

平成 21年 4 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591886
 研究課題名 (和文) 精子の細胞膜コレステロールと先体がもたらす ICSI 受精卵の遺伝的リスク
 研究課題名 (英文) Genetic risks of sperm plasma membrane cholesterol and acrosome in ICSI embryos
 研究代表者
 立野 裕幸 (TATENO HIROYUKI)
 旭川医科大学・医学部・教授
 研究者番号：80163492

研究成果の概要：精子を卵子に直接注入する卵細胞質内精子注入法 (ICSI) で作製したマウス受精卵では染色体の構造異常率が増加するが、精子の細胞膜から予めコレステロールを除去しておくことと異常率の増加を抑えられることが明らかになった。一方、強制的に先体反応を誘起した精子を使用した場合には異常率の増加を抑制できなかった。以上の結果は、精子細胞膜のコレステロールが ICSI 受精卵における構造的染色体異常の原因の 1 つであることを示唆する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：細胞遺伝学、生殖生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖工学、マウス、ICSI、精子、染色体異常、コレステロール、先体

1. 研究開始当初の背景

卵細胞質内精子注入法 (ICSI 法) はヒトの男性不妊症の治療にとって不可欠の生殖補助技術となっている。その一方で、ICSI 法の遺伝的リスクを懸念する声もある。ヒトの ICSI 胎児や ICSI 新生児の染色体検査では染色体異常頻度が自然妊娠や通常の体外受精 (IVF) による妊娠に比べて有意に高いという報告がある。マウスでは ICSI 受精卵の構造的染色体異常率は通常の IVF 受精卵のおよそ 6 倍高いことが示されている。染色体異常との関連性については不明であるが、マウスやブタ、リスザルの ICSI 卵において、精子核の脱凝縮 (リモデリング) が変則的である

ことも報告されている。同様の現象はハムスター卵に注入されたヒト精子核においても観察されている。この精子核のリモデリング異常は、正常受精では卵子内に入らない先体が ICSI 法では注入されるために起こるのではないかと考えられている。これと関連して、先体酵素が卵子の細胞骨格を障害して卵子を退行変性させることも報告されている。

これまでのマウスを用いた研究において、ICSI 受精卵の構造的染色体異常率は精子の培養条件に依存して変化することが明らかになっている。すなわち、重炭酸イオン緩衝系培養液 (TYH、mCZB)、ヘパース緩衝系培養液 (H-TYH、H-mCZB)、およびリン酸緩衝系培

養液 (PB1) を使用し、培養時間を 0 時間、0.5 時間、2~2.5 時間、6 時間の 4 段階に変えて染色体に及ぼす影響を調べたところ、0 時間培養と 0.5 時間培養の精子に由来する ICSI 受精卵では、培養液の種類にかかわらず構造的染色体異常率が IVF 受精卵に比べて 3~5 倍高かった。また、H-TYH、H-mCZB および PB1 を使用すると培養時間に依存してさらに異常率が増加した。ところが、TYH 培養液の使用では、培養時間が長くなるにつれて異常率は IVF 受精卵のレベルまで低下した。

TYH はマウス精子の受精能獲得用培養液であり、この培養液中で精子を 90 分以上培養しておく、およそ 80% の精子が受精能を獲得し、40% ほどの精子は先体反応を起こすと報告されている。受精能獲得の過程で見られる大きな生化学的変化の 1 つは細胞膜からコレステロールが外れることであり、これが先体反応の引き金になる。コレステロールの遊離は細胞膜の柔軟性を向上させ、各種イオンチャンネルを活性化させる。受精能獲得が不十分で、ICSI の際にコレステロールや先体がそのまま卵内に持ち込まれたならば、精子核のリモデリングが正常に進行せず、DNA が傷害を受けてしまう可能性も指摘されている。

マウスやハムスターを用いた研究によれば、精子核のリモデリングに卵子由来のトポイソメラーゼが働いており、この酵素の阻害剤は DNA 切断や染色体切断を高頻度で誘発することがわかっている。このように、受精後の精子核リモデリングは染色体の正常性を維持する上で極めて重要なステップである。

ICSI によって卵内に持ち込まれる細胞膜コレステロールや先体が精子核のリモデリングを障害し、結果的に受精卵の染色体に異常を引き起こすのか。これはヒトの ICSI 法をより安全なものにするために、早急に取り組まなければならない重要な課題である。

2. 研究の目的

マウスをモデルにして以下の4点について調査する。

(1) 細胞膜のコレステロール含有量が少ない精巣精子を、TYH、H-mCZB、およびPB1で培養してから作製したICSI受精卵の染色体を分析し、細胞膜コレステロールが少ない場合でも染色体異常率が時間依存的に変化するかどうかを調べる。

