
ヒト未熟卵胞の凍結保存およびマイクロカプセル
による体外成熟に関する研究

(15591725)

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成18年3月

研究代表者 千石 一 雄
(旭川医科大学医学部教授)

<はしがき>

ヒト卵巣組織または未熟卵胞の凍結保存および融解後の成熟卵子の獲得に関する研究は緒についたばかりである。未熟卵胞の異種間移植または体外培養により成熟卵子の獲得が可能となれば卵巣摘出、悪性腫瘍で化学療法、放射線療法を余儀なくされる若年婦人の妊孕性の温存が安全かつ容易に可能となる。さらに、膨大な原始卵胞の数からも poor responder、早発閉経に起因する不妊患者の治療法として応用が可能であり、極めて有用性が高い。また、マイクロカプセルを応用した未熟卵胞の異種間移植による成熟卵胞・成熟卵子の獲得に関する研究は国内外を問わず認められず極めて独創的である。この実験モデルを応用した、卵細胞シグナルの研究は、卵胞発育機構・卵子成熟機構の解明の一端になるものと期待される。最終的にヒト未成熟卵胞の体外成熟が可能になれば、現在の生殖補助医療技術（ART）における排卵誘発が不要となり、極めて安全かつ経済的に不妊治療が可能になることが期待される。

研究組織

研究代表者：千石一雄（旭川医科大学医学部教授）

研究分担者：田熊直之（旭川医科大学医学部助教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	1,700,000	0	1,700,000
平成16年度	800,000	0	800,000
平成17年度	900,000	0	900,000
総計	3,400,000	0	3,400,000

研究発表

(1) 学会誌等

T. Miyamoto, K Sengoku, S Hasuike, N Takuma, H Hayashi, T Yamashita, M Ishikawa:

Isolation and expression analysis of the human testis-specific gene, SPERGEN-1, a spermatogenic cell-specific gene-1

J Assist Reprod Genet 20: 101-104, 2003

Miyamoto T, Hasuike S, Sengoku K, Takuma N, Hayashi H, Sasaki Y, Yamashita T, Ishikawa M:

Molecular cloning and expression analysis of the mouse Spot-2 gene in pituitary development

Dev Genes Evol 213:199-202, 2003

千石一雄、堀川道晴、B. Pan、碁石勝利、石川睦男：

初期胚発生における HB-EGF の細胞間シグナル伝達機構の解析
産婦人科世界 55:12, 1299-1306, 2003

Kazuo Sengoku, Naoyuki Takuma, Toshinobu Miyamoto, Michiharu Horikawa, Mutsuo Ishikawa:

Integrin are not involved in the process of Human sperm-oolemmal fusion

Human reproduction 19:3; 639-644, 2004

B Pan, K Sengoku, N. Takuma, K Goishi, M Horikawa, K Tamate, M Ishikawa: Differential expression of heparin-binding epidermal Growth factor-like growth factor in the rat ovary

Mol Cell Endocrinol 214:1-8, 2004

B Pan, Y. Kato, K. Sengoku, N. Takuma, N. Niezeki, M. Ishikawa:

Treatment of climacteric symptoms with herbal formulas of traditional Chinese medicine

Gynecol Obstet Invest 57: 144-148, 2004

T. Miyamoto, K Sengoku, H Hayashi, Y Sasaki, N Takuma T Yamashita, M Ishikawa: Isolation and expression analysis of the testis-specific gene, human OPPO1
J Assisted Reprod Genetics 21:4;129-134, 2004

K. Sengoku, N Takuma, T Miyamoto, T Yamauchi, M Ishikawa :
Nucleus dynamics of parthenogenesis of human Oocytes: Effect of oocyte ageing in vitro
Gynecol Obstet Invest 58:155-159 , 2004

片山英人、山下剛、千石一雄、石川睦男：
子宮頸癌の治療－進行癌の BOMP 療法
日本臨床 62 (S 10):187-191 、 2004

田熊直之、佐々木禎仁、千石一雄：
対応に苦慮した嵌胎盤の一例
臨床婦人科産科 58 : 1327-1331、 2004

Y. Sasaki, T. Miyamoto, K. Sengoku, H. Hayashi, N. Takuma, M. Ishikawa :
The human transcript induced in spermatogenesis 50
Reprod Med Biol 3:237-243, 2004

T. Miyamoto, K. Sengoku, H. Hayashi, Y. Sasaki, Y. Jinno, M. Ishikawa:
GATM, the human ortholog of the mouse imprinted Gatm gene, escapes genomic imprinting in placenta
Genetics and Molecular Biology 28:1, 44-45 , 2005

長坂武、田熊直之、千石一雄、石川睦男：
漢方製剤による更年期症状の治療について

産婦人科漢方研究の歩み 22:75-77、2005

千石一雄：

排卵誘発としてのゴナドトロピン療法
産婦人科の世界 57;7;33-40、2005

田熊直之、日高康弘、千石一雄：

Fetal Growth Restriction-当科の管理指針
臨床婦人科産科 59;12;1594-99、2005

H Sato, T Miyamoto, L Yogev, M Namiki, E Koh, H Hayashi, Y Sasaki, M
Ishikawa, D Lamb, N Matsumoto, N Niikawa, K Sengoku:
Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human
azoospermia by meiotic arrest
J Human Genetics

(2) 口頭発表

宮本敏伸、千石一雄、田熊直之、山内智文、石川睦男
[ヒト SYCP3 遺伝子の単離およびその機能解析]
第55回日本産婦人科学会 4月14日、2003 (福岡)

