

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15593

研究課題名(和文)新しいICSIの創出：より自然な注入を回避した配偶子膜融合

研究課題名(英文)Creation of new ICSI:More natural gamete fusion avoiding injection

研究代表者

熊澤 由紀代(Kumazawa, Yukiyo)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：70400504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、次世代の顕微授精法の実現に向け、卵子内への精子の導入を自動化する卵細胞膜穿破を介さない新規顕微授精法の確立を目的とし、マウスをモデルとして不活化センダイウイルスを用いた精子・卵子の膜融合による受精実験を実施した。まず、精子先体外膜除去の為、Ca ionophore A23187を用いた人為的先体反応誘起実験を行った。精子内カルシウム濃度の上昇により先体反応の進行および先体内膜の露出が起こったが、先体反応誘起処理後にセンダイウイルスを用いた融合実験を実施した結果、最終的に精子・卵子の膜融合には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, for the purpose of establishing a novel micro-insemination method without the egg cell membrane penetration, fertilization experiments were conducted by membrane fusion of sperm-eggs using inactivated Sendai virus using mouse as a model. First, in order to remove the outer acrosomal membrane of the spermatozoa, artificial acrosome reaction induction experiments using Ca ionophore A 23187 were performed. Progression of the acrosome reaction and exposure of the inner acrosomal membrane occurred due to elevation of calcium concentration in spermatozoa, but as a result of carrying out fusion experiment using Sendai virus after the acrosome reaction induction treatment, finally sperm-egg membrane fusion did not lead to fusion.

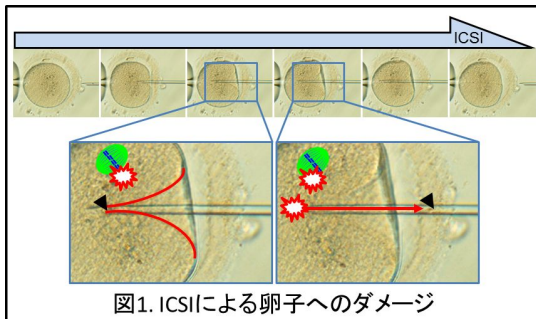
研究分野：産婦人科学

キーワード：顕微授精 センダイウイルス 膜融合

## 1. 研究開始当初の背景

近年の生殖補助医療の高齢化においては、高齢患者や一定の背景をもつ患者に、全ての採卵卵子の細胞膜が非常に脆弱で従来のICSIには耐えられない場合も存在する。また、ICSIによる受精率・変性率および良好胚発生率には少なからず技術者間の差が認められ、不妊症治療の現場では、ICSIの技術の改善と標準化は、依然として望まれる。

ICSIの際、最も自然の受精現象と異なり、かつ卵子が大きくダメージを受けるプロセスは、卵子内へ精子を注入する際の、卵細胞膜の刺破と細胞質の吸引であり、紡錘体の損傷や細胞骨格の破壊等が負の影響として指摘されている(図1)。



この卵細胞質内への精子の導入の行程の自動化、すなわち卵子と精子の人為的膜融合が可能となれば、技術者の違いによる患者への不利益が最小限に抑えることが可能となる。細胞膜の融合を利用した顕微授精は、囲卵腔内精子注入法により試みられた(Ng SC et al. Lancet 1988)。しかし、融合を生理的な現象に求めたため効率是非常に低く、効率改善のために囲卵腔に入れる精子の数を増やした結果多精子受精を増加招き、実用にはいたらなかった。膜融合を人為的に、確実に起こすことにより、一つの卵子への一つの精子の確実な導入が可能となる。細胞膜の人為的融合については、近年、核移植・細胞質置換分野において不活化センダイウイルスがその有用性を報告しており、霊長類の細胞質置換による産仔も報告されている(Tachibana M et al. Nature 2009)。イギリスではミトコンドリア病患者を対象とし、不活化センダイウイルスを用いた細胞質置換がスタートする見通しであり、感染性および増殖性のない不活化センダイウイルスのヒトへの使用についても、一定の安全性が認められている。本研究では、次世代の顕微授精法の臨床応用への可能性を見据え、マウスを

用いた基礎研究により新規顕微授精法の確立を目指す。

## 2. 研究の目的

現行の顕微授精(卵細胞質内精子注入法, Intracytoplasmic sperm injection: ICSI)は、精子注入時の、紡錘体の損傷、細胞骨格の破壊などが指摘されている。近年の生殖医療では拳児を希望する女性が高年齢化しており、より卵子へのダメージが少ない顕微授精技術の改善が望まれる。本研究では、次世代の顕微授精法の実現に向け、卵子内への精子の導入を自動化する卵細胞膜穿破を介さない新規顕微授精法の確立を目的とし、マウスをモデルとして以下の項目について検討する。

