

200719016A

厚生労働科学研究費補助金
子ども家庭総合研究事業

超少子化時代のわが国における新たな不妊症原因の究明と
社会に即した治療システムの開発

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 阿久津 英憲

平成20(2008)年4月

目 次

I 総括研究報告書

- 超少子化時代のわが国における新たな不妊症原因の究明と社会に即した
治療システムの開発..... 3
阿久津 英憲

II 分担研究報告書

1. 子宮・卵巣疾患の不妊症メカニズム解明及び治療体系の研究..... 13
佐藤 章
2. 子宮・卵巣疾患の不妊症メカニズム解明及び治療体系の研究
—生殖器疾患の不妊症機序に関する基礎的・臨床的研究—..... 15
吉村 泰典
久慈 直昭
3. 生殖器疾患の不妊症機序に関する基礎的・臨床的研究..... 21
大須賀 穰
矢野 哲
4. 男性不妊症感受性遺伝子の集団間、霊長類種間比較..... 29
井ノ上 逸朗
5. 子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な生殖補助医療の治療体系に関する研究..... 33
柳田 薫
6. 卵細胞の質に係わる分子機構の解明に関する研究..... 41
岡部 勝

III 研究成果に関する一欄表..... 45

IV 研究成果の刊行物・別冊..... 51

I 総括研究報告書

超少子化時代のわが国における新たな不妊症原因の究明と社会に即した
治療システムの開発

阿久津 英憲

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

総括研究報告書

超少子化時代のわが国における新たな不妊症原因の究明と社会に
即した治療システムの開発（H18-子ども一般-004）

主任研究者 阿久津英憲

国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部生殖技術研究室長

研究要旨：本研究では、社会で活躍する年代の女性が罹患することが多い子宮内膜症等の生殖器疾患を対象に体系的に妊孕性改善に対する治療を検討し治療の最適化・標準化を図ることで生殖補助医療の質を上げる。同時に、現在の生殖医療において大変重要な課題である、女性の年齢と出生率低下の関係において加齢の卵細胞の質への影響に関して科学的裏付けのある確かなエビデンスを獲得すべく、実験動物マウスを用い、加齢・卵細胞質の発生への影響・胚性幹細胞機能への影響という3つをリンクさせた独自の研究システムにより生殖・再生医療分野に新たな解析方法を提供し新知見を得ていく。初年度は、子宮内膜症の病因メカニズムと不妊機序の解明に関して多角的で、新規的なアプローチにより取り組み、得られた成果は将来の治療法に対して新たな可能性を強く示唆するものであり、一部新聞紙上で報道された（毎日新聞平成18年11月10日）。当該年度は、子宮内膜症は、女性ホルモンが強く関与する疾患であるが新たな視点としてステロイドレセプターコファクター（SRC）に着目し、SRC FamilyのType-1が卵巣性子宮内膜症に強発現していることを突き止め、子宮内膜症を有する患者の正所性子宮内膜でも発現パターンが認められ子宮内膜症の進展にステロイドレセプターの共役因子が関与している可能性が強く示唆された。現在、米国ベイラー医科大学と共同研究を推進している。これまでの成果として、子宮内膜症組織で正常内膜組織とは異なる発現形式を取ることを突き止めた。多嚢胞性卵巣症候群に関しては、卵成熟、排卵障害の局所的な機能障害だけに着目するのではなく、メタボリック症候群の一形態というとらえ方で、インシュリン抵抗性改善薬の有効性について内分泌学的に検討し、更に、この病気では着床不全がおこることを突き止め、その分子メカニズムの一端を明らかにしてきた。順次すすめる基礎研究成果を実際の臨床応用に反映するため、子宮内膜症、多嚢胞性卵巣症候群等の不妊症治療の最適化・標準化を平行して進めていく。もう一つの課題として、生殖と加齢の問題がある。特に卵の質の低下に関して社会の中で理解の混乱があるため、まずは卵細胞の加齢への影響を示すエビデンスが必要とされている。加齢と卵細胞の質における基礎研究では、加齢卵が分化多能性へ影響を及ぼすことが実験動物マウスを使った研究で初めて示された。ライフスタイルの変化により出産時年齢は高齢化し生殖と加齢との関連性に係わる疾患や現象に対して、科学に基づいたエビデンスを与えこの社会に即した生殖医療システムを構築し国民に提供することを目指す。尚、各施設において行う臨床研究は機関内倫理審査委員会での承認の下に行う。ヒト細胞を使用した研究は倫理審査を受け、確認を受け遂行している。「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。

A. 研究目的

女性の生殖適齢期間は、より高齢へとシフトするわけではなく、晩婚化により妊娠が可能である期間はより限られた短い期

間となっている。社会で活躍する年代の女性に好発する子宮内膜症、多嚢胞性卵巣症候群等が、出産時年齢の上昇とともに不妊症の原因としても大きな割合を占めるに

いたっている。本研究班では、初年度に子宮内膜症ではステロイドレセプターコファクターが特異的に発していることを突き止めた。世界に先駆け因果関係を更に基礎研究レベルで証明するため、内膜症細胞に関与する機能をノックアウトマウス等の実験動物モデルを用い、米国ベイラー医科大学と共同研究で新たなメカニズム解明を行っている。

更に、子宮内膜症では様々なケモカイン、サイトカインがその発症、増殖に関わることを報告してきた。本年度はその基礎的現象をベースに血管新生抑制作用で知られるDienogestが内膜細胞の増殖を抑えることを専門誌に報告している。新たな治療法の展開へ着実に進んでいる。一方卵巣の疾患で排卵障害による不妊症となることが知られている多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)は、生殖補助医療において卵巣過剰刺激症候群を引き起こすことが多く、この合併症を予防するために十分な排卵誘発を行なえず妊娠率が低下することになってしまう。本研究では、インスリン抵抗性改善薬を併用し効果的な排卵誘発法比較検討していく。PCOSの病態は未解明であるが、近年アディポカイン産生異常を伴うことが示唆され、子宮内膜でのアディポネクチン受容体の発現動態を明らかにしてきた。アディポカイン類は全身の代謝調節に関わっており、メタボリックシンドロームの観点からもPCOSの病態解明のため、アディポカイン類の産生異常と臨床データを比較検討しPCOSの新たな病態解明の糸口とする。アディポカインの細胞内ターゲットであるAMPキナーゼに着目した分子メカニズムの新知見を報告した。PCOS患者の不妊症治療では、排卵誘発の困難性と着床不全による不妊症治療成功率の低下が問題となっている。ヒト胚の着床時におこる内膜細胞の脱落膜化のAMPキナーゼ関与に着目しPCOSで着床不全がおこるメカニズムを分子レベルで解明していく。