(2) 精巣上体尾部精子の細胞膜からコレステロールを取り外してICSIした場合、受精卵の染色体異常率が低下するかどうかを調べる。

(3) 先体反応を誘起した精巣上体尾部精子をICSIした場合、受精卵の染色体異常率が低下するかどうかを調べる。

(4) 細胞膜のコレステロール含有量を増やして受精能獲得や先体反応を起こりにくくしてからICSIした場合、受精卵の染色体異常率が増加するかどうかを調べる。

以上の結果から、ICSI受精卵の構造的染色体異常の生成に精子の細胞膜コレステロールや先体(酵素)がどのように関わっているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 精巣精子に由来する ICSI 受精卵の作製
成熟した雄マウス (B6D2F1) の精巣を採取し、TYH、H-mCZB、PB1 中で細切した。上層の精子を回収し、各培養液中で 0.5 時間および 6 時間培養 (37°C) した後に、同系マウスの卵子に注入し ICSI 受精卵を作製した。

(2) メチルβシクロデキストリン (MβCD) によるコレステロールの除去と受精卵の作製
精巣上体尾部精子を採取し、MβCD (1mM) を含む H-TYH 中で 3~3.5 時間培養 (37°C) した後、ICSI 受精卵を作製した。また、MβCD が精子 DNA に対して直接的な影響を及ぼすかどうかを調査する目的で、MβCD 処理精子を用いて IVF 受精卵を作製した。

(3) カルシウムイオノフォア (A23187) による先体反応の誘起と受精卵の作製
カルシウム濃度を 2 倍に高めた修正 TYH 中に A23187 を 20 μM の濃度で添加し、その中で精巣上体尾部精子を 10 分間処理 (37°C) した。(2) と同様に、処理精子を用いて IVF 受精卵と ICSI 受精卵を作製した。

(4) 精子細胞膜へのコレステロールの付加および受精卵の作製
水溶性コレステロール、あるいはコレステロール負荷 MβCD を 3 mg/ml の濃度で精子培養液に添加した。その中で精子を 1 時間処理してから ICSI 受精卵を作製した。

(5) 先体反応の検出
MβCD および A23187 で処理した精子の先体を FITC-標識レクチン (PNA) で染色し、先体反応の誘起率を調査した。

(6) 染色体標本作製および染色体分析
(1)~(4) で作製した受精卵を第一卵割中期まで発生させ、透明帯除去、低張処理を施した後、漸進固定空気乾燥法を用いて染色体標本作製した。通常のギムザ染色法と動原体部を染色する C 分染法を用いて染色体分析を行った。本研究では、特に断わらない限り、各実験群 200 個以上の受精卵を分析して染色体異常率を算出した。

4. 研究成果

(1) 精巣精子由来の ICSI 受精卵の染色体分析

精巣精子に由来する ICSI 受精卵では、精子培養液の種類や培養時間にかかわらず、構造的染色体異常率は 7.4~11.7% とほぼ一定であった。この結果を精巣上体尾部精子由来の ICSI 受精卵の分析結果と比較すると、0.5 時間培養では精子の由来による違いはなかったが、6 時間培養では培養液によって異常率に差が認められた (図 1)。

この結果から、細胞膜コレステロール含有量の少ない精巣精子に由来する ICSI 受精卵の構造的染色体異常率は精子の培養条件によってほとんど影響を受けないことが明らかになった。同時に、H-mCZB と PBI の 6 時間培養でみられた精巣上体尾部精子由来の ICSI 受精卵における構造的染色体異常の増加は、精子 DNA に対する培養液の直接的な損傷によるものではなく、ICSI 後の卵細胞質内で二次的に生じた DNA 損傷に起因するものであることが示唆された。

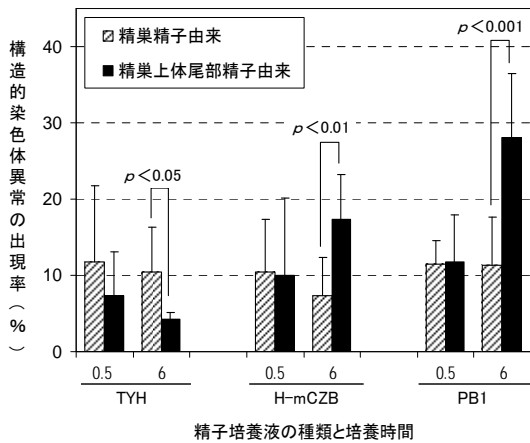


図 1 精巣精子由来と精巣上体尾部精子由来の ICSI 受精卵における構造的染色体異常率の比較

(2) MβCD による先体反応と受精卵の染色体分析

MβCD によって先体反応を起こした精子の割合は 83% と高く、MβCD によって細胞膜のコレステロールを除去すると、これが引き金となって効率よく先体反応が起こることが明らかになった (図 2)。

