

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)**研究期間：2007～2009****課題番号：19591901****研究課題名 (和文) ヒト精子核酸-蛋白複合体の不均一性が受精・胚発生に及ぼす影響****研究課題名 (英文) Relationship between heterogeneity of human sperm nuclear chromatin and embryo development in vitro****研究代表者****片寄 治男 (KATAYOSE HARUO)****国際医療福祉大学・大学病院・准教授****研究者番号：90281237**

研究成果の概要 (和文)：ヒト精子核酸-蛋白複合体の不均一性は精子核成熟度を反映する。顕微授精後の胚発生は精子核成熟性が低いほど良好であり、これは精子核蛋白内 S-S 結合の多寡が影響することが示唆された。一方、精子核 DNA 断片化は胚発生を有意に阻害した。

研究成果の概要 (英文)：It was suggested that oocytes injected with sperm nuclei with poor S-S bonds have more developmental potency than that with S-S rich sperm nuclei. Moreover, it has been pointed out from the assessment of DNA fragmentation that oocytes injected with genetically impaired nuclei have little potency to develop beyond 8 cell stage embryo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分野・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖、精子、核酸、蛋白、受精

1. 研究開始当初の背景

(1) 昨今、顕微授精法が不妊の夫婦に大きな福音をもたらしたことは周知の事実である。卵細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI) は我々および関連施設で基礎研究が 1990 年から行われており、1994 年には本邦で最初の妊娠・出産がえられ、それ以後急速に国内外に広まった。また、最近では先進各国における精液所見 (精子濃度、運動率) の低下傾向が世界的な論文に報告されるようになり、ICSI の適応症例が以前より増加していることも事実である。精液所見のみならず、雄性 genome の保存装置である精子核、特にそれを支持している核蛋白の異常が不妊を惹起することが最近の我々の核酸類似蛍光色素 acridine orange を用いた検討で明らかとなり、不妊症の新たな原因としてクローズアップされている。

(2) 受精障害が原因である症例を見いだすためのヒト精子の質的診断として acridine orange を用いた解析は有用であり、分子生物学的手法により更にその解析の意義は close up される。また 現在のところ精子核に関する正確な質的診断法は報告および開発はほとんどなく、本研究がにより精子核クロマチン解析が不妊症検査としての地位を確立するものとする。さらに、近年の内分泌攪乱物質を代表とする環境因子による精液所見の悪化が先進各国で指摘されており、いわゆる男性因子不妊症の増加に寄与している可能性が示唆されている。ヒトでは精子 DNA あるいは chromatin の構造異常が環境因子により惹起され易い可能性があり、今後我々が行おうとしている精子核クロマチン解析がその調査に役立つことが予想され、不妊症だけでなく他方面への研究の応用も期待される。

(3) 我々の行った初期の疫学調査では、不妊症患者全体の 3.7% に精子核の質的異常による受精障害が認められることが判明し、これは一般精液所見が正常な男性においても確認された。しかし、いまだ精子核の質的未熟性と受精能について基礎的な解明がなされぬまま治療だけが先行しているのが現状である。諸検査により原因の特定できない機能性不妊症の平均不妊期間は我々の施設の調査では 94 カ月であり、他の不妊症 (平均 52 カ月) に比べて 42 カ月長い。これは原因が不明なためによる的確な治療の選択がなされていないことによる。機能性不妊は全不妊の 15% 程度存在し、実地臨床では timing 指導→AIH→IVF という治療の流れをとることがほとんどである。精子核 chromatin 異常は受精障害と密接な関連があり、DNA-protamine complex の S-S 結合がすくないタイプと DNA-histone complex を持つ精子では IVF を行っても受精が得られない。これらの症例を screening することは機能性不妊の治療に大いに貢献し、cost benefit も高いと考えられる。不妊臨床におけるこれらの検討から、構成蛋白の未熟性により惹起される雄性 genome の異常および不妊症が今後増加するものなのか長い span で観察することにより明らかになる可能性が高い。

(4) また、疫学的検討を加えることによりヒト不妊、特に男性不妊に関わる原因が特定できる可能性がある。精子核蛋白に着眼した男性不妊の検査、疫学調査は知見に乏しく研究すべき課題の一つと考える。今後のヒト生殖能力を予見する上で重要な示唆が得られる可能性が高い検討である。

