



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1614号
学位記番号	第1149号
氏名	澤田 祐季
授与年月日	平成 30年 3月 26日
学位論文の題名	Clinical utility of decorin in follicular fluid as a biomarker of oocyte potential (卵胞液中 decorin の卵子の質のバイオマーカーとしての臨床的有用性) Reproductive Biology 2017 Dec 8. doi:10.1016/j.repbio.2017.12.001. [Epub ahead of print]
論文審査担当者	主査： 安井 孝周 副査： 齋藤 伸治, 杉浦 真弓

論文内容の要旨

【目的】

生理活性物質の1つである decorin (DCN)は、コラーゲン繊維の形成、細胞の接着や侵入、血管新生誘導に関与しており、それらの機能を通して、絨毛の子宮内膜への侵入や腫瘍発育に関わっているとの報告がある。

卵巣では卵胞の莢膜、間質細胞、成熟卵胞の卵胞液、黄体中に存在することが報告されており、growth factor の調節等を介して卵胞発育、排卵、黄体維持を含め卵巣内で多くの役割を担っていると考えられている。しかし、生殖現象における DCN の作用の詳細や局在は不明であるため、その役割や由来を解析し不妊治療における biomarker としての意義を解明することを目的とした。

【方法】

2010年4月～2016年3月に名古屋市立大学病院において、原因不明不妊症の適応で生殖補助医療による治療を受けた患者の内、本研究に同意を示した者を対象とした。

調節卵巣刺激法を用いて採卵を行った。調節卵巣刺激法は患者年齢及び事前に測定した anti-Mullerian hormone を参考にしてロング法、ショート法、アンタゴニスト法、CC-Gn 法の4つから選択した。最初に穿刺する予定の卵胞周囲の血流の pulsatility index (PI)を採卵前に測定した。第一穿刺卵胞から回収した卵子は個別に培養し、その後の受精及び分割を観察した。また第一穿刺卵胞から得た卵胞液は-20℃で保存し、一部の卵胞液から顆粒膜細胞を抽出し、4℃で保存した。

受精方法は原則的に conventional in vitro fertilization (C-IVF)を行ったが、過去の C-IVF において受精率が低かった患者には顕微授精 (ICSI)を、採卵数が6個以上であった場合には split ICSI を行った。受精卵は採卵後2日の時点で Veeck 分類に準じて評価し、Grade1,2を良好胚、Grade3～5を不良胚とした。

卵胞液中の DCN 濃度(F-DCN)、採卵直前に採取した血清中の DCN 濃度(S-DCN)及び卵胞液中の IGF-1 濃度を ELISA にて測定した。そして F-DCN と、S-DCN、患者年齢、調節卵巣刺激法における総 FSH/hMG 投与量、卵胞液中 IGF-1 濃度、卵胞周囲血流の PI、DCN を計測した卵胞から得られた卵子の受精の有無、受精卵の質との関連について解析した。

また DCN の顆粒膜細胞での存在を調べるために、卵胞液から回収した顆粒膜細胞を検体として免疫染色及び Western blotting を行った。

【成績】

のべ88人の患者から卵子130個、卵胞液及び血清を130検体回収した。130個の卵子のうち、70個に ICSI を施行した。130検体の F-DCN 及び S-DCN の median value (IQR: interquartile range) は、39.26 ng/ml (28.41-44.44)と 4.88 ng/ml (3.95-5.75)であった。

調節卵巣刺激法、受精方法、受精卵の質の違いにより、F-DCN に有意差は認めなかった。F-DCN と年齢、総 FSH/hMG 投与量、卵胞液中 IGF-1 濃度、卵胞周囲血流の PI との相関は認めなかったが、S-DCN とは弱い負の相関を認めた。

受精(+)群と受精(-)群の F-DCN 及び S-DCN の比較では、全体では有意差を認めなかった。しかし ICSI を行った患者群に限って検討すると、受精(+)群 (n=52) 33.24 (26.67-41.43) ng/ml、受精(-)群 (n=18) 40.18 (33.11-45.64) ng/ml と受精(+)群で有意に F-DCN が低い結果であった ($P<0.05$)。また F-DCN の受精の有無に対する ROC 曲線から決定した F-DCN のカットオフ値を 34.5ng/ml とすると、カットオフ値よりも F-DCN が低い卵胞から採取された卵子は、F-DCN が高い卵胞から採取された卵子よりも受精率が高い傾向があった。加えて受精に対する F-DCN の陽性的中率は 0.86