千石一雄、田熊直之、宮本敏伸、山内智文、石川睦男
[ヒト卵巣発生における in vitro 加齢の影響]
第55回日本産婦人科学会 4月14日、2003 (福岡)

田熊直之、千石一雄、宮本敏伸、山内智文、石川睦男
[妊娠率向上のための卵巣チョコレート嚢腫の腹腔鏡下治療]
第55回日本産婦人科学会 4月14日、2003 (福岡)

堀川 道晴、千石 一雄、田熊 直之、石川 睦男

[Differential Display 法による初期卵胞発育に関与する遺伝子の解析] 第
48 回日本不妊学会 10 月 2 日、2003 (東京)

小島貴志、小島奈緒美、千石一雄、石川睦男

「産婦人科領域における化学物質過敏症の診療」

第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会 4 月 12 日、2004 (東京)

千石一雄、横浜祐子、山内智文、堀川道晴、宮本敏伸、田熊直之、石川睦男

[ヒト卵細胞膜と精子の結合・融合過程におけるインテグリンの関与]

第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会 4 月 12 日、2004 (東京)

堀川道晴、横浜祐子、山内智文、千石一雄、石川睦男

[生殖細胞特異的遺伝子 GC-LRR(Germ Cell Leucine-Rich Repeat)の発現解
析]

第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会 4 月 12 日、2004 (東京)

宮本敏伸、千石一雄、田熊直之、石川睦男

[マウス下垂体発生に関与する遺伝子 Spot2 の単離およびその機能解析]

第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会 4 月 12 日、2004 (東京)

横浜祐子、山内智文、堀川道晴、千石一雄、石川睦男

[凍結融解胚移植周期における 2 種類の経皮吸収エストロゲン製剤の比較検討]

第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会 4 月 12 日、2004 (東京)

佐々木禎仁、日高康弘、小島貴志、田熊直之、千石一雄

[胎児腹壁破裂の出生前診断において胎児 MRI が有効であった 1 症例]

第 27 回日本産科婦人科 ME 学会 8 月 27 日、2004 (仙台)

千石一雄

シンポジウム [ゴナドトロピン療法の実際と問題点]

第 46 回日本不妊学会、第 22 回日本受精着床学会

9 月 2 日、2004 (旭川)

千石一雄

シンポジウム [酢酸セトロレリクスの国内臨床試験成績]

第46回日本不妊学会、第22回日本受精着床学会

9月3日、2004(旭川)

佐々木禎仁、宮本 敏伸、田熊 直之、千石 一雄、石川 睦男

[ヒト精巣特異的遺伝子である TISP50, TISP15, TISP43 についての解析]

13回産婦人科分子内分泌懇話会 10月8日、2004(兵庫県淡路島)

佐々木禎仁、日高 康弘、吉田 俊明、田熊 直之、千石 一雄

[胎児消化管異常の出生前診断において胎児3D-MRIが有用であった2症例]

第2回日本胎児治療研究会 11月26日、2004(大阪)

千石 一雄

ランチョンセミナー 「GnRH antagonist の ART への応用」

第9回日本生殖内分泌学会 11月27日、2004(大阪)

堀川道晴、横浜祐子、佐藤 恒、宮本敏伸、千石一雄、石川睦男

[不妊症治療としての腹腔鏡下手術と子宮内膜症との関連について]

第26回エンドメトリオーシス研究会 1月21日、2005(札幌)

佐々木禎仁、宮本敏伸、日高康弘、田熊直之、千石一雄

[孤立性心筋緻密化障害の胎児心エコーと1家系における遺伝子解析について]

第11回日本胎児心臓病研究会学術集会 2月11日、2005(東京)

堀川道晴、千石一雄、石川睦男

[生殖細胞特異的遺伝子 GC-LRR(Germ Cell Leucine-Rich Repeat)ファミリーの解析]

第57回日本産科婦人科学会学術講演会 4月3日、2005(京都)

宮本敏伸、千石一雄、堀川道晴、石川睦男

[GATM, the human ortholog of the mouse imprinted Gatm gene, escapes genomic imprinting in placenta]

第57回日本産科婦人科学会学術講演会 4月3日、2005 (京都)

千石一雄、田熊直之、堀川道晴、宮本敏伸、石川睦男

[ヒト受精機構における tetraspanin ファミリーの役割]

第57回日本産科婦人科学会学術講演会 4月3日、2005 (京都)

佐々木禎仁、田熊直之、日高康弘、千石一雄、石川睦男

「胎児消化管異常の出生前診断において胎児3D-MRIが有用であった2症例」

第57回日本産科婦人科学会学術講演会 4月3日、2005 (京都)

田熊直之、佐々木禎仁、日高康弘、千石一雄、石川睦男

[羊水由来培養細胞を用いた遺伝子診断の一例]

第57回日本産科婦人科学会学術講演会 4月3日、2005 (京都)

日高 康弘、金井 麻子、内田 亜紀子、佐々木 禎仁

吉田 俊明、田熊 直之、千石 一雄

「マイコプラズマによる産褥感染症の一例」

日本産婦人科感染症研究会学術講演会5月28日、2005 (東京)

荻野 元子、山下 剛、千石 一雄

[主治医が行うがん患者の心のケアに対する意識調査]

日本緩和医療学会・サイコオンコロジー学会合同大会7月1日、2005
(横浜)

佐々木 禎仁、金井 麻子、板橋 詠子、北 香、日高 康弘、田熊 直之、
千石 一雄

[胎児消化管異常の出生前診断において胎児3D-MRIが有用であった5症例]

