

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25年6月1日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591837

研究課題名（和文）精子品質管理による不妊治療の安全性向上—精子頭部空胞と DNA 損傷の関連性解析

研究課題名（英文）Enhanced safety of infertile therapy by means of quality control of sperm - relationship between vacuole in sperm head and DNA fragmentation

研究代表者 兼子 智（KANEKO SATORU）東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：40214457

研究成果の概要（和文）：

新たに単一細胞 DNA 断片化を高感度に可視化する single cell pulse field gel electrophoresis (SCPFGE)法を開発した。本法により、DNA 断片化の初期段階を定量的に解析することが可能となった。SCPFGE を用いて空胞陽性率が高い検体と低い検体の DNA 切断率を測定したが、相関は見られなかった。培養環境における DNA 保護を検討した結果、高酸素環境下における培養では DNA 損傷率が上昇することを認めた。

研究成果の概要（英文）：

The early stage of DNA fragmentation in a single nucleus could be observed by single cell pulse field gel electrophoresis (SCPFGE). First, a few large fibrous fragments were derived from a bundle of long chain fibers, the cleavages were advanced until finally almost all the DNA was shredded to granular fragments. There found no significant correlation between DNA fragmentation and vacuole in sperm head. The cell culture under high oxygen concentration caused increment of the percentage of DNA fragmentation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科頸臨床医学・産科婦人科学

キーワード：品質管理、精子頭部空胞、DNA 損傷、顕微授精、染色体

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

ヒト精液中の精子は多種多様な機能的、形態的異常を有する。造精機能障害は精子産生量の量的低下のみならず、多様な機能異常を招く。これらの中で多くの論文が精子核における 2 重鎖切断による DNA 断片化に注目している。DNA 損傷は 2 重鎖切断、片側開裂、酸化的損傷、化学物質による塩基修飾など多様であるが、中でも 2 重鎖切断は内因的に最も修復が困難であり、重要な遺伝子が障害されれば 1 箇所の切断でも重大な問題となるため最も細胞致死性が高い。精子は第 2 減数分裂後期以降 DNA 修復能を失い、卵侵入後に卵側の DNA 修復に依存するが、培養環境における卵修復能に関しては未知の部分が多い。もし未修復もしくは不完全修復された DNA を有する精子が卵と受精すれば、それは染色体異常、流産率の増加などの妊娠損失につながる。

2. 研究の目的

ヒト精子には頭部(染色体収納部位)に空胞を認めるものが高頻度で存在するが、ほとんどの不妊治療施設は精子 DNA 損傷ならびに空胞を考慮せずに顕微授精(ICSI)が施行してきた。今、染色体収納部位における空胞が精子 DNA 損傷の原因となるのか、さらに ICSI 児の健全性に影響するか、深刻な論議となっている。本研究の全体構想は、診断を目的とした精子機能評価、すなわち精子細胞診の概念を生殖補助医療(ART)に導入し、ART による出生児の健全性確保に寄与することにある。その一端として、精子頭部空胞と DNA 損傷の関係を明らかにし、それらの診断的意義を検討する。

3. 研究の方法

ヒト精液から運動精子を分画するには、Percoll 密度勾配遠心分離法と swim up 法を組み合わせた。調製した運動精子はサイトスピン装置を用いてスライドガラスに塗抹した。溶解した 0.56% アガロース (0.1 M sodium acetate, pH 4.7, 0.05% Triton X-100, 540 μ l) に精製トリプシン 60 μ l を混合した。厚さ 50 μ m となるように調製アガロースで包埋、低温で 30 分間固化した。固化したゲルは細胞融解液 (30 mM Tris-ポリリン酸、8.2 mM Na ヘキサメタリン酸、0.05% Triton X-100, 5.0 mM dithiothreitol, pH8.1) に浸漬して 37 °C、30 分間反応させた。

SCPFGE に用いる電気泳動槽は 90 度の角度で交差する 2 組の電極を有する。その交点に細胞塗抹部位が位置するようにスライドガラスを置き、電位差 1.5V/cm で 3 秒ごとに交互に通電して 7 分間泳動を行った。泳動後に Syber Gold で DNA 蛍光染色した。

