

氏 名	中 村 容 子
(ふりがな)	(なかむら ようこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 29 年 1 月 11 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Analysis of the methylation rate of the androgen receptor promoter region in granulosa cells in moderate to severe endometriosis patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation  (子宮内膜症性不妊症例の顆粒膜細胞におけるアンドロゲンレセプター (AR) プロモーター領域のメチル化率の検討)
論文審査委員	(主) 教授 高 井 真 司 教授 朝 日 通 雄 教授 矢 野 貴 人

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 《目的》

子宮内膜症は、子宮内膜の類似組織が子宮外に発育、増殖する疾患で、初経年齢の低年齢化、出産年齢の高齢化、少子化といった現代女性のライフスタイルの変化により、近年増加傾向にある。子宮内膜症は、生殖年齢女性の約 10%に存在し、特に不妊症女性においては約 50%に存在すると報告されている。体外受精治療において子宮内膜症性不妊症では、卵胞発育障害による、採卵数や受精率、妊娠率の低下を認めるが、その原因については未だ不明な部分が多い。

アンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子は Xq11.2\_12 に存在する。アンドロゲンの生理作用は、卵巣上皮をはじめ、顆粒膜細胞、夾膜細胞のほか黄体細胞にも存在する AR を介した、標的遺伝子群の発現制御機構によって発揮される。

我々はこれまでに、非子宮内膜症症例において認める、顆粒膜細胞における AR と FSH 受容体の発現の正の相関が、子宮内膜症症例においては認められないことを報告した。また、顆粒膜細胞における AR の発現率と AR プロモーター領域のメチル化の有無を検討し、子宮内膜症症例では非子宮内膜症症例と比較して有意に AR の発現率が低く、プロモーター領域がメチル化されていることを示した。

そこで今回、子宮内膜症症例における妊孕能低下の一因に、顆粒膜細胞の AR のプロモーター領域のメチル化の上昇が関与しているのではないかと考え、顆粒膜細胞における AR プロモーター領域のメチル化率を定量的に算出し、検討した。

#### 《対象と方法》

2010 年 10 月から 2013 年 12 月、当院で体外受精を受ける患者に対してインフォームドコンセントを取得後、採卵時に顆粒膜細胞が得られた 42 例（子宮内膜症症例 18 例、非子宮内膜症症例 24 例）を対象とした。卵胞液より採取した顆粒膜細胞から genomic DNA を抽出後、バイサルファイト処理しメチル化特異的 PCR 法（MSP）で増幅した。まず人工合成した DNA（メチル化および非メチル化）を使用して検量線を作成し、それに基づいて試料中のそれぞれの分子数を測定し、AR のプロモーター領域のメチル化率を算出した。

これらのうち 15 例（子宮内膜症症例 6 例、非子宮内膜症症例 9 例）の AR mRNA の発現量について、顆粒膜細胞から cDNA を抽出後、TaqMan プロローベを用いた One step リアルタイム PCR 法で増幅し、 $\Delta\Delta Ct$  法で解析を行った。

#### 《結果》

妊孕能に関連する項目において 2 群間で差を認めたのは胞状卵胞数、成熟卵胞数、採卵数で、子宮内膜症症例で低値であった。

子宮内膜症症例の顆粒膜細胞における AR のプロモーター領域のメチル化率は、非子宮内膜症症例と比較して有意に高値であった（ $p=0.018$ ）。

子宮内膜症症例において、AR のプロモーター領域のメチル化率は、胞状卵胞数 ( $r=-0.48$ )、採卵数 ( $r=-0.50$ )、採卵率 ( $r=-0.61$ )、受精率 ( $r=-0.50$ ) と負の相関を認めたが、良好胚率との相関は認められなかった。非子宮内膜症症例においては、これらのすべてにおいて相関が認められなかった。また、両群において、AR のプロモーター領域のメチル化率は、年齢と正の相関を認めた(子宮内膜症群:  $r=0.2$ 、非子宮内膜症群:  $r=0.45$ )。

子宮内膜症症例と非子宮内膜症症例の AR mRNA の発現率と AR のプロモーター領域のメチル化率は、負の相関傾向であった ( $r=-0.3$ )。

#### 《考察》

本研究により、子宮内膜症性不妊症例において、AR のプロモーター領域のメチル化率の上昇と AR の発現率の低下が、卵胞発育不全の一因となっている可能性が示唆された。

本研究の限界として、対象とした子宮内膜症症例は全例手術を行い、病巣を確認し、摘出術が行われていることが考えられる。病巣を除去することによってメチル化の状態が変化する可能性がある。病巣除去とメチル化率の変化の関係や、それらの卵胞発育に対する影響に関しては現段階では不明である。

(様式 甲6)

## 論文審査結果の要旨

現代女性のライフスタイルの変化により近年増加傾向にある子宮内膜症は、生殖年齢女性の約 10%に存在し、特に不妊症女性においては約 50%に存在すると報告されている。体外受精治療において子宮内膜症性不妊症では、卵胞発育障害による、採卵数や受精率、妊娠率の低下を認めるが、その原因については未だ不明な部分が多い。本研究は、子宮内膜症症例における妊孕能低下の一因に、顆粒膜細胞のアンドロゲン受容体 (AR) のプロモーター領域のメチル化の上昇が関与しているのではないかと考え、顆粒膜細胞における AR のプロモーター領域のメチル化の程度を定量的に評価し、妊孕能との関係について検討したものである。

申請者らは、体外受精治療を受けた 42 例 (子宮内膜症症例 18 例、非子宮内膜症症例 24 例) を対象に検討を行った。妊孕能に関連する項目において 2 群間で差を認めたのは胞状卵胞数、成熟卵胞数、採卵数で、子宮内膜症症例で低値であった。子宮内膜症症例の顆粒膜細胞における AR のプロモーター領域のメチル化率は、非子宮内膜症症例と比較して有意に高値で、AR mRNA の発現率と AR のプロモーター領域のメチル化率には負の相関傾向があることから、子宮内膜症症例における AR mRNA の発現率の低下に AR のプロモーター領域のメチル化率の上昇が関与する可能性を示した。また、子宮内膜症症例において、AR のプロモーター領域のメチル化率は、胞状卵胞数、採卵数、採卵率、受精率と負の相関を認めた。

本研究では、子宮内膜症症例において、顆粒膜細胞の AR のプロモーター領域がメチル化することで顆粒膜細胞の AR mRNA の発現率が低下し、その結果、卵胞発育不全を来す可能性が示唆された。今後、子宮内膜症治療によるメチル化率の変化や、それによる卵胞発育、妊孕能に対する影響に関する長期的検討が期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of reproductive endocrinology & infertility 1 (1): 5, 1-8, 2015