第41回日本周産期・新生児学会学術集会7月11日、2005

山下 剛、石谷 敬之、片山 英人、荻野 元子、渡邊 まり子、千石 一雄

[当科における腹腔鏡下広汎子宮全摘術の現況]

第45回日本産婦人科内視鏡学会7月15日、2005

片山 英人、渡邊 まり子、荻野 元子、石谷 敬之、山下 剛、千石 一雄

[当施設における内視鏡下子宮全摘術(LAVH,LH,TLH)の後方視的検討]

第45回日本産婦人科内視鏡学会7月15日、2005

佐藤 恒、堀川 道晴、宮本 敏伸、横浜 祐子、佐久川 直子、Zou Yi Jie、
石川 麻希子、千石 一雄

[Non-contact infrared laser を用いた Assisted hatching の有用性に関する
検討]

第23回日本受精着床学会総会8月4日、2005 (大坂)

堀川 道晴、佐久川 直子、佐藤 恒、宮本 敏伸、千石 一雄

[経膈超音波下子宮内腔長計測による胚移植部位決定の有用性]

第23回日本受精着床学会総会8月4日、2005 (大坂)

片山英人、石谷敬之、山下 剛、千石一雄

[子宮頸癌における Sentinel node の評価について]

第64回日本癌学会9月15日、2005 (札幌)

佐々木 禎仁、田熊 直之、千石 一雄

[The Expression Analysis of Human Transcript Induced in
Spermatogenesis (TISP) 50,

TISP 15 and TISP 43]

第19回アジアオセアニア産婦人科学会10月3日、2005 (ソウル)

田熊 直之、日高 康弘、佐々木 禎仁、千石 一雄

[A Case Of The Prenatal Genetic Diagnosis From Amniotic Fluid]

第19回アジアオセアニア産婦人科学会10月3日、2005 (ソウル)

宮本 敏伸、佐藤恒、堀川道晴、千石一雄

[ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト FKBP6 遺伝子の解析]

第50回日本不妊学会総会11月17日、2005（熊本）

（3）出版物

千石一雄：

生殖医療のコツと落とし穴—原因不明不妊に対する排卵誘発
中山書店 136—137、2004

千石一雄、石谷敬之：

麻酔科診療プラクティス 16：これだけは知っておきたい術後管理—子宮摘出
術：広汎あるいは準広汎子宮全摘
文光堂（編集：稲田英一）、 204—205、2004

千石一雄：

無月経と排卵障害

今日の治療指針（医学書院）888-889、2006

研究成果

(1) ヒト未熟卵胞の凍結保存およびマイクロカプセルによる体外成熟に関する研究

哺乳動物の卵巣には膨大な数の原始卵胞、一次卵胞などの未熟卵胞が存在しており、その保存ならびに *In vitro*, または *In vivo* の発育が可能となれば、極めて有用性の高い生殖細胞の source となりうる。この観点から、今回、ヒト未熟卵胞の凍結保存、凍結融解後の未熟卵胞（原始卵胞、一次卵胞）の体外培養の可能性に関し検討を加えた。

1. 研究目的

ヒト未熟卵胞の凍結保存法の確立、凍結融解後の未熟卵胞（原始卵胞、一次卵胞）の体外培養系の確立のための第一段階として、異種間移植のためのマイクロカプセルを開発し、未熟卵胞を異種動物（マウス）へ移植し、成熟卵胞・卵子を獲得すること、ならびに、初期卵胞発育機構に関し、卵細胞・顆粒膜細胞からの相互のシグナリングを中心に解析し、ヒト未熟卵胞の体外培養系の確立を目指すものである。

2. 研究方法

婦人科手術時に得られたヒト卵巣の一部をコラゲナーゼ、DNAエースで処理し、原始卵胞、卵胞腔形成前の1次卵胞を採取し、得られた卵胞を *vitrification* 法により凍結保存し、融解後の生存率を検討した。凍結未熟卵胞を融解後、塩化アルギンビーズ、アガロースマイクロカプセル、アガロース/ポリスチレン/スルホン酸を用いた三層性アガロースカプセルまたは *polyvinyl alcohol hydrogel* を応用したマイクロカプセルを用い、*In vitro* 培養系での生存率、性ステロイド（E2, P4）産生能を検討した。

卵胞内卵子および卵胞細胞からグアニジウムチオシアネイト法により total RNA を抽出し逆転写酵素により一本鎖 cDNA を合成し、*real time polymerase chain reaction* 法を行いアガロースゲルを用いて電気泳動を行い GDF-9, C-kit, CD9, CD98, CD81 mRNA の卵細胞での発現を *real timePCR* を用い検討した。

研究成績

1) *Vitrification* 法によるヒト未熟卵胞の凍結保存法の確立のための前段階として体外受精時に受精の認められなかったヒト未受精卵を用い *vitrification* の

有用性に関し検討した。ガラス化液として 10% EG 含有 PBS 液で 10 分間前処理後、15%EG+15%DMSO+0.5M sucrose 含有 PBS に浸漬しクライオトップを用いて急速凍結を行った。propidium iodide と carboxyfluorescein 蛍光色素による double staining 法により、約 90% の融解後の生存率、また、その後の胚発育も観察され、この方法を応用することにより未熟卵胞の凍結保存の可能性が示唆された。

2) 各マイクロカプセルを用いた *in vitro* での培養実験では卵胞組織の生存を認めたが生存率は低値であり、ステロイド産生も確認できなかった。

3) ヒト卵子における GDF-9, CD9, CD98, C-kit mRNA の発現を PCR 法で確認した。また、CD9, CD94 蛋白の発現も間接蛍光抗体法により確認された。

