

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10659

研究課題名(和文)自然周期採卵における小卵胞由来卵子の由来推定とその有用性

研究課題名(英文) Mature oocytes from non-dominant small follicles

研究代表者

田中 宏一 (TANAKA, Hirokazu)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70507194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：自然周期による成熟卵はdominant follicle由来するだけではなく、小卵胞からも妊娠に供する可能性がある卵子を得ることができることを証明し、採卵時にdominant follicleのみを穿刺するという既存の概念を打ち破り、回収卵子数を増やして妊娠率の向上をはかることを目的とした。小卵胞穿刺より平均で1.26個/周期の成熟卵を得ることができ、300弱の成熟卵から18が受精し、5人の生児を得ている。さらに卵胞液、LHGR発現より小卵胞は閉鎖卵胞由来であり、マウスの卵丘細胞卵複合体の解析より、微小環境の高アンドロゲン状態を解消することにより、成熟卵の獲得率を上げる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Objective: To determine whether oocyte retrieval from non-dominant small follicles supplies mature oocytes and increases live births in natural cycle IVF. And to increase the number of harvest mature oocytes and improve the pregnancy rate.
Results: An average of 1.26 mature oocytes can be obtained from small follicle puncture. We have gotten 18 fertilizations from less than 300 mature oocytes, and obtained 5 live births during 2years (2015-2016). And follicular fluid and LHGR expression analyses revealed that small follicles are derived from closed follicles. Mouse cumulus cells-oocyte complex study showed high concentrate androgen prevented oocyte maturation.
Conclusion: Non-dominant small follicles are a promising supplementary source of mature oocytes for natural cycle. To obtain mature oocytes from small follicles, it's important to eliminate the high androgen state of the microenvironment by early retrieve just after LH surge.

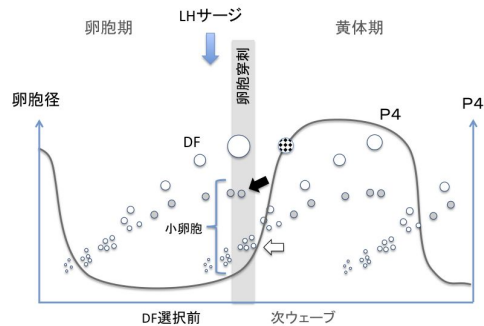
研究分野：生殖医学

キーワード：小型卵胞 自然周期排卵 成熟卵 小卵胞穿刺

1. 研究開始当初の背景

月経周期ごとに、20-30 個 (コホート) の卵胞が同期して発育を開始する。その後、クラス6 (直径 1-2 mm まで) 胞状卵胞の時点で選択が行われ、通常 1 つのみが選択され dominant follicle となって排卵に至る。その他の卵胞は閉鎖過程に入り、破裂することなく変性吸収されると考えられている。したがって、自然周期採卵 (排卵誘発を行わない体外受精) では、dominant follicle のみの穿刺がおこなわれ、回収される卵子は通常 1 個である。ところが、最近、自然周期採卵の際に、dominant follicle とはならなかった卵胞 (LH サージ後も 3-10mm に留まる) の体外受精成績が報告された。

このことは、自然周期における採卵のコンセプトを大きく変えるものであり、「LH サージ後に存続する小型卵胞のなかに、正常な発育能を有する成熟卵子 (M2 期) が存在する」ことを意味している。



小卵胞から回収される成熟卵子は 閉鎖卵胞由来か 次ウェーブ由来か?

上図に示した通りこの小卵胞は 閉鎖卵胞に向かう卵胞であるのか (図中黒矢印)、同周期内の、2nd 発育コホートによるもの (図中白矢印) が明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では自然周期による dominant follicle 由来する成熟卵子だけではなく、小卵胞からも妊娠に供する可能性がある卵子を得ることができることを証明し、採卵時に dominant follicle のみを穿刺するという既存の概念を打ち破り、回収卵子数を増やして妊娠率の向上をはかることにある。そのために小卵胞の卵丘細胞・卵胞液を解析し、小卵胞からも成熟卵子を得ることができることを証明する。さらに小卵胞が、閉鎖卵胞に向かう卵胞であるのか (図中黒矢印)、同周期内の、2nd 発育コホートによるもの (図中白矢印) を証明する。また、小卵胞からの成熟卵胞採取の効率を上げる環境を探索することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 承諾を得た患者より、主席卵胞、小卵胞 (卵胞 3-10mm) からの卵採。得られた成熟卵 (MII) を生殖医療に使用。またその際得られた卵胞液を使用し、ステロイドプロファイルを行う。また、卵丘細胞を使用しその遺伝子