PCOSでは、局所の機能改善のための研究方向性ではなく、メカニズムを解明しながら不妊症の病態を改善し、新たな治療体系を整えていくことを目的とする。子宮内膜症、PCOSともにこれまでにない、重要な分子メカニズムと関連した新規治療薬の有効

性に関して報告し、最終目的の、女性の社会的QOLを損なわない社会に即した不妊症治療の診断・治療体系の科学的基盤を整備していく。

出産年齢が上昇していることより加齢と卵細胞の質への影響は早急に解明しなければならない問題である。実験モデルマウスを用いて、加齢モデル由来の胚より胚性幹(ES)細胞を樹立することに初めて成功し、幹細胞機能維持機能及び分化機能への影響を解析したところ加齢卵子が分化動態へ影響を及ぼすことを突き止めた。これら、卵細胞質の加齢化を評価するあらたな体外培養評価系であり、新知見を得るシステムを構築、評価し加齢と卵の質そしてES細胞の質をリンクさせてわが国の生殖医療と再生医療を結び付ける基盤研究である。

B. 研究方法

1) 子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な生殖補助医療の治療体系に関する研究

子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な生殖補助医療の治療体系について検索論文によるエビデンスから子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な治療指針を検討した。

2) 子宮内膜症不妊機序の解明

-子宮内膜症とSRC Family-

子宮内膜症はエストロゲン依存性疾患である。エストロゲン受容体には転写活性化を行うためsteroid receptor coactivator(SRC)などの共役因子が必要とされているが、本研究において卵巣性子宮内膜症におけるSRCの発現様式を検討した。子宮内膜症患者の子宮内膜組織を対象とし、卵巣性子宮内膜症また子宮内膜症を有する正所性子宮内膜がSRC familyを発現しているかをRT-PCRとHScoreにより半定量化し解析した。更に、SRC遺伝子改変マウスを用い子宮内膜症進展がSRCと関与しているかどうか直接的役割を解明することを米国ベイラー医科大学と共同研究で行っている。

遺子多型を調べた。腹腔鏡下手術を施行する際に同意を得た患者において、子宮内膜症の病巣が確認された症例群と、

子宮内膜症を発症していない健常群において、特定遺伝子の多型ハプロタイプ解析を行った。なお子宮内膜症および子宮筋腫などのリプロダクティブヘルスに関連する疾患と特定遺伝子との関連性について検討を行う研究については、課題名「子宮内膜症および子宮筋腫の遺伝子診断・発症予測に関する研究」として、慶應義塾大学医学部倫理委員会にて承認済みである。このときに承認された患者説明書および同意書を用いて、同意をえられた患者の検体のみから遺伝子研究を行った。

-子宮内膜症発症分子メカニズムと新規治療薬への展開-

膜貫通接着分子の CD44 は、近年、子宮内膜症での重要性もいわれている。この CD44 には可溶性の sCD44 もあるが、子宮内膜症における意義は不明な点も多い。今回の研究では sCD44 の子宮内膜症における意義を探った。加えて、子宮内膜症の発症・進展に免疫が関与していることは以前より指摘されているが、最近 T 細胞系の働きで Treg、Th17 が新たに発見された。Th17 細胞とその主たる産生サイトカインである IL-17 の子宮内膜症における意義を明らかにする試みを行った。子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者の腹腔鏡手術施行時に腹腔内貯留液を採取して、sCD44 濃度を ELISA により測定した。更に、フローサイトメーターで CD4 陽性かつ IL-17 陽性の Th17 細胞の存在を解析し、培養子宮内膜間質細胞を使用して IL-17 の IL-8 産生に対する作用、COX-2 発現に対する作用などを検討した。

ミドカインは血管新生作用、細胞増殖作用などを持つ成長因子のひとつで、子宮内膜症に対しての作用を既に報告しているが、卵胞発育におけるミドカインの意義について、ヒト顆粒膜細胞培養系などを用いて検討した。

体外受精施行患者の卵胞液と顆粒膜細胞を採取し、卵胞液中のミドカインの存在をウエスタンブロットを行った。また、顆粒膜細胞培養系ではミドカインの BrdU 取り込みに与える作用を調べた。さらに、正常卵巣の切片を作製して、ミドカインの

in situ hybridization を施行した。

メトフォルミンの子宮内膜症細胞に与える影響についての検討。昨年度、AMPK を活性化するメトフォルミンが子宮内膜症細胞で、培養上清中の IL-8 産生、細胞内での aromatase の遺伝子発現および活性、さらに、細胞増殖能を濃度依存性に抑制することを示した。今回は本剤の臨床応用を考えて正所性子宮内膜に対する作用を異所性子宮内膜に対する作用と比較検討した。

子宮内膜症に対する新規治療薬ジェノゲストの子宮内膜症細胞に対する直接作用の検討。ジェノゲストは新しいタイプの 19 ノルプロゲスチンでプロゲスチン作用とともに抗アンドロゲン作用を持ち、子宮内膜症細胞に直接作用することが最近示唆されるようになってきた。今回、培養子宮内膜間質細胞を使用して本剤の子宮内膜症への直接作用を検討した。