考察

Vitrification 法によりヒト未受精卵の凍結保存が可能であることが明らかとなり、しかも融解後の生存率が高率であることから、未熟卵胞においても vitrification 法による凍結保存が可能であることが示唆された。また、ヒト卵子において CD9, CD98, GDF-9, C-kit mRNA の存在が確認され、同様に CD9, CD98 の蛋白も確認できた結果は、これらの oocyte factor が卵子、卵胞成熟の評価因子となり、未熟卵胞の体外培養系確立に寄与する可能性が示唆される。しかし、マイクロカプセルを用いたヒト卵胞の *in vitro*, *in vivo* 培養系の確立には至っておらず、今後マイクロカプセルの改良、体内および体外培養環境に影響を及ぼす諸因子の解析など、さらなる検討の必要性が示された。

(2) ヘパリン結合表皮成長因子様成長因子 (HB-EGF) のラット卵巣における局在に関する研究

近年 HB-EGF が卵胞発育、初期胚発育、着床など生殖生理に深く関与していることが明らかにされつつあり、我々もこれ迄 HB-EGF が卵子の成熟および初期胚発育に促進的作用を有することを明らかにしてきた。一方、未熟卵胞、卵子の発育、成熟には多くの局所因子の関与が報告されており、我々もヒト黄体化顆粒膜細胞において HB-EGF は局所因子として黄体形成とアポトーシス

調節機構を介し、ヒト黄体機能に重要な役割を果たすことを報告した。今回、未熟卵胞、卵子の発育、成熟におよぼす局所因子の作用を検討するため HB-EGF のラット卵巣における局在ならびに HB-EGF 受容体 mRNA の発現に関し検討を加えた。

研究目的

卵巣機能の発現に視床下部－下垂体－卵巣系が重要な役割を果たしていることが知られているが、同時に卵巣局所因子が卵胞発育、黄体形成・退縮に関与していることも示唆されている。ヘパリン結合表皮成長因子様成長因子 (Heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF) は EGF family の新しいメンバーで、膜アンカー型の前駆体 (proHB-EGF) と、ectodomain shedding により前駆体より切断された溶解型 (sHB-EGF) の成熟 HB-EGF として存在する。sHB-EGF は paracrine 作用により細胞の生存と増殖を促進し、一方、proHB-EGF は juxtacrine 作用により細胞に多様な機能をもたらすことが知られている。しかし、卵巣における HB-EGF の局在、機能に関しては十分に明らかにされていない。本研究では、ラット卵巣における HB-EGF の局在および HB-EGF, HB-EGF 受容体 messenger RNA 発現を解析することにより、HB-EGF の卵胞発育、黄体形成、退縮における役割に関し検討した。

研究方法

1. 排卵周期を有する成熟 Wistar 系ラットならびに過排卵処理した偽妊娠未熟ラットより各卵胞発育ステージの卵巣を採取し、proHB-EGF の局在ならびに HB-EGF および HB-EGF 受容体 mRNA の発現を検討した。
2. 免疫組織化学法：Vector Laboratories, Inc の ABC-P0 kit を用い、AEC 染色により HB-EGF 蛋白のラット卵巣における局在を免疫組織化学法で検討した。
3. 各卵胞発育ステージのラット卵巣より total RNA を抽出し、HB-EGF、HB-EGF 受容体である erbB1, erbB4 の mRNA 発現を semi-quantitative RT-PCR 法で測定した。

研究成績

1. 自然排卵周期および過排卵処理ラット卵巣における HB-EGF の発現

原始卵胞、一次卵胞の顆粒膜細胞の大部分に HB-EGF の存在が確認され、2 次卵胞においても弱いながら染色が認められた。一方、アポトーシスを起こしている閉鎖卵胞では HB-EGF の強い染色を認めるが、成熟卵胞の顆粒膜細胞においては HB-EGF 蛋白の局在は確認できなかった。黄体では HB-EGF の局在を認めるが、黄体化早期の黄体に対し、成熟した黄体程強い発現が認められた。また、間質の細動脈および平滑筋細胞にも強い発現が認められた。

過排卵処理未熟ラット卵巢においても成熟ラット同様成熟卵胞以外の卵胞顆粒膜細胞に HB-EGF の局在を認め、黄体細胞では排卵後時間が経過する程強い発現を示した。

2. 自然排卵周期および過排卵処理ラット卵における HB-EGF mRNA の発現
自然排卵周期ラットでは排卵前のプロエストラス期で HB-EGF mRNA は最低値を示し、その後漸増し、黄体期であるジエストラスおよびプロエストラスの早朝に最も強い発現を認めた。過排卵処理未熟ラットでは卵胞期に HB-EGF mRNA レベルは最低値を示し、hCG 投与後（排卵後）急増し、黄体期 6 日目までは高いレベルが維持され、その後漸減し黄体期 14 日目の mRNA レベルは卵胞期と同レベルまで減少した。

3. 自然排卵周期および過排卵処理ラット卵における HB-EGF 受容体 mRNA の発現

成熟ラットおよび未熟ラット卵巢において erbB1mRNA の発現を認めたが、erbB4 mRNA の発現は認められなかった。

考察

本研究からラット卵巢において HB-EGF は間質の動脈平滑筋および外莖膜細胞に恒常的に発現が認められ、また、卵巢顆粒膜細胞、黄体細胞では排卵周期でダイナミックにその局在が変動することが明らかとなり、この結果より、HB-EGF は卵巢機能に重要な役割を果たしていることが示唆された。

