

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592420

研究課題名(和文) 生殖補助医療：走化性による新規精子選別法を目指したマウス精子による検討

研究課題名(英文) Development of the method of selecting the sperm in the ART (Assisted reproductive technology)

研究代表者

杉山 仁 (Sugiyama, Hitoshi)

沖縄科学技術大学院大学・サイエンス・テクノロジー・グループ・リサーチサイエンティスト

研究者番号：70301596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：顕微授精法(ICSI)を用いた体外受精では、一つの精子で授精が可能である。ICSIでは自然妊娠で働くであろう生理的選択は起きず、ICSIの施行者が1個の精子を選択することになる。この問題に対処するため、本研究では高度な精子選別法の開発を目指した。選別された精子の遺伝的正常性を解析するために、数種の解析法と染色体解析のために必要なマウスICSI法の技術習得を試みた結果、問題なく実施可能になった。一方、本研究では哺乳類精子の走化性を精子選別に利用できるかどうか検討したが、今回用いた解析法では明らかな走化性を検出することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：In in vitro fertilization using intracytoplasmic sperm injection (ICSI), a single sperm is injected directly into an egg. Although the physiological separation acts in the natural pregnancy, a sperm provided to ICSI is chosen by an embryologist. We customized method of ICSI and some methods for analyses of the sperm DNA fragmentation in mice to perform in our laboratory, and then it was examined whether chemotaxis could use for mammalian sperm separation in this study, but it could not detect the chemotaxis by methods that we used.

研究分野：医歯薬学

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：生殖医療 精子 走化性 受精

1. 研究開始当初の背景

(1) 生殖補助医療における精子の調整

生殖補助医療 (assisted reproductive technology, 以下 ART) における体外受精法の発達により、使用する精子の数は少なくなり、卵細胞質内精子注入法 (以下 ICSI) を用いた体外受精では一つの精子で受精が行われる。ICSI の場合には、自然妊娠の際に働くであろう生理的選択は働かず、ICSI の施行者が 1 匹の精子を選択することになる。

しかし、ヒト精子をハムスター卵に受精、膨化させ染色体分析した結果、15% にも及ぶ精子に染色体異常を認め、ICSI により新生児の遺伝子異常頻度が上昇にするか否かは相反する報告があり、不明である。これは受精後出産に至るまでに異常胚が淘汰され、新生児では差の検出が困難になるためと思われる。つまり、精子調整により異常精子を排除することができれば、新生児の遺伝子異常の減少、さらに ICSI における出生率の大幅な改善が期待できる。

精子成熟には約 74 日を要し、第二減数分裂以降に生じた DNA 損傷は修復されずに蓄積する。精子の自然選別は精子形成からはじまり、一部の精細胞は造精過程でアポトーシスにより排除され、排除されずに射出された中でも遺伝子異常精子が混在する。射出精子は雌性生殖路の遡上過程で精漿、細菌等の除去、運動精子の選別、さらに受精能獲得、先体反応等を経て卵との融合が可能となる。この遡上過程で精子は選別を受け、卵管膨大部に到達するのはマウスでは数十個、人では数百程度であるといわれている。精液所見の悪化は到達精子数の減少を意味し、ART ではその対策として体外受精-胚移植法を実用化してきた。この技術では遡上過程の自然選別がすべて省かれる。さらに、精子を穿刺挿入する ICSI では配偶子間の接触、融合までも省略される。それゆえ、遺伝的に不適切な精子による受精を回避するため、精子は高度な選別が要求される。ART における精子の調製は自然選別を代行することであり、特に ICSI においては遺伝子異常精子の選別法の確立が強く望まれる。

ICSI では主に遠心分離法と swim up 法の組み合わせにより選ばれた精子群から光学顕微鏡下で運動および形態が良好と思われる精子を選択し、尾部を傷つけ不動化した精子を卵内に穿刺挿入する。強拡大顕微鏡観察 (600 - 1000 倍以上) による形態的選別が導入されつつあるが、依然 DNA 損傷を有するような不適切な精子を選択する危険性が残る。もっとも確実なのは、遺伝子異常の有無を確認した後、分析精子そのものを使用することであるが、これを可能にする分析法はない。よって、異常精子を高度に排除し得る選別法を実用化することが急務である。