-子宮内膜症と遺伝子多型にみる新たな関連遺伝子の発見-

子宮内膜症のエストロゲン依存性に着目し、AHRR (aryl-hydrocarbon receptor repressor) と EP300 (E1A binding protein p300) の遺伝子多型について解析した。AHRR は、今回は、子宮内膜症の発症年齢という観点から検討を加えた。また、EP300 はエストロゲンレセプターの共役因子の中でも主要な役割を果たしていると推測される EP300 の遺伝子多型と子宮内膜症の発症について検討を行うことを目的とした。腹腔鏡を施行した患者で、腹腔内に子宮内膜症の存在した症例と子宮内膜症が発症していない症例において、遺伝子多型の解析を検討した。子宮内膜症発症症例と非発症症例の計 302 症例を対象とした。対象とした遺伝子は、AHRR

(aryl-hydrocarbon receptor repressor) と EP300 (E1A binding protein p300) で、AHRR の SNP は一か所 (SNP ID: rs2292596) を探索し、EP300 の SNP は 3 か所、EP300 SNP1 (SNP ID: rs20554)、EP300 SNP2 (SNP ID: rs2076577)、EP300 SNP3 (SNP ID: rs2076578A) に対して検討を行った。

3) 将来を見据えた不妊症感受性遺伝子同定のための連鎖不平衡マッピング

不妊症の原因究明に関し、女性側要因のみでなく男性側要因へのアプローチも重要である。もとより、不妊の原因として男性要因が 25%程度を占めるといわれている上、最近では環境ホルモンの影響もあり男性不妊症の増加が危惧されている。

本研究では疾患感受性遺伝子の解明に不可欠な連鎖不平衡マッピング法を、より実践的なマッピング法として確立するためにヒトの遺伝子における連鎖不平衡の成り立ち、ヒトゲノムの多様性を明らかにしようとするものである。そのモデル研究として、今回は ADP-ribosyltransferase (ART) 遺伝子の連鎖不平衡の解明を行うことでヒト不妊症関連遺伝子のゲノムの多様性を明らかにすることを目的とした。なおサンプルの取り扱いについては生命倫理的な手続きを経てとりおこなわれた。

4) 加齢化モデル由来胚の多分化能性解析

-卵細胞の質に係わる分子機構の解明に関する研究-

卵細胞の「質」が受精後の発生・分化に影響を与えるのではないかと考え、マウスを材料に研究を行うことにした。直接老齢マウスを使用した実験では材料の調整と実験の円滑な遂行が難しいため、人工的に細胞質に問題があると考えられるマウスの実験系を作出したうえで、卵細胞の質にかかわる分子機構の解明を目指した。Sry 遺伝子を欠損した Y 染色体である Ytdym1 をもつ XYtdym1 型のマウスは性分化に異常をきたし雌となる。この性転換マウスは生殖能力を持つがこの XY tdym1 型雌マウスから生まれてくる仔には性染色体の異常が頻繁にみられることが報告されており、野生型の雌マウスに比べ産仔数が少ないばかりでなく、生殖期間も短くなると報告されていることから、XYtdym1 雌マウスの卵子は老齢卵子に代えて、卵細胞の「質」を研究するための材料として適していると考えた。

-加齢と卵細胞の質に関する研究-

実験動物マウスを用いて行う。個体加齢と卵細胞質との慣例性について新たな評価系の構築と、卵細胞機能に関する新たな分子メカニズムの解明を行う。加齢モデルを構築し、卵細胞への影響を観察する実験システムは個体あるいはそれより得られるサンプルの希少性よりこれまで世界的にも十分な解析システムが構築されず、極限られた知見が得られるのみであった。本研究では、胚盤胞期胚の将来胎児となる内部細胞塊から樹立される ES 細胞を加齢化モデルの胚より樹立しその特性解析から加齢化卵の多分化能性へ寄与する性質を体外培養系で探る実験系を構築する。未だ試みられていない方法であったが、私たちは 72 週齢という非常に高齢なマウスより卵を採取し、顕微授精を行い最終的に加齢卵由来の ES 細胞を複数株樹立することに成功した。この加齢 ES 細胞に対して行った網羅的遺伝子解析や分化挙動解析から、通常の ES 細胞と異なる遺伝子発現動態と分化傾向の変化を突き止めることが出来た。加齢卵子の卵細胞本来の性質、全能性、について初めてアプローチ出来るシステムが構築でき、精力的に解析をおこなっている。卵細胞機能に関する分子メカニズムを解明し、加齢に伴う卵細胞内での分子レベルでの変化を解析し、確かな科学的データに基づくエビデンスを社会に提供していく。

C. 研究結果

1) 子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な生殖補助医療の治療体系に関する研究

子宮内膜症が妊孕能に及ぼす影響は以下にまとめられる。

- a. 卵管周囲間の病巣による機能低下
 - b. 具体的には卵子の捕獲障害や輸送障害
 - c. 卵巣機能への影響
 - d. 腹腔内の炎症に関与するサイトカインによる受精、着床障害
- これらの事項以外に、免疫系の異常による場合には流産や着床不全が起こることもあると考えられる。

本研究項目について、分担研究者の柳田が詳細に検討し、治療体系を明確にした。

2) 子宮内膜症不妊機序の解明

-子宮内膜症と SRC Family-

卵巣性子宮内膜症に SRC-1 が強く発現を認めた。HScore では正常子宮内膜増殖期に比較し分泌期では低下していた。卵巣性子宮内膜症では増殖期、分泌期とも正常子宮内膜増殖期に比較して有意にそのスコアが上昇していた。子宮内膜症を有する正所性子宮内膜の増殖期に比較し正常子宮内膜で認められたような分泌期の低下を認めなかった。RT-PCR 法でも卵巣性子宮内膜症において SRC-1 mRNA が SRC-2, SRC-3 に比較し強いシグナルを認めた。

-子宮内膜症発症分子メカニズムと新規治療薬への展開-

子宮内膜症患者において腹腔内貯留液中 sCD44 は子宮内膜症でない患者のそれより有意に高値であり、臨床進行期と関連していた。

CD4 陽性、CD17 陽性の Th17 が子宮内膜症患者に存在していた。Th17 は、正常子宮内膜に比較し子宮内膜症病変に著明に多く存在し、培養子宮内膜間質細胞においては IL-17 受容体が発現していた。子宮内膜症間質細胞は IL-17 刺激により有意に IL-8 の産生を亢進した。IL-17 刺激は、1ng/ml 以上で子宮内膜症間質細胞の BrdU の取り込みを有意に増加させた。