原始卵胞、一次卵胞などの未熟卵胞顆粒膜細胞に HB-EGF 蛋白の強い発現を認める結果は、未熟卵胞では FSH 受容体数が少ないこと、ならびに未熟卵胞周囲では血管網の発育が不十分であり FSH が十分作用しない可能性を考えあわせると、初期卵胞発育には内分泌因子よりも HB-EGF などの卵巢局所因子が重要な役割を担う可能性が推測される。また、成熟卵胞顆粒膜細胞に HB-EGF 蛋白ならびに mRNA の発現が認められない結果は、未熟卵胞においては HB-

EGF の細胞増殖作用が初期卵胞発育に必須であるが、卵胞の最終成熟には HB-EGF の細胞増殖作用から脱し、細胞分化に向かう必要性を示すものと考えられる。この仮説は HB-EGF が局在する閉鎖卵胞では未だ細胞分裂が認められるのに対し、成熟卵胞ではほとんど細胞分裂を認めないことから支持される。

成熟ラットでは後期黄体で proHB-EGF 蛋白の強い発現が認められ、過排卵処理未熟ラットでも後期黄体で発現が増強する結果であった。一方、HB-EGF mRNA は排卵直後の黄体期では後期黄体に比べ高い発現を認めた。免疫組織化学法では proHB-EGF が特異的に染色されることより、黄体期早期では ectodomain shedding による溶解型 HB-EGF (sHB-EGF) の産生が促進され、逆に、proHB-EGF 蛋白が減少しているものと考えられる。黄体期早期では sHB-EGF はパラクライン作用を介し、黄体細胞の増殖を促進し、黄体期後期では shedding が抑制され増加した膜アンカー型 proHB-EGF が juxtacrine 作用を介し黄体細胞のアポトーシスを誘導するものと考えられる。また、ラット卵巣において、erbB1 mRNA の発現を認めるが erbB4 mRNA の発現が認められないことから、HB-EGF の作用は erbB1 受容体を介して機能するものとも考えられる。動脈の平滑筋細胞、外莖膜細胞にも HB-EGF 蛋白の強い発現を認める結果は、HB-EGF は卵巣機能のみならず卵巣構造のリモデリングにも関与する可能性が示唆される。

結論

HB-EGF およびその受容体がラット卵巣において細胞特異的ならびに排卵周期特異的に発現し、未熟卵胞の増殖、黄体形成、退縮に関与することを明らかにした。以上の成績から HB-EGF は卵巣局所因子として卵巣機能および組織構築に重要な役割を果たしていることが示唆された。この検討成績は未熟卵胞の体外培養系の確立にも大いに寄与するものと考えられる。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。(資料1)

Differential expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the rat ovary

Molecular Cellular Endocrinology 214:1-8, 2004

(3) In vitro 加齢のヒト単為発生卵核の経時的変化に及ぼす影響

未熟卵胞、卵子の体外培養系の確立を目的とする際には、in vitro における卵子の加齢が、その後の卵の発育能、正常性に及ぼす影響に関し検討を加える必要がある。そこで、体外培養による in vitro の加齢がヒト卵において単為発生後の核の経時的変化に影響するか否かに関し基礎的検討を加えた。

研究目的

受精機構の詳細な情報を得ることは、卵子活性化機構、初期胚発育機構の研究において重要であることは言うまでもない。しかしヒト卵子に関しては未だ十分な検討がなされていない。今回、ヒト卵における受精機構のモデルとして単為発生に着目し、特に、体外培養系ではさけられない in vitro における卵子加齢の卵子核に及ぼす影響に関し基礎的研究を試みた。

研究方法

体外受精時に受精が認められなかった 1 day old (採卵後 20 - 24 時間) および 2 day old (採卵後 44 - 50 時間) の非受精卵を informed consent を得て使用した。5 μ M calcium ionophore A23187 で 5 分間処理後、10 μ M puromycin 添加培養液中で培養し、1、2、4、6、8 時間後の核の状態を観察した。核染色は透明帯を 0.1 % pronase で融解し、固定後、Hoechst 33328 を用いて行った。蛍光顕微鏡下に各培養時間における metaphase II (MII), anaphase/telophase II (A/T), 前核 (PN) の出現率を検討した。

研究成績

- 1) 91 個の 1 day old 卵と 94 個の 2 day old 卵の puromycin 培養 6 時間後の活性化率は各々 95.6%, 95.2% で両群とも高い活性化率を示した。
- 2) 核の経時的変化に関する検討では、1 day old 卵では puromycin 添加 2 時間後ではすべての卵が MII に留まっており、4 時間後には 21 卵中 6 卵が A/T ステージに達していたが、PN は認められなかった。6 時間後では 25 卵中 19 卵が A/T, 5 卵が PN 期、8 時間後では 20 卵中 17 卵が PN 期まで発育していた。一方、2 day old 卵では 2 時間後すでに 21 卵中 13 卵が A/T 期まで達しており、6 時間後には 86.4% の卵に前核を認め、1

day old 卵に比し、核の進行速度が著明に促進している結果が得られた。

考察

本研究により細胞内カルシウム上昇薬剤である calcium ionophore と蛋白合成阻害剤である puromycin により卵子の加齢に関連なく90%以上と高率にヒト卵の活性化を誘起することが可能であることが明らかとなった。一方、活性化後の卵子核の進行は、加齢の進んだ卵で進行速度が促進することを明らかにした。加齢による活性化後の卵子核の進行速度の促進機構は不明であるが、マウス、ラットでは加齢卵の maturation promoting factor (MPF) および mitogen activated protein kinase (MAPK)活性の低下が報告されている。従って、Calcium ionophore 添加による細胞内カルシウム濃度の増加による cytotatic factor(CSF)の不活性化、続く puromycin 処理による新たな CSF 産生の阻害は in vitro 加齢卵において低下している MPF のさらなる活性低下を招き、新鮮卵に比べ、より早期の第二減数分裂の再開、前核形成がもたらされるものと推察される。