発現解析を行う。

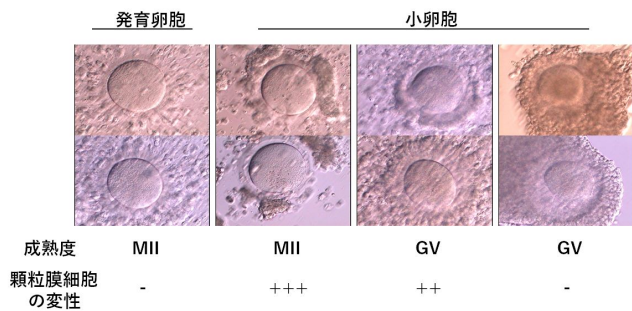
(2) マウス卵巣より、卵丘細胞卵複合体を取り出し、ex-vivo 実験系を確立し、得られたステロイドプロファイルに従い、培養条件を変え、その卵子発育状態を検討する。

4. 研究成果

(1) 自然周期による小卵胞穿刺施行

卵胞径 3-10mm を小卵胞と定義し、主席卵胞と小卵胞の穿刺吸引を行った。

Fig1



採取された卵胞を Fig1 のように分類。小卵胞からの卵子を成熟度 (核膜、極体放出など) 卵丘細胞 (顆粒膜細胞) の編成の度合いなどから 3 種に分類。2015,2016 年の 2 年間で、72 人、217 周期に穿刺を施行。発育卵胞から成熟卵 (MII) が約 60% 回収できた。一方、小卵胞からは顆粒膜の変性がみられるものの成熟卵 (MII) が 1.26 (個/周期) 回収できた。これらのうち 18 個が受精し、胚盤胞まで発育、ET 施行。さらにこのうち 5 例が生児を得ている。また、小卵胞から得られた GV 卵はある条件下で培養することにより成熟卵 (MII) に移行したものは存在するが、受精し、胚盤胞に移行したものは全くなかった。以上小卵胞からも成熟卵 (MII) を得ることができ、それが生児獲得に寄与することが証明された。

(2) 成熟卵胞と小卵胞の卵胞液中のステロイドホルモン

Fig2

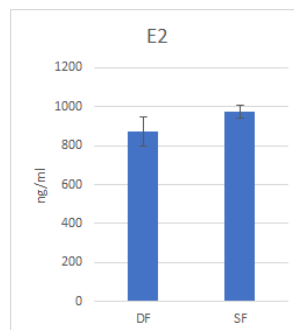


Fig3

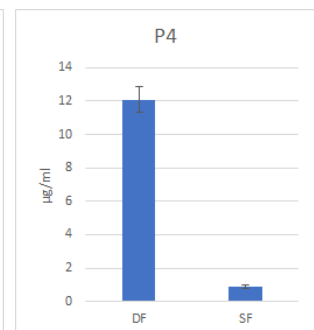
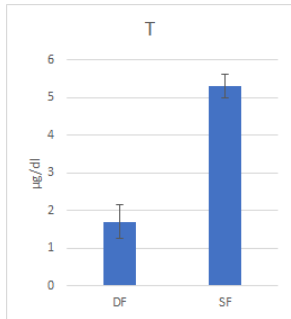


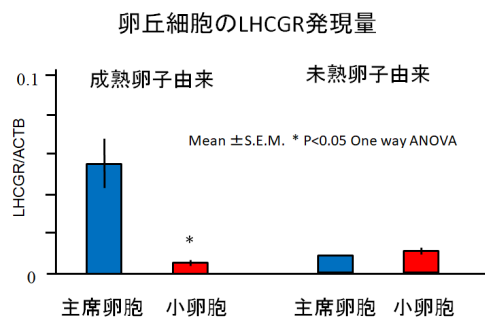
Fig4



そこで小卵胞と成熟卵での卵子周囲環境を卵胞液のステロイド濃度を比較することにより検討した。エストロゲン濃度の違いは認められなかったが(Fig2)、プロゲステロンはかなり少ない状況であった(Fig3)。これは成熟卵胞では黄体化が進むため、LHサージ後は急速にプロゲステロンが上昇することを反映していると思われる。さらに、テストステロンは有意差をもって、小卵胞で上昇していた。小卵胞はLHサージの影響を受けないといわれている。実際、いくつかの報告で、主席卵胞ではLHCGRの発現が高くなり、LHサージの影響を受けやすくなっていることが示されている。そこで本研究ではさらに、卵丘細胞中でのLHCGRの発現状況を確認している。