4. 研究成果

細胞核内 DNA は核タンパクと静電的結合により複合体を形成し、さらに nuclear matrix と呼ばれる各骨格で核膜に固定されている。従来法では高濃度の食塩と S-S 結合還元剤で核タンパクを可溶化して検査を実施している。しかし、もう一つの DNA 結合因子である nuclear matrix はこの操作に耐性である。しかも電気泳動の方法が従来型の 1 組の電極による泳動である。本研究では絡まった DNA をほぐし、長い断片を泳動するため SCPFGE を使用している。さらにゲル内トリプシン消化により細胞の融解、特に核タンパクと nuclear matrix の両者を消化することにより DNA をフリーな状態にすることに成功した。泳動像を見るとよく解るが、DNA は蛇が這

うようにアガロースの網目の中を蛇行して進んで行く。

ヒト精子核における DNA 断片化の初期段階を定量的に観察するため、単一核に由来する長鎖 DNA fiber、繊維状断片、断片化が進行した粒子状断片のサイズおよび数を観察する方法の開発を行った。SCPFGE により DNA fiber を電気泳動的に伸長、分離するには、トリプシンによる細胞消化が不可欠であった。精製した運動精子を Syber Gold を添加した細胞溶解液に懸濁すると、精子頭部は数分で膨潤したが、DNA fiber は膨潤した精子頭部内に留まっていたが、その懸濁液に精製トリプシン (20 μ g/ml) を添加すると、数十秒で DNA fiber が頭部周囲に拡散することを認めた。懸濁液中における DNA fiber 自由拡散は個々の精子に由来する DNA fiber および断片の特定には不向きであり、アガロースへの包埋は必須であった。精製運動精子と射精精液をアガロース包埋してトリプシンを添加して細胞融解を行うと、前者ではほとんどが絡まりあった DNA fiber の端が周囲に突き出した状態を示した。一方、射精精液では多様な形態を認め、前者で見られた形態に加え、粒子状断片が同心円状に周囲に拡散した様相を示すものを認めた。これらは電圧を印加することなくアガロース網目構造内を自由拡散したものであり、すでに DNA 断片化が進行した精子と考えられる。

トリプシン存在下に細胞融解した精子を SCPFGE により分離すると、精製運動精子では原点から数十本の均一な DNA fiber が伸長した。一方、射精精液では極めて多様な泳動像が観察された。運動精子に見られた DNA fiber が伸長したもの、DNA fiber の先に分離された数本の糸状断片を認めるもの、断片化の進行に伴い粒子状の断片が出現し、それに伴い DNA fiber の長さ並びに本数が減少し、最終

的には原点の毛糸玉状の DNA の絡まりの容積が減少して原点から直接粒子状の断片が泳動されていく。泳動された DNA fiber を高倍率で鏡検すると、pulse field に電圧を印加したことにより fiber はアガロース網目構造内をジグザグに伸長しているのが観察された。精製運動精子中には断片化が進行し、多数の粒子状断片を観察するものはなかったが、一部には繊維状断片を観察するものが存在した。繊維状断片の長さおよび数は症例により異なっていた。これらの結果は、射精精液から *in vitro* で運動精子を分画することにより、射精精液中に見られる DNA 断片化が進行した精子は排除できるが、運動精子中にも断片化の初期段階のものが存在し、これらは除去できないことを示唆している。