結論

Calcium ionophore および puromycin 処理によりヒト卵においても高率に活性化を誘起することが可能であること、さらに in vitro 加齢は活性化後の核の進行を促進することを明らかにした。以上の成績は卵子活性化および受精過程解明に寄与するものであり、長時間の体外培養による卵子の加齢は胚発育の異常を誘起する可能性が示唆され、今後のさらなる検討の必要性を明らかにした。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。(資料2)

Nuclear dynamics of parthenogenesis of human oocytes: Effect of oocyte aging in vitro

Gynecol Obstet Invest 58:155-159, 2004

(4) ヒト卵細胞膜と精子の融合におけるインテグリンの役割に関する研究

未熟卵胞および未熟卵の体外培養による成熟卵の確保を目的とした場合、透明

帯硬化などによる体外培養卵の受精障害が惹起される可能性がある。また、未熟卵胞の凍結保存においても同様の現象が起こることも十分に予想される。この観点から受精機構とくに卵子と精子の相互作用の詳細を明らかにすることは重要な課題である。精子と透明帯の結合・融合に関しては多くの報告が認められるが卵細胞膜と精子の結合・融合メカニズムに関しては未だ十分に解明されていない。近年、マウスにおいて、卵細胞膜と精子の結合・融合に接着因子、CD9などの tetraspanine family の関与が報告された。今回、接着因子の一つであるインテグリンのヒト卵細胞膜と精子の融合における役割に関し検討した。

研究目的

マウス卵子細胞膜と精子の結合・融合に関しては、これまで精子の fertilin や cyritestin のディスインテグリン領域と卵細胞膜のインテグリンの関与が強く示唆されてきた。特にモノクロナル抗体を用いた阻害実験よりインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ が卵細胞膜上の精子受容体の最も有力な候補であるとされてきた。しかし、 $\alpha 6$ ノックアウトマウスにおいて卵細胞膜と精子の結合・融合が阻害されない実験結果がえられ、インテグリンが実際に卵細胞膜と精子の結合・融合に関与するか否か再考が求められている。ヒトにおいては、卵細胞膜に各種のインテグリンが発現していることが報告されているが、インテグリンの卵子と精子の結合・融合における役割は未だ不明である。今回ヒト卵細胞膜における種々のインテグリンサブユニットの発現ならびに透明帯除去ヒト卵を用いた sperm-oocyte binding and fusion assay によりヒト卵細胞膜と精子の結合・融合過程におけるインテグリンの関与に関し検討した。

研究方法

体外受精時に受精が認められなかった非受精卵を informed consent を得て使用した。

免疫組織化学：酸性タイロイド液処理にて透明帯を除去したヒト非受精卵を 2% パラホルムアルデヒドで固定後、各種の抗インテグリンサブユニット ($\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \alpha V, \alpha M, \beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4, \beta 5, \beta 6$) モノクロナル抗体添加培養液で 1 時間培養した。洗浄後、FITC でラベルした第 2 抗体および Hoechst33342 で二重染色し、蛍光顕微鏡下に卵細胞膜における各種インテグリンサブユニットの局在を検討した。

卵細胞膜への精子結合・融合：透明帯除去卵を各種抗インテグリンサブユニット抗体で処理後媒精し、卵細胞膜への精子の結合および融合状態をHochst33342を用いたDye transfer techniqueにより解析した。

研究成績

各種インテグリンサブユニット抗体による局在の検討では、 $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 5, \alpha 6, \alpha V, \alpha M, \beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4, \beta 5, \beta 6$ インテグリンサブユニットがヒト卵細胞膜上に発現していることが確認された。一方、 $\alpha 1, \alpha 4$ サブユニットの発現は確認できなかった。また、各種インテグリンの染色パターンは卵細胞膜全面に認められるものから、一部のみ染色されるものまで個々の卵で相違が認められた。抗インテグリン抗体処理による媒精実験では、卵細胞膜に発現を認めたすべての α サブユニットおよび $\beta 1, \beta 2, \beta 3$ 抗体の添加により最高55%程度の結合精子数ならびに融合精子数の減少が認められた。しかし、全精子数（結合精子数+融合精子数）に対する融合精子数の割合は対照群と差は認められず、インテグリンは精子結合に関与するものの、融合には直接関与しない可能性が強く示唆された。

考察

本研究によりヒト卵細胞膜に $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 5, \alpha 6, \alpha V, \alpha M, \beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4, \beta 5, \beta 6$ の各サブユニットが存在していること、また、 $\alpha 1, \alpha 4$ の局在が認められないことを明らかにした。さらに、卵細胞膜に存在するインテグリンサブユニットに対する抗体を用いた精子と卵細胞膜の結合・融合実験から $\beta 4, \beta 5, \beta 6$ 以外の抗インテグリン抗体は卵細胞膜への精子の結合を抑制することが明らかとなった。しかし、その抑制率は最大55%であり、さらに結合した精子のその後の融合は阻害されない結果より、今回検討した各インテグリンサブユニットは卵細胞膜への精子の結合に関与する可能性はあるが、その作用は補完的もしくは部分的なものであるものと推測される。最近マウスで $\alpha 9 \beta 1$ がADAMの受容体であり、fertilin β のディスインテグリン領域に特異的に結合することが報告されており、今回は検討していないが、 $\alpha 9 \beta 1$ がヒト卵においても卵細胞膜と精子の結合に関与する可能性は残されている。近年 $\alpha 3$ および $\beta 1$ ノックアウトマウス卵子は精子と正常に結合・融合することが報告され、本研究結果と考えあわせれば卵細胞膜のインテグリンは精子との相互作用に必