ミドカインのウエスタンブロット解析では、卵胞液中にミドカインが存在することが明らかとなった。ミドカインとその受容体の遺伝子発現が顆粒膜細胞にも認められ、in situ hybridization では顆粒膜細胞、莢膜細胞ともにミドカインを発現していることが明らかにされた。

メトフォルミンは10-1000 mMの濃度で

子宮内膜症間質細胞における IL-8 産生を用量依存性に抑制したが、正所性子宮内膜の間質細胞では効果は認められなかった。

ジェノゲストは子宮内膜症間質細胞における BrdU 取り込みを抑制した。G0/G1 期の細胞を増加させる一方、S 期、G2/M 期の細胞を減少させた。

-子宮内膜症と遺伝子多型にみる新たな関連遺伝子の発見-

子宮内膜症の有無と、AHRR (SNP ID: rs2292596) の各遺伝子型で統計学的有意差を認めず、進行度にも関連性はなかった。30 歳以下の子宮内膜症発症群と子宮内膜症非発症群を比較した場合、前者で有意に GG ホモ接合体を多く認めた (カイ二乗検定 $p=0.012$ Fisher の直接確率検定 $p=0.019$)。子宮内膜症を有する患者のうち30歳以下の群と31歳以上の群を比較した場合、30歳以下の群で有意に GG ホモ接合体を多く認めた (カイ二乗検定 $p=0.017$ Fisher の直接確率検定 $p=0.029$)。

3) 将来を見据えた不妊症感受性遺伝子同定のための連鎖不平衡マッピング

ヒト ART 遺伝子に対して、ART3 領域における疾患に関連する SNP のタイピングを行った結果、あるハプロタイプが疾患特異性にあることが分かった。各々の大陸集団に特異的な遺伝子頻度の変化も多数存在することが確認された。

4) 加齢化モデル由来胚の多分化能性解析

-卵細胞の質に係わる分子機構の解明に関する研究-

本研究で用いた XYtdym1 雌マウスは C3H 系統の雌と B6 系統のコンジェニックの XGFP Ytdym1 Sry トランスジェニックマウスから誕生させた。この XYtdym1 雌マウスはこれまでの報告と同様に XO 型、XXY 型、XYY 型の性染色体の組合せを持つ仔を生み、産仔数も約半数であった。

-加齢と卵細胞の質に関する研究-

加齢マウスは不妊であるため、ICSI により受精卵を獲得し、胚盤胞を得た。それより、ES 細胞を樹立し種々の解析に供した結果、ES 細胞の基準は問題なく満たしていたが、網羅的遺伝子発現解析により加齢由来 ES 細胞で特徴的に

発現する遺伝子群があることをつきとめ、分化動態へ影響を及ぼすことを発見した。卵子の質がES細胞の質へ影響を及ぼすことを突き止めた。

D. 考察

子宮内膜症例では妊孕能が低下する。時間経過とともに子宮内膜症が増悪すること、また卵巣(卵子)が ageing することことから、よりテンポの早い治療計画が必要である。子宮内膜症の低下している妊孕能は腹腔鏡検査(手術)によって改善が期待できることから、まず腹腔鏡検査を計画することが望ましい。腹腔鏡手術後は、IVFの適応としないのであれば、6ヶ月間タイミング法および人工授精(AIH)を主とした治療を行う。それによって妊娠が得られない場合には、体外受精の適応とする。体外受精の適応と考えられた場合には、子宮内膜症例では卵子や胚の質の低下が起きている可能性が強いので、妊孕能向上の効果が認められている GnRH agonist の前治療を実施することが望ましい。この場合少なくとも2ヶ月間(～6ヶ月まで)の GnRH agonist の投与を行い IVF または ICSI 実施する(詳細は、分担研究者柳田の報告)。来年度に向けて、新たな治療薬の研究データをもとに社会に即した治療法の標準化を目指す。

妊孕性を一時的にでも低下させることのない、子宮内膜症の新規治療薬として期待されるメトフォルミンとジェノゲストを分子レベルのメカニズムを解明しつつ子宮内膜細胞への作用機序を明らかにしてきた。科学的エビデンスに基づいた、新規治療アプローチの可能性を広げることができている。

メカニズムに関しては、本研究は初めて子宮内膜症患者腹腔内貯留液中の sCD44 を明らかにした。CD44 との関連で子宮内膜症の進行に抗する生体の防御メカニズムを捉える新たな可能性を示唆している。

Th17 細胞の確認についての一連の研究成果から子宮内膜症上皮近傍を場として免疫応答機構が作動していることをうかがわせる。一方、子宮内膜間質細胞

は IL-17 受容体を発現しており、この IL-17 受容体を介した作用が子宮内膜症組織で起こっていることが推測される。培養細胞での実験の結果より IL-17 は子宮内膜間質細胞の増殖を直接刺激することより増殖因子としても子宮内膜症の進展に寄与していることが示唆された。IL-17 が子宮内膜症の進展を促進することが推測された。ミドカインは卵胞液中に存在し卵胞発育に関係していることが示唆された。種々の結果より、ミドカインは卵胞発育の重要な調節因子として機能していることが示唆された。

SRC と疾患に関わる解析は、良性疾患における解析は非常に少ない。本研究は卵巣性子宮内膜症においてエストロゲンだけでなく、SRC-1 が強く発現しているという共役因子もその進展に関与している可能性を示唆するものであった。今後このようにリガンド依存性疾患に対し共役因子を解析することが重要になると考える。子宮内膜症についても現在 GnRH アゴニスト、ダナゾール、低容量ピルなどが治療薬として用いられているが、共役因子の重要性が確認されればこれを抑制するような創薬にも貢献することができる。