(3) ヒト卵丘細胞におけるLHCGRの発現比較

Fig5



いくつかの報告では、LHCGRを発現しているのは顆粒膜細胞で、卵丘細胞では発現がないと報告されているが、本研究では少ないながらも、LHCGRを発現しており、さらにその発現量に差があることを示している。興味深いことに主席卵胞であっても成熟卵子が取れなかった場合は、卵丘細胞でLHCGRの発現が少ないことがわかった。このことは、卵子成熟に卵丘細胞の質的変化が重要であることを示唆している。そこで、成熟卵子形成における卵丘細胞の役割を探索するため、卵丘細胞における環境変

化による発現遺伝子の違いを検討した。

(4) マウス卵丘細胞卵複合体(COC)の形態変化と発現遺伝子解析

卵丘細胞卵複合体(COC)の形態変化、遺伝子発現検討を行うため、マウス卵巣より卵丘細胞卵複合体(COC)を取り出し、培養する ex-vivo の系を確立した。

Fig6

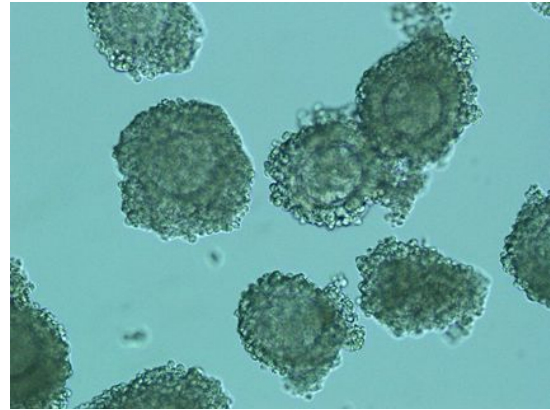


Fig6 に採取時の COC を示した。卵子は卵丘細胞に囲まれた状況である。小卵胞では卵胞液中のテストステロン濃度が上昇していることより、高濃度テストステロン状況下で培養を行った。

Fig7

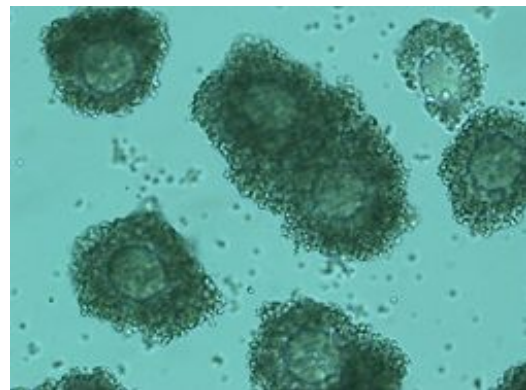


Fig8

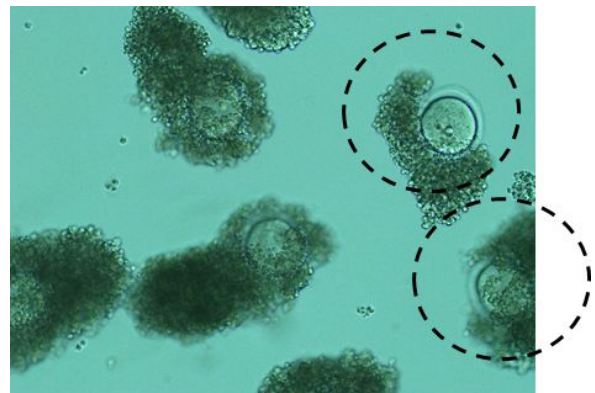


Fig7,8 に培養後 48 時間の COC を示した。Fig7 は通常の培養液で培養したコントロールであり、Fig8 は高濃度テストステロン状況下で培養を行った COC である。テストステロンにより卵丘細胞間の結合力が減少し、卵子がむき出しになる、“denude”現象が認められた。テストステロンによるこの形態変化にかかわっている因子を探索するため、テストステロン暴露下で、排卵に関与していることが示されている、3 遺伝子に関し、発現量の変化を検討した。Ptgs2 (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2) Has2 (Hyaluronan Synthase 2) Tnfaip (TNF alpha induced protein 6)

