

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592411

研究課題名(和文) 免疫性不妊女性における抗透明帯抗体のクラス分類と不妊治療への応用

研究課題名(英文) The class classification of anti-ZP antibodies in immunologic infertility women and application to infertility treatment

研究代表者

鈴木 達也 (SUZUKI, TATSUYA)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90348003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：抗透明帯抗体が不妊症の原因となるとの報告がある。本研究では抗透明帯抗体を保有する不妊女性の不妊機序を明らかにすることを目的とした。その結果、体外受精予定患者70名中4名(6%)を抗透明帯抗体陽性と判定した。さらに抗透明帯抗体陽性血清を用いてウエスタンブロッティングを行い、3種類の透明帯糖タンパクのうち、1種類(ZPB)にのみ反応を示した。抗透明帯抗体陽性4例の受精率は $78 \pm 12\%$ 、陰性66例の受精率は $87 \pm 21\%$ であり、有意差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Some authors reported that anti-ZP antibodies cause infertility. In the present study, we intended to clarify the infertility mechanism of anti-ZP antibodies. As a result, we detected 6% of anti-ZP antibodies in IVF-ET patients and they reacted for ZPB. There was no significant difference of fertilization rate between IVF-ET patients with and without anti-ZP antibodies.

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：免疫性不妊症 透明帯 精子 受精

1. 研究開始当初の背景

体外受精 (in vitro fertilization; IVF) の成功とそれに引き続いた顕微授精 (intra-cytoplasmic sperm injection; ICSI) の発展で、不妊カップルの多くは妊娠が理論的に可能となった。しかしこれらの生殖補助医療 (assisted reproductive technology; ART) を用いても受精が不可能な場合があり、この一因に免疫因子が関与する可能性がある。女性の場合自己抗原としての卵子、または非自己抗原である精子や受精卵などの抗原から感作を受けることがある。その結果抗卵抗体、抗透明帯抗体、抗精子抗体を産生し、胚や胎児に対する免疫現象により不妊症あるいは不育症の一因となる。

卵透明帯 (zona pellucida; ZP) は卵細胞周囲を取り囲む細胞外マトリックスの一種であり、卵母細胞により合成・分泌される。卵子に対して物理的な保護作用を有しているが、抗体やウイルスなどは通過する。卵透明帯は ZPA、ZPB、ZPC という3種類の糖タンパクから構成され、Yanagimachi により化学的性状は明らかになっている (New York Raven Press, Mammalian fertilization, 1994)。ZP は膜タンパクとしてゴルジ体で合成され、糖鎖が付加された後、細胞膜貫通ドメインを含む C 末端側が転換酵素により切断を受け遊離型となり卵から分泌される (Wassarman, et al. Annual Review of Biochemistry, 1988)。

精子の卵透明帯結合様式は、3段階に分類できる。第1段階の primary binding とは、卵子に近づく精子の先体外膜表面上の卵透明帯認識分子であるリガンドと、卵透明帯上の精子レセプターである ZPC の結合をいう。第2段階の secondary binding では、先体反応を誘起された精子の先体外膜が遊離・脱落し、内部の先体内膜上の分子と ZPA との結合を介して、精子が卵透明帯に侵入する。その後第3段階の ZPB の架橋作用により ZPC と ZPA は相互に結合する。

卵透明帯は臓器特異抗原としての強い抗原性を有する。Hasegawa et al. (J Reprod Immunol, 1992) はブタ透明帯を用いて種々の動物に能動免疫を行うと、免疫動物のほとんどが不妊になり、抗透明帯抗体の産生と同時に、卵巣の委縮を認めたと報告した。Koyama et al. (Reprod Biol, 2005) はリコンビナントハムスター ZPA でメスハムスターを免疫しても、ハムスターは各々のリコンビナントタンパクに対する抗体を産生するとともに、性周期の乱れと卵巣の発育障害を呈することを示した。

ヒトにおいては、血中に抗透明帯を保有する不妊婦人の存在が Shivers et al. により報告され (1977) 抗透明帯抗体による卵透明帯への精子結合障害や、卵透明帯の変性・硬化による hatching 障害により、女性を不妊症に導くことが知られている。

ところで不妊治療における ART の重要性が高まる一方で、受精障害の一因である抗透明帯抗体の検出法は一般に普及していない。その理由はヒト透明帯の入手が困難であること、共通する抗原をもつブタ透明帯を材料として抗体検出を行うと、対照女性や男性に対しても非特異的に反応を示してしまうという2点が問題であった。

我々は微量のヒト卵透明帯を用い、特異性の高い抗透明帯抗体検出法である micro-dot assay を開発した (Takamizawa et al. Fertil Steril, 2007)。この方法は可溶化したヒト卵透明帯を材料としてニトロセルロース膜上に micro-dot を作成し、患者血清を一次抗体として免疫染色により抗透明帯抗体を検出する。検査材料であるヒト卵透明帯は、ART における不受精卵をインフォームドコンセントのもと冷蔵保存し、数百個を確保できた段階で可溶化する。この特異的検出法を用いて、自己抗体である抗透明帯抗体の関与が示唆されている早発卵巣不全患者の一部に抗体を認めた。なお対照女性や健康男性においては陽性者を認めなかった。同様の検出法を用いて Koyama et al. (Reprod Biol, 2005) も早発卵巣不全患者の 50% で抗体が陽性であったと報告している。

