生 物 理 工 学 研 究 科

平成 26 年度

（課程修了による）

西 原 卓 志

# 学位論文審査結果の報告書

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 西原　卓志 |
| 生年月日 | (昭和)・平成　48年　11月　5日 |
| 本籍（国籍） | 奈良県 |
| 学位の種類 | 博　　士（　工　学） |
| 学位記番号 | 生　第　40　号 |
| 学位授与の条件<br>（博士の学位） | 学位規程第５条該当 |

論文題目

ヒト体外受精システムにおける卵胞液の解析と
生殖補助医療成績の向上に関する研究

審査委員

| | | |
|---|---|---|
| （主　査） | 松本　和也 | |
| （副主査） | 細井　美彦 | |
| （副主査） | 三谷　匡 | |
| （副　査） | | ㊞ |
| （副　査） | | ㊞ |

# 論 文 内 容 の 要 旨

生殖補助医療(ART : Assisted Reproductive Technology)とは、体外受精・胚移植法（IVF-ET：In Vitro Fertilization and Embryo Transfer）を中心とする高度な生殖補助技術を用いた治療である。1978年にイギリスのEdwardsとSteptoeが、この治療技術によって世界初の体外受精児を誕生させた。日本では、1983年に初めて実施症例が報告されて以来、広く普及している。2012年には、国内で3万7953人の児が体外受精で生まれるに至っている。現在、総出生数における体外受精児の割合は約27人に1人となっている（日本産科婦人科学会, 2012）。

一方、近年多胎妊娠が増加傾向にあることも明らかになり、その一因として複数胚の移植をするARTの普及によることが大きいと指摘された。そのため、ARTにおいて移植する胚の数は原則として単一とするとの見解が出されている（日本産科婦人科学会, 2008）。臨床現場において単一胚の移植をするためには、質の良い（成功率の高い）胚を移植胚として選択する必要がある。しかしながら、卵子の成熟率・受精率や、胚のグレードが悪い症例、良い胚を移植しても妊娠に至らない反復不成功例、不成功の原因が明らかにできず治療の方針が立てられない症例などの克服すべき問題が指摘されている。ART現場で、健康な児が産まれるまでの過程では、卵子の発育・成熟、排卵、受精、胚発生、着床、妊娠の継続において様々因子が関わっている。IVF-ETは、本来は体内で行われる生理現象を体外で人為的に実施する過程にしているため、卵胞刺激・採卵・受精・胚培養・胚凍結の外因的なストレスを受けることが危惧される。事実、外因的なストレスが配偶子に影響を及ぼすことによって、胚の発育不良、着床不全、流産などが発生することが認められている（du Plessis et al., 2008）。ストレスの中でも、活性酸素種（ROS : Reactive Oxygen Species）が酸化ストレスの主要因としてあげられており、一般にROSはDNA損害・脂質過酸化・タンパク質の酸化損傷などの障害をもたらし、活性酸素などの「酸化剤」とそれを消去する「抗酸化剤」の間のバランスの異常により発生することが明らかとなっている（Fujii et al., 2005, Agarwal et al., 2005）。一方、細胞にはROSに対する抗酸化作用防御システムを備えており、非酵素系（低分子抗酸化剤）、酵素系が中心に働き、ROSから細胞を守るシステムがある(Sugino et al., 2006)。また、非酵素系の低分子抗酸化剤は体内における絶対量も多く、ROSと反応し無毒化する機能において重要な役割を果たしている。生殖関連の組織・細胞である卵巣・卵胞・子宮・卵子の生存にとって、ARTの現場で必要以上に発生するROSから保護機能を有する抗酸化剤が機能していることが必要であると考えられる。しかしながら、そのROSに対する保護機能において、各抗酸化剤の作用の総合的な抗酸化力が重要なのか、もしく

