

Endocrinol. Metab. 87, 2359-2366.  
(13) Frosk, P., Weiler, T., Nysten, E., Sudha, T.,  
Greenberg, C.R., Morgan, K., Fujiwara,  
T.M., Wrogemann, K., 2002. Limb-girdle

muscular dystrophy type 2H associated  
with mutation in TRIM32, a putative  
E3-ubiquitin-ligase gene. Am. J. Hum.  
Genet. 70, 663-672.

Table 1. Characteristics of 215 cases with recurrent pregnancy loss (RPL) and 420 controls in a Japanese population

	Cases		Controls	
	Number	%	Number	%
Age				
≤29	58	27.0	167	39.8
30-39	139	64.7	230	54.8
≥40	18	8.4	23	5.5
Pregnancy loss				
2	92	42.8	—	—
3	74	34.4	—	—
≥4	49	22.8	—	—
Primary RPL	178	82.8	—	—
Secondary RPL	37	17.2	—	—
<9 weeks	122	56.7	—	—
9-13 weeks	78	36.3	—	—
≥14 weeks	15	7.0	—	—

Table 2. Distribution of PAPP<sub>A</sub> genotypes among 215 cases with RPL and 420 controls

	Cases		Controls		OR <sup>a</sup> (95% CI)	P value
	Number	%	Number	%		
AA	135	62.8	282	67.1	1.00 (reference)	
AC	69	32.1	127	30.2	1.17 (0.82–1.68)	0.39
CC	11	5.1	11	2.6	2.06 (0.87–4.90)	0.10
					<i>P</i> for trend,	0.12
A allele	339	78.8	691	82.3		
C allele	91	21.2	149	17.7		

<sup>a</sup> Age-adjusted logistic regression analysis.

Table 3. Distribution of PAPP<sub>A</sub> genotypes among 93 cases experienced at least one pregnancy loss after 9 weeks of gestation and 420 controls

	Cases		Controls		OR <sup>a</sup> (95% CI)	P value
	Number	%	Number	%		
AA	52	55.9	282	67.1	1.00 (reference)	
AC	35	37.6	127	30.2	1.54 (0.95–2.49)	0.08
CC	6	6.5	11	2.6	2.83 (1.00–8.05)	0.05
					<i>P</i> for trend,	0.02
AC + CC	41	44.1	138	32.9	1.65 (1.04–2.62)	0.03

<sup>a</sup> Age-adjusted logistic regression analysis.

## ヒト無精子症原因候補遺伝子に関する研究（MEI1 について）

分担研究者 石川 睦男 旭川医科大学付属病院病院長

分担研究者 千石 一雄 旭川医科大学医学部産婦人科学講座 教授

### 研究要旨

無精子症に代表される男性不妊症は近年の先進国における生活レベルの向上とともに増加傾向にあり、またいくつかの化学物質もその原因のひとつではないかと考えられている。また男性不妊症の原因として遺伝学的素因が示唆されているものの、そのほとんどがいまなお明らかにされていないのが現状である。近年、マウス *Mei1* 遺伝子の異常により、減数分裂停止に起因する無精子症がマウスにおいて引き起こされることが明らかにされた。そこで、我々はヒト *MEI1* 遺伝子が減数分裂異常に起因するヒト無精子症に何らかの関与をしているのではないかと仮説をもとに、マウス *Mei1* 遺伝子のアミノ酸配列を利用し、ヒト *MEI1* cDNA を単離した。またヒト *MEI1* はマウス同様精巣特異的に発現していた。組織学的解析により、その原因が減数分裂停止によると判断された 26 名の無精子症患者（アメリカ人 13 名、イスラエル人 13 名）で *mutation* 解析を施行し、4 つの新たな single-nucleotide-polymorphism (SNP1, 2, 3, 4) を同定した。これらの SNP に関して、無精子症患者群と正常コントロール群においてその頻度を解析したところ、SNP3 および SNP4 においてアメリカ人患者群と正常コントロール群では有意な差を認めた。これらの結果より、ヒト *MEI1* 遺伝子はアメリカ人の精子形成過程における減数分裂において重要な役割を担っていることが提言された。

### 【研究協力者】

田熊 直之

旭川医科大学病院周産母子センター  
助教授

宮本 敏伸

旭川医科大学医学部産婦人科学講座  
助手

### A. 研究目的

精子形成における減数分裂の欠損は無精子症の重要な原因のひとつである。しかしながら、その詳細はほとんど明らかにされていないのが現状である。特に哺乳動物においてはその傾向は顕著であり、減数分裂における遺伝学的なメカニズムは依然、謎のままである。2000 年マウス *Mei1* 遺伝子の異常により、減数分裂停止による無精子症マウスが形成され

ることが明らかとなった。本研究において、我々はマウス *Mei1* 遺伝子をもとにヒト *MEI1* cDNA を単離し、さらにヒトにおいて減数分裂停止に起因する無精子症とヒト *MEI1* 遺伝子の関与を解析した。

### B. 研究方法

1. GenBank をもとにマウス *Mei1* 遺伝子のアミノ酸配列と相同性を有するヒトゲノム配列にプライマーを設定し、ヒト精巣 cDNA ライブラリーを用いて PCR, 5-RACE 及び 3-RACE 法を施行し、ヒト *MEI1* cDNA を単離した。シーケンス解析はセンス、アンチセンスともに数回行った。