(2) Cysteine-rich secretory proteins (CRISPs)

哺乳類の CRISPs はゲノム上の CRISPs ク

ラスターにコードされており、ゲノム上にマウスでは 4 種類、ヒトでは 3 種類が確認される。CRISP は精細胞とセルトリ細胞との接着に必須な分子であり、精子形成に不可欠である。また、雌性生殖路において CRISPs は、1) 精子の卵管壁への付着を担い、CRISP が切断されることで卵管壁から精子は遊離する、2) 受精能獲得抑制因子として作用する、3) 透明体タンパク質 (ZP-3) を感知して先体反応を誘起する、4) 先体反応により新たに露出した細胞膜上に存在し、卵細胞との膜融合を引き起こす。以上の事実から、CRISP が異常であれば自然受精はほぼ不可能である。

Xenopus laevis (以下 *Xenopus*) の jelly layer から精子の走化因子として発見された allurin は CRISP ファミリーに属し、脊椎動物で初めて精子の走化因子として同定された約 21 kDa のタンパク質である。最近、allurin は近縁の両生類の精子にも作用することが確認された。さらに、哺乳類の CRISPs との相同性も高い。

これらの状況から、哺乳類精子が allurin に対し走化性を示す可能性があり、allurin による哺乳類精子の誘引、選別に成功すれば、ヒト精子への応用が現実味を帯びてくる。また、既存の方法とは異なる原理に基づいた新規選別法を組み合わせることで、より高度な選別が可能であり、精子形成および受精の過程で広範に働くタンパク質群、CRISPs を利用した精子選別法の優位性を予測できる。allurin による走化性を利用した新規選別法を生殖補助医療に利用できれば、現在 ART で行われている精子調整のための swim up 法と置き換えることで、煩雑化することなく高度な精子の選別が可能になる。本研究の成果は ICSI による新生児の遺伝子異常率の低減、さらには ICSI による出生率の大幅な改善が期待できる。

2. 研究の目的

ART における体外受精、特に ICSI に供する精子の新規選別法を開発し、異常精子を高度に排除し得る選別法を実用化することが本研究の最終目的である。

新規選別法に利用できる精子の既知の性質はいくつかあると考えられるが、本研究では、まず、allurin による哺乳類精子の誘引が可能であるか検討する。

本研究では、まず、allurin の精子誘因活性の特徴を解析する。ついで、マウス精子への allurin の作用を検討する。マウス精子への活性が明らかになった時点で、マウス精子の選別法の至適化を図る。選別された精子群において、その遺伝的正常性を、DNA の断片化を指標に検討し、allurin に対する走化性による精子選別が有用であるか検討する。その後、新規の選別法を確立し、体外受精に適した精子の選別を可能にする。さらに、選別デバイスの設計、検討を行い、走化活性ペプチドを作成することによりヒト精子への応用を

目指す。将来的には走化性を利用した新規選別法を生殖補助医療の現場へ提供することを最終目的とする。

3. 研究の方法

まず、研究方法の概略であるが、最初に *Xenopus* 精子に対する allurin による走化活性の特徴を解析した。これは、のちに哺乳類精子に allurin を作用させたときに、正常な走化活性を発揮しているかどうかの判断に必要である。次に、哺乳類精子に対する allurin の作用を検討した。この目的には実験の容易さから、マウス精子を用いた。さらに、将来的にマウス精子の DNA 断片化の評価を行うことになるので、その解析法の条件検討を行った。

(1) 精子調整

Xenopus の成熟雄から精巣を摘出し、フラッシング法により採取した精子を血球計算板を用いてカウントし、 2×10^6 個/ml に調整した。マウスの精子は 8-12 週齢のマウスの精巣上体尾部より精子塊を採取し、Sperm washing medium (Irvine Scientific, Modified Human Tubal Fluid を基礎とした培地) 中で 90 分間培養し受精能獲得を促した後、 2×10^6 個/ml に希釈した。