1. 不活化センダイウイルスを用いた精子卵子人為的膜融合(受精)法の至適条件の決定

2. 膜融合胚と、従来の顕微授精法による胚の、発生能、着床能、正常発育能の比較

3. 膜融合法と顕微授精法施行時の雌雄核細胞周期および細胞膜細胞質への影響の比較検討

4. 加齢固体からの卵子を用いた膜融合法の有用性の検証

## 3. 研究の方法

不活化センダイウイルスの膜融合能を用い卵子内に精子を導入する新規顕微授精法を開発し、それにより得られた産仔の正常性を確認するために、本研究計画では以下の研究項目を予定している。

1. 不活化センダイウイルスを用いた精子卵子人為的膜融合(受精)法の至適条件の決定

2. 膜融合胚と、従来の顕微授精法による胚の、発生能、着床能、正常発育能の比較

3. 膜融合法と顕微授精法施行時の雌雄核細胞周期および細胞膜細胞質への影響の比較検討

4. 加齢固体からの卵子を用いた膜融合法の有用性の検証

**不活化センダイウイルスを用いた精子卵子人為的膜融合(授精)の至適条件の決定**

精子-卵子細胞膜融合は、マイクロマニピュレーターを用いて行う。ホールディングピペットに卵子を固定し、透明帯の貫通まで

は Piezo-ICSI と同様に Piezo パルスにより行う。インジェクションピペットに精子とセンダイウイルス懸濁液を吸引し、卵細胞質に接着させ、膜融合を誘導する(図2)。

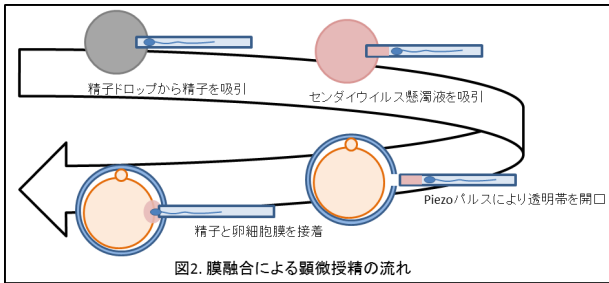


図2. 膜融合による顕微授精の流れ

膜融合(受精)の効率を最大にする至適条件について、以下の3項目について検討する。

### 精子先体膜の有無が膜融合に与える影響

センダイウイルスを用いた人為的膜融合において、融合前に先体反応が必須か否か、すなわち先体外膜と卵細胞膜が融合可能かどうかについては、知見はない。

本来自然の受精では、卵細胞膜と、先体反応後の精子の先体内膜が融合する。先体反応は、先体外膜が破れ、内包された先体酵素が放出され、最終的に先体内膜が露出することで完了する(図3)。

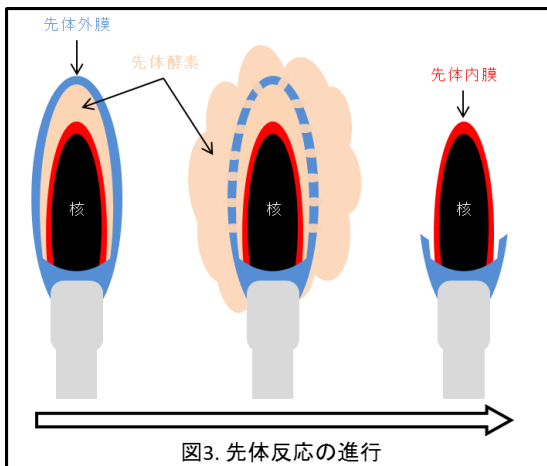


図3. 先体反応の進行

先体外膜と先体内膜の卵細胞膜への融合性の高さを、インタクトな精子と先体反応誘起精子を用いて評価し、膜融合の前処理として精子先体反応の誘起を必要とするかを確認する。