Fig9

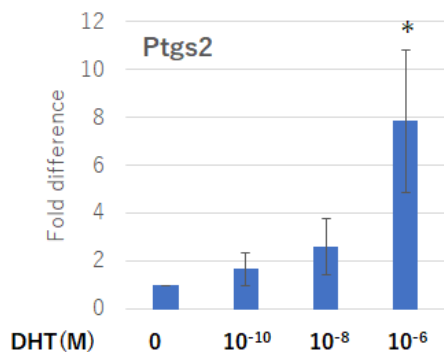


Fig10

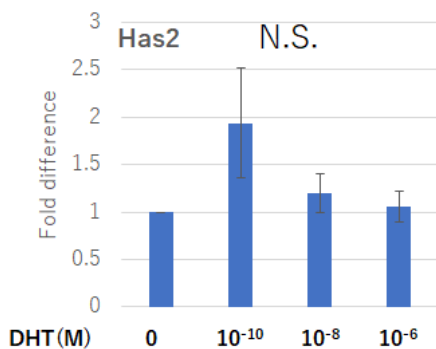


Fig11

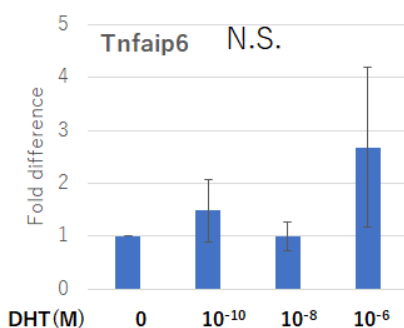


Fig9 に示した通り、テストステロンの影響で、Ptgs2 の発現が上昇している。これかどのように卵丘細胞に影響をもたらしているのか、denude に寄与しているのかは現在精査中で、今後の課題である。

以上

本研究では自然周期による採卵の効率を上げるため、主席卵胞以外の小卵胞に注目し、卵胞径 3-10mm の小卵胞と主席卵胞との穿刺吸引を行い、成熟卵(MII)を得ることに成功した。さらにその成熟卵獲得率を上げる条件を、卵胞液のステロイドプロファイリング、卵丘細胞卵複合体の解析を行うことにより検討した。成熟卵を持つ小卵胞が閉鎖卵胞由来であることを示唆し、さらに高濃度のテストステロンが小卵胞の卵成熟に negative に働くことを示唆した。小卵胞の質的向上を望む場合は、LH サージによる高テストステロン状態に長く置くことは小卵胞において不利な状況となり、LH サージ後、もしくは HCG 投与後、比較的早い段階での採卵が、成熟卵獲得を上げる可能性を示唆している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Bacterial culture-negative subclinical intra-amniotic infection can be detected by bacterial 16S ribosomal DNA-amplifying polymerase chain reaction.

Morimoto S, Usui H, Kobayashi T, Katou E, Goto S, Tanaka H, Shozu M. Jpn J Infect Dis. 2018 Apr 27.

2. Progesterone as a Postnatal Prophylactic Agent for Encephalopathy Caused by Prenatal Hypoxic Ischemic Insult.

Kawarai Y, Tanaka H, Kobayashi T, Shozu M. Endocrinology. 2018 Apr 10.

3. High serum progesterone associated with infertility in a woman with nonclassic congenital adrenal hyperplasia.

Kawarai Y, Ishikawa H, Segawa T, Teramoto S, Tanaka T, Shozu M. J Obstet Gynaecol Res. 2017 May;43(5):946-950.

4. Nondominant small follicles are a promising source of mature oocytes in modified natural cycle in vitro fertilization and embryo transfer.

Teramoto S, Osada H, Sato Y, Shozu M. Fertil Steril. 2016 Jul;106(1):113-118.

〔学会発表〕(計 4件)

1. 日本エンブリオロジスト学会(2018年1月6日、7日、東京)

閉鎖卵胞はプロスタグランジン E2 を合成する

小林達也、田中宏一、大久保毅、石井久美子、藤田真紀、石川博士、生水真紀夫(**最優秀水スター賞受賞**)

2. 第62回日本生殖医学会学術講演会・総会(2017年11月16~17日、下関)

マウス in vitro PCOS モデルを用いたアンドロゲン合成阻害剤の排卵回復作用の検討

小林達也、田中宏一、石井久美子、大久保毅、藤田真紀、石川博士、生水真紀夫

3. 第58回日本卵子学会学術集会(2017年6月2~3日、宜野湾)

アロマトーゼ欠損による高アンドロゲン環境は卵子-卵丘細胞複合体の異常をもたらす

小林達也、田中宏一、石井久美子、藤田真紀、大久保毅、石川博士、生水真紀夫

4. 第61回日本生殖医学会学術講演会(2016年11月3日~4日、横浜)

アロマトーゼ欠損マウスの前胞状卵胞には形態異常が認められる

小林達也、石川博士、藤田真紀、生水真紀夫

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 宏一 (TANAKA, Hirokazu)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70507194

(2)研究分担者

生水 真紀夫 (SHOZU, Makio)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：30226302

(3)研究協力者

小林 達也 (KOBAYASHI, Tatsuya)

千葉大学・医学部附属病院・技術職員

研究者番号：00645640