(2) 組換えタンパク質

TaKaRa PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit を用いて作成した Deletion mutants を用いた。大腸菌に組換えタンパク質の発現を誘導した後、遠心により集菌し、界面活性剤で溶菌した。不溶な組替タンパク質封入体を洗浄、回収し、冷凍保存した。本研究では、この冷凍保存したタンパク質を適宜融解して用いた。融解したタンパク質をグアニジン塩酸で可溶化後、アフィニティーカラムで精製、透析した。

(3) 精子走化性の解析

Xenopus およびマウスの精子は Sugiyama et.al. (2004) に従って two-chamber assay 法にて解析した。概要は次のとおりである。直径 $12 \mu\text{m}$ の細孔を持つ膜で仕切られた 2 つのチャンバーのうち、上のチャンバーに精子懸濁液 $500 \mu\text{l}$ を、下のチャンバーのバッファ中に $100 \mu\text{l}$ の走化因子を静かに apply した。40 分後に走化因子に引き寄せられて下のチャンバーに移動した精子の数をカウントした。この方法では半定量的解析が可能である。

(4) 遺伝的正常性の評価：

以下に記述した 4 種の分析について、解析方法の検討を行った。ただし、近年、ART においてエピジェネティクスに係わる問題提起が散見される。主にはゲノムインプリンティング異常症候群である。今後、場合によっては、インプリンティング制御領域 (imprinting control region, ICR) のインプリント解析を行わなければならない状況も考慮している。その場合、もっとも良く研究されているインプリントは DNA メチル化であり、ICR のメチル化パターンの解析が有用

であると考えている。

精子染色体断片化の組織化学的観察：TUNEL 法で染色体 nick を検出する方法を検討した。常法に従い、nick を FITC ラベル化し、PI で対比染色を行った。nick 陽性精子は緑色、陰性精子は赤色蛍光を発する。一般的に蛍光顕微鏡観察により染色体 nick を有する精子の比率は 99% Percoll 攪拌密度勾配法および 30 分間の swim up 法を行って運動精子を回収した場合、1.0% 程度である。走化性による選別精子での比率を求め、この値と比較することで精子選別法の有用性を確認することができる。

細胞電気泳動による精子染色体断片化の観察：コメット法には DNA の二本鎖切断のみを検出できるニュートラル法と DNA の一本鎖切断、二本鎖切断および alkali-labile site を検出できるアルカリ法がある。本研究ではアルカリ法を検討した。精子をスライドグラス上で agarose に包埋し、1% Triton X-100 で細胞溶解後、300 mM NaOH で 1 分間処理し、中和後電気泳動した。サイバーゴールドを用いて DNA 染色し、蛍光像を顕微鏡観察し、断片化された DNA を持つ精子を確認した。

第一卵割中期における染色体分析：この分析には ICSI 法が用いられる。ICSI は技術的に困難な手法であり、実験に用いるには十分な訓練が要求される。そこで、本研究では研究代表者が技術習得を目的に訓練を開始した。4-8 週齢の雌 ICR へ PMSG と hCG 各 7.5 IU を 48 時間間隔で腹腔内投与し、過排卵処理を施し、卵管膨大部より未受精卵を採取した。0.1% ヒアルロニダーゼで卵丘細胞を除去し、ICSI に用いた。また、凍結未受精卵が使用可能であれば、将来的に実験が容易になるため、新鮮未受精卵による ICSI 法の検討と同時に、簡易ガラス化法による凍結未受精卵による ICSI 法を BDF1 マウスの卵で検討した。凍結融解または新鮮未受精卵に Piezo-pulse により運動性精子の精子頭部のみを分離し、それを卵細胞質内に注入し、初期発生を観察して、ICSI の成否を検討した。染色体分析では、第一卵割中期の染色体標本を作製し、ギムザ染色して染色体分析を行うのが一般的である。

4. 研究成果

本研究課題を開始する前に、allurin の構造と生理活性に注目して研究を開始しており、すでに精子走化性の半定量解析法の確立、卵から抽出した allurin の精製、組替タンパク質の作成が済んでいた。本研究前の予備実験では、精製した allurin は多相性の容量活性曲線を示した。また、本研究で用いた 8 種類の deletion mutant はすでに作成しており、本研究では冷凍保存したタンパク質を用いて、その活性を検討した。その結果、allurin の *Xenopus* 精子に対する活性はこれまでの予備の実験で得られていた結果と同様であった。また、allurin の全長を含む組替タンパク質は *Xenopus* 卵から抽出した native allurin と同様の活性を示した。さらに

deletion mutant の活性解析により、allurin の N 末端付近の領域が多相性活性曲線の発現に必要であることが示唆された。また、予備的に allurin の一部の配列をもとに合成ペプチドを作成してその活性を調べたが、明らかな活性を検出することはできなかった。