不妊症と抗透明帯抗体の関係における興味深い研究として、Papale et al. (Hum Reprod, 1994) は IVF 時に卵胞液を個別採取し、ブタ卵透明帯を材料として卵胞液中の抗透明帯抗体の検出を行い、IVF による治療成績を報告した。それによると、血中の抗透明帯抗体が陰性であっても卵胞液の一部に抗体が陽性である場合があること、卵胞液中に抗体を認めた場合は IVF で受精に至らず、抗体陰性の卵胞液から得た卵子の受精率より有意に受精率が低いことを示した。しかしながら著者らは、材料にブタ卵透明帯を用いていること、血中抗体陽性者における報告がないことから、精度と信頼度の限界を有すると判断している。また Tung et al. (Biology of reproduction, 1999) はマウスを用いて ZPC をメスマウスに免疫し、卵巣機能障害を与えることなく自己免疫卵巣炎を発症させ、長期の不妊状態を誘導した。そして Th1 細胞が卵巣機能障害に関与していることを明らかにした。

以上から、現在原因不明不妊とされてきた患者の一部に、抗透明帯抗体が関与する卵巣予備能低下や受精障害、hatching 障害例が存在する可能性があり、抗透明帯抗体による不妊機序に関してのさらなる研究が必要と考えた。

2. 研究の目的

本研究は卵細胞周囲を取り囲む透明帯に対する抗体を保有する、免疫学的不妊女性の不妊機序を血中及び卵胞液中の抗体のクラ

ス分類を利用して明らかにするものである。ヒト透明帯を抗原としたウエスタンブロッティングの実験系を用いて、抗体のクラス分類および抗体量比を解析することにより、免疫学的不妊女性における受精率・妊娠率の向上を期待できるかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) micro-dot assay

1. ヒト可溶化透明帯の作成

ヒト卵は ART 施行患者からインフォームド・コンセントを得、未授精または未熟のために使用しなかった卵子の提供を受け、0.5M 硫酸アンモニウム・1M 塩化マグネシウム・0.1M デキストラン混合溶液中に 4℃ で保存した。十分量（数百個）貯まった後、実験に供した。

卵子からの透明帯の分離は器械的に行った。すなわち卵子径より若干小さい開口径を有するガラスピペットを作成し、PBS 中でピペティングにより透明帯、細胞質を分離した。透明帯のみを回収し、PBS 中に 100 μg/mL 濃度（透明帯 100 個/PBS30 μL）に調整して 75℃、30 分で溶解、可溶化透明帯を作成し、-80℃ に凍結保存した。

2. micro-dot assay の手技

micro-dot assay は免疫染色による。血清中の抗透明帯抗体は可溶化透明帯蛋白を抗原として検出される。すなわちニトロセルロース膜上に作成した可溶化透明帯蛋白の micro-dot を抗原とし、一次抗体として被検血清中の抗透明帯抗体を結合させ、さらに二次抗体として HRPO（horseradish peroxidase-conjugated）-抗ヒト IgG（Sigma Chemical Co.）を結合させ、これを発色可視化する。

ニトロセルロース膜（縦 10mm × 横 15mm）にヒト可溶化透明帯 0.2 μL の micro-dot を作成し、室温で乾燥した。3%BSA（bovine serum albumin）（Sigma Chemical Co.）含有 PBS（3%BSA/PBS）中で 10 分間ブロッキングを行い、一次抗体として、3%BSA/PBS で 5 倍希釈した被検血清 180 μL をニトロセルロース膜上に滴下被覆し、4℃ で一晩反応させた。血清を除去後、0.02% Tween20（Kanto Chemical Co. polyoxyethylenesorbitan monolaurate）含有 PBS（Tween20/PBS）で洗浄 5 分間を 3 回施行した。洗浄液を除去し、二次抗体反応として PBS1,000 倍希釈 HRPO-抗ヒト IgG 液中にニトロセルロース膜を浸し、室温で 1 時間反応させた。ニトロセルロース膜を 0.005% Tween20/PBS による 5 分間の洗浄を 3 回施行した後、発色液（クロロナフトール 3mg 溶解無水メタノール 1mL、PBS5mL、過酸化水素水 2 μL 混合液）中で 10 分間反応させ発色

させた。蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させた。

3. micro-dot assay の解析

発色可視化した micro-dot はコンピューターに取り込み処理し、反応強度を解析した。ニトロセルロース膜をフラッドベッドスキャナーにて 256 グレー階調で読み込み、アメリカ合衆国 NIH（National Institute of Health: 国立衛生研究所）で開発、公開配布されている画像処理解析プログラムの NIH image を用いて反応強度を定量化算出し、これを NIN（NIH image number）とした。