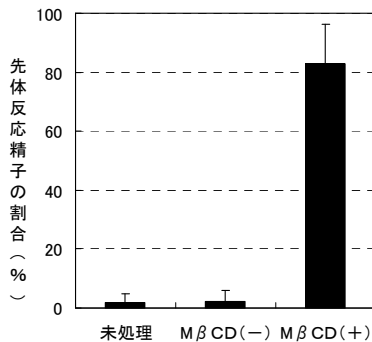


図 2 MβCD による先体反応の誘起

MβCD 処理精子 (+) に由来する IVF 受精卵の構造的染色体異常率は未処理精子 (-) に由来する IVF 受精卵のそれとほぼ等しく、MβCD には染色体異常誘発能のないことが明らかになった (図 3)。一方、ICSI 受精卵の染色体異常率は MβCD 処理精子 (+) 由来の方が未処理精子 (-) 由来のものよりも有意に低かった。すなわち、MβCD 処理によって予め細胞膜からコレステロールを除去し、先体反応を誘起しておくことが構造的染色体異常の増加を抑制するのに効果的であることが示している。

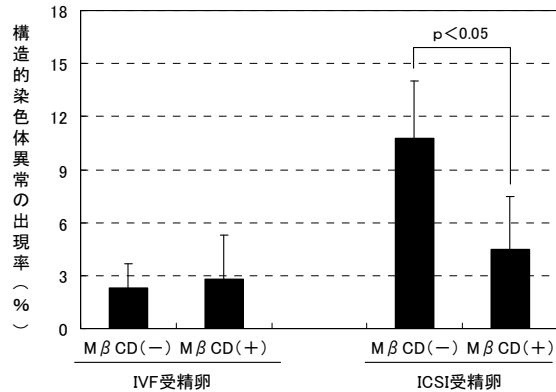


図 3 MβCD で処理された精子に由来する IVF 受精卵と ICSI 受精卵の構造的染色体異常率の比較

(3) A23187 による先体反応と受精卵の染色体分析

A23187 による先体反応の誘起率は、採取後すぐに精子を処理した場合 (培養なし)、処理後に 2 時間培養した場合 (後培養)、あるいは精子をあらかじめ 2 時間前培養してから処理した場合 (前培養) で異なったが、いずれも高率で先体反応が誘起され、A23187 がマウス精子の先体反応の誘起に有効であることが明らかになった (図 4)。

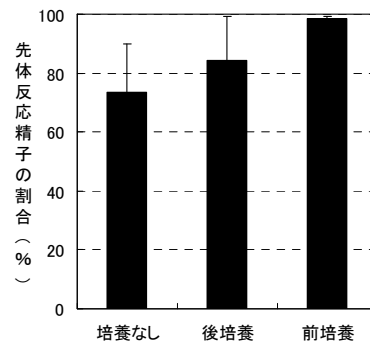


図 4 A23187 による先体反応の誘起

A23187 で処理した精子を利用して作製した IVF 受精卵の構造的染色体異常率は、1.1~2.8% で 3 群間に有意差はなかった (図 5)。これらの値は、A23187 で処理しない精子を用いて作製した IVF 受精卵の異常率 (2.7%) と同様であった。この結果から、A23187 は精

子 DNA に対して直接的な損傷を与えないことがわかった。ところが、A23187 で処理された精子に由来する ICSI 受精卵では、対応する IVF 受精卵に比べて構造的染色体異常率が顕著に高かった。異常率が最も高かったのは培養なし群で、これに比べ、後培養群、前培養群では有意な減少が認められた。この減少は、図 4 で示した先体反応率と逆の関係にあることから先体反応の誘起が異常率の低下に少なからず関わっていることを示唆している。