2. ヒト *MEI1* cDNA を用いてイントロンをはさむ形でプライマーを設定し、クロンテック社のヒト cDNA パネルを用いて合計 15 臓

器に関して PCR 法を行い、ヒト MEI1 遺伝子の発現パターンを解析した。

3.ヒト MEI1 遺伝子とヒト無精子症の関係を解析するために、アメリカ人患者 13 名及びイスラエル人患者 13 名、計 26 名の患者 DNA を用いて mutation 解析を施行した。Coding region 内の全てのエクソン及び隣接するイントロンにプライマーを設定し、PCR 及びダイレクトシーケンス解析を施行した。さらに対照群として正常コントロール 121 名も同時にシーケンス解析した。

4.mutation 解析により 4 つの新たな single-nucleotide-polymorphism (SNP1, 2, 3, 4)を同定した。これらの SNP に関して、無精子症患者群と正常コントロール群においてその頻度の差を Fisher's exact test を用いて有意差検定した。

（倫理面への配慮）

本研究に参加したすべての患者及び正常コントロールは全て文章による同意を得た後に血液を採取し、DNA を抽出した。また本研究は大学の倫理委員会の承認後、開始された。

### C. 研究結果

我々はマウス Meil 遺伝子のアミノ酸配列をもとに、ヒト MEI1 cDNA を単離した。ヒト MEI1 遺伝子は 16 個のエクソンより構成され、染色体 22q13.2 領域に局在している。ヒト MEI1 遺伝子は 2,714bp と 2,609bp の 2 つの転写体を持っており、それぞれ 642 個と 607 個のアミノ酸をコードしている。2,609bp からなる cDNA はエクソン 7 を alternative splicing により欠いている。ヒト MEI1 遺伝子とマウス Meil 遺伝子はアミノ酸レベルで 77%の相同性を有していた。またヒト MEI1 はヒト精巣組織に優位に発現していた。

ヒト MEI1 の mutation 解析にて Open Reading Frame (ORF)内に 4 つの新たな single-nucleotide-polymorphism (SNP1, 2,

3, 4)を検出した。

アメリカ人患者 13 名と 61 名のアメリカ人正常コントロール群では SNP3 及び SNP4 のアレルの頻度に有意な差を認めた。しかしながらイスラエル人患者 13 名とイスラエル人正常コントロール群 60 名では全ての SNP において有意差を認めなかった。

### D. 考察

我々はヒト MEI1 cDNA を単離し、またマウス Meil との比較では、ORF 内での核酸レベルでは 61%またアミノ酸レベルでは 77%の相同性を認めた。ヒト MEI1 は 2 つの転写体からなり 2 つのアミノ酸をコードしている。これはマウス Meil 遺伝子でも同様である。

マウス Meil 遺伝子のエクソン 12 の部分的欠失もしくは完全欠失により、フレームシフトが生じ不完全なアミノ酸が形成され、結果マウス精子形成において減数分裂停止が起こり、減数分裂後に出現する round spermatid, elongated spermatid などが全く認められず無精子症を呈する。

我々はヒト MEI1 の coding region において 4 つの SNP を同定した。アメリカ人患者とコントロール群の比較では SNP3 及び SNP4 のアレルの出現頻度に有意な差を認め、これよりこれらの領域がアメリカ人の精子形成ことにその減数分裂に重要役割を担っていることが示唆された。

### E. 結論

本研究はヒト MEI1 遺伝子の SNP がヒト精子形成阻害に関与していることを示す最初の報告である。しかしながら、そのメカニズムは、依然謎のままである。我々の研究成果はヒト無精子症原因の分子メカニズムを解明する手助けとなるものであり、今後他の民族及びより多くの患者においてヒト MEI1 遺伝子の解析が望まれる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato H, Miyamoto T, Yogeve L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, Sasaki Y, Ishikawa M, Lamb DJ, Matsumoto N, Niikawa N and Sengoku K. Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. (submitted to J. Hum. Genet.)

2. 学会発表

1. 佐藤 恒、宮本敏伸、千石一雄、石川睦男  
ヒト無精子症の原因遺伝子であるヒト  
MEI1 の同定およびその解析  
第14回産婦人科分子内分泌談話会（山梨）  
（2005年10月20日）
2. 佐藤 恒、宮本敏伸、堀川道晴、千石一雄  
ヒト無精子症の原因遺伝子であるヒト  
MEI1 の同定および無精子症症例において  
の解析  
第58回日本産科婦人科学会（横浜）（2006  
年4月24日予定）

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

特記すべきことなし。

## ヒト無精子症原因候補遺伝子に関する研究（FKBP6 について）

分担研究者 石川 睦男 旭川医科大学付属病院病院長

分担研究者 千石 一雄 旭川医科大学医学部産婦人科学講座 教授

### 研究要旨

FKBP6 (FK506 binding protein 6) 遺伝子は prolyl isomerase/FK506 binding domain と tetratricopeptide protein-protein interaction domain を有する遺伝子ファミリーのひとつである。近年そのノックアウトマウスが報告され、homo-mutant のオスは成熟精子を全く有していなかった。詳細な解析の結果ノックアウトマウスのオスは減数分裂過程における異常により、濃縮した核をもつ特徴的な pachytene spermatocyte を有し、pachytene stage を超える細胞は全く観察されなかった。そこで我々はヒト FKBP6 遺伝子の変異とヒト無精子症の関与について解析した。組織学的に減数分裂停止に起因する無精子症と診断された患者 19 名においてヒト FKBP6 の全ての coding region において mutation 解析を施行した。ヒト FKBP6 はマウス同様精巣特異的に発現しており、新たな SNP(Y60X)をエクソン 3 において検出した。加えて、本研究において我々はヒト FKBP6 遺伝子とその精巣において genomic imprinting を受けている可能性を示唆する知見を得ることができた。

