

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592086

研究課題名（和文）

円形精子細胞は生殖補助医療に使用可能か：受精諸プロセスにおけるその機能の検証

研究課題名（英文）

Functional analyses of mammalian round spermatid for fertilization

研究代表者

早坂 真一（HAYASAKA SHINICHI）

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：00535099

研究成果の概要（和文）：

本研究では受精成立能力が極めて低いとされている哺乳動物の円形精子細胞の受精成立能をヒトおよび実験動物（マウス、ウサギ）を用いて検討した。円形精子細胞には卵子活性化能力、および精子中心体機能という精子が卵子内に侵入したのちの受精の大きなイベントを遂行するための精子機能が欠如あるいは極めて低下していることが明らかになった。さらに、円形精子細胞で低下していた卵子活性化能力を補う方法の一つとして、マウス円形精子細胞のホルモン添加下セルトリ細胞との共培養系を開発した。以上より、哺乳動物の円形精子細胞は受精のイベントをプロセスする能力が低い、しかしそれを補填できる方法も存在する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

The goal of the fertilization assumes the fusion of the sex genome in the egg cytoplasm. We examined fertilization establishment ability of the round spermatid of the mammal that was assumed to be extremely low, using human and a laboratory animal (a mouse, rabbit). Sperm function to accomplish a major event of the fertilization after the sperm entry, oocyte activation ability and sperm centrosomal function were found to be decreased. Furthermore, as one of the methods to supplement ability for oocyte activation that decreased with round spermatid, we developed the co-culture system with hormone addition and Sertoli cells of the mouse round spermatid.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：産婦人科学

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：円形精子細胞、精子中心体、補助活性化法、受精障害

1. 研究開始当初の背景

精巣内精子採取（Testicular Extraction

of Spermatozoa (TESE)) にも成熟精子が採取できない精子成熟障害男性不妊症例の

殆どは、減数分裂を終了した半数体の精子細胞での成熟停止例である。精子細胞を用いた顕微授精による産児の誕生は極めて少数であるが、報告されている (Tesarik et al. Human Reprod 1996)。本邦においては、平成7年の日本生殖医学会倫理委員会の報告により、ヒト精子細胞を使用した顕微授精は実質的には禁止されている。その論拠としては精子細胞を用いた顕微授精に関する科学的な情報が不足していることが挙げられている。しかし、その報告より13年が経過した現在も本技術に関する科学的知見は集積されておらず、精子成熟障害による不妊症男性は「わからないことだらけなので」挙児を諦めている現実が存在する。

本研究では「ヒト精子細胞は臨床に使用しうるか？」という命題に答えを出しうる科学的事実を提供、構築することを目的とする。

2. 研究の目的

円形精子細胞が受精成立、すなわち卵子内での雌雄ゲノムの融合までのプロセスを行うための機能を有しているか、兎およびヒト円形精子細胞を用いてその機能を検証した。さらに、円形精子細胞の受精能力を向上させる試みとして、マウス円形精子細胞とセルトリ細胞との共培養系をもちいた体外成熟誘導にかんして検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒトおよびウサギ円形精子細胞の受精能力の検証

ウサギの未成熟精子細胞の顕微授精システムを用いた動物実験モデルを使用した。すなわち、ウサギの円形精子細胞から精子までの各成熟段階の精細胞をウサギ卵子内に顕微注入して、その発育と免疫蛍光染色による精子星状体の発現、すなわち、精子中心体機能を評価した。さらにヒト円形精子細胞を用いて同様の検証をした。

(2) マウス体外培養系における円形精子細胞の卵子活性化能力の向上に関する検討

マウス円形精子細胞をホルモン添加セル

トリ細胞共培地で2日間体外培養に供してそれらの卵子活性化能力を測定した。

4. 研究成果

(1) ヒトおよびウサギ円形精子細胞の受精能力の検証

本研究は精子細胞が現在までに正常な受精の成立に必要と考えられているファンクションを有するか否かの検討である。さらに、その機能が正常に発現されているかの検証も並行して行うことを予定した。研究の端緒として、円形精子細胞の顕微注入後の卵子活性化能は極めて低いことがあきらかになった。さらに円形精子細胞を顕微注入後の卵子内で精子中心体の機能発現である精子星状体の形成は認められなかった。すなわち、この基礎実験から、円形精子細胞には受精の成立に必要な精子中心体機能が備わっていないことが明らかになった。さらに、円形精子細胞注入後の卵子に人為的な活性化処理をおこなったが、精子星状体の形成は認められなかった。(平成21年度から22年度)次に、ヒト円形精子細胞における中心体機能の発現を顕微授精システムを用いて評価した。ヒト精巣組織のサンプリングはなかなか機会が恵まれずその遂行に時間を要した。精巣組織を細切して、顕微鏡下に形体的に円形精子細胞を同定し、マイクロマイクロマニピレーターで細胞それぞれを回収した。それらの円形精子細胞を卵子内に注入したところ、卵子の活性化とそれに引き続く発生は認められなかった。しかるに、カルシウムイオノファーを用いて補助活性化を施行した。補助活性化により核相は減数分裂を再開がみとめられたので、それを継続して培養し免疫蛍光染色にて微小管の形成を観察した。検討した30個の円形精子細胞注入後補助活性化施行卵子のなかで精子中心体機能の発現である精子星状体のみとめられたのは3個(10%)であった。この結果はヒト円形精子細胞にも微小管形成中心としての機能的な精子中心体が存在することを示す。しかし、その機能発現効率は通常の補助活性