須のものではないものと推測される。また、結合と融合は異なった現象であり、インテグリンは少なくとも精子の融合には関与しないものと考えられる。現在、ノックアウトマウスの実験より卵細胞膜の CD9 が精子と卵子の融合に最も重要な役割を担うことが報告され、本研究結果からも CD9 はインテグリン以外の蛋白と tetraspanin web を形成し卵細胞膜における精子受容体として作用し、卵細胞膜と精子の融合過程の初期に関与することが示唆される。

結論

各種抗インテグリンサブユニット抗体による卵細胞膜と精子の結合阻害実験結果よりインテグリンは精子の卵細胞膜への結合ステップの一つには関与するものの、結合および融合機構に重要ではなく、インテグリン以外の蛋白が重要な役割を担うものと考えられた。以上の成績は未熟卵胞の体外培養で得られる卵子のその後の受精、胚発育の研究に極めて有意義なものである。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。(資料 3)

Integrins are not involved in the process of human sperm-oolemmal fusion

Hum Reprod 19:639-644, 2004

(5) ヒト精子形成遺伝子に関する研究

ヒト不妊症の原因の一つとして男性不妊が大きな要因を占めるが、ヒトにおいて精子形成に関与する遺伝子、精子形成メカニズムに関しては十分に解明されているとは言えない。近年、マウス、およびラットにおいて精巣および精子特異的に発現する遺伝子が数多く報告されるに至っている。これらの遺伝子群のヒト精子形成における役割を検討することは無精子症の原因の解明、しいては、これらの症例に対する妊孕能の回復につながることを期待される。

研究目的

ヒト精子形成過程に関与する遺伝子を同定するため、マウス spermatogenesis,

spermiogenesis に関与すると報告されている遺伝子をもとに、genomic database を利用してヒト遺伝子 cDNA の単離およびその機能解析を試みた。

(a) ヒト OPPO1 遺伝子、MEI1 遺伝子の単離および発現・機能解析

研究方法

GenBank をもとにマウス *Oppo1*, *Mei1* 遺伝子のアミノ酸配列と相同性を有するヒトゲノム配列にプライマーを設定し、ヒト精巣 cDNA ライブラリーを用いて PCR, 5'RACE および 3'RACE 法を施行し、ヒト OPPO1、MEI1 cDNA を単離した。

ヒト OPPO1、MEI1 cDNA を用いてイントロンをはさむ形でプライマーを設定し、クロンテック社のヒト cDNA パネルを用いて PCR を施行し OPPO1 および MEI1 の臓器発現パターンを解析した。また、ヒト MEI1 遺伝子とヒト無精子症の関係を解析するために、無精子症患者の DNA を用いて mutation 解析を施行し得られた、4つの single-nucleotide-polymorphism(SNP1, 2, 3, 4) に関し患者と対照群で出現頻度を比較検討した。

研究成績

マウス *Mei1* および *Oppo1* 遺伝子のアミノ酸配列をもとにヒト MEI1、OPPO1 cDNA を単離した。ヒト MEI1 遺伝子は 2714bp と 2609bp の2つの転写体を有しており、各々642個と607個のアミノ酸をコードし、22番染色体に存在していた。マウスとはアミノ酸レベルで77%の相同性が認められ、発現パターン解析では精巣優位な発現を認めた。ヒト MEI1 の mutation 解析にて ORF 内に4つの SNP を検出した。SNP3 および SNP4 のアメリカ人におけるアレル出現頻度は正常群と無精子症群で有意差が認められた。一方、OPPO1 遺伝子は 257 個のアミノ酸をコードし、Open reading frame は 183 nt から 956 nt までであり、17番染色体に存在していた。ヒト OPPO1 遺伝子とマウス *Oppo1* 遺伝子は蛋白レベルで42%の相同性を有していたが、マウスと異なり既知のモチーフを有していなかった。また検討した15臓器におけるヒト OPPO1 遺伝子の発現パターンの検討では、精巣組織において優位な発現を認めた。

考察

マウス *Mei1* 遺伝子のエクソン 1 2 の部分的欠失もしくは完全欠失により、フレームシフトが生じ不完全なアミノ酸が形成され、精子形成過程で減数分裂停止が起こり round spermatid, elongated spermatid などがまったく見られず無精子症を呈する。ヒト *MEI1* の coding region において4つの SNP が認められ、アメリカ人无精子症患者とコントロール群の比較では SNP3 および SNP4 のアレル出現頻度に有意差が認められたことより、*MEI1* 遺伝子は精子形成とくに減数分裂に重要な役割を担っていることが示唆された。一方、マウス *Oppo1* 蛋白はサルモネラ菌の鞭毛基底体桿蛋白と共通のアミノ酸配列を有していることより、精子鞭毛の形成および機能に関与する遺伝子であることが推測されている。また、マウス *Oppo1* は成熟マウス精巣に特異的に発現しており、mRNA は spermatid から elongated spermatid に特異的に認められ、spermiogenesis に関与すると考えられている。ヒト *OPPO1* 蛋白は鞭毛基底体桿蛋白を有せず、マウスとは異なる機能を示すものと考えられるが、マウスとのアミノ酸レベルでの高い同一性、また、精巣特異的に発現を認めることを考えあわせれば、ヒト *OPPO1* 遺伝子も精子形成過程で何らかの役割を有していることが示唆される。