2. 研究の目的

(1) 分子生物学的方法論により未熟核蛋白を

直接証明し、臨床の成績と精子核の未熟性あるいは DNA fragmentation の起こりやすさの間の関連を調査することを本研究の主な目的とした。DNA fragmentation は胚発生異常および初期流産との関連が指摘されており、本研究が paternal origin の pregnancy loss に関する知見にも大いに寄与する可能性も指摘される。

(2) 精子核クロマチン異常が受精障害を起こす機構の生物学的、分子生物学的な研究

- 1) Flow cytometry を駆使した客観的精子核成熟性の評価と精液所見、受精能および発生能との相関
- 2) DNA fragmentation 検出と精液所見、受精能および発生能との相関

(3) 着床後の妊娠予後と精子核クロマチン異常との相関

3. 研究の方法

(1) 対象：(フェーズ 1) 2004 年 1 月から 10 月まで assisted reproductive technique

(ART) を施行した患者周期から回収され凍結保存をしていた射出精子、91 検体を対象とした。また、同期間に ART により 5 個以上の受精卵が得られ、さらに 5 日間胚培養された IVF 21 周期、ICSI 22 周期を胚盤胞形成に関する比較検討対象とした。(フェーズ 2) 2007 年 10 月から 2009 年 5 月の間に実施された通常体外受精 81 周期と顕微授精 44 周期を対象とした。なお、受精率に関しては、採卵時 MII 卵が 2 個以上獲得された周期を対象とした

(IVF69 周期、ICSI40 周期)。

(2) 精子の回収、保存：本研究に対して同意の得られた症例から用手的に回収された射出精子を検体とした。射出精液採取後 37°C 大気下で 30 分間液化させた後、一般精液所見(精子濃度、精子運動率)を computer assisted sperm

analysis (CEROS V12、Hamilton Thorne Research、MA、USA) を用いて計測後、HEPES 緩衝 HTF を用いて 300g、5 分間遠心洗浄し 1 ml 原精液精子浮遊液を作成し、ART に供されなかった 200 μ l の余剰検体を回収し解析に使用した。自然酸化による精子核蛋白 protamine 内の S-S 結合形成を防止する目的に、thiol blocking agent である N-ethylmaleimide (NEM、SIGMA) (5mM 最終濃度、in PBS) と反応させた後、測定まで -80°C で凍結保存した。

(3) 調節卵巣刺激、採卵

卵巣刺激は GnRH agonist を用いた long protocol で行った。治療前周期 21 日目より GnRH agonist (スプレキュア、持田製薬、東京) 投与を開始し(600~900 μ g/日)、治療周期 3-5 日目にホルモン検査(LH、E₂)を行い、下垂体 down regulation を確認してから(LH<5 IU/L (RIA 法)、E₂<50 pg/ml (RIA 法))、pure FSH(フェルティノーム P、セロノジャパン、東京)の連日皮下投与を施した。経膈超音波断層法により主席卵胞径が 17mm 以上を卵胞成熟徴候とし、hCG 5000-10000 単位を筋肉内投与後 36 時間に経膈超音波ガイド下に採卵術を行った。

(4) IVF、ICSI: IVF では精液静置法(swim-up)により運動性良好精子を選別し、運動精子濃度 2×10^5 /ml で媒精した。卵-顆粒膜細胞複合体は 3-4 個を 1 つの培養皿で培養し、light mineral oil (Irvine) で被覆したのち、3 時間の前培養ののち媒精を行った。

ICSI は Piezo 法により実施した。卵顆粒膜細胞は、0.02-0.05% hyaluronidase 処理にて除去し、成熟卵 (metaphase-II) に対してのみ ICSI を行った。運動精子を選別し注入用 needle 内に吸引後、精子尾部に対し Piezo 圧

電刺激を印加することで運動性を失わせ（不動化）、卵細胞質内に注入した。

(5) 胚培養：授精後は培養液として fertilization medium (0.3%ヒト血清アルブミン(HSA)添加 HTF, Irvine)、cleavage medium (0.3% HSA 添加, Irvine)、blastocyst medium (0.3% HSA 添加, Irvine) による sequential medium を用いて行った。16-18 時間後に雌雄両前核と第 2 極体の放出をもって受精と判断した。判定後は cleavage medium へ受精卵を移した。授精後 3 日後には blastocyst medium に初期胚を移し、胚盤胞形成は媒精 120 時間後判定した。胚盤胞形成率は胞胚腔を形成した early blastocyst 以上の胚数を受精卵数で除した%で表した。

(6) Flow cytometry (FCM)