AHRR の遺伝子多型と子宮内膜症に関する解析から若年発症であればあるほど、より遺伝的素因が疾患の発症に関与すると推測される。若年発症のリスクが高い群が判断されることにより、予防的薬剤投与(ピルなど)が計画されることが可能であり、また、発症が若年であることが予想される場合、妊娠時期を早めるなど、女性のライフプランにも大きな影響を与えることになる。今後、疾患の発症のみならず、疾患予防にたいして新たな予防法の提示が可能となる。

卵細胞の質の研究では XYtdym1 雌由来の胚の発生率が著しく悪いということだけでなく、その差が産仔数の差よりも大きいことが示された。このことは過排卵処理によって、強制的に成熟させた XYtdym1 卵子のほとんどが個体として発生する能力を有していなかったことを示唆する。このような差が真に卵子細胞

質の差によるものなのか次年度明らかにしていきたい。超少子化時代となり社会の様々な方面に切実な問題を投げかけているが、その中でも生殖医療が関連する事象は重要であるが解明されていなかったり、国民への適切な啓蒙が不足している現状がある。例えば、卵子の質の低下に関しても、広く認識されていないが故に国民の一部に大きな誤解を招いている。基盤的、科学的データの裏付けのある誠実な情報を提示することは我々研究者が社会に対して行うべき責務である。

E. 結論

女性のライフスタイルに合わせ、これまでの社会的 QOL を減ずるような治療法にとってかわる新規治療薬・法の臨床研究を行ってきた。分子レベルで子宮内膜症の一端を明らかにし、科学的エビデンスを構築し現在の社会に即した治療法を構築していく。さらなるデータの検討には、症例の積み重ねとメタ解析が必要となる。目的である生殖器疾患合併不妊症の治療法の最適化・標準化に向けて、専門に解析する人員を補充しより明確な治療戦略を提示していく。基礎的研究においては、SRC が新たなキープレイヤーである可能性を突きとめてきた。子宮内膜症の進展に SRC がホルモン依存性の観点から関与していることが示唆された。本研究により子宮内膜症に関して新たな分子メカニズムが解明でき、今後は更に基礎的研究を推進するとともに、臨床研究を治療法の最適化・標準化の確立に向け展開していく基盤が確立できた。

これまで、世界的にみても加齢と卵子の質に関する適切な実験系が存在しないためにその領域の研究が遅々としてすすまなかったが、本研究において、基盤となる研究システムの構築が整ってきた。

F. 健康危険情報

なし

G. 倫理面への配慮

1. 臨床研究に対する倫理面への配慮

各機関において、ヒト組織及び細胞を取り扱う際には、慶應義塾大学、東京大学、福島県立医科大学、東海大学医学部において、機関内倫理委員会において承認済みである。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い必要に応じて意見交換を行った。

2. 実験動物に対する倫理

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施した（承認番号 2003-002, 2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめ、またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなった。

H. 研究発表

論文発表

Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K and Kiyokawa N. Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 364(4):838-843.

Sullivan S, Ichida JK, Umezawa A, Akutsu H. Nuclear reprogramming and the control of differentiation in mammalian embryos. Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach. *Reprod Biomed Online.* 2008; 16(1):41-50.

Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, Akutsu H, Okabe M, Mekada E, Sakakibara K, Miyado M, Umezawa A, Miyado K. Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. *Mol Reprod Dev.* 2008;75(1):150-155.

Sullivan, S. Egli, D. Akutsu, H.

Melton, D. Eggen, K. Cowan, CA. :
Derivation of human ES cells.
Human Embryonic Stem Cells: A
Practical Handbook 2007.

I. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

Ⅱ 分担研究報告書

子宮・卵巣疾患の不妊症メカニズム解明及び治療体系の研究

佐藤 章

子宮・卵巣疾患の不妊症メカニズム解明及び治療体系の研究

-生殖器疾患の不妊症機序に関する基礎的・臨床的研究-

吉村 泰典

久慈 直昭

生殖器疾患の不妊症機序に関する基礎的・臨床的研究

大須賀 穰

矢野 哲

男性不妊症感受性遺伝子の集団間、霊長類種間比較

井ノ上 逸朗

子宮内膜症を合併する不妊症患者の合理的な生殖補助医療の治療体系に関する研究

柳田 薫

卵細胞の質に係わる分子機構の解明に関する研究

岡部 勝

子宮・卵巣疾患の不妊症メカニズム解明及び治療体系の研究

研究者 佐藤 章 福島県立医科大学産婦人科教授

研究要旨 子宮内膜症はエストロゲン依存性疾患である。エストロゲン受容体には転写活性化を行うため steroid receptor coactivator (SRC) などの共役因子が必要である。今回、本研究において卵巣性子宮内膜症における SRC の発現様式を検討した。SRC family のなかで SRC-1 が卵巣性子宮内膜症に強発現していた。また、子宮内膜症を有する患者の正所性子宮内膜でも正常子宮内膜と比較し分泌期の低下を認めず正常子宮内膜と発現パターンが異なることを明らかにした。本研究から子宮内膜症の進展に steroid receptor の共役因子が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

子宮内膜症は若年婦人に認められ、月経痛、不妊をひきおこす代表的疾患である。現在まで、エストロゲン依存性に発症、進展することが多数報告されている。今回、私たちはエストロゲン受容体など転写活性化に必要な共役因子である SRC family が子宮内膜症の進展に関与するかを目的とした。今回、1) 卵巣性子宮内膜症また子宮内膜症を有する正所性子宮内膜が SRC family を発現しているか。2) SRC 遺伝子改変マウスを用い子宮内膜症進展が SRC と関与しているかどうか直接的役割を解明することを検討した。

B. 研究方法

昨年より検体数を増やし、結果をさらに明確なものとした。正常子宮内膜9名、卵巣性子宮内膜症21名、子宮内膜症を有する正所性子宮内膜9名から手術時検体を採取、これを10%のホルマリン液にて

固定し SRC-1, SRC-2, SRC-3 の免疫染色に供した。半定量化を客観的に評価するため HScore を用い検討した。また卵巣性子宮内膜症において SRC-1 mRNA を検出するため RT-PCR 法を用いた。SRC-1 ノックアウトマウスはベイラー医科大学(米国)から供与された。

(倫理面への配慮)

