
- (14) 西園啓文、佐藤佑一朗、上村尚美、太田茂男、阿部宏之(2010)新規細胞抑制タンパク質を用いたミトコンドリア機能保護というまったく新しいアプローチによる精子保存技術の開発、第103回日本繁殖生物学会大会(十和田市、北里大学獣医学部キャンパス、2010年9月2-4日)
- (15) 阿部宏之、山下祥子、星宏良(2010)超高精度細胞呼吸計測技術を応用したウシ受精卵ミトコンドリア機能に影響する血清因子の解析、第103回日本繁殖生物学会大会(十和田市、北里大学獣医学部キャンパス、2010年9月2-4日)
- (16) Utsunomiya T., Yasuhisa A., Abe H. (2010) Benefit of measuring oxygen consumption for increasing pregnancy rate. The 2nd Japan-Korea ART Conference 2010 (The Westin Resort & Conference Center, Awaji Island, Japan, August 12-13, 2010)
- (17) 阿部宏之、山下祥子、星宏良(2010)ウシ胚ミトコンドリア機能に影響する血清因子の解析、日本動物学会平成22年度東北支部大会(福島市、福島県立医科大学光が丘会館、2010年8月7日)
- (18) 山中昌哉、橋本周、天羽杏実、右島理可、阿部宏之、檜垣将二郎、伊藤隆広、森本義晴(2010)ヒト凍結融解胚盤胞の呼吸測定による退行予測の検討、第28回日本受精着床学会総会・学術講演会(横浜市、パシフィコ横浜、2010年7月28-29日)
- (19) 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(2010)選択的単一胚移植(eSET)において移植胚選択に迷う症例での胚呼吸量測定の有用性、第28回日本受精着床学会総会・学術講演会(横浜市、パシフィコ横浜、2010年7月28-29日)
- (20) 阿部宏之(2010)超高感度細胞呼吸測定による胚のクオリティー評価、ART (Assisted Reproductive Technology) Forum'10(横浜市、パシフィコ横浜、2010年7月28日)
- (21) Utsunomita T., Kumasako Y., Ito H., Goto K., Koike M., Abe H. (2010) Measurement of oxygen consumption rate of embryos to select the best embryo for e-set. The 26th Annual Meeting of ESHRE (June 27-30, 2010, Rome, Italy)
- (22) 青野展也、杉村智史、菊地裕幸、田中孝幸、横尾正樹、阿部宏之、吉田仁秋、佐藤英明(2010)異なる成熟培地により得られた体外成熟卵母細胞のミトコンドリア機能への影響、第51回日本哺乳動物卵子学会(新潟市、朱鷺メッセ、2010年5月29-30日)
- (23) 小池恵、佐藤晶子、城戸京子、後藤香里、熊迫陽子、宇津宮隆史、荒木康久、阿部宏之(2010)選択的単一胚移植(e-SET)におけるday3胚の呼吸量測定の試み、第51回日本哺乳動物卵子学会(新潟市、朱鷺メッセ、2010年5月29-30日)
- (24) 後藤香里、熊迫陽子、小池恵、城戸京子、佐藤晶子、宇津宮隆史、阿部宏之(2010)移植胚選別困難例における胚呼吸量測定の有用性、第67回日本生殖医学会九州支部会(福岡市、エルガーラホール、2010年5月9日)
- (25) Kumasako Y., Goto K., Koike M., Utsunomiya T., Araki Y., Abe H. (2010) Clinical efficacy of a novel evaluation method with measurement of the embryo oxygen consumption rate using a scanning electrochemical microscopy. 3rd Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE 2010) (Bangkok, Thailand, April 9-11, 2010)

H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得(出願)

