

|          |  |         |         |         |
|----------|--|---------|---------|---------|
| 氏 名 (本籍) | はや<br>早  | さか<br>坂 | しん<br>真 | いち<br>一 |
| 学位の種類    | 博 士 (医 学)  |         |         |         |
| 学位記番号    | 医 博 第 2 6 0 3 号  |         |         |         |
| 学位授与年月日  | 平 成 2 0 年 3 月 2 5 日  |         |         |         |
| 学位授与の条件  | 学位規則第 4 条第 1 項該当   |         |         |         |
| 研究科専攻    | 東北大学大学院医学系研究科<br>(博士課程) 医科学専攻                              |         |         |         |
| 学位論文題目   | 不妊症例を用いたヒト受精系における精子-卵子<br>細胞膜融合に関する機能的蛋白, IZUMO の発現<br>の検証 |         |         |         |

(主 査)

|        |            |            |
|--------|------------|------------|
| 論文審査委員 | 教授 岡 村 州 博 | 教授 荒 井 陽 一 |
|        | 教授 笹 野 公 伸 |            |

## 論文内容要旨

近年、体外受精 (cIVF: conventional in vitro fertilization)、卵細胞質内精子注入法 (ICSI: Intracytoplasmic sperm injection) に代表される生殖補助技術 (ART: assisted reproductive technology) は格段の進歩を遂げている。しかしながら cIVF, ICSI 共に成功率は、ここ 10 数年 20~30% 台と満足すべきものになっていない。ART の成功率を上げるためには、未解明な部分も多い受精現象のメカニズムの解明が必須である。最近、精子と卵子細胞膜の融合に必須と考えられる IZUMO という蛋白が同定された。IZUMO は射精直後の精子膜表面には存在せず先体反応後の精子においてはじめて先体内膜表面に露出する。IZUMO をノックアウトしたマウスでは、雌は正常であるが雄は不妊で、その精子は卵子細胞膜と融合する能力を完全に欠失していた。

そこで本研究ではヒトにおいて、正常妊孕能を持つ男性の精子と比べて、臨床的に ICSI の適応となった重症男性不妊症例の精子、及び cIVF において受精障害となった不妊症例の精子の IZUMO の発現に変化があるか検証した。

本研究には、同意の得られた妊孕能を確認されている健康な男性の射出精子、臨床的に ICSI の適応となった男性不妊症例 13 例の射出精子 (凍結精子 2 例含む)、cIVF において受精率=0% であった受精障害症例 12 例の射出精子を用いた。精子を液化、洗浄、遠心し、培養して先体反応を誘起させ免疫蛍光染色を行った後、蛍光顕微鏡にて観察し精子先体内膜表面上の IZUMO の発現を検討した。なお、先体反応後精子を同定するマーカーとして、IZUMO 同様に先体反応後に精子先体内膜上に出現することがわかっている CD 46 を同時に免疫蛍光染色した。観察した精子のうち、CD 46 陽性と考えられる先体反応後精子の中で、IZUMO が陽性であるもの、陰性であるものをそれぞれカウントした。

妊孕能を確認されている射出精子では、観察された精子数 570 のうち CD 46 陽性の先体反応後精子 (精子数 170, 先体反応率 32.7%) は全て IZUMO 陽性であり IZUMO の発現が確認された。臨床的に ICSI の適応となった重症男性不妊症例 13 例の射出精子 (凍結精子 2 例含む) では、全ての先体反応後精子において妊孕能確認例同様に IZUMO 陽性であり IZUMO の発現が確認された。cIVF で媒精された平均卵子数 8.92 個について受精率=0% であった受精障害症例 12 例の検討においても、観察された平均精子数 403 のうち CD 46 陽性の先体反応後精子 (平均精子数 203, 先体反応率 50%) は、妊孕能確認例同様全て IZUMO 陽性であり IZUMO の発現が確認された。

本研究により、臨床的に ICSI の適応とされた、著しい精子濃度、運動率の低下を認める精子の卵子細胞膜との融合能は正常であることが示唆された。これは、単一のファクター、例えば精子運動率の低下、IZUMO の発現、他の受精過程に必須と考えられるファクターなどの情報から、

生殖治療における ART の計画をたてることの困難さを示唆しているものと考えられた。また、受精障害症例 12 例の中には、蛋白質レベルの解析で IZUMO 陰性と考えられる症例は存在しなかった。IZUMO が欠如している男性は ICSI 以外の方法では子孫を残すことが困難であると考えられるため、ICSI が生殖医療に取り入れられていなかった約 15 年前では子孫を残せなかった可能性が考えられ、その存在が非常に稀であり今回の検体数では検出できなかった可能性が考えられた。

## 審査結果の要旨

IZUMO は精子と卵子細胞膜の融合に必須と考えられる最近同定された蛋白である。IZUMO は射精直後の精子膜表面には存在せず先体反応後の精子においてはじめて先体内膜表面に露出する。IZUMO をノックアウトしたマウスでは雌は正常であるが雄は不妊で、その精子は卵子細胞膜と融合する能力を完全に欠失していた。

筆者はヒトにおいて、正常妊孕能を持つ男性の精子と比べて、臨床的に顕微授精の適応となった重症男性不妊症例の精子、及び体外受精において受精障害となった不妊症例の精子の IZUMO の発現に変化があるか検証した。

本研究では、同意の得られた妊孕能を確認されている健康な男性の射出精子、臨床的に顕微授精の適応となった男性不妊症例 13 例の射出精子、体外受精において受精率 = 0 % であった受精障害症例 12 例の射出精子を用い、精子先体反応を誘起後に免疫蛍光染色を行った後、蛍光顕微鏡にて観察し精子先体内膜表面上の IZUMO の発現を検討した。なお、先体反応後精子を同定するマーカーとして、IZUMO 同様に先体反応後に精子先体内膜上に出現することがわかっている CD 46 を同時に免疫蛍光染色した。観察した精子のうち、CD 46 陽性で先体反応後と考えられる精子の中で IZUMO が陽性であるもの、陰性であるものをそれぞれカウントした。

妊孕能を確認されている射出精子では、観察された精子のうち CD 46 陽性の先体反応後精子（精子数 170, 先体反応率 32.7%）は全て IZUMO 陽性であり IZUMO の発現が確認された。臨床的に顕微授精の適応となった重症男性不妊症例 13 例の射出精子では、全ての先体反応後精子において妊孕能確認例同様に IZUMO 陽性であり IZUMO の発現が確認された。体外受精で媒精された平均卵子数 8.92 個について受精率 = 0 % であった受精障害症例 12 例の検討においても、観察された精子のうち CD 46 陽性の先体反応後精子（平均精子数 203, 先体反応率 50%）は、妊孕能確認例同様全て IZUMO 陽性であり IZUMO の発現が確認された。

本研究により、臨床的に顕微授精の適応とされた著しい精子濃度、運動率の低下を認める精子の卵子細胞膜との融合能は正常であることが示唆された。これは、単一のファクター、例えば精子運動率の低下、IZUMO の発現、他の受精過程に必須と考えられるファクターなどの情報から生殖治療の計画をたてることの困難さを示唆しているものと考えられた。また、受精障害症例 12 例の中には蛋白質レベルの解析で IZUMO 陰性と考えられる症例は存在しなかった。IZUMO が欠如している男性は顕微授精以外の方法では子孫を残すことが困難であると考えられるため、顕微授精が生殖医療に取り入れられていなかった約 15 年前では子孫を残せなかった可能性が考えられ、その存在が非常に稀であり今回の検体数では検出できなかった可能性が考えられた。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。