### 【研究協力者】

田熊 直之

旭川医科大学病院周産母子センター  
助教授

宮本 敏伸

旭川医科大学医学部産婦人科学講座  
助手

### A. 研究目的

ヒト無精子症の原因として以前より、Y 染色体上の部分的欠失ことに AZF 領域の欠失が報告されている。しかしながら、今日までこの領域においてヒト無精子症の原因遺伝子として同定されたのは、DAZ, RBMY 及び USP9Y のわずか 3 つにすぎない。世界的には今なお多くの研究者が無精子症原因遺伝子の検索を AZF 領域において行っているが、最後に同定された原因遺伝子は実に 8 年前までさかのぼる。加えて最近の知見ではヒト無精子症患者のうち、その Y 染色体に微小欠失を伴うものは

10%以下であろうと推定されている。近年、我々はその遺伝子変異により無精子症を引き起こす新たな遺伝子ヒト SYCP3 を同定した (Miyamoto et al., Lancet 2003)。特筆すべき点はこの SYCP3 はヒト 12 番染色体上に位置している点である。ヒト SYCP3 は AZF 領域以外で同定された最初の無精子症原因遺伝子である。加えて昨年我々は新たにヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト MEI1 遺伝子の同定に成功した (Sato et al., J Hum Genet 2006) 以上より、我々はヒト常染色体上にも多数の無精子症原因遺伝子が存在すると確信している。近年、Fkbp6 遺伝子のノックアウトマウスが報告され、homo-mutant のオスは成熟精子を全く有していなかった。詳細な解析の結果ノックアウトマウスのオスは減数分裂過程における異常により、濃縮した核をもつ特徴的な pachytene spermatocyte を有し、pachytene stage を超える細胞は全く観察されなかった。そこで我々はヒト FKBP6 遺伝子のヒト無精

子症への関与を解析した。

## B. 研究方法

1. ヒト FKBP6 の発現様式を解析するために、我々は Clontech 社のヒト成人 cDNA パネル（15 臓器）を鋳型として PCR 法を施行した。
2. 対象は組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された患者 19 名及び正常コントロール 40 名である。本研究に参加したすべての患者及び正常コントロールは全て文章による同意を得た後に血液を採取し、DNA を抽出した。また本研究は大学の倫理委員会の承認後、開始された。全ての患者は染色体異常がないことまたその Y 染色体の微小欠失が存在しないことが確認されている。
3. ヒト FKBP6 の coding region である Exon1 から Exon8 までの隣接するイントロンにプライマーを各々設定し、PCR 法を施行し、ダイレクトシーケンス解析した。
- 4.3 にて検出された single nucleotide polymorphism (SNP) において正常コントロール群でも同様に PCR 及びダイレクトシーケンス解析を施行した。
5. 検出された 2 つの SNP において genomic imprinting の有無を解析するために患者精巣及び正常精巣組織から各々 RNA を抽出し、RT-PCR 法を施行し、それぞれダイレクトシーケンス解析を施行した。

（倫理面への配慮）

本研究に参加したすべての患者及び正常コントロールは全て文章による同意を得た後に血液を採取し、DNA を抽出した。また本研究は大学の倫理委員会の承認後、開始された。

## C. 研究結果

ヒト FKBP6 はマウス同様その精巣に特異的な発現パターンを呈した。また mutation 解析を施行したところ、患者 19 名中 4 名において Exon3 においてシトシンからグアニンへの変換をヘテロに認めた。このシトシンからグアニンへの変換により早期にストップコドンが出現し、コードされるアミノ酸は正常では 327 個であるが、わずか 60 個となり不完全な FK506 binding domain が形成される。そこで正常コントロールでも同様にシーケンス解析したところ、40 名中 4 名において同様なヘテロの配列を認めた。しかしながら、このグアニンが RNA レベルで発現し、不完全なアミノ酸をコードしているとは考えにくい。そこで、ヒト FKBP6 は genomic imprinting を受けているのではないかとの仮説のもとに解析を進めた。ヘテロを認めた患者 1 名のみの精巣からの RNA を得ることができ、解析したところ、RNA レベルで発現しているのはシトシンのみであった。また同様に解析した正常コントロール 4 名でも RNA レベルではシトシンのみが発現していた、さらに、Exon6 でヘテロを検出した多型部位での解析でも RNA レベルでは mono allelic な発現を呈した。

## D. 考察

ヒト FKBP6 はマウス同様ヒト精巣特異的に発現していた。この結果はヒト FKBP6 がヒト精子形成に重要な役割を担うことを示唆するものである。Mutation 解析により、我々は Exon3 において新規の SNP を同定することができた。この SNP および Exon6 における SNP を用いた解析により、ヒト FKBP6 が mono allelic に発現していることが明らかになった。しかしながら、本研究においてはいずれの両親からも DNA を得ることが出来なかったため、どちらのアレルが発現しているのかは不明のままである。よって、本研究は、ヒト FKBP6

遺伝子が genomic imprinting を受けている可能性を示唆するものである。Imprinting 遺伝子は cluster を形成する傾向があるため、今後隣接する遺伝子の解析さらにはマウス Fkbp6 遺伝子の imprinting の有無の検討が望まれる。またヒト FKBP6 とヒト無精子症との関連は今回解析された患者数が 19 名であったため、今後更に解析数を増やした検討が必要と考えられる。

## E. 結論

本研究により、ヒト FKBP6 遺伝子とその精巣において genomic imprinting を受けている可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Miyamoto T, Yu YS, Sato H, Hayashi H, Sakugawa N, Ishikawa M, Sengoku K. Mutational analysis of the human MBX gene in four Korean families demonstrating microphthalmia with congenital cataract. Turk J Pediatr (in press).
2. Miyamoto T, Sato H, Yogev L, Kleiman S, Namiki M, Koh E, Sakugawa N, Hayashi H, Ishikawa M, Lamb DJ, Sengoku K. Is a genetic defect in FKBP6 a common cause of azoospermia? Cell Mol Biol Lett 11: 567-569. 2006.
3. Sato H, Miyamoto T, Yogev L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, Sasaki Y, Ishikawa M, Lamb DJ, Matsumoto N, Birk OS, Niikawa N, Sengoku K. Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by

meiotic arrest. J Hum Genet 51: 533-540. 2006.