以上の研究成果はヒト精子形成メカニズム解明の一端を担うものであり、生殖医療の発展に大いに寄与するものである。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。(資料 4、5)

Isolation and expression analysis of the testis-specific gene, human *OPPO1*

J Assist Reprod Genet 21: 129-134, 2004 (資料 4)

Polymorphic alleles of the human *MEI1* gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest

J Human Genetics (in press) (資料 5)

(b) ヒト *TISP50* に関する研究

研究方法

1. ヒト TISP 遺伝子ファミリーの発現様式

報告された 80 個のマウス Tisp は大部分 partial cDNA であったため、Genome database を利用して、その相同性から full length cDNA の同定を試みた。その後マウス Tisp 遺伝子群とアミノ酸レベルでヒトゲノムシーケンスと相同性を有する部位を検索した。結果、80 の Tisp cDNA のうちヒトにおいて相同性を有する部位が検出されたものは 28 個であった。相同部位にプライマーを設定し、ヒト成人組織から構成された cDNA ライブラリーを鋳型として PCR を施行した。

2. ヒト TISP50, TISP15 及び TISP43 cDNA の単離

検討した 28 個のヒト TISP 遺伝子の内 TISP50, TISP15, TISP43 の 3 個の遺伝子がヒト精巣特異的発現を示したため、これらの cDNA の単離を試みた。Genome database を用いた解析より、マウス Tisp50 はマウス Shippo1 遺伝子と Tisp15 は Oaz3 とまた Tisp 43 は Tesp1 とそれぞれ同一のものであり、Tisp50, Tisp15 及び Tisp43 cDNA は全て partial cDNA であることが判明した。ヒト TISP50 cDNA を単離すべくマウス Shippo1 のアミノ酸配列と相同性を有するヒトゲノムシーケンス領域にプライマーを設定し、ヒト精巣 cDNA ライブラリーを鋳型として PCR を施行、その後 5'RACE、3'RACE を施行しシーケンス解析した。

3. ヒト TISP50, TISP15 及び TISP43 の発現パターン

ヒト TISP50, TISP15 及び TISP43 の発現様式を解析するためにそれぞれイントロンを挟む形でプライマーを設定し、PCR を施行し、臓器発現パターンを解析した。

研究成績

マウスで精巣特異的な発現を示す 80 個の TISP 遺伝子ファミリーのうちヒトにおいても相同性を有する 28 の TISP 遺伝子を解析したが、このうち 5 つはヒト精巣に発現が認められなかった。また、マウス同様ヒトにおいても精巣特異的な発現を示したのは TISP50, TISP15 及び TISP43 のわずか 3 つの遺伝子にすぎず、残り 20 の遺伝子はヒトでは精巣のみならず様々な組織で発現が認められた。ヒト TISP50 は 254 個のアミノ酸をコードしており、その Open Reading Frame は 270nt から 1034nt までであり、マウスとはアミノ酸レベルで 93% と高い相同性を有していることが明らかとなった。しかし、6 つの Pro-Gly-Pro リピートを

有するものの既知のドメインはコードされていないことが判明した。TISP43 及び TISP15 に関しては共に 5'RACE を施行したものの、そのスタートコドンを検出することはできず、今回単離した cDNA はともに partial cDNA と考えられる。しかしながら、TISP43 は trypsin-like serine protease ドメインをコードしていること、また TISP43 及び TISP15 のマウスとのアミノ酸レベルでの相同性はそれぞれ 43% 及び 78% である結果が得られた。発現パターン解析では、今回単離した 3 つの cDNA は全て精巣に強く発現しているが、膵臓にもわずかにバンドが認められた。

考察

本研究によりマウス精巣特異的に発現する 80 個の Tisp 遺伝子の内、ヒトと相同性を認めるものは 28 遺伝子であり、このうち 5 個の遺伝子はヒト精巣に発現を認めないことが明らかとなった。一般的には、機能的に重要な役割を担う遺伝子は種を通じて保存されていることより、これら 5 つの遺伝子はマウスでも精子形成に重要ではないものと考えられる。また解析した 28 のヒト TISP において精巣優位な発現パターンを認めたのはわずか 3 個にすぎず、マウスとヒトとにおいて生物学的な不一致が存在することが明らかとなった。マウス Tisp43 は精子が卵細胞の透明帯を通過する際に重要であることが知られており、マウスとヒト TISP43 との高い相同性よりヒトでも同様な機能を持つことが推測される。マウス Tisp50 蛋白は精子尾部に沿って存在し精子の運動能に関与していることが報告されており、マウスとヒトとの 93% と高い相同性を考慮するとヒトでも同様の機能をもつことが示唆される。さらに、ヒト TISP50 は Imprinting 領域である 11p15.5 に存在するためヒトにおいて Imprinting を受けているか否か今後解析が必要である。

結論

本研究において 3 個のヒト精巣特異的な遺伝子を単離した。その発現パターン及びアミノ酸配列から単離した遺伝子がヒト精子形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。(資料 6)

The human transcript induced in spermatogenesis 50

Reprod Med Biology 3: 237-243, 2004