と高い値を示した。

免疫染色及び Western blotting では、顆粒膜細胞に DCN の存在は確認できなかった。

【結論】

ICSI を施行した患者群での検討において、受精(+)群の F-DCN が受精(-)群よりも低かったことより、卵胞液中の DCN が卵子の質や成熟に関与していることが示唆された。また DCN の顆粒膜細胞での存在が確認されなかったことより、DCN は顆粒膜では産生されておらず、間質での産生や血中から卵胞液中に流入している可能性が考えられた。

生殖現象における DCN の詳細な働きをさらに解明する必要があるが、成熟卵胞中の DCN はその卵胞内の卵子の状態を示す biomarker として有用であることが示された。

論文審査の結果の要旨

【目的】生理活性物質の1つである decorin (DCN)は、コラーゲン繊維の形成、細胞の接着や侵入、血管新生誘導に関与しており、それらの機能を通して、絨毛の子宮内膜への侵入や腫瘍発育に関わっているとの報告がある。卵巣では卵胞の莢膜、間質細胞、成熟卵胞の卵胞液、黄体中に存在するが、生殖現象における DCN の作用の詳細や局在は不明であるため、その役割や由来を解析し不妊治療における biomarker としての意義を解明することを目的とした。

【方法】原因不明不妊症の適応で体外受精を受けた 88 人を対象とした。調節卵巣刺激法は患者年齢及び anti-Mullerian hormone 値を参考にしてロング法、ショート法、アンタゴニスト法、CC-Gn 法の 4 つから選択した。第一穿刺卵胞周囲の血流 pulsatility index (PI)を採卵前に測定した。第一穿刺卵胞から回収した卵子は個別に培養し、その後の受精及び分割を観察した。卵胞液は-20℃で保存し、一部の卵胞液から顆粒膜細胞を抽出し、4℃で保存した。

受精方法は原則的に conventional in vitro fertilization (C-IVF)を行ったが、過去の C-IVF において受精率が低かった患者には顕微授精 (ICSI)を、採卵数が 6 個以上であった場合には split ICSI を行った。Veck 分類に準じて Grade1,2 を良好胚とした。卵胞液中の DCN 濃度(F-DCN)、採卵直前に採取した血清中の DCN 濃度(S-DCN)及び卵胞液中の IGF-1 濃度を ELISA にて測定した。F-DCN と、S-DCN、患者年齢、調節卵巣刺激法における総 FSH/hMG 投与量、卵胞液中 IGF-1 濃度、卵胞周囲血流の PI、DCN を計測した卵胞から得られた卵子の受精の有無、受精卵の質との関連について解析した。卵胞液から回収した顆粒膜細胞を検体として免疫染色及び Western blotting を行った。

【成績】卵子 130 個、卵胞液及び血清を 130 検体回収した。70 個に ICSI を施行した。130 検体の F-DCN 及び S-DCN の median value (IQR: interquartile range)は、39.26 ng/ml (28.41-44.44)と 4.88 ng/ml (3.95-5.75)であった。調節卵巣刺激法、受精方法、受精卵の質の違いにより、F-DCN に有意差は認めなかった。F-DCN と年齢、総 FSH/hMG 投与量、卵胞液中 IGF-1 濃度、卵胞周囲血流の PI との相関は認めなかったが、S-DCN とは弱い負の相関を認めた。

ICSI を行った患者群では、受精(+)群 (n=52) 33.24 (26.67-41.43) ng/ml、受精(-)群 (n=18) 40.18 (33.11-45.64) ng/ml と受精(+)群で有意に F-DCN が低い結果であった ($P<0.05$)。また F-DCN の受精の有無に対する ROC 曲線から決定した F-DCN のカットオフ値を 34.5ng/ml とすると、F-DCN が低い卵胞から採取された卵子は、F-DCN が高い卵胞から採取された卵子よりも受精率が高い傾向があり、F-DCN の陽性的中率は 0.86 と高い値を示した。免疫染色及び Western blotting では、顆粒膜細胞に DCN の存在は確認できなかった。卵胞液中の DCN が卵子の質や成熟に関与していることが示唆された。

【審査の内容】約 20 分間のプレゼンテーションの後に、主査の安井からは fDCN の由来、排卵調節の副作用、ELISA 法の原理などの 7 項目の質問がなされた。また第一副査の齋藤教授からは、採卵方法、卵胞液の量や平均卵子数、DCN に着目した理由、血清よりも卵胞液の濃度が高い物質には何があるか、など 11 項目の質問がなされた。第二副査の杉浦教授からは不妊症の原因と治療、良好胚の選別方法、妊娠率を改善する方法の 3 項目の質問がなされた。概ね満足のいく回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると共に専門領域の知識も十分であると判断した。本研究は、成熟卵胞中の DCN が卵子の状態を示す biomarker として有用であることを示した初めての論文であり、意義がある。以上をもって本論文の著者には、博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 安井 孝周

副査 副査 齋藤 伸治 杉浦 真弓