(2) 体外受精予定患者血清中の抗透明帯抗体の検出

1. 対象、血清準備

当科の体外受精予定患者 70 名を対象とした。条件として 40 歳未満、原発性不妊症、FSH < 10mIU/mL の症例に限定した。インフォームド・コンセントを得た上、血清を採取した。血清は 3%BSA/PBS で 5 倍希釈し、micro-dot assay に供した。

2. micro-dot assay の NIN cut off 値の設定

ヒト可溶化透明帯を用いた micro-dot assay による抗透明帯抗体陽性または陰性と判断する NIN cut off 値は、我々の以前の報告より、NIN=18 と設定した（Takamizawa et al. Fertil Steril, 2007）。

(3) ヒト可溶化透明帯の SDS-PAGE

SDS-PAGE は Leammli 法により実施した。分離ゲルは 10%ポリアクリルアミドを用いた。100mM β-mercaptoethanol を含む SDS バッファとヒト可溶化透明帯の混合物を試料として使用した。

(4) 抗透明帯抗体陽性血清を用いたウエスタンブロッティング

ウエスタンブロッティングは Towbin らの方法に従った。SDS-PAGE の後、タンパク質を PVDF 膜上へ移した。プロットされた膜は 5%BSA を含む Tris buffered saline（TBS）で 20 分の条件で 1 時間ブロッキングし、その後一次抗体として抗透明帯抗体陽性血清を用いてさらに 20 分・1 時間インキュベーションした。TBS で洗浄後、二次抗体として HRPO-抗ヒト IgG とともにインキュベーションした。発色は ECL プラスキットを用いた。ウエスタンブロッティングの反応性はデンシトメーターを用いて測定した。

(5) 体外受精における受精率の検討

抗透明帯抗体陽性および陰性症例の体外受精における受精率を比較した。

4. 研究成果

(1)(2) ヒト透明帯を用いた micro-dot assay

による体外受精予定患者血清中の抗透明帯抗体の検出

体外受精予定患者血清 70 例中 29 例 (41%) は反応せず (NIN=0)、37 例 (53%) は低反応 (NIN<18)を示した。NIN 18である4例(6%)を抗透明帯抗体陽性と判定した。

(3)(4)抗透明帯抗体陽性血清を用いたウエスタンブロッティング

ヒト可溶性透明帯を電気泳動で分離し、透明帯抗体陽性血清を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、4例とも約75kDaのバンドのみ反応した。分子量から考えるとZPA(100kDa)、ZPB(75kDa)、ZPC(55kDa)のうちZPBに対応する抗体の存在が示唆された。

(5)体外受精における受精率の検討

抗透明帯抗体陽性4例の受精率は78±12%、陰性66例の受精率は87±21%であり、有意差を認めなかった。

今回、40歳未満、卵巣予備能正常で体外受精を予定した原発性不妊症例を対象に抗透明帯抗体の頻度を検討したが、70例中4例、6%であった。しかしながら、抗透明帯抗体の存在自体が不妊症と強く関連があるのであれば、頻度として低くはない。

透明帯と精子のprimary bindingは、精子の先体外膜表面上の透明帯認識分子であるリガンドとZPCの結合を示す。従って、抗透明帯抗体の不妊症機序で最も理に適っている受精障害を考慮すれば、3種類の透明帯糖タンパクの中でZPCに対する抗体が主に陽性になるのであろうと考えていた。しかしながら、今回は4例ともZPBにのみ反応を示しており、予想に反する結果となった。

また、体外受精における受精率の検討では、抗透明帯抗体陽性症例は陰性症例と比較して受精率が低かったが、有意差を認めなかった。

抗透明帯抗体と不妊症との関連に関しては、背景に記載したように関連ありとする報告と、一方では関連なしとする報告もあり、controversialと言わざるを得ない。

本研究の現時点での結論として、抗透明帯抗体を持つ不妊女性は一定頻度存在するものの、抗透明帯抗体が不妊原因となっているとは断言できなかった。しかしながら、抗透明帯抗体陽性例が少なかったこと、予備実験に多大な時間がかかり、hatching障害等の受精障害以外の検討ができなかったことを考慮すれば、さらなる検討が必要と判断している。

本研究計画の期間は終了となるが、不妊女性における受精率や妊娠率を向上できるよう、引き続き研究を継続する予定である。

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1件)

Hasegawa A, Tanaka H, Shibahara H: Infertility and Immunocontraception based on zona pellucida
Reprod Med Biol 13:1-9,2014. 査読あり

[図書](計2件)

郡山純子、柴原浩章：
V-4 受精と免疫(抗精子抗体、抗透明帯抗体)。
生命の誕生に向けて 第二版。
(編)日本哺乳動物卵子学会。
pp128-132,2011.

柴原浩章、高見澤 聡：

V-20 抗透明帯抗体。
卵子学(編)森 崇英。pp205-213,2011.

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 達也 (SUZUKI TATSUYA)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90348003

(2)研究分担者

柴原 浩章 (HIROAKI SHIBAHARA)
研究者番号：80206143
兵庫医科大学・医学部・教授