本研究は倫理委員会の承認を得、検体採取に関して同意書を患者から書面でいただいた。また、遺伝子改変マウスを搬入するにあたり、当院の組み換え DNA 実験計画を申請し許可を得た。

C. 研究結果

卵巣性子宮内膜症に SRC-1 が強く発現を認めた。HScore では正常子宮内膜増殖期に比較し分泌期では低下していた。卵巣性子宮内膜症では増殖期、分泌期とも正常子宮内膜増殖期に比較して有意にそ

のスコアが上昇していた。子宮内膜症を有する正所性子宮内膜の増殖期に比較し正常子宮内膜で認められたような分泌期の低下を認めなかった。RT-PCR法でも卵巣性子宮内膜症においてSRC-1 mRNAがSRC-2, SRC-3に比較し強いシグナルを認めた。そこでベイラー医科大学から供与されたSRC-1欠損マウスを用いて子宮内膜を腹腔内に移植し、野生型と比較をこころみる予定であったが、繁殖が芳しくなく現在実験継続中である。

D. 考察

本研究はエストロゲン依存性である子宮内膜症に対し共役因子であるSRCの発現を解析したはじめての報告である。SRCと疾患に関わる解析はYanaseらによれば、androgen insensitivity syndromeなどのcoregulator diseaseとホルモン依存性悪性腫瘍などのcoregulator-related diseaseのみである。良性疾患における解析はいまだ数少ない。本研究は卵巣性子宮内膜症においてエストロゲンだけでなく、SRC-1が強く発現しているという共役因子もその進展に関与している可能性を示唆するものであった。今後このようにリガンド依存性疾患に対し共役因子を解析することが重要になると考える。子宮内膜症についても現在GnRHアゴニスト、ダナゾール、低容量ピルなどが治療薬として用いられているが、共役因子の重要性が確認されればこれを抑制するような創薬にも貢献できるであろう。

E. 結論

卵巣性子宮内膜症にSRC-1が強く発現していた。子宮内膜症を有する正所性子宮内膜はSRC-1の発現において正常子宮内膜で認められるような発現低下を認めなかった。その病理学的意義を解析するため今後SRC-1ノックアウトマウスを用い子宮内膜の腹腔内移植実験を行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

現在、論文投稿準備中

2. 学会発表

Kumagami A., Ito A., Takayama T., Morozumi K., Komiya H., Sato A
Expression of steroid receptor coactivator-1 is elevated in human ovarian endometrisos
(The XXth Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology
Tokyo 2007. 9. 21-9. 25)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

～子宮・卵巣疾患の不妊症メカニズム解明及び治療体系の研究
生殖器疾患の不妊症機序に関する基礎的・臨床的研究～

分担研究者 吉村 泰典（慶應義塾大学産婦人科 教授）

分担研究者 久慈 直昭（慶應義塾大学産婦人科 講師）

研究要旨

晩婚化と挙児希望年齢上昇に伴い、妊娠を希望する婦人における子宮筋腫および子宮内膜症の発症頻度は増加してきている。ことに子宮内膜症は、骨盤内の癒着病変を生じることで、器質的原因により妊孕能低下を来す可能性があるとともに、腹腔内のケミカルメディエーターを増加させることで、受精障害を含めた妊孕性へ影響を及ぼしている。妊孕能を客観的に評価することは困難であるが、子宮内膜症の進展を早期から発症する遺伝的素因について検討することにより、診断の補助となると考えられる。子宮内膜症の発症時期を予測する因子が明確になれば、ピルによる子宮内膜症の発症予防、あるいは、妊娠を考える時期の変更などにより、子宮内膜症が重症化する以前に妊娠にいたることが可能となる。

このような背景をもとに、本研究においては、将来の子宮内膜症発症予測のための因子解析、子宮内膜症病巣進展のマーカー探索を行った。子宮内膜症の若年発症予測因子として、AHRR 多型が候補であると考えられた。

A. 研究目的

子宮内膜症は疼痛および不妊を発症する疾患の一つである。晩婚化と挙児希望年齢の高齢化に伴い、子宮筋腫および子宮内膜症の発症患者が妊娠希望者に増加し、子宮内膜症と妊孕能、子宮内膜症と疼痛の問題がより顕著になってきている。病態の発症と進行に関して予測する手段はいまのところ存在していないが、妊孕性に与える影響と疼痛などの QOL を著しく障害する症状が出現する可能性があり、子宮内膜症の発症予測と治療は極めて重

要な問題となってきた。子宮内膜症や子宮筋腫の発症予測が可能であれば、ピルの使用など、予防的対策を若年からとることができ、それにより、妊孕能温存と QOL 向上を行うことができるようになる。このような観点から、今年度の研究において、子宮内膜症の発症予測が可能な因子を探索することを目的とした。

子宮内膜症はエストロゲン依存性疾患であり、今回検討した項目は、AHRR (aryl-hydrocarbon receptor repressor) と EP300 (E1A binding

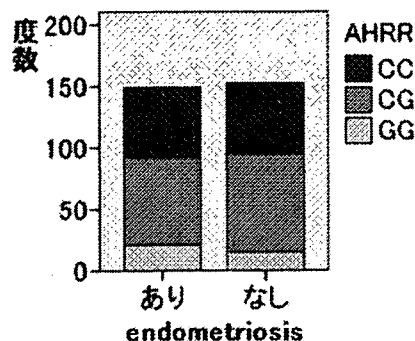
protein p300) の遺伝子多型である。AHRR は過去に子宮内膜症との関連の可能性が指摘されているが、今回我々は、子宮内膜症の発症年齢という観点から検討を加えた。また、EP300 はエストロゲン関連因子の一つである。エストロゲンレセプターは多数の共役因子と関与しながら効果を発現する核内レセプターであるが、その発現のコントロールには、共役因子が重要な役割をはたすことが指摘されるようになってきた。エストロゲンレセプターの共役因子の中でも主要な役割を果たしていると推測される EP300 の遺伝子多型と子宮内膜症の発症について検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