先体外膜の融合性に先体内膜に比して非劣性が確認された場合、先体反応の誘起の必要はなくなる。

### センダイウイルス懸濁液濃度

細胞(膜)の種類により使用するセンダイウイルス懸濁液濃度と融合効率の関係は異なる(本杉, 木村ら。

<http://www.iskweb.co.jp/hvj-e/>). 成熟

精子と卵細胞膜の融合効率を最大にするべく、至適センダイウイルス懸濁液濃度を決定する。

### 精子-卵子の接着時間と感作温度

センダイウイルスは、低温(0~8 )で速やかに細胞表面に吸着し、それを加温(37 )すると接着細胞同士の細胞膜融合が進行する。しかし、この原理にしたがい卵子を低温でハンドリングすることは、紡錘体を形成する微小管の不可逆的な脱重合を引き起こし不受精に繋がるため、避ける必要がある。感作温度を微小管の重合を維持できる範囲に留める場合、配偶子間の膜融合には数分から十数分の時間を要することが予測され、卵細胞膜に精子を接着させた状態を保持する時間が必要だと考えられる。しかし、インキュベーター外での胚の操作時間の延長による温度および培養液 pH 変動は、授精および胚発育に悪影響を与える。以上を踏まえ、受精および発生への影響を最低限に抑え融合効率を維持できる適正温度を決定する。

### 膜融合により受精した胚と、従来の顕微授精法により受精した胚の、発生能の比較

膜融合胚と顕微授精胚の発生能を、Day3 良好胚率、Day5 胚盤胞形成率、Day5 良好胚盤胞率について比較する。また、タイムラプスインキュベーターを用い、卵子内への精子の導入から、第二極体放出時間、雌雄前核形成時間、前核期継続時間、第一卵割時間、それ以降の各ステージへの発生速度についても詳細に比較する。いずれかのポイントについて発生時間の遅延が生じた場合、それに関わる細胞周期に異常が存在する可能性を検出できる。

### 膜融合胚と顕微授精胚の、着床能、仔への正常発育能の比較

膜融合胚と顕微授精胚の着床能、仔への正常発育能を、偽妊娠させたマウスへの移植実験により検討する。得られた産仔の寿命、経代的な繁殖能に関しても検討する。

### 膜融合による受精と、従来の顕微授精法による受精の雌雄前核の細胞周期の検討

従来の膜融合を介さず直接注入する顕微授精法では、先体部の精子核の脱凝縮が遅延する異常な前核形成が観察されている。また、直接注入例では雌雄前核が DNA 合成期(S 期)にシンクロナイズして移行しない不自然な現象が観察されている。(Terada et al.

MRD2000) そこで、膜融合による受精誘起後のマウス受精卵の前核形成時の形態およびそれぞれの核のS期への移行を傾向染色およびBrdUの取り込みで確認する。直接注入よりもより自然の受精(精子核が均一に脱凝縮し、雌雄前核が同時期にS期に移行する)に近い所見が得られることでこの方法の利点を確認される。

#### **膜融合による受精と、従来の顕微授精法による受精の卵子細胞質に与えるダメージの検討**

それぞれの方法で精子が卵子内に存在した段階で、卵子を固定して細胞膜の裏打ち構造を構成する細胞骨格系(microfilamentsを中心とした構造群)の形態解析を行う。また、配偶子操作の卵子へのダメージの直接的な結果は卵子細胞質内ミトコンドリア機能である。それぞれの胚のミトコンドリア活性を、膜電位測定プローブJC-1を用いて比較検討する。

#### **加齢固体よりの卵子への有用性の検討**

マウスにおいても加齢した固体より得られた卵子の発生能は低く、精子の顕微注入操作後の生存性、発生能が低いことが知られている。加齢固体より得られた卵子をもちいて、膜融合法および直接注入法を施行して得られた胚の発育能、着床能を比較検討する。これにより、膜融合法が発生能の低下した加齢固体からの卵子の受精法として適しているかを確認する。

#### **4. 研究成果**

本研究では、次世代の顕微授精法の実現に向け、卵子内への精子の導入を自動化する卵細胞膜穿破を介さない新規顕微授精法の確立を目的とし、マウスをモデルとして不活化センダイウイルスを用いた精子・卵子の膜融合による受精実験を実施した。

まず、精子先体外膜除去の為、Ca ionophore A23187を用いた人為的先体反応誘起実験を行った。精子内カルシウム濃度の上昇により先体反応の進行および先体内膜の露出が起こったが、先体反応誘起処理後にセンダイウイルスを用いた融合実験を実施した結果、最終的に精子・卵子の膜融合には至らなかった。

#### **5. 主な発表論文等**

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Onodera Y, Takahashi K, Goto M, Anzai M, Ono N, Shirasawa H, Sato W, Miura H, Sato N, Sato A, Kumazawa Y, Terada Y: The location of "8"-shaped hatching influences inner cell mass formation in mouse blastocysts. PLOS ONE (査読有) 12(4):e0175150(2017)