4. Sasaki Y, Miyamoto T, Hidaka Y, Sato H, Takuma N, Sengoku K, Sugimori H, Inaoka T, Aburano T. Three-dimensional magnetic resonance imaging after ultrasonography for assessment of fetal gastroschisis. Magn Reson Imaging 24: 201-203. 2006.

## 2. 学会発表

1. 宮本敏伸, 佐藤 恒, 佐久川直子, 堀川道晴, 千石一雄: ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒトFKBP6の解析（第58回日本産科婦人科学会, 高得点演題口演）, 横浜, 2006年
2. 宮本敏伸: ヒト精子形成遺伝子（第51回日本不妊学会 シンポジウム）大阪, 2006年
3. 宮本敏伸: ヒト無精子症原因遺伝子群（第24回日本受精着床学会 シンポジウム）軽井沢, 2006年

## 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

特記すべきことなし

## ヒト無精子症と化学物質に関する研究

分担研究者 石川 睦男 旭川医科大学付属病院病院長

分担研究者 千石 一雄 旭川医科大学医学部産婦人科学講座 教授

### 研究概要

無精子症に代表される男性不妊症は近年の先進国における生活レベルの向上とともに増加傾向にあり、またいくつかの化学物質もその原因のひとつと考えられている。また男性不妊症の原因として遺伝学的素因が示唆されているものの、そのほとんどがいまなお明らかにされていないのが現状である。近年、我々は新たなヒト無精子症原因遺伝子としてヒト SYCP3 遺伝子(Miyamoto et al., Lancet 2003)、MEI1 遺伝子(Sato et al., J Hum Genet 2006) 及び MEISEZ 遺伝子の同定に成功した（論文作成中）。今後更にヒト無精子症と化学物質の関連の上でも解析を進め、今日の最も深刻な日本の社会問題の一つである少子化問題の解決に、新たな不妊治療を駆使することにより貢献することを本研究の目的とする。

### (1) ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト FKBP6 遺伝子に関する研究

#### A. 研究目的

ヒト無精子症の原因として以前より、Y 染色体上の部分的欠失ことに AZF 領域の欠失が報告されている。しかしながら、今日までこの領域においてヒト無精子症の原因遺伝子として同定されたのは、DAZ, RBMY 及び USP9Y のわずか 3 つにすぎない。世界的には今なお多くの研究者が無精子症原因遺伝子の検索を AZF 領域において行っているが、最後に同定された原因遺伝子は実に 8 年前までさかのぼる。加えて最近の知見ではヒト無精子症患者のうち、その Y 染色体に微小欠失を伴うものは 10%以下であろうと推定されている。近年、我々はその遺伝子変異により無精子症を引き起こす新たな遺伝子ヒト SYCP3 を同定した(Miyamoto et al., Lancet 2003)。特筆すべき点はこの SYCP3 はヒト 12 番染色体上に位置している点である。ヒト SYCP3 は AZF 領域以外で同定された最初の無精子症原因遺伝子である。加えて昨年我々は新たにヒト無精子症

原因候補遺伝子であるヒト MEI1 遺伝子の同定に成功した (Sato et al., J Hum Genet 2006) 以上より、我々はヒト常染色体上にも多数の無精子症原因遺伝子が存在すると確信している。近年、Fkbp6 遺伝子のノックアウトマウスが報告され、homo-mutant のオスは成熟精子を全く有していなかった。詳細な解析の結果ノックアウトマウスのオスは減数分裂過程における異常により、濃縮した核をもつ特徴的な pachytene spermatocyte を有し、pachytene stage を超える細胞は全く観察されなかった。そこで我々はヒト FKBP6 遺伝子のヒト無精子症への関与を解析した。

#### B. 研究方法

1. ヒト FKBP6 の発現様式を解析するために、我々は Clontech 社のヒト成人 cDNA パネル（15 臓器）を鋳型として PCR 法を施行した。
2. 対象は組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された患者 19 名及び正常コントロール 40 名である。本研究に参加したすべての患者及び正常コントロールは全て文章による

同意を得た後に血液を採取し、DNAを抽出した。また本研究は大学の倫理委員会の承認後、開始された。全ての患者は染色体異常がないことまたそのY染色体の微小欠失が存在しないことが確認されている。

3. ヒトFKBP6のcoding regionであるExon1からExon8までの隣接するイントロンにプライマーを各々設定し、PCR法を施行し、ダイレクトシーケンス解析した。

4. 3にて検出されたsingle nucleotide polymorphism (SNP)において正常コントロール群でも同様にPCR及びダイレクトシーケンス解析を施行した。

5. 検出された2つのSNPにおいてgenomic imprintingの有無を解析するために患者精巣及び正常精巣組織から各々RNAを抽出し、RT-PCR法を施行し、それぞれダイレクトシーケンス解析を施行した。

#### （倫理面への配慮）

本研究に参加したすべての患者及び正常コントロールは全て文章による同意を得た後に血液を採取し、DNAを抽出した。また本研究は大学の倫理委員会の承認後、開始された。

### C. 研究結果

ヒトFKBP6はマウス同様その精巣に特異的な発現パターンを呈した。またmutation解析を施行したところ、患者19名中4名においてExon3においてシトシンからグアニンへの変換をヘテロに認めた。このシトシンからグアニンへの変換により早期にストップコドンが出現し、コードされるアミノ酸は正常では327個であるが、わずか60個となり不完全なFK506 binding domainが形成される。そこで正常コントロールでも同様にシーケンス解