液化原精液 500 μ l をサンプリングチューブに入れ、-80°C で測定まで凍結保存した。測定は Spano らの方法に従った。解凍後、D-PBS (SIGMA) にて 1ml の精子浮遊液を作製後、その 200 μ l 精子浮遊液に対し 400 μ l の low pH detergent (0.1% TritonX-100, 0.15M NaCl, 0.08N HCl, pH1.4) を加え、30 秒間反応させた。次に 1.2ml の A0 液 (6mg/L A0, 0.1M citrate, 0.2M Na₂HPO₄, 1mM EDTA, 0.15M NaCl, pH6.0) を添加し染色を行った。処理された精子浮遊液を 20 μ m ナイロンメッシュでフィルターして FACScan (soft:CELL Quest, Bacton Dickinson Immunocytometry Systems, USA) により 1 万精子を測定した。蛍光の excitation は 488nm、精子核の emission を 630nm 以上の red (FL1-H) と、530 \pm 30nm の green (FL3-H) をそれぞれプロットとして、図 1 のような cytogram を得た。cytogram では cell outside the main population (COMP) にあたる area を、設定し解析した。COMP は%

で表した。

(7) 精子核 DNA 断片化解析：本研究では DNA breakage detection-fluorescent in situ hybridization assay による DNA 断片化判定と一致し、簡易で多くの検体の判定に適している sperm chromatin dispersion (SCD) test を一部修正して採用した。-80°C で凍結保存された検体 200 μ l を室温で解凍し、HEPES 緩衝 HTF 培養液を用いて精子濃度 5-10 \times 10⁶/ml に調整した。精子浮遊液 100 μ l と等量の 1.4% low melting agarose (NUSIEVE GTG, FMC BioProducts, ME, USA) を混和し、あらかじめ 0.65% standard agarose (SeaKem GTG, Cambrex Bio Science Rockland, ME, USA) でコーティング (80°C 条件下) されたスライドガラス上に 50 μ l を滴下、18 x18mm カバーガラスで被覆した。これを 4°C で 4 分間以上冷却したのち、カバーガラスを慎重に取り外し、速やかに 0.08N HCl で 7 分間室温下に酸処理を施した (acid denaturation)。精子核蛋白の除去は、スライドをまず 0.4M Tris (TRIZMA BASE, SIGMA), 0.8M DTT, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS, Bio-Rad Laboratories, CA, USA), 50mM EDTA (pH 7.5) で 10 分間、0.4M Tris, 2M NaCl, 1% SDS (pH 7.5) で 5 分間処理し、0.4M Tris, 2mM EDTA (pH 7.5) で 3 回洗浄することで行った。70%、90% および 100% エタノール (WAKO) により順次 2 分間の脱水処理を施した後、ethidium bromide (SIGMA, 最終濃度 20 μ g/ml) で染色し、蛍光顕微鏡にて 1 検体につき 100 精子核以上を観察した。判定は精子核周囲に拡散した DNA fiber が形成する halo の状態により large, medium, small, no halo と判定し、no halo sperm head の割合 (%) を SCD の指標とした。

(8) 妊娠・流産判定：妊娠判定は、移植日よ

り 14 日後に尿中 hCG 定性 (25mIU/ml) で確認し、さらに 1 週間後に超音波にて胎嚢の確認を行い妊娠判定とした。臨床的流産は 6~7 週時の胎児心拍の有無にて診断した。

(9) 統計：実験結果は平均±標準偏差で表した。臨床における患者背景は分散分析を用いて検討した。また精子核構造解析と精子 DNA 断片化、あるいはそれぞれと胚盤胞形成率の相関は、linear regression analysis を用いて有意水準 5% で検定した。データ解析は SPSS (12.0J for Windows; SPSS Japan Inc.) を使用した。

4. 研究成果

(フェーズ 1)

(1) 精子核蛋白構造異常と体外胚発生の相関：IVF 症例では、COMP 値と胚盤胞形成率との間に有意な相関を認めなかった ($r=0.030$ 、 $p=0.899$ 、 $n=21$) が、ICSI 症例では正の有意な相関を認め ($r=0.477$ 、 $p=0.025$ 、 $n=22$)、精子核蛋白内 S-S 結合が少ないほど胚発生が良好であった。