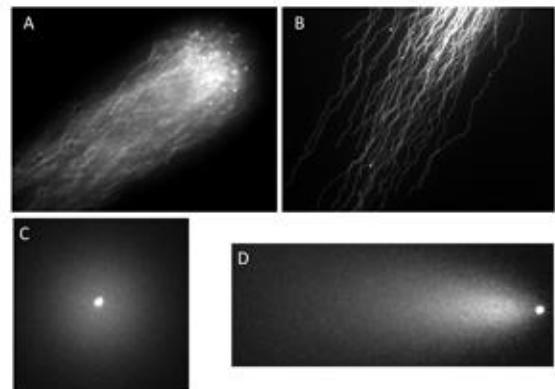


図1 DNA 泳動像

A: 長鎖 DNA 泳動原点付近、B: 長鎖 DNA 泳動先端、C: 高度断片化像、電気泳動前、D 高度断片化 泳動像

トリプシンを添加しないで細胞融解を行うと、SCPFGE における泳動像は全く異なったものとなった。すなわち、精製運動精子では原点から DNA fiber が伸長せず、射精精液においても少量の粒子状断片が泳動されるのみで DNA fiber を観察することはできなかった。これは nuclear matrix が DNA を把持し

た状態では、繊維状断片の観察が不可能であることを示している。

DNA に対するアルカリ処理の影響を観察した。トリプシンを添加して細胞融解を行った精製運動精子を 0.05 または 0.1 mole/L NaOH に室温で 10 分間浸漬した後、水洗して SCPFGE に供した。0.05 mole/L NaOH において断片化した粒子状 DNA のみが泳動され、DNA fiber は認められなかった。0.1 mole/L NaOH ではさらに原点が縮小し、断片化が進行していた。次に SCPFGE 後に 0.1 mole/L NaOH に浸漬すると、伸長した DNA fiber はその場で断片化しており、アルカリ処理により DNA の断片化が誘起されることを認めた。一方、トリプシンを添加することなく細胞融解を行った標品では、少量の粒子状断片が泳動されるのみであった。トリプシンを使用しないことにより、nuclear matrix が fiber を保持して偽陰性を生じる、一方、アルカリ処理により DNA は人工的に切断され、偽陽性を生じるが、nuclear matrix はアルカリ耐性であり、この点では偽陰性を生じる。このように実験条件の不備が一見、何らかの結果を提示しているような状況を生む。

運動精子を調製して DNA 切断率を 3 群に分類して測定した結果、断片が検出されない ($77.7 \pm 9.47\%$)、1-10 個 ($11.7 \pm 6.88\%$)、10 個以上 ($10.6 \pm 4.44\%$) であった。運動率 ($94 \pm 2.1\%$) と比して全ての検体で DNA 切断陰性精子比率は有意に低く、運動精子には非運動精子に見られるような高度断片化精子は存在しないが、断片化の初期段階にあるものが存在し、その比率は個人差があることが示された。

培養環境における DNA 保護を検討する一旦として、酸素濃度管理型培養装置、ガス循環型クリーンベンチを作成した。線維芽細胞を 5% CO₂-空気、2% O₂-5% CO₂-93% N₂ で 48 時間

培養を行った。SCPFGE 法を用いて DNA 切断率を測定した結果、 $23.1 \pm 8.61\%$ 、 $9.26 \pm 3.42\%$ であり、高酸素環境では DNA 損傷率が上昇することを認めた。

運動精子を調製し、微分干渉光学照明を用いて精子頭部空胞を観察した。SCPFGE を用いて空胞陽性率が高い検体と低い検体の DNA 切断率を測定した。両群間で明確な傾向は認められず、空胞と DNA 損傷の相関は不明である。これは 1. 空胞は DNA 損傷に関係ない、2. 空胞内で高度に断片化が進み、SCPFGE では検出できない少断片にまで破壊されている可能性が考えられた。この点に関して、さらなる検討が求められる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Satoru Kaneko, Joji Yoshida, Hiromichi Ishikawa, Kiyoshi Takamatsu, Single-Cell Pulsed-Field Gel Electrophoresis to Detect the Early Stage of DNA Fragmentation in Human Sperm Nuclei. PLoS ONE, 7(7), e42257, 2012

doi:10.1371/journal.pone.0042257

[図書] (計 1 件)

Satoru Kaneko, Kiyoshi Takamatsu, Cell Handling and Culture Under Controlled Oxygen Concentration, in "Biomedical Tissue Culture", 19-34, INTECH, Rijeka, Croatia, 2012, ISBN 978-953-51-0788-0

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼子 智 (KANEKO SATORU)
研究者番号: 40214457