析したところ、40名中4名において同様なヘテロの配列を認めた。しかしながら、このグアニンがRNAレベルで発現し、不完全なアミノ酸をコードしているとは考えにくい。そこで、ヒトFKBP6はgenomic imprintingを受けているのではないかとの仮説のもとに解析を進めた。ヘテロを認めた患者1名のみ精巣からのRNAを得ることができ、解析したところ、RNAレベルで発現しているのはシトシンのみであった。また同様に解析した正常コントロール4名でもRNAレベルではシトシンのみが発現していた。さらに、Exon6でヘテロを検出した多型部位での解析でもRNAレベルではmono allelicな発現を呈した。

### D. 考察

ヒトFKBP6はマウス同様ヒト精巣特異的に発現していた。この結果はヒトFKBP6がヒト精子形成に重要な役割を担うことを示唆するものである。Mutation解析により、我々はExon3において新規のSNPを同定することができた。このSNPおよびExon6におけるSNPを用いた解析により、ヒトFKBP6がmono allelicに発現していることが明らかになった。しかしながら、本研究においてはいずれの両親からもDNAを得ることが出来なかったため、どちらのアレルが発現しているのかは不明のままである。よって、本研究は、ヒトFKBP6遺伝子がgenomic imprintingを受けている可能性を示唆するものである。Imprinting遺伝子はclusterを形成する傾向があるため、今後隣接する遺伝子の解析さらにはマウスFkbp6遺伝子のimprintingの有無の検討が望まれる。またヒトFKBP6とヒト無精子症との関連は今回解析された患者数が19名であったため、今後更に解析数を増やした検討が必要と考えられる。

## E. 結論

本研究により、ヒト FKBP6 遺伝子とその精巣において genomic imprinting を受けている可能性が示唆された。

## (2) ヒト MEI1 遺伝子の同定及びヒト精子形成過程ことにその減数分裂におけるヒト MEI1 遺伝子に関する研究

### A. 研究目的

今日までに、ヒト男性不妊の遺伝学的な素因として Y 染色体の微小欠失に代表される染色体異常及び Y 染色体上の AZF (azoospermia factor) 領域に存在する DAZ, RBMY 及び USP9Y さらには 12 番染色体上に局在する SYCP3 遺伝子の異常などが報告されているものの (1)、その原因のほとんどは今なお謎のままである。

精子形成過程における減数分裂の異常は無精子症の重要な原因の一つであるが、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。しかしながら、マウスにおいてはいくつかの減数分裂において重要な役割を担う遺伝子 (Dmc1, Fkbp6, Scp3 (Sycp3), Spo11, Msh4 と Msh5) が報告されてきた。近年、胚性幹細胞に抗癌剤を投与し生み出された不妊マウスのスクリーニングにより、減数分裂異常に起因する無精子症を呈する *mei1* (meiosis defective 1) マウスが同定され、さらにポジショナルクローニング法により、マウス *Mei1* 遺伝子の mutation が染色体のシナプスの欠損に起因する減数分裂停止による無精子症を引き起こすことが明らかにされた (2)。

今回我々は、マウス *Mei1* cDNA をもとにヒト MEI1 cDNA を単離し、その発現パターンを解析し、さらにヒト MEI1 遺伝子の異常とヒト無精子症の関係を明らかにするために、組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断

された患者の genomic DNA を用いて解析を行った。

### B. 材料・方法

#### 1. ヒト MEI1 cDNA の単離及びヒト成人組織におけるその発現様式の解析

マウス *Mei1* 遺伝子のアミノ酸配列およびヒト Genome database を利用して、マウス *mei1* 遺伝子とアミノ酸レベルで相同性を有するヒトゲノムシーケンス領域にプライマーを 2 組設定し、ヒト精巣 cDNA ライブラリーを鋳型として First PCR 及び Nested PCR を施行した。Nested PCR 産物を T Easy ベクターにサブクローニングしシーケンス解析を行った。その後、full length cDNA を単離すべく 5,RACE 及び 3,RACE 法を施行し PCR 産物をそれぞれシーケンス解析した。

単離された遺伝子のエクソン内にイントロンをはさむ形でプライマーを設定し、15 のヒト成人組織から構成された Clontech 社の Multiple Tissues cDNA Panels を用いて PCR を施行した。本研究において全ての PCR は Clontech 社の Advantage 2 PCR Enzyme System を使用した。PCR 反応は 95°C150 秒後、95°C15 秒 68°C90 秒を First PCR で 32 サイクル、Nested PCR では 20 サイクルそれぞれ施行された。

#### 2. 対象患者群と正常コントロール群

対象患者は組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された27名であり、ヨーロッパ系アメリカ人患者13名、イスラエル人13名及び日本人1名である。全ての患者は染色体異常がないこと、またY染色体の微小欠失が存在しないことが確認されている。正常コントロールとしてヨーロッパ系アメリカ人61名及びイスラエル人60名が同様に解析された。全ての患者及びドナーは文章によるインフォームドコンセントを得た後、血液を採取しDNAを抽出した。また本研究