(2) 精子核 DNA 断片化と体外胚発生の相関：調査した 18 症例の検討では有意な相関は観察されなかったが ($r=0.390$ 、 $p=0.109$)、夫人患者年齢 35 歳以下の加齢因子を取り除いた 11 症例による検討では、統計学的に有意な相関が観察され ($r=0.620$ 、 $p=0.043$ 、 $n=11$)、精子核 DNA 断片化は胚発生を阻害する要因であると結論付けた。

(3) 精子核蛋白構造異常と精子核 DNA 断片化の相関：両者の間に有意な相関は観察されなかった ($r=0.114$ 、 $p=0.291$ 、 $n=91$)。すなわち、精子核蛋白組成が DNA 断片化に及ぼす影響は証明できなかった。

(フェーズ 2)

(1) 精子濃度と %COMP の相関：IVF 群は一定

の相関が認められなかったが ($n=81$ 、 $r=0.088$ 、 $p=0.432$)、ICSI 群には比較的強い相関が認められた ($n=44$ 、 $r=0.376$ 、 $p=0.012$)。

(2) 総精子数と %COMP の相関：IVF 群は一定の相関が認められなかったが ($n=81$ 、 $r=0.068$ 、 $p=0.549$)、ICSI 群には強い相関が認められた ($n=44$ 、 $r=0.403$ 、 $p=0.007$)。ICSI 症例では精子数と精子成熟度は相関したが、その理由は不明である。

(3) 精子運動率と %COMP との相関：IVF 群 ($n=81$ 、 $r=0.505$ 、 $p<0.001$)、ICSI 群 ($n=44$ 、 $r=0.651$ 、 $p<0.001$) 共に強い相関が認められた。精子運動性は精子成熟性と相関することが示唆された。

(4) 奇形精子率と %COMP の相関：IVF 群 ($n=81$ 、 $r=0.291$ 、 $p=0.008$)、ICSI 群 ($n=44$ 、 $r=0.316$ 、 $p=0.037$) 共に相関が認められた。精子奇形は精子成熟性と相関することが示唆された。

(5) 受精率と %COMP の相関：IVF 群 ($n=69$ 、 $r=0.153$ 、 $p=0.209$)、ICSI 群 ($n=40$ 、 $r=0.172$ 、 $p=0.288$) 双方に相関は認められなかった。

(6) 妊娠群と非妊娠群における %COMP の比較：IVF 群は妊娠例が 21 症例、非妊娠例が 32 症例であり、ICSI 群は妊娠例が 12 症例、非妊娠例が 20 症例であった。IVF 群 ($p=0.223$)、ICSI 群 ($p=0.735$) 共に有意差は認めなかった。精子成熟度が妊娠予後を推測する指標ではなかった。

(7) 流産群と非流産群における %COMP の比較：IVF 群は流産例が 9 症例、非流産例が 12 症例であり、ICSI 群は流産例が 3 症例、非流産例が 9 症例であった。IVF 群 ($p=0.493$)、ICSI 群 ($p=0.639$) 共に有意差を認めなかった。流産と精子成熟度との相関は証明できなかった。

(8) IVF 群と ICSI 群間の %COMP の比較：IVF 群

(n=81)と比較し、ICSI 群(n=44)のCOMPは有意に高かった。(p<0.001)。すなわち、ICSI 適応症例は明らかに精子成熟度が低下していることが証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

①Takayama T, Katayose H, Yanagida K, Sato A, Embryo development after intracytoplasmic sperm injection can be predicted by assessment of sperm nuclear chromatin, *Reprod Med Biol*, 査読あり、8、2009、63-69

②片寄治男、高山智子、菅沼亮太、林章太郎、柳田薫、佐藤章、精子核の質的評価と体外胚発生能、*日本哺乳動物卵子学会雑誌*、査読有、24巻、2007、153-160

〔学会発表〕(計16件)

①片寄治男、シンポジウム；Top quality 精子を得る(治療周期)受精障害精子の治療、第12回日本IVF学会、2009.9.12、仙台市

②片寄治男、シンポジウム3 胚発生における精子の関与 ICSI 後胚発生における精子核クロマチンの関与、第52回日本生殖医学会総会・学術講演会、2007.10.26、秋田市

〔図書〕(計2件)

①片寄治男、他、医歯薬出版株式会社、カラーアトラス 不妊治療のための卵子学 受精障害、2010、77-84

②片寄治男、中外医学社、産婦人科診療指針 2版、新しい排卵誘発法；GnRH antagonist、2008、528-533

〔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

片寄 治男 (KATAYOSE HARUO)

国際医療福祉大学・大学病院・准教授

研究者番号：90281237