腹腔鏡で骨盤内を詳細に検討した症例のみを対象とし、腹腔内に子宮内膜症の存在した症例と子宮内膜症が発症していない症例において、遺伝子多型の解析を検討した。子宮内膜症発症症例は 149 症例、子宮内膜症の非発症症例は 153 症例、計 302 症例を対象とした。対象とした遺伝子は、AHRR (aryl-hydrocarbon receptor repressor) と EP300 (E1A binding protein p300) である。AHRR の SNP は一か所 (SNP ID: rs2292596) を探索し、EP300 の SNP は 3 か所、EP300 SNP1 (SNP ID: rs20554)、EP300 SNP2 (SNP ID: rs2076577)、EP300 SNP3 (SNP ID: rs2076578A) に対して検討を行った。

C. 研究結果

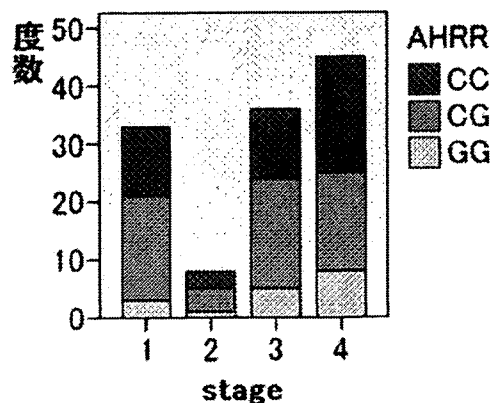
1. AHRR (SNP ID: rs2292596) と子宮内膜症発症の関連についての検討



		endometriosis		合計
		あり	なし	あり
AHRR	CC	57	58	115
	CG	71	80	151
	GG	21	15	36
合計		149	153	302

子宮内膜症の有無と、AHRR (SNP ID: rs2292596) の各遺伝子型で統計学的有意差を認めなかった (カイ二乗検定 $p=0.474$)。

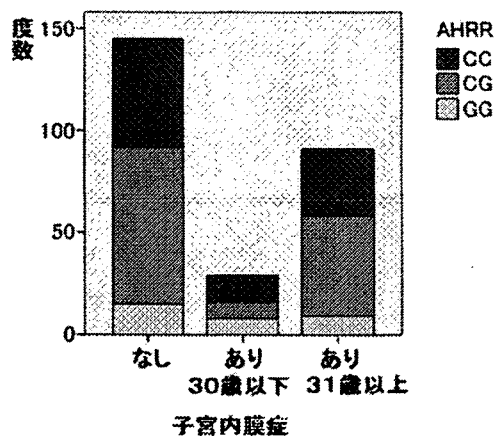
2. AHRR (SNP ID: rs2292596) と子宮内膜症重症度との関連についての検討



		endometriosis		合計
		なし	ステージIV	
GGホモ	GG	15	8	23
	non-GG	138	37	175
合計		153	45	198

子宮内膜症中等症（Ⅲ期+Ⅳ期）の発生と多型塩基ホモ接合体の間で統計学的有意差は認められなかった（カイ二乗検定 $p=0.161$ ）。子宮内膜症重症（Ⅳ期）の発生と多型塩基ホモ接合体の間で統計学的有意差は認められなかった（カイ二乗検定 $p=0.142$ ）

3. AHRR (SNP ID: rs2292596) と子宮内膜症発症年齢の関連についての検討

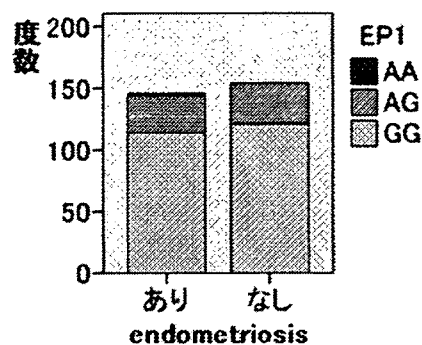


30歳以下の子宮内膜症発症群と子宮内膜症非発症群を比較した場合、前者で有意に GG ホモ接合体を多く認めた（カイ二乗検定 $p=0.012$ Fisher の直接確率検定 $p=0.019$ ）。子宮内膜症を有する患者のうち 30歳以下の群と 31歳以上の群を比較した場合、30歳以下の群で有意に GG ホモ接合体を多く認めた（カイ二乗検定

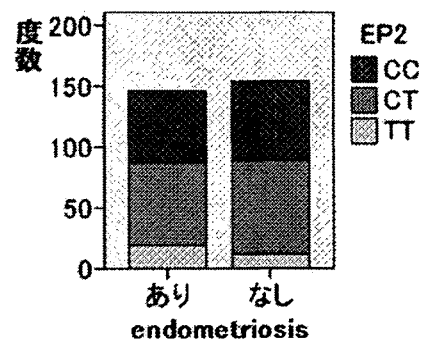
$p=0.017$ Fisher の直接確率検定 $p=0.029$ ）。

4. EP300 の各 SNP と子宮内膜症の関係 (n=300) についての検討

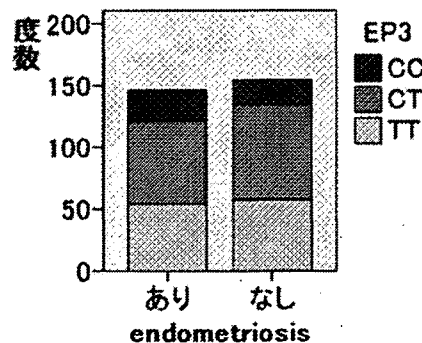
EP300 SNP1



EP300 SNP2



EP300 SNP3



子宮内膜症の発症の有無と、ここで検討した EP300 の遺伝子多型は統計学的な有意差は認められなかった。また、SNP1~3 各塩基の組み合わせのうち頻度の高い

組み合わせ（ハプロタイプ）を推定して各ハプロタイプの検定を行った。対象数 300 名に対してハプロタイプ推定を行い、以下の 4 つが推定された。各ハプロタイプ間で子宮内膜症を有する割合に有意差を認めなかった。