DOI:10.1371/journal.pone.0175150

Shirasawa H, Terada Y: In vitro maturation of human immature oocytes for fertility preservation and research material. Reproductive Medicine and Biology (査読有) 16:258-267(2017)

DOI:10.1002/rmb2.12042

Shirasawa H, Kumazawa Y, Sato W, Ono N, Terada Y: In vitro maturation and cryopreservation of oocytes retrieved from intra-operative aspiration during second enucleation for ovarian tumor: a case report. Gynecologic Oncology Reports (査読有) 19:1-4(2016)

DOI:10.1016/j.gore.2016.11.009

Shimoda Y, Kumagai J, Anzai M, Kabashima K, Togashi K, Miura Y, Shirasawa H, Sato W, Kumazawa Y, Terada Y: Time-lapse monitoring reveals that vitrification increases the frequency of contraction during the pre-hatching stage in mouse embryos. J Reprod Dev (査読有) 62(2):187-193(2016)

Doi:10.1262/jrd.2015-150.

Togashi K, Kumagai J, Sato E, Shirasawa H, Shimoda Y, Makino K, Sato W, Kumazawa Y, Omori Y, Terada Y: Dysfunction in gap junction intercellular communication induces aberrant behavior of the inner cell

mass and frequent collapses of expanded blastocysts in mouse embryos. J Assist Reprod Genet (査読有)32:969-976 (2015)

Doi: 10.1007/s10815-015-0479-1

Shirasawa H, Kumagai J, Sato E, Kabashima K, Kumazawa Y, Sato W, Miura H, Nakamura R, Nanjo H, Minamiya Y, Akagami Y, Terada Y: Novel method for immunofluorescence staining of mammalian eggs using non-contact alternating-current electric-field mixing of microdroplets. Scientific Reports(査読有) 5:15371 (2015)  
Doi:10.1038/srep15371

[学会発表](計6件)

小野寺洋平, 尾野夏紀, 白澤弘光, 佐藤亘, 熊澤由紀代, 寺田幸弘 (2017) 内部細胞塊の評価と孵化についての検討  
第21回日本生殖内分泌学会、1月、大阪

Shirasawa H, Kumazawa Y, Sato W, Ono N, Kodama H, Terada Y (2017) In vitro maturation of immature human oocytes retrieved from non-stimulated ovaries resected from patients with gynecologic cancer and from intraoperatively non-stimulated ovaries in patients undergoing surgery for non-cancer indications  
第69回日本産科婦人科学会、4月、広島

Onodera Y, Ono N, Shirasawa H, Sato W, Kumazawa Y, Terada Y (2017) Eight-shaped hatching occurred near ICM induces spreading of the ICM  
第69回日本産科婦人科学会、4月、広島

下田勇輝, 富樫嘉津恵, 三浦康子, 佐藤亘, 佐藤敏治, 牧野健一, 熊澤由紀代, 熊谷仁, 寺田幸弘 (2016) 凍結解凍操作はタイムラプス観察で認められるマウス胚の収縮運動を増加させる。  
第68回日本産科婦人科学会、4月、東京

白澤弘光, 尾野夏紀, 佐藤亘, 熊澤由紀代, 寺田幸弘 (2016) 片側のみ卵巣が残存し核出既往のある患者において, 非卵巣刺激下に行う手術時の未成熟卵子回収個数をいかに予測するか。  
第61回日本生殖医学会、11月、横浜

小野寺洋平, 尾野夏紀, 白澤弘光, 佐藤亘, 熊澤由紀代, 寺田幸弘 (2016) マウス胚盤胞期胚の虚脱に関する細胞生物学的解析。  
第61回日本生殖医学会、11月、横浜

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

[その他]  
ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熊澤由紀代 (KUMAZAWA, Yukiyo)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号: 70400504

### (2) 研究分担者

佐藤亘 (SATO, Wataru)  
秋田大学・医学部・助教  
研究者番号: 10726441

白澤弘光 (SHIRASAWA, Hiromitsu)  
秋田大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 60598019

熊谷仁 (KUMAGAI, Jin)  
秋田大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号: 60333936

椋嶋克哉 (KABASHIMA, Katsuya)  
秋田大学・医学部・技術系補佐員  
研究者番号: 30615422

佐藤恵美子 (SATO, Emiko)  
秋田大学・医学系研究科・技術系補佐員  
研究者番号: 00638273

(3)研究協力者

長谷川久隆 (HASEGAWA,Hisataka)

神奈川レディースクリニック・胚培養士