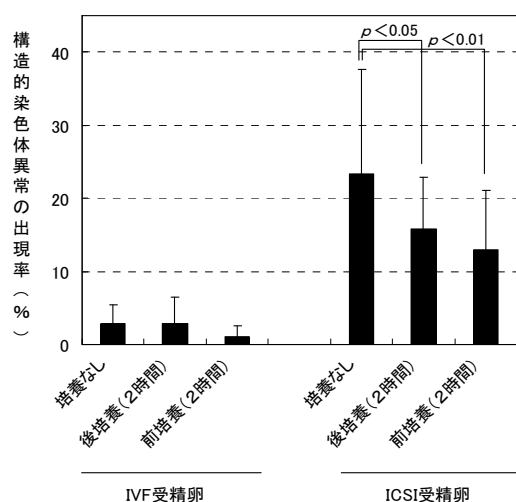


図5 A23187で処理された精子に由来するIVF受精卵とICSI受精卵の構造的染色体異常率の比較

以前の研究において、A23187 で処理せずにTYH中で2~2.5時間前培養してから作製したICSI 受精卵の構造的染色体異常率は3.8%であった。ところが前培養後にA23187 処理を加えると図5に示したように異常率がおおよそ3倍に上昇した。この上昇はA23187 による直接的な精子DNAの損傷によるものでないことは同図にあるIVF 受精卵の染色体分析結果からも明らかである。A23187 の精子細胞膜内における動態については不明であるが、もしも細胞膜内に留まっているならばICSI によって卵内に持ち込まれ、二次的に染色体異常を誘発した可能性も考えられる。

A23187 は先体反応の誘起剤として広く研究に利用されている。今回の研究において、A23187 で先体反応を誘起された精子由来のICSI 受精卵では構造的染色体異常率が低下せず逆に増加したことは予想外の結果であり、今後、補助生殖技術分野におけるこの薬品の使用法について再検討する必要がある。

(4) コレステロール付加精子由来のICSI 受精卵の染色体分析

精子にコレステロールを付加する方法として、コレステロールを負荷したMβCDを作製して培養液に添加するか、もしくは市販の水溶性コレステロールを培養液に添加する

方法がある。ところが、いずれの方法も精子に対する細胞毒性が強く、5mg/mlの濃度で2時間処理するとほとんどすべての精子が運動性を失い死滅した。そこで、濃度を3mg/mlに下げ、処理時間を1時間に短縮した条件下で精子を処理してICSI 受精卵を作製した。現在までのところ、58例の染色体分析を行い、構造的染色体異常を有するものは8例(13.8%)であり、特に異常率の顕著な増加は認められていない。

精子頭部の細胞膜にはすでに十分な量のコレステロールが分布しているため、外部からコレステロールを添加してもほとんど付加されないという指摘もある。今回の方法によってどれだけのコレステロールが精子頭部の細胞膜に付加されたかを検証するとともに、コレステロールの適切な付加方法について再度検討を加える必要がある。

なお、本研究ではICSI法やIVF法で作製した受精卵に出現する構造的染色体異常の検出に加え、異数性についても調査を行ったが、いずれの実験群においても頻度の有意な増加は認められなかった。したがって、これらの補助生殖技術自体が異数性生成のリスク因子となる可能性は低いと考えられる。

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2件)

- ① Tateno H, Chromosome aberrations in mouse embryos and fetuses produced by assisted reproductive technology, Mutation Research(査読有), 657, 2008, 26-31.
- ② 立野裕幸, ICSIと染色体、産婦人科治療(査読無)、96、2008、357-361.

〔学会発表〕(計7件)

- ① 立野裕幸, 配偶子における染色体異常、第14回日本エンブリオロジスト学会、平成21年3月21日、札幌.
- ② 立野裕幸, 精子操作と染色体異常—マウスART研究から見えてくるもの—、第8回東海不妊内分泌研究会、平成21年1月31日、静岡.
- ③ 立野裕幸, トポイソメラーゼII阻害剤による受精期マウス精子核の染色体異常、日本環境変異原学会第37回大会、平成20年12月4~6日、沖縄.
- ④ 立野裕幸, マウスICSI法に潜む構造的染色体異常のリスク因子、第10回RMB(生殖医学・生物学)研究会シンポジウム、平成20年7月26日、東京.
- ⑤ 立野裕幸, マウスの精巣上体尾部および

精巣精子に由来するICSI受精卵の染色体分析、第50回日本生殖医学会北海道地方部会、平成20年3月1日、札幌。

- ⑥ 立野裕幸、マウス卵細胞質内精子注入法（ICSI法）で作製した受精卵に由来する胎仔および精巣内未熟精子に由来する受精卵の染色体分析、第58回染色体学会・第17回染色体コロキウム、平成19年11月26～28日、葉山（神奈川）。
- ⑦ Tateno H., Chromosome aberrations in mouse embryos and fetuses produced by assisted reproductive technology、第8回国際染色体異常シンポジウム、平成19年10月4～6日、淡路（兵庫）。

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立野 裕幸 (TATENO HIROYUKI)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：80163492

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし