

シンポジウム2 配偶子形成とその成熟の分子機構

配偶子形成過程における細胞骨格系の形成と受精における機能発現： 生殖補助技術向上のための新しいストラテジーにむけて

東北大学助教授 寺 田 幸 弘

目 的

配偶子成熟とは雌雄の配偶子が受精を正常に完了するために必要な能力を得る過程であり、それぞれの形成細胞には極めてダイナミックな細胞構造の変化が要求される。それら生命誕生への“動き”を司るのが細胞骨格系である。細胞骨格系には微小管(MT)、微小繊維(MF)などがあり、その動態は調節タンパクにより制御されている。また、微小管形成中心である中心体はヒト受精では精子より導入され、卵内にMTによる精子星状体を形成する。精子星状体は両性ゲノムの融合に必須の細胞骨格構造である。近年の不妊症診療で、ICSIを含めた生殖補助技術でも受精が成立しないケースが存在することが明らかになり、その病態解明が求められている。その原因の多くは配偶子自体の問題であり、主因の一つとして細胞骨格系の機能不全が推測されている。本研究の目的は配偶子形成過程における細胞骨格系のダイナミックな“動き”を明らかにすることである。さらに、その受精における機能発現を検討して受精障害の新たな病態解明の糸口とすることである。

方 法

(ヒト配偶子を用いた全ての検討は本学倫理
委員会の承認、患者同意書所得後施行)

A：ヒトおよびマウス卵子成熟過程における細胞骨格系の形成と調節タンパクの局在：(1) ヒトおよびマウス卵子成熟過程のMT、MFおよびMTの動態を調節するタンパク(γ -tubulin, centrin)の局在を観察した。方法は免疫蛍光染色による観察とpoloscopeあるいは蛍光標識細胞骨格タンパクの顕微注入による生体観察を用いた。(2) MT inhibitor, MF inhibitorを成熟培地に添加して細胞骨格系の卵成熟における役割を検討した。(3) 細

胞内小器官である表層顆粒の卵成熟における局在変化とそれに対するMT、MFの役割を検討した。

B：ヒトおよびマウス精子形成における細胞骨格系の形成と調節タンパクの局在：(1) 病理剖検時のヒト精巣およびマウス精巣より精子形成細胞群を採取して成熟の各過程におけるMT、MF、および γ -tubulin, centrinの局在を観察した。(2) TESEおよび診断的精巣生検時に採取される男性不妊症例の精子形成細胞群について同様の検討を行い正常例と比較検討した。(3) マウスの若年個体と老齢個体とでこれらの細胞骨格の形成を比較した。

C：受精時の雌雄ゲノム融合に必須な細胞骨格系を誘導する精子中心体機能の検討：(1) ウシ卵子を用いてヒト精子中心体機能を測定するシステムを開発した。(2) 奇形精子症による不妊症例の精子形態を観察し、その精子中心体機能を測定した。

成 績

A：(1) マウス卵成熟過程でMFは卵核胞(GV)期には卵核胞周辺に存在しmetaphase 2(M2)期には第2減数紡錘体周辺の細胞膜直下に局在した。MTは第1, 第2減数紡錘体を構成して、樽状の極には γ -tubulinが存在した。M2期卵の細胞質内にはMTが放射状に形成された小構造(cytoplasmic aster)がいくつか存在し、その中心に γ -tubulinが存在した。成熟卵子の第2減数紡錘体をpoloscopeで生体観察しながら細いガラスニードルを卵内に挿入すると減数紡錘体を細胞内で移動させることが可能であった。ヒト卵子成熟過程でのMFはGV期卵で卵核胞周辺に集積し、成熟卵子ではマウス卵子のような強い極性を示さなかった。また、MTは減数紡錘体を形成し、マウス

で観察された cytoplasmic aster は存在しなかった。(2) マウス GV 期卵体外培養系に MF inhibitor を添加すると、成熟は M1 期で停止して第 1 減数紡錘体の卵表層への移動が観察されなかった。また、マウス成熟卵に MT inhibitor を添加すると第 2 減数紡錘体の消失と染色体の卵表層への飛散が認められ、飛散した染色体周辺に MF が集積した。ヒト GV 卵子体外培養系に MF inhibitor を添加すると細胞表層に M1 期で停止した減数紡錘体が観察され、第一極体の放出は認められなかった。(3) マウス卵子表層顆粒は GV 期卵では細胞質内全体に存在するが、成熟に伴い卵表層付近に移動した。この動きは MF inhibitor にて阻害された。

B: (1) ヒトおよびマウス精子形成細胞群では、MT は分裂紡錘体に MF は分裂溝に存在した。Spermiogenesis 時にはマンシェット状の MT が精子細胞内に形成され residual body が精子より分離されてゆくのが観察された。また、 γ -tubulin, centrin はヒト spermiogenesis では精子中心体に残存しているが、マウスでは residual body 内に排出されているのが観察された。(2) 男性不妊症例の精子形成細胞群では分裂紡錘体を持った細胞の率の低下、分裂紡錘体の形態異常、マンシェット状の MT の形態異常が認められた。更に、精子形成過程での機能的中心体タンパクの発現の欠如が認められる症例が存在した。(3) マウス老齢個体精巣細胞群に若年個体と比較して分裂紡錘体の位置および大きさに異常が見られた。

C: (1) ウシ成熟卵子内にヒト精子を Piezo micromanipulator を用い ICSI して 6 時間後に卵を固定して微小管の形成を観察したところ、ヒト精子中心体より精子星状体の形成が観察された。本システムでヒト精子中心体機能のアッセイが可能

であることが明らかになり、正常精子での星状体形成率は約 60% であった。(2) Globozoospermia 症例の奇形精子は精子中心体が存在する精子中片を含めた形態の異常が観察された。ウシ卵子内での星状体形成率は 15% で低値を示した。臨床 ICSI において全て 2 前核期で停止した症例の精子は精子中片から尾部に特徴的な形態を示した (fibrous sheath defect)。ウシ卵子内での星状体形成率は 16% で低値を示した。すなわちこれらの受精障害の背景として精子中心体機能不全が存在することが明らかになった。

結 論

配偶子形成と形成過程で獲得した機能が受精における発現を細胞骨格の観点より解析した。卵子形成系、精子形成系に細胞骨格系の正常な機能発現が不可欠であることを示した。卵成熟の過程では細胞骨格系による細胞質のダイナミックな動きが存在し、ヒトとマウスではその形成および調節タンパクの局在が異なることが明らかとなった。また、成熟卵には減数紡錘体や染色体を細胞膜下の位置に繫留しておくシステムが存在することが明らかになった。形態異常精子形成の原因として細胞骨格系の機能異常が推測された。また、マウスと異なりその受精時に雄性配偶子より中心体が導入されるヒトの精子形成過程では spermiogenesis の段階で中心体機能タンパクが精子に保持されることが明らかとなった。精子形成過程での異常は受精での細胞骨格の機能発現にも影響する可能性を、受精障害を呈した不妊症症例の精子を用いて示した。本研究は配偶子機能の新しい評価と機能不全例への対応を解明する端緒となり、生殖補助技術向上のための新しいストラテジーをもたらす。