マウスの精子に対する allurin の活性を two-chamber assay 法にて解析した。その結果、弱い活性を検出することができたが、結果が安定せず、活性を明確に示すことはできなかった。そこで、精子運動の軌跡を顕微鏡下で記録し、解析する顕微鏡法での解析を試みたが、この解析法の確立には至らなかった。

マウス精子の顕微鏡法による走化活性解析を検討している過程で、マウス精子の「走流性」(精子が溶液の流れに反応して運動する性質)を観察することができた。我々が観察した精子の走流性は培養液の流れに対して上流に向かい移動する正の走流性であった。文献的調査を行ったところ、精子の走流性は哺乳類に特異的であり、卵管膨大部への移動に役立つと考えられた。哺乳類精子の走流性は 1872 年に Lott により報告されたが、この 100 年余りほとんど議論されていなかった。そうした中、本研究の最終年度にあたる 2013 年、Miki and Chlapham がヒト精子も走流性を示すこと、Catsper (Ca²⁺チャネル) の Knock-out mouse の精子は走流性を示さないことを報告した。Catsper は精子のみに発現し、精子の運動制御を担う重要な分子である。走流性のみならず、精子の超活性化にも不可欠であり、さらに哺乳類精子の走化因子候補である progesterone や bourgeonal など多様な分子と結合して Ca²⁺の流入を起こすことから、走化性への関与も議論されている分子である。これらの状況から、走流性を利用して運動精子と非運動精子の分離が可能であり、さらに我々の観察では個々の精子によって遡上の速度に差がみられたこと、PVP 含有培地においても走流性は顕著に観察されることから、高運動能精子の選別に走流性を利用できると考え、さらに文献的調査を行い、得られた知見を本研究の成果の一部として、総説の中で公表した (Sugiyama and Chandler, Protoplasma (2014) 251:461-475)。

これらの解析と並行して、精子の遺伝的正常性の評価法を検討した。その結果、*Xenopus* 精子、マウス精子ともに TUNEL 法による染色体 nick の検出、アルカリ法によるコメット解析での DNA の一本鎖切断、二本鎖切断、alkali-labile site の検出が可能になった。今後、マウス精子の選別が可能になれば、これらの解析により、DNA の断片化を検討することが可能である。また、第一卵割中期における染色体分析を行うために ICSI 法の習得を試みた結果、研究代表者がこの手技を習得するに至った。さらに BDF1 の未受精卵の簡易ガラス化法による凍結保存にも成功し、融解後の卵は光学顕微鏡下における形態では異常が見られなかった。しかしながら、本研

究における予備実験では、凍結-融解未授精卵の ICSI では受精率が低く、染色体解析に用いるには大幅な改善が必要であると結論した。

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 1 件)

Sugiyama H, Chandler DE., Sperm guidance to the egg finds calcium at the helm. Protoplasma. 2014 May;251(3):461-75.

doi: 10.1007/s00709-013-0550-7.

査読有

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 仁 (SUGIYAMA, Hitoshi)

沖縄科学技術大学院大学、サイエンス・テクノロジー・グループ、リサーチサイエンティスト

研究者番号：70301596

(2)研究分担者

船橋 利也 (Funabashi, Toshiya)

聖マリアンナ医科大学、医学部、教授

研究者番号：70229102

(平成 23 年度 4 月から平成 23 年度 8 月まで)

屋宜 千晶 (YAGI, Chiaki)

琉球大学、医学部付属病院、助教

研究者番号：20529341

(平成 24 年度 6 月から平成 25 年度 3 月まで)

安里 こずえ (ASATO, Kozue)

琉球大学、医学部付属病院、助教

研究者番号：30452246

(平成 24 年度 6 月から平成 25 年度 3 月まで)