

氏名	鎌田美佳
(ふりがな)	(かまだ みか)
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25年1月16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	Expression and epigenetic change of the AR and FSHR genes in the granulosa cells of endometriosis patients (子宮内膜症の顆粒膜細胞におけるFSH受容体発現とアンドロゲン受容体プロモーター領域のメチル化解析)
論文審査委員	(主) 教授 大槻 勝紀 教授 朝日 通雄 教授 林 秀行

### 学位論文内容の要旨

#### 《研究目的》

子宮内膜症とは子宮内膜あるいはその類似組織が子宮外の骨盤内外に発育、増殖する疾患であり、生殖年齢の約10%に存在する。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の女性のライフスタイルにより発見される機会は近年増加傾向にある。不妊とも関連があり、女性側不妊の25-40%の原因を子宮内膜症が占めている。また、子宮内膜症患者では、卵管性不妊症や男性不妊症患者と比較すると、体外受精を行っても受精率、着床率が低いことが知られている。一方、アンドロゲンは男性の reproductive system に重要であることは知られているが、女性においては閉鎖卵胞の原因になると考えられてきた。アンドロゲン受容体(AR)遺伝子は Xq11.2\_12 に存在し、アンドロゲンの生理作用は

AR を介した特異的標的遺伝子群の発現制御機構によって発揮される。AR のヒト卵巣での局在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検出されたことにより、アンドロゲンが単なるエストロゲンの基質ではなく、遺伝子を介して卵胞発育に影響を及ぼしている可能性がある。近年、アンドロゲンが卵胞刺激ホルモン(FSH)と密接に関わり合いながら卵胞発育を促進することが言われている。アンドロゲンが核内 AR を介して、FSHR 発現を誘導し、逆に FSH は FSHR を介して AR 発現を誘導している。アンドロゲンの 1 つであるアンドロステンジオン(A4)は子宮内膜を急速に増殖させる作用があり、子宮内膜症でも AR を介して影響を及ぼしていると推測できる。また、2009 年 Bulun らは子宮内膜症症例ではプロゲステロン受容体(PR)やエストロゲン受容体 $\beta$  (ER $\beta$ )のプロモーター領域の非メチル化による過剰発現が後天的イベントとして子宮内膜症を引き起こしていると報告した。しかし、子宮内膜症における雄性ホルモンの受容体である AR の epigenetic な修飾については未だ不明である。そこで今回申請者らは、顆粒膜細胞における AR および FSHR mRNA の発現を子宮内膜症症例と非子宮内膜症症例（コントロール群）とで比較し、子宮内膜症が受精率、着床率に及ぼす影響におけるこれらの受容体の役割を明らかにすることを主目的とした。さらに顆粒膜細胞から genomicDNA を抽出し、AR のプロモーター領域のメチル化の有無についてコントロール群と比較検討した。

#### 《対象と方法》

- ① 対象は 2003 年から 2009 年まで、当科でインフォームドコンセント取得後に採卵した重症子宮内膜症合併不妊症例（47 例）とコントロール群として非子宮内膜症性不妊症例（28 例）である。AR および FSHR mRNA の発現量については、採卵時に得られた顆粒膜細胞から 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
- ② AR プロモーター領域のメチル化の有無については、対象を新たに 2009 年から 2011 年まで、当科でインフォームドコンセント取得後に採卵した重症子宮内膜症合併不妊症例（11 例）とコントロール群として非子宮内膜症性不妊症例（11 例）とした。顆粒膜

細胞から total DNA を抽出し、バイサルファイト処理を行った DNA を MS-PCR 法で増幅し、解析した。

#### 《結 果》

- ① AR および FSHR の発現は年齢と相関を認めなかった。
- ② 妊娠群と非妊娠群で AR および FSHR の発現を検討してみると、AR の発現はコントロール群のみ妊娠群が非妊娠群より有意に高かった ( $p < 0.05$ )。FSHR は発現に有意差を認めなかった。また、子宮内膜症症例とコントロール群で AR および FSHR の発現を検討してみると、子宮内膜症合併不妊症例では AR の発現が有意に低下していた ( $p < 0.05$ )。
- ③ コントロール群のみ AR の発現と FSHR の発現に強い相関がみられた ( $R=0.7$ ) が、子宮内膜症合併不妊症例では相関は認めなかった。
- ④ AR のプロモーター領域のメチル化は子宮内膜症合併不妊症例においては 11 例中 11 例 (100%) において見られたが、コントロール群では 11 例中 5 例 (45%) であり、有意差を認めた。 ( $p < 0.05$ )

#### 《結 論》

子宮内膜症症例では、顆粒膜細胞の AR 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が亢進し、それが AR の発現を減少させ、AR と FSHR の協調的な発現誘導による卵胞成熟が障害されることが不妊の一因となっている可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

子宮内膜症は、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の女性のライフスタイルの変化により発見される機会は近年増加傾向にある。不妊とも関連があり、女性側不妊の 25 - 40%の原因を占めており、他の不妊原因と比較すると、体外授精を行っても受精率、着床率が低いことが知られている。本研究は顆粒膜細胞で従来卵胞発育とは関係ないとされてきたアンドロゲン受容体(AR)発現と FSH 受容体(FSHR)発現、子宮内膜症が不妊をもたらす機構における役割を検討したものである。申請者らは重症子宮内膜症合併不妊症例と非子宮内膜症性不妊症例を対象とし、AR および FSHR の発現と年齢との関係、子宮内膜症の有無による AR および FSHR の発現、妊娠の有無による発現を検討した。その結果、

- ① AR および FSHR の発現は、共に年齢との相関を認めなかった。
- ② FSHR は子宮内膜症合併不妊症例、非子宮内膜症性不妊症例のいずれにおいても、妊娠の有無による発現差を認めなかったが、AR は非子宮内膜症性不妊症例において妊娠によって発現が有意に上昇した。また、子宮内膜症合併不妊症例では非子宮内膜症性不妊症例に比べて AR の発現が有意に低下していた。
- ③ コントロール群においてのみ AR および FSHR の発現に強い相関がみられたが、子宮内膜症合併不妊症例では相関は認めなかった。
- ④ AR のプロモーター領域は子宮内膜症合併不妊症例において有意にメチル化が亢進していた。

本研究により、FSH/アンドロゲン系の卵胞発育における役割が見直され、子宮内膜症による不妊に対する関与が示唆され、それによって顆粒膜細胞における新たな内分泌機構の解明に役立つことができた。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条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)

Genetics & Epigenetics 2012:4 1-8,  
doi: 10.4137/GEG.S9877