はアメリカ、イスラエル及び日本の各大学の倫理委員会の承認を得た後に開始された。

### 3. ヒト無精子症患者におけるヒト MEI1 の遺伝子変異解析

ヒト MEI1 遺伝子における coding region 内の全てのエクソンに隣接するイントロン部位にプライマーをそれぞれ設定し、組織学的解析で減数分裂停止による無精子症と診断された27名の患者の genomic DNA を用いて PCR 及びダイレクトシーケンス解析を行った。妊孕能の確認されている正常コントロール群の genomic DNA を用いて同様に PCR 及びダイレクトシーケンス解析を施行し、同定された4つの coding single-nucleotide-polymorphism (cSNP) において genotype およびアレルの出現頻度を比較検討した。さらに expectation-maximization (E-M) algorithm をもちいて近似的に頻度を計算してハプロタイプに対しても比較検討を行った。

### C. 成績

単離された full length cDNA は2つの転写体からなり、ヒトゲノムシーケンスとの比較によりヒト MEI1 遺伝子は16個のエクソンから構成され、短い cDNA は alternative splicing によりエクソン7を欠いていた。コードされるアミノ酸はそれぞれ642個及び607個でマウスとの相同性はアミノ酸レベルで77%、核酸レベルで61%であった。

発現パターンの解析では、ヒト MEI1 は精巣にほぼ特異的に強く発現していたが、脾臓と胸腺にもわずかに発現が検出された。

無精子症患者のシーケンス解析により open reading frame (ORF) 内に4箇所 single nucleotide polymorphism (SNPs) が検出された。genotype、アレル解析を行ったところ、SNP3 及び SNP4 においてコントロール群に対して統計学的な有意差が認められた

( $p < 0.05$ )。さらに人種別に genotype、アレル解析を同様に行ったところアメリカ人の SNP3 及び SNP4 においては有意差が認められたがイスラエル人では有意差が認められなかった。さらに、ハプロタイプ解析を SNP3-SNP4 において行ったところアメリカ人でやはり有意差が認められ、イスラエル人にも同様に有意差が検出された。

### D. 考察

我々はヒト MEI1 cDNA を単離した。単離された cDNA は2つの転写体を有しており、2つのアミノ酸をコードしている。これはマウス Meil 遺伝子と一致する。またその発現はマウス同様ヒト精巣に特異的なものであり、精子形成への関与を示唆するものである。

mei1 マウスはマウス Meil 遺伝子のエクソン12の部分的欠失もしくは完全欠失によりフレームシフトが起こることにより生じる。近年、マウスにおいて Meil 遺伝子と DNA 修復遺伝子 Dmc1 遺伝子の関係が報告され Meil はマウス減数分裂において Dmc1 の上流に位置していることが明らかとなった(3)。今後ヒト MEI1 遺伝子と DMC1 遺伝子の関係を明らかにするために、さらなる解析が必要とされている。

本研究においてヒト MEI1 の coding region において新たに4つの SNP を同定することが出来た。それらの SNP の解析では、SNP3 と SNP4 においてその出現頻度がアメリカ人患者群ではコントロール群に対して統計学的有意差を認められたことにより、そのメカニズムは不明なものの今回同定された SNP がヒト精子形成過程、特にその減数分裂において深く関与している可能性が示唆された。

### E. 結論

本研究はヒト MEI1 遺伝子とヒト精子形成との関係を示唆した最初の報告である。我々の研究成果は今後のヒト減数分裂の分子メカニ

ズムの解明に何らかの貢献をする可能性がある。ヒト MEI1 遺伝子において今後、より多くの症例数を用いた解析及び他の民族における解析が強く望まれる。

### (3) ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト HOP2, CDK2, MEISEZ 遺伝子に関する研究

#### A. 研究目的

近年、マウス Hop2, Cdk2 及び Meisez 遺伝子のノックアウトマウスが報告された。これらのマウスは全て生殖能力を全く有していなかった。詳細な解析の結果、これらのマウス全てが精子形成過程における減数分裂異常に起因する無精子症を呈することが判明した。そこで我々はこれら 3 つの遺伝子がヒトでもヒト無精子症の原因遺伝子となりうるのではないかとの仮説をもとに解析を行った。

#### B. 研究方法

対象となる患者はアメリカ人、イスラエル人及び日本人の計 55 名である。すべての患者及び正常コントロール群は文章によるインフォームドコンセントを得た後に血液から DNA を抽出し、また大学の倫理委員会の承認を得た後に解析が開始された。3 つの遺伝子における全ての coding region において mutation 解析を施行した。

#### C. 研究結果

解析の結果、coding region 内においてヒト HOP2 遺伝子で 1 箇所、CDK2 遺伝子で 1 箇所さらに、MEISEZ 遺伝子で計 11 箇所の single nucleotide polymorphism (SNP) を検出した。これらの SNP において正常コントロール群とそのアレル、ゲノタイプの出現頻度を比較検討したところ、HOP2 及び CDK2 遺伝子では患者群とコントロール群で有意な差を認めなかった。しかしながら、ヒト MEISEZ

遺伝子においては今回検出された 11 の SNP のうちその 2 箇所において患者群とコントロール群でそのアレルおよびゲノタイプの出現頻度において統計学的な有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

#### D. E. 考察及び結論

本研究により、ヒト MEISEZ 遺伝子がヒト無精子症特にその精子形成過程における減数分裂に関与していることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Miyamoto T, Sengoku K, Hayashi H, Sasaki Y, Jinno Y, Ishikawa M. GATM, The human ortholog of the mouse imprinting Gatm gene, escapes genomic imprinting in placenta. Genet Mol Biol 28 (1): 44-45. 2005.
- 2) Miyamoto T, Sato H, Yogev L, Kleiman S, Namiki M, Koh E, Sakugawa N, Hayashi H, Ishikawa M, Lamb DJ, Sengoku K. Is a genetic defect in Fkbp6 a common cause of azoospermia in human? Cell Mol Biol Lett 11(4): 557-569. 2006.
- 3) Sato H, Miyamoto T, Yogev L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, Sasaki Y, Ishikawa M, Lamb DJ, Matsumoto N, Birk OS, Niikawa N, Sengoku K. Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. J Hum Genet. 51: 533-540. 2006.
- 4) Sasaki Y, Miyamoto T, Hidaka Y, Satoh H, Takuma N, Sengoku K, Sugimori H,