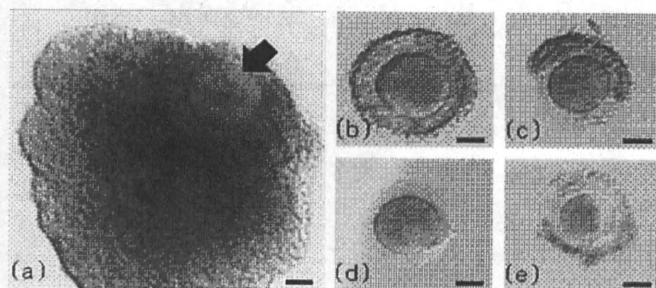


図1. ヒト卵丘細胞-卵子複合体 (COC) の光学顕微鏡像。(a) グレード1: 卵子 (矢印) の周囲には卵丘細胞層が多層に密に付着している。(b) グレード2: 卵丘細胞が1~3層付着している。(c) グレード3: 卵丘細胞層は1-3層で部分的に剥離している。(d) グレード4: 卵丘細胞が全く付着していない。(e) グレード5の: 卵丘細胞層の付着が認められるが卵子が変形している。スケールバーは、50 μm を示す。

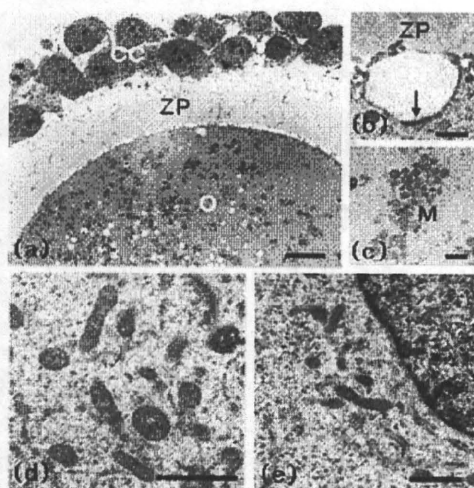


図2. ヒ 卵丘細胞-卵子複合体 (COC) の電子顕微鏡像。a-d: グレード1。卵細胞表面には卵丘細胞から伸びた突起との間にギャップ結合 (矢印) が観察される (b)。卵子 (O) には円形で小型のミトコンドリア (M) がクラスター状になって、ほぼ均一に局在している (a, c)。卵丘細胞にはクリステが発達したミトコンドリアが多数観察される (d)。e: グレード3。卵丘細胞のミトコンドリアは小型で数も少ない。ZP: 透明帯。スケールバーは、a: 10 μm 、b-e: 1 μm を示す。

カテゴリー	成熟培養前 (n)	成熟培養後 (n)
グレード 1	7.79±1.00 (50)	6.11±0.74 (50)
グレード 2	1.46±0.15 (25)	1.63±0.33 (25)
グレード 3	1.26±0.35 (8)	1.60±0.55 (8)
グレード 4	0.86±0.30 (2)	0.79±0.11 (2)
グレード 5	0.77 (1)	0.35 (1)

表 1. 形態的特徴 (グレード1~5) により分類したヒト卵丘細胞-卵子複合体 (COC) の酸素消費量 ($F \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)

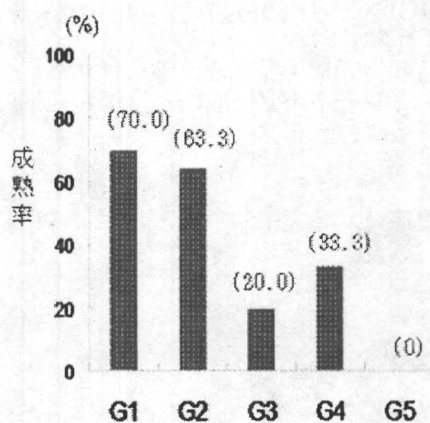


図 3. ヒト卵丘細胞-卵子複合体 (COC) を成熟培養した後の卵子成熟率。G1: グレード 1、G2: グレード 2、G3: グレード 3、G4: グレード 4、G5: グレード 5。

課題番号: H20-子ども-若手-011

課題名: 成育疾患克服等次世代基盤研究事業「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して、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、子宮内腔洗浄液にMMPが強陽性の場合には抗生剤とプレドニゾロンによる内服療法によるMMPのコントロールが奏功を示し、それが妊娠率の改善に導くことが明らかとなった。次に、子宮内腔内のCD9濃度と妊娠率との関係について検討を加えた。まず、マウスにおける基礎的検討を進めた結果、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。さらに、ヒト子宮内腔洗浄液中のCD9濃度をウェスタンブロット解析し、その後の妊娠予後を検討したところ、CD9濃度は低い方が妊娠に有利であることが示唆された。

G. 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した。

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。

H. 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