は各抗酸化剤のそれぞれの抗酸化力が重要なのか、その詳細は未だ明らかにされていない。そこで第２章では、ART 現場で採卵と同時に採取可能な卵胞液に着目して、卵胞液中の低分子抗酸化剤酸化ストレスマーカーと治療成績との関連に対する研究を行った。特に、卵胞液は卵胞内卵子を取り巻く環境に存在するため、卵子やそれを取り巻く細胞に影響する液性因子を解析するうえで、貴重な情報をもたらすものと期待される。検討の結果、総抗酸化力の評価が可能な Total Antioxidant Capacity (TAC)と個々の酸化ストレスマーカーとの相関性、TAC と体外受精成績との相関性がみられなかったことから、総抗酸化力よりも各抗酸化剤それぞれの抗酸化力により評価を行うことが重要であることが明らかとなった。また受精率と GSH に正の相関が、酸化性ストレスによる DNA 損傷の指標を示す酸化ストレスマーカーとして広く用いられている 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン(8-OHdG)との間に負の相関がみられたことから、卵胞内卵子を取り巻く環境における抗酸化活性の低下によるものが低受精率の原因の一つであることが示唆された。これらの結果から、体外受精胚移植における受精に関する酸化ストレスマーカーとして、GSH や 8-OHdG を使用できることが明らかとなった。また、子宮内膜症症例で総 GSH 濃度が有意に低値を示したことから、子宮内膜症によるヒト卵胞液中の抗酸化剤活性の低下により卵子や胚の質の低下が発生し、子宮内膜症による不妊の原因となることも示唆された。以上の結果より、卵子の受精・発育の過程において相関する酸化ストレス関連因子が、GSH や 8-OHdG を含め卵胞液中に存在している可能性があると考えられた。ART 現場において、形態的な評価のみでその卵子の評価に加えて、非侵襲性のサンプルである卵胞液中の酸化ストレスマーカーも含めた相対的な評価についても考慮することは、受精障害の原因究明や ART 成績の向上に貢献することが期待される。

子宮内膜が子宮外で増殖する疾患である子宮内膜症は、生殖年齢女性の約10%に発生して、ほぼ半数は不妊症を合併することが明らかになっており、子宮内膜症症例では対照群と比較し妊娠率が低下することが認められている(D'Hooghe et al., 2003, Gupta et al., 2008) 。さらに、卵子の質は子宮内膜症が存在することによって、悪化することも示されている（Andrade AZ et al.,2010)。一般に、子宮内膜症症例では腹腔内貯留液内のインターロイキン(IL)などの炎症性サイトカインが増加しており（Taketani et al.,1992, Akoum et al.,2000, Akoum et al.,2001)、これらの炎症に伴って内膜症組織や卵胞液にROSが発生し増加することも示されている（Campos et al. 2008)。しかしながら、子宮内膜症に起因する卵子の質の低下の分子機序は明らかにされておらず、そのため具体的な治療法もないのが現状である。第３章では、子宮内膜症症例の卵胞内環境を明らかにするために卵胞液のプロテオーム解析を用い、

子宮内膜症において卵母細胞の質の低下を導く分子機構の解明を行った。その結果、子宮内膜症例の卵胞の過程でILが産生され、他の炎症性のILの分泌を促進することにより卵巣内の環境を悪化させ、それが子宮内膜症の不妊症の原因の一つであることが明らかとなった。また、卵胞液中のIL-25（IL-17E）濃度の上昇は子宮内膜症症例固有のものである可能性が認められた。IL-25（IL-17E）の詳細な機能は未だ解明されていないため、子宮内膜症による卵巣の卵胞内IL-25（IL-17E）量の増加の分子機構とIL-25（IL-17E）が卵子に及ぼす影響について不明である。今後、これらの分子機構の解明によって、卵母細胞の質低下と受精後の胚発生の不良を導く卵胞内環境の悪化に関する新しい知見が得られるものと考えられた。

ROSが増加することで亢進した酸化ストレスがミトコンドリア機能を低下させ、その結果ATP産生の低下を引き起こし、最終的に受精後の胚発生の低下が起こることが明らかになっている（Takahashi et al., 2013）。そのため、受精卵の胚発生の低下を軽減させるために、ART現場で発生するROSを制御する方法の検討が重要となっている。そこで、第4章では、服用後に小腸で吸収後に直ちに抗酸化作用を果たすことが期待される還元型Coenzyme Q10 (CoQ10)、および松果体ホルモンであるメラトニンの服用が卵巣機能や卵子の質を向上させるか否かを検証することを目的とし、経口投与による治療成績への影響を解析した。これまで、抗酸化作用やATP産生亢進の両面からミトコンドリア機能の活性化作用を有するCoQ10が、細胞内ではミトコンドリアに多く分布して電子伝達系の補酵素として重要な働きを有する物質であることが明らかになっている。また、同様に抗酸化作用を有するメラトニン（N-acetyl-5-methoxytryptamine）は、松果体から分泌されるホルモンで、概日リズム（サーカディアンリズム）の調節作用を持ち睡眠障害などに用いられるだけでなく、免疫力増強作用を有するなどさまざまな生理作用を有することが明らかにされており、その作用はフリーラジカルを直接消去、あるいは生体内の抗酸化酵素を間接的に活性化することにより、生体の防御に働いていることが証明されている（Tamura et al., 2014., Fernando et al., 2014）。まず、CoQ10の経口投与により、服用後に血中および卵胞液中のCoQ10濃度が上昇し、受精率、分割期移植可能胚率、胚盤胞到達率、良好胚盤胞率の改善が確認された。特に、移植可能胚率は、検討を行った11例すべての症例において改善がみられた。次に、メラトニンの経口投与により服用後の受精率が改善され、分割期移植可能胚率も有意に改善されることが明らかとなった。特に、低受精率症例に対しては服用後に劇的な受精率の改善がみら