化などでは低く、新しい中心体機能賦活化の方法の開発が必要であることが明らかになった。(平成 23 年度)

(2) マウス体外培養系における円形精子細胞の卵子活性化能力の向上に関する検討

マウス円形精子細胞における活性化能力を顕微授精システムを用いて評価した。精巣組織を細切して、顕微鏡下に形体的に円形精子細胞を同定し、マイクロマイクロマニピレーターで細胞それぞれを回収した。それらの円形精子細胞を卵子内に注入して、細胞内のカルシウムオシレーションを測定した。さらに、円形精子細胞をホルモン添加セルトリ細胞共培地で 2 日間体外培養した。体外培養により約 20% の円形精子細胞は細胞質が楕円形になり伸長精子細胞様の形態を示した。これらの体外培養伸長精子細胞を卵子内に顕微注入し、卵子内のカルシウムオシレーションを測定した。体外培養伸長精子細胞は円形精子細胞に比してより多くの卵子を活性化し、そのカルシウムパターンは精巣より直接採取した伸長精子細胞(体内成熟精子細胞)と同様の所見をしめした。すなわち、円形精子細胞には卵子活性化因子が殆ど存在せず、卵子活性化能は円形精子細胞が形態を変化させつつある精子成熟の過程で、出現することが明らかになった。さらに円形精子細胞を体外培養することで、形態が伸長精子細胞様に変化した精子細胞には円形精子細胞に比して活性化能が高くなったことが明らかになった。この知見は J Assist Reprod Genetics 27:565-570. 2010 に掲載され、その号の巻頭コメントリーに新しい知見として紹介された。

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 10 件)

①Nabeshima H, Nishimoto M, Utsunomiya H, Arai M, Ugajin T, Terada Y, Yaegashi N. Total laparoscopic conservative surgery for an intramural ectopic pregnancy.

Diagn Ther Endosc.

(査読有) (2010 PubMed, 20981282[uid])

②Hayasaka S, Ugajin T, Fujii O, Nabeshima H, Utsunomiya H, Yokomizo R, Yuki H, Terada Y,

Murakami T, Yaegashi N.

Risk factors for recurrence and re-recurrence of ovarian endometriomas after laparoscopic excision.

J Obstet Gynaecol Res. (査読有) 37(6); 581-585 (2011)

③Hayasaka S, Murakami T, Nabeshima H, Terada Y, Yaegashi N

Laparoscopic management of recurrent rupture of an adnexal mass in the second trimester of pregnancy: A case report Asian Journal of Endoscopic Surgery (査読有) 3; 201-203 (2010)

④Ugajin T, Terada Y, Hasegawa H, Nabeshima H, Suzuki K, Yaegashi N

The shape of the sperm midpiece in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection relates sperm centrosomal function.

Assist Reprod Genetics (査読有) 27(2-3); 75-81 (2010)

⑤Ugajin T, Terada Y, Hasegawa H, Velayo CL, Nabeshima H, Yaegashi N

Aberrant behavior of mouse embryo development after blastomere biopsy as observed through time-lapse cinematography.

Fertil Steril (査読有) 93; 2723-2728 (2010)

⑥Terada Y, Ugajin T, Arai-Kikuchi M, Hayasaka S, Nabeshima H, Yaegashi N

Laparoscopic removal of the rudimental uterus followed by colpopoiesis in a Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome patient with a functional endometrium and peritoneal endometriosis.

J Gynecol Surg (査読有) 26; 201-203 (2010)

⑦Terada Y, Schatten G, Hasegawa H, Yaegashi N

Essential roles of the sperm centrosome in human fertilization: developing the therapy for fertilization failure due to sperm centrosomal dysfunction.

Tohoku J Exp Med. (査読有) 220(4); 247-258 (2010)

⑧Kikuchi-Arai M, Murakami T, Utsunomiya H, Akahira JI, Suzuki-Kakisaka H, Terada Y, Tachibana M, Hayasaka S, Ugajin T, Yaegashi N

Establishment of Long-Term Model throughout Regular Menstrual Cycles in Immunodeficient Mice.

Am J Reprod Immunol. (査読有) 64(5); 324-332 (2010)

⑨Hasegawa H, Terada Y, Ugajin T, Yaegashi N, Sato K

A novel culture system for mouse spermatid maturation which produces elongating spermatids capable of inducing calcium oscillation during fertilization and embryonic development.

J Assist Reprod Genet. (査読有) 27(9-10); 565-570 (2010)

⑩Hayasaka S, Murakami T, Arai M, Ugajin T, Nabeshima H, Yuki H, Terada Y, Yaegashi N

A Method for Safe Hysteroscopic Synechiolysis in Patients with Asherman Syndrome.

J Gynecol Surg (査読有) 25:147-52 (2009)

[学会発表] (計1件)

①寺田 幸弘、Post ICSI events in fertilizationに関わる配偶子の質について、日本生殖医学会 RMBシンポジウム、平成22年11月20日、徳島

[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] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早坂 真一 (HAYASAKA SHINICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：00535099

(2) 研究分担者

寺田 幸弘 (TERADA YUKIHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10260431

高野 忠夫 (TAKANO TADAO)

東北大学・未来医工学治療開発センター・准教授

研究者番号：40282058

大槻 健郎 (OTSUKI TAKEO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：40531330

鍋島 寛志 (NABESHIMA HIROSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：90547415

長谷川 久隆 (HASEGAWA HISATAKA)

東北大学・病院・技能補佐員

研究者番号：20455835

(H21)

今井 紀昭 (IMAI NORIAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：60531332

(H21)