Inaoka T, Aburano T. Three-dimensional magnetic resonance imaging after ultrasonography for assessment of fetal gastroschisis. *Magn Reson Imaging*. 24(2):201-3. 2006

- 5) Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Promoter hypermethylation contributes to frequent inactivation of a putative conditional tumor suppressor gene connective tissue growth factor in ovarian cancer. *Cancer Res*. 67(15):7095-105. 2007
- 6) Miyamoto T, Yu YS, Sato H, Hayashi H, Sakugawa N, Ishikawa M, Sengoku K Mutational analysis of the human MBX gene in four Korean families demonstrating microphthalmia with congenital cataract. *Turk J Pediatr*.;49(3):334-6. 2007.
- 7) Inaoka T, Sugimori H, Sasaki Y, Takahashi K, Sengoku K, Takada N, Aburano T. VIBE MRI for evaluating the normal and abnormal gastrointestinal tract in fetuses. *AJR Am J Roentgenol*. 189(6):W303-8. 2007.

## 2. 学会発表

- 1) 宮本敏伸、佐久川直子、佐藤 恒、堀川道晴、千石一雄 [ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒトFKBP6遺伝子の解析] 第57回日本産科婦人科学会学術講演会
- 2) 片山英人、渡邊まり子、荻野元子、加藤育民、西脇邦彦、山下 剛、千石一雄 [子宮頸癌 Sentinel node における微小転移検索について] 第57回日本産科婦人科学会学術講演会
- 3) 横浜祐子、渡邊まり子、荻野元子、加藤育民、片山英人、西脇邦彦、山下 剛、千石一雄 [子宮体癌におけるホメオボックス遺伝子HOXの過剰発現と浸潤転移能の解析] 第57回日本産科婦人科学会学術講演会
- 4) 佐藤 恒、佐久川直子、宮本敏伸、堀川道晴、千石一雄 [ヒト無精子症の原因遺伝子であるヒトMEI1の同定および無精子症例におけるの解析] 第57回日本産科婦人科学会学術講演会
- 5) 佐久川直子、佐藤 恒、宮本敏伸、堀川道晴、千石一雄 [男性不妊症に対する精巣内精子採取術(TESE-ICSI)についての検討] 第57回日本産科婦人科学会学術講演会
- 6) 佐々木禎仁、北 香、日高康弘、田熊直之、千石一雄 [胎児消化管異常における3D-MRIによる評価] 第57回日本産科婦人科学会学術講演会
- 7) 田熊直之、北 香、佐々木禎仁、日高康弘、千石一雄 [非典型的な子宮破裂3症例の検討] 第57回日本産科婦人科学会学術講演会
- 8) 荻野元子、渡邊まり子、加藤育民、片山英人、西脇邦彦、山下 剛、千石一雄 [成熟嚢胞性奇形腫摘出術における体内法と体外法の比較] 第13回北海道婦人科内視鏡学会
- 9) 片山英人、渡邊まり子、荻野元子、加藤育民、西脇邦彦、山下 剛、千石一雄 [早期子宮体癌症例において腹腔鏡下手術は成立するか] 第13回北海道婦人科内視鏡学会
- 10) 荻野元子、山下 剛、千石一雄 [主治医が苦慮する終末期患者の精神的サポート(緩和ケアチームに依頼した4症例の検討)] 第19回日本サイコオンコロジー学会
- 11) 佐久川直子、佐藤 恒、宮本敏伸、堀川道晴、千石一雄 [男性不妊症に対する精巣内精子採取術—卵細胞質内精子注入法(TESE-ICSI)についての検討] 第4回北海

道生殖医療カンファレンス

- 12) 菊池良子、千石一雄 [CGH アレイによる  
卵巣癌の網羅的ゲノム解析] 第 40 回日本  
婦人科腫瘍学会
- 13) 安達かおり、金井麻子、北 香、日高康弘、  
伊藤秀行、田熊直之、千石一雄 [当科にお  
ける術式を統一した最近 2 年間の前置胎  
盤症例の検討 第 4 回周産期談話会  
他合計 76 回

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

特記すべきことなし。

## 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD)の絨毛細胞における glucose transport protein 発現に関する研究

分担研究者 遠藤 俊明 札幌医科大学医学部産科周産期科・生殖内分泌科 准教授

### 研究要旨

妊娠絨毛細胞モデルとして絨毛癌株を用いて 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)添加実験を行い、m-RNA および蛋白レベルでの glucose transport protein (GLUT)発現につき検討した。JEG-3 細胞株 10nM TCDD 添加 24 時間後に、一時的ではあるが GLUT4 m-RNA および蛋白発現は抑制された。これらの結果から、環境ホルモンの胎盤に対する糖輸送能の微妙な変化は、正常な胎児発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

### 【共同研究者】

齊藤 豪

札幌医科大学 教授

林 卓宏

札幌医科大学 講師

### A. 研究目的

環境ホルモンの一種である 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は、その摂取によりベトナム戦争軍人の統計から、2型糖尿病との関連が報告されている。また、血中の TCDD が高濃度の群では、糖尿病を発症しなかった場合でも高インスリン血症を示し、いわゆる TCDD によるインスリン抵抗性の存在が推測されている。