れた。以上の結果から、卵子の老化や胚の質の低下に影響を及ぼすROSによるミトコンドリアの機能低下を、CoQ10やメラトニンなどの抗酸化サプリメントを服用することで卵巣の卵胞内環境が改善された結果、生殖補助医療での成功率の向上に寄与することが示唆された。今後、卵子の成熟率や受精率が悪い症例、胚質不良例、反復不成功例など困難な症例に対しても、抗酸化サプリメントを活用することでART成績の改善につながることが期待された。

以上、本研究では酸化ストレスに起因する不妊症の原因は多岐にわたるものの、その一つ一つの分子機構の解明と、その知見を基盤としてART現場で改善を行うことで、卵子の質低下や反復不成功例などの現在克服すべき課題の解決につなげるトランスレーショナル研究を実施した。

# 論 文 審 査 結 果 の 要 旨

イギリスのEdwardsとSteptoeが、1978年に世界初の体外受精児を誕生させることによって、体外受精・胚移植法（IVF-ET：In Vitro Fertilization and Embryo Transfer）の臨床的な応用が始まった。その後、IVF-ETは細胞質内顕微注入法の確立など高度な生殖補助技術を用いた治療である生殖補助医療(ART : Assisted Reproductive Technology)は世界的に発展してきている。日本においては、2012年のデータで総出生数における体外受精児の割合は約27人に1人であることが報告されている（日本産科婦人科学会, 2012）。

ARTは着実に普及しているものの、臨床現場では妊娠成功率の高いと評価される「質の良い」卵をどのように選別するかが大きな障害となっている。事実、卵の成熟率、受精率や胚のグレードが悪い症例、良い胚を移植しても妊娠に至らない反復不成功例、不成功の原因が明らかにできず治療の方針が立てられない症例などが、ART現場で直面する課題となっている。これら課題の原因として、大きく注目されているのは酸化ストレスを生み出す活性酸素種（ROS : Reactive Oxygen Species）である。特に、卵巣における卵胞内環境は、卵子の発育・成熟に重要な環境となっており、その環境下で過剰に発生するROSから卵子を保護する機能が存在することが知られているが、未だその詳細は明らかになっていない。本研究では、ART現場で妊娠成功率の高いと評価される「質の良い」卵の選別方法の確立を目的に、卵巣における卵子を取り囲む卵胞内環境としてヒト卵胞液に着目して、酸化ストレスとの関連性から卵胞液の解析を行うことで「質の良い」卵の選別に関する基礎的知見を獲得し、ART成績の向上につなげるトランスレーショナル研究を実施した。

まず、第2章では、ART現場で採卵と同時に採取可能な卵胞液に着目して、卵胞液中の酸化ストレスマーカーと治療成績との関連に関する実験を行った。その結果、総抗酸化力の評価を行うことが可能なTotal Antioxidant Capacity (TAC)と体外受精成績との相関性は認めることできなかったものの、水溶性の抗酸化作用を持つ総グルタチオン濃度（総GSH）と受精率に相関性があることが示された。さらに、抗酸化剤であるアスコルビン酸（ビタミンC）と負の相関が示されたDNA損傷指標である8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン(8-OHdG)が、受精率と良好胚盤胞率の低下と関連していることを認めた。これらの結果から、卵胞内環境における抗酸化活性の低下が卵子の質低下を招くことを明らかになった。また、興味深いことに、不妊を主症状とする子宮内膜症症例で、卵胞液中の総GSH濃度が有意に低値を示したことから、子宮内膜症症例の卵巣では卵子の受精能と発生能に及ぼす卵胞内環境の悪化と不妊との関連性が示された。以上のことから、ART現場における抗酸化

