

学位論文の要旨

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 臨床医学系講座 産科婦人科学分野	氏 名	立花 亮太
<p>主論文の題名 Carboxylated Poly-L-lysine Potentially Reduces Human Sperm DNA Fragmentation after Freeze-Thawing, and Its Function Is Enhanced by Low-Dose Resveratrol</p> <p>主論文の要旨 緒言と目的 精子 DNA 断片化 (SDF) は、生殖補助医療における体外受精成績への悪影響が懸念されている。SDF が生じる一因に精子の凍結融解があり、我々が以前の研究で開発したカルボキシル化ポリ-L-リジン (CPLL) 含有ヒト精子凍結保存液は、臨床で一般的に使用されているヒト血清アルブミン (HSA) 含有ヒト精子凍結保存液と比較し、凍結融解時の SDF を減少させる可能性が示唆された。しかし、比較した凍結保存液同士の成分が若干異なっていたため、CPLL により SDF が減少したかどうかは不明であった。そこで、本研究では CPLL に SDF 減少効果があるのかを確認し、その関連要因を評価した。さらに、CPLL 含有ヒト精子凍結保存液の将来的な臨床応用のために、SDF 減少効果をより増強するための最適な抗酸化物質とその濃度を同定し、関連要因についても評価した。</p> <p>方法 世界保健機関のガイドライン (2021) に基づき、正常な精子所見と評価された 24 名の男性から得た精液を使用した。密度勾配遠心法で精液中の良質精子を選別した後、各種凍結保存液に分注して凍結した。CPLL の SDF 減少効果と関連要因の評価は、CPLL 含有精子凍結保存液、CPLL を除いた凍結保存液、CPLL を 5% v/v の HSA と代替した HSA 含有凍結保存液の 3 種類を使用した。また、最適な抗酸化物質の選択とその濃度の同定は、CPLL 含有凍結保存液に、カンタキサンチン、アスタキサンチン、ピロロキノリンキノン、レスベラトロール (RES) を添加した 4 種類の凍結保存液を使用した。約 1 週間の凍結保存後に融解し、精子運動率と SDF を評価した。さらに最も SDF 率が低減した凍結試薬について、SDF の直接的な発生原因である活性酸素 (ROS) と精子膜の脂質過酸化 (LPO)、ROS 生成原因であるミトコンドリア損傷などの抗酸化機序を評価した。</p>			

結果

CPLL のヒト精子凍結保存液への添加は、精子凍結融解後の精子運動率を改善し、SDF を減少した。その要因としてミトコンドリア損傷の抑制、細胞質内 ROS 生成の抑制、LPO 生成の抑制が確認された。また、CPLL を含むヒト精子凍結保存液への 0.1 mM RES の添加は SDF を顕著に減少させ、その要因として精子凍結融解後のミトコンドリア損傷の抑制、ミトコンドリアおよび細胞質内 ROS 生成の抑制、LPO 生成の抑制も確認された。

考察

精子凍結で生じる SDF の主な原因は、凍結時の急激な浸透圧変化によりミトコンドリアから生成する過剰な ROS である。凍結時に生成された過剰な ROS は、SDF の直接的な原因となるだけでなく、SDF の一因である LPO やミトコンドリア損傷による ROS 生成を促進することで間接的にも SDF を増加させる。CPLL は凍結時の急激な浸透圧変化を防ぐことが先行研究で示唆されており、CPLL の浸透圧変化の抑制が、凍結時の過剰な ROS 生成を抑制し、それに付随して生じる LPO やミトコンドリア損傷を抑制することで SDF を減少させた可能性がある。また、LPO とミトコンドリアの損傷は精子運動に密接に関係している。LPO は細胞膜の流動性と精子膜の完全性を低下させ、精子運動に悪影響を及ぼす。さらに、精子運動はミトコンドリアが産生する ATP に依存しており、ミトコンドリア損傷により ATP 産生が障害され運動率が低下する。従って、CPLL の間接的な LPO 抑制ならびにミトコンドリア損傷抑制が精子運動率の改善に寄与した可能性がある。

CPLL 含有ヒト精子凍結保存液への 0.1mM RES の添加は、SDF を更に低減した。細胞質には通常抗酸化酵素が含まれており、過剰な ROS は抗酸化酵素により除去され悪影響を及ぼさないが、ヒト精子は細胞質が極めて少ないため ROS の影響を受けやすい。抗酸化剤である RES は、ヒト精子に不足している抗酸化酵素の機能を補うことで、凍結時に生じた過剰な ROS を除去し、それに付随する LPO とミトコンドリア損傷を抑制することで SDF を減少させた可能性がある。

結論

本研究は、CPLL がヒト精子凍結時の ROS と LPO 生成を抑制する抗酸化作用を示し、間接的に SDF を減少させる可能性が示唆された。さらに、CPLL の抗酸化作用は臨床で一般的に使用されている HSA より高く、SDF の減少効果も顕著であった。また、CPLL を含むヒト精子凍結保存液に最適な抗酸化物質は、0.1 mM RES であることを確認した。RES は精子の抗酸化酵素の機能を補い、凍結で生じる過剰な ROS を除去することで SDF を減少すると考えられる。今回開発した CPLL と RES を含むヒト精子凍結保存液は、将来的には生殖補助医療の治療成績を改善する可能性がある。