現在我々の生活においても TCDD は日常的に食物から経口摂取されており、血中脂質 TCDD 濃度は 2.5 ppt ときには 10ppt を超える場合もあるとされている。10-15 ppt を超えると、インスリン抵抗性の出現可能性が高まると報告されている。

胎盤は胎児の発育のために、母体から栄養分および酸素を運搬する重要な臓器であるが、特に母体糖分は胎児にとって重要な栄養源である。同時に、胎盤の機能を維持するためには大量の糖分を必要とすることから、胎盤は糖要求

性の高い臓器であるといえる。マウスの実験では、TCDD を投与することによりグリコーゲンの生成が増加し胎盤の胎児への糖輸送能が低下、遅れて glucose transport protein(GLUT 3) m-RNA の発現が変化し、胎盤への糖取り込みも変化することにより胎盤の糖輸送能のかく乱を生じて、最終的に胎仔の発育異常や子宮内死亡に至ると報告されている。従ってヒト妊婦の場合でも、日常的に TCDD の暴露を受けた場合に、胎盤の糖輸送能に変化を及ぼし、胎児の発育状況に悪影響を与える可能性が考えられる。

今回我々は、妊娠絨毛細胞モデルとして絨毛癌株を用いて TCDD 添加実験を行い、m-RNA および蛋白レベルでの GLUT 発現につき検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 細胞培養法

絨毛癌細胞株 JAR, JEG-3 を 10% fetal bovine serum 加 RPMI1640 にて培養。単離浮遊細胞を 10cm ディッシュに  $1.0 \times 10^5$  cells  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベータ内で 2 日間培養後、DMSO に溶解した TCDD を濃度 10nM 添加し培養 0、24、48 時間後の上清ならびに細胞を回収した。なお、コントロールとして同量の

DMSO を加えた培養液で同様に添加・培養した。

## 2. 上清 $\beta$ -hCG 測定

培養細胞の分化程度を決定するため、 $\beta$ -hCG RIA キットを用いて得られた上清の濃度を測定した。

## 3. RT-PCR

培養細胞を ISOGEN にて処置し、その溶解液から total RNA を採取。これら 5  $\mu$ gRNA から DNase 1 による m-RNA 精製後、random oligodeoxynucleotide primers を用い一本鎖 cDNA を作成し PCR を施行した。PCR 条件は 95°C、5 min の後、95°C、60°C、72°Cそれぞれ 30 sec を 35 サイクルの後 72°C、7 min とした。

今回用いたプライマーは、以下のごとくである。

GLUT1 (NM006516)

L: tcaactgtgctcctggttctg

R: cctgtgctcctgagagatecc

product size 233bp

GLUT3 (NM006931)

L: accggcttctcattacctt

R: aggctcgatgctgttcac

product size 159bp

GLUT4 (NM001042)

L: cttegagacagcaggggtag

R: aggagcagagccacagtcac

product size 180bp

GLUT9(NM001001290)

L: tacaacctgctggtggtgaa

R: gcagaaattgcaaacccatt

product size 236bp

GLUT12(NM145176)

L: acatcgagagattgctcct

R: tgcaattgcttgcaaaactc

product size 179bp

また、housekeeping 遺伝子として  $\beta$  アクチンを用いた。

## 4. Western analysis

超音波破碎を行った細胞溶解から蛋白質を抽出し 1 xSDS サンプルバッファーに溶解した 100  $\mu$ g を電気泳動、膜トランスファーの後 GLUT 各種抗体を作用させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ結合 2 次抗体を作用し、 $\beta$  アクチンを基準に NIH image にて画像解析した。

## C. 研究結果

### 1. 細胞増殖および $\beta$ hCG 分泌量

JAR 細胞株では、添加 0 時間後の細胞数と比較し、いずれの条件でも添加 24 時間後には約 2.7 倍、48 時間後には約 5 倍の細胞増殖を認めた(図 1)。JEG-3 細胞株でも同様に、添加 0 時間後の細胞数と比較し、いずれの条件でも添加 24 時間後に約 2 倍、添加 48 時間後に約 4 倍の細胞増殖を認めた(図 2)。以上より JAR および JEG-3 細胞株どちらも TCDD 添加による細胞数増加に対する変化は認めなかった。

次に、JAR 細胞株の細胞数 105 個あたりの  $\beta$  hCG 分泌量を検討したところ TCDD 1nM 添加 24 時間後でコントロールと比較し 1.4 倍、TCDD 10nM 添加では 1.6 倍の分泌量増加を認めた。しかしながら 48 時間後では、いずれの濃度においてもコントロールと同様の分泌量となった(図 3)。JEG-3 細胞株ではいずれの濃度・添加時間でもコントロールと比較し変化はなかった(data not shown)。

### 2. GLUT1、3 および 12 m-RNA の発現

JAR、JEG-3 細胞株ともに、GLUT1 および 3 m-RNA 発現を認め、TCDD 添加による m-RNA 発現変化は認めなかった( )。

### 3. GLUT4 m-RNA の発現

JEG-3 細胞株において、TCDD1 および 10nM 添加 24 時間後に GLUT4 m-RNA 発現低下を認めた。しかし、TCDD 添加 48 時間後で

は、どちらの濃度においても control と同程度の GLUT4 m-RNA 発現に復帰した。

#### 4. GLUT9 m-RNA の発現

JAR 細胞株では GLUT9 m-RNA 発現は認めなかったが、JEG-3 細胞株ではいずれの条件でも同様に発現を認めた。

#### 5. GLUT4 蛋白発現の検討

次に JEG-3 細胞株に絞って TCDD 添加による GLUT4 蛋白発現を、免疫染色法を用いて検討した。GLUT4 m-RNA 発現と同様に