D. 考察

子宮内膜症に関する研究は多数存在するが、その発症因子に関しては未だ明確にはなっていない。多数ある報告の中には、エストロゲン関連遺伝子群や、IL-8、IL-1、TGF- β などのケミカルメディエーターが多数報告されている。子宮内膜症は局所の炎症性疾患であり、それぞれのファクターのなかでどの因子が主役になっているかの判断はきわめて困難である。我々は、エストロゲン関連遺伝子群として、AHRR と EP300 を候補遺伝子として検討を加えてみた。

エストロゲンレセプターの発現には多数の共役因子が関与していることが知られている。EP300、p72、p68 などが報告され、エストロゲンレセプターの機能発現に関して、極めて重要な役割を果たしていることが推測されている。この中でも重要な因子である、EP300 に注目して、遺伝子多型に関して検討した。我々の検討結果では、EP300 に報告されている遺伝子多型は子宮内膜症の発症患者と非発症者の間で有意な差は見いだせなかった。また、発症年齢による多型の差も見いだせなかった。エストロゲンレセプターの

発現に関与している共役因子は多数あると報告されているが、今回検討した EP300 では子宮内膜症の発症との関連性が明確にはなっていないが、その他の共役因子を探索することで、子宮内膜症の発症に関連した因子を明確にできる可能性があると考えられた。今後、エストロゲンレセプター共役因子を総合的に検討し、子宮内膜症発症の主役になっている因子を明確にしていく必要があると考えられた。

AHRR の遺伝子多型と子宮内膜症の発症に関しては、関連があるという報告と、関連がないという報告が混在していて、その、子宮内膜症発症への寄与は明らかではない。また、AHRR の遺伝子多型は、小陰茎との関連があるとの報告もあり、ダイオキシン関連遺伝子群と性ホルモンとの関連性についても報告されてきた。本研究では、AHRR の遺伝子多型と子宮内膜症に関して詳細な検討を加えてみた。AHRR の遺伝子多型と子宮内膜症の発症との関連性は今回の 302 症例の検討では見いだせなかった。一方、発症年齢に注目することで、30 歳以下の発症群と 31 歳以上の発症群に分離して検討したところ、30 歳以下の発症群に GG ホモ接合体を多く認めた。若年発症であればあるほど、より遺伝的素因が疾患の発症に関与すると推測されるが、一方、若年発症はそれほど多い症例ではないため、解析は困難である。今後の検討にはより多数例での検討が必要であるが、30 歳前で発症する因子の一つが見いだされたことは

極めて有意義である。若年発症のリスクが高い群が判断されることにより、予防的薬剤投与（ピルなど）が計画されることが可能であり、また、発症が若年であることが予想される場合、妊娠時期を早めるなど、女性のライフプランにも大きな影響を与えることになる。今後、疾患の発症のみならず、発症時期や、発症の形態に関連した因子（遺伝子多型など）を探索することが、より、詳細な疾患予防に寄与すると考えられた。

E. 結論

子宮内膜症の発症年齢に関与する因子に関して、遺伝子多型をもとに検討を行った。その結果、AHRR の遺伝子多型と子宮内膜症の若年発症との関連性を新たに見いだした。子宮内膜症の発症のみならず、その、発症年齢などに注目し、若年発症にかかわる因子を、疫学的、遺伝学

的に検出することで、子宮内膜症発症予防を行うかどうか、妊娠を考える年齢の検討など、女性のライフスタイルに深く関与する情報が得られる可能性が示された。

今後、早期発症因子を検出することにより、子宮内膜症の発症予防対策がとられることが望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

分担研究報告書

生殖器疾患の不妊症機序に関する基礎的・臨床的研究

分担 研究者 大須賀 穰 東京大学医学部講師

矢野 哲 東京大学医学部助教授

研究要旨

子宮内膜症は生殖年齢に好発し、不妊症の大きな原因となっている。本疾患は発症機序をはじめとして不明な点が多く、そのため治療にも苦慮している疾患である。今年度の研究では、我々の研究により解明された子宮内膜症発症機序に基づいた新規治療法の開発に向けた研究と、最近使用され始めた新規子宮内膜症治療薬の新しい作用機序を探る研究を第一とした。さらに、今後の新治療法の発展につなげるべく、子宮内膜症の発症機序について接着因子と免疫の観点から研究を施行した。特に、免疫学的側面に関しては最近の新しいThセオリーをふまえた研究を行った。最後に、不妊症治療にもっとも直接的に関係する卵胞発育に関する基礎研究も施行した。治療法に関する研究では、培養細胞での研究でメトフォルミンが正常のヒト子宮内膜には作用せずに、子宮内膜症病巣細胞に選択的に抑制作用を示す結果を得ることができ、今後の臨床応用に弾みをつけた。また、新規子宮内膜症治療薬ジェノゲストも子宮内膜症細胞に直接増殖抑制をもたらすことが判明し、局所投与などの新しい治療法の可能性を示した。一方、sCD44が子宮内膜症患者の腹腔内貯留液中で上昇していることが明らかとなり、子宮内膜症発症における接着因子の重要性が再認識された。さらに、今回の研究ではTh17細胞およびその産生サイトカインであるIL-17が子宮内膜症発症・進展に関与していることをはじめて示すことができた。卵胞についての研究では、ミドカインが卵胞発育に重要な作用を担っていることが示唆された。以上、今年度の研究から、従来の偽妊娠療法や偽閉経療法とその変法としての子宮内膜症治療ではなく、子宮内膜症の発症機序に基づいた新たな子宮内膜症治療の可能性が示唆され、不妊症の解消に向けてさらに一步前進できたと考える。

A. 研究目的

不妊症は女性のQOLを医学的、社会的、経済的など多くの側面から低下させる。現在の少子化の時代において不妊症の治療はますます重要となっているが、一方で、結婚年齢、出産年齢の高齢化にともなわない生殖年齢の期間に好発する子宮内膜

症、子宮筋腫などの疾患が不妊症治療に影響を与えることが増えており、これらの疾患と不妊症の関係を適切にとらえて介入していくことが以前にもまして重要となっている。昨年度の研究報告書においては、子宮内膜症が不妊治療にあたえる影響の解析を示した。これによると、