作用に着目した卵胞液の解析の重要性を明らかにしている。

次に、第3章では、前章で明らかになった子宮内膜症症例に認められた卵子の受精能と発生能に及ぼす卵胞内環境の悪化に関する分子メカニズムの解明に向けた実験を行なった。一般に、子宮内膜が子宮外で増殖する疾患で、生殖年齢女性の約10%に発生しおよそ半数は不妊症を合併して妊娠率が低下することが明らかとなっている(D'Hooghe et al., 2003, Gupta et al., 2008)。さらに、卵子の質は子宮内膜症の存在によって悪化することも示されている（Andrade AZ et al.,2010)。しかしながら、その発生機序と子宮内膜症による卵子の質の低下の原因は明らかにされていない。そこで、子宮内膜症症例において抗酸化作用低下を招く卵胞内環境の悪化の分子メカニズムを明らかにすることを目的に、子宮内膜症症例における卵胞液のプロテオーム解析を行い。対照群のそれと比較した。その結果、排卵直前の卵胞液中のIL-25（IL-17E）濃度が、対象群と比較して子宮内膜症群で上昇していることが認められた。現在、近年同定されたIL-25（IL-17E）は、免疫細胞だけでなく非免疫細胞である上皮細胞・内皮細胞でも発現して好酸球増加症やアレルギー疾患を増悪化させることが知られているが、詳細な機能は十分に解明されていない。そのため、子宮内膜症における卵胞内IL-25（IL-17E）量の増加の分子機構、並びにIL-25（IL-17E）が卵子に及ぼす影響について、さらなる研究が求められる。以上のことから、子宮内膜症症例における卵胞液内のIL-25（IL-17E）量の上昇現象の発見は、子宮内膜症が不妊を招く分子機構の解明について新しい知見が得る契機なると考えられた。

さらに、第4章では、ART成績の向上を目的に、卵巣中の卵胞内環境の改善に着目したトランスレーショナル研究を実施した。抗酸化作用やATP産生亢進の両面からミトコンドリア機能の活性化が明らかとなっているCoenzyme Q10(CoQ10)は、細胞内ではミトコンドリアに多く分布して電子伝達系の補酵素として重要な働きを有する。また、同様に抗酸化作用を有する、メラトニン（N-acetyl-5-methoxytryptamine）は松果体から分泌されるホルモンで、概日リズム（サーカディアンリズム）の調節作用を持ち、睡眠障害などに用いられるだけでなく、免疫力増強作用を有するなど多様な生理作用を有することが明らかにされており、その作用はフリーラジカルを直接消去、あるいは生体内の抗酸化酵素を間接的に活性化することにより、生体の防御に働いていることが明らかになっている（Tamura et al., 2014., Fernando et al., 2014)。そこで、服用後に小腸で吸収後に直ちに抗酸化作用を果たすことが期待される還元型CoQ10、および松果体ホルモンであるメラトニンの服用が卵巣中の卵胞内環境や卵子の質を向上させるか否かを検証することを目的とし、抗酸化サプリメントの経口

投与がART成績に及ぼす影響を検討した。その結果、CoQ10のサプリメントの経口投与により、服用後に血中および卵胞液中のCoQ10濃度が上昇し、有意な差はなかったものの受精率、分割期移植可能胚率、胚盤胞到達率、良好胚盤胞率が改善された。特に、移植可能胚率は、検討を行った11例すべての症例において分割期の移植可能胚率が改善された。また、メラトニンのサプリメントの経口投与により、服用後の受精率が改善され、分割期移植可能胚率も有意に改善されることが明らかとなった。特に低受精率症例に対して服用後に劇的な受精率の改善がみられた。以上のことから、ART現場で直面する卵の成熟率や受精率が悪い症例、子宮内膜症による胚質不良例、原因不明の胚質不良例、何度良好胚を移植しても妊娠に至らない反復不成功例などの症例に対して、抗酸化サプリメントを活用することでART成績の改善につながる可能性を提示した。

以上のように、本研究はART現場で要求されている妊娠成功率の高いと評価される「質の良い」卵の選別方法の確立において、卵胞液中の酸化ストレスマーカーに着目して卵胞内環境の検討を行って、抗酸化サプリメントの投与によってART成績の改善を明らかにした研究である。このように本論文の研究内容は、臨床現場において基礎的研究の知見をART成績の向上につなげたトランスレーショナル研究の重要性を明らかにしたものであり、博士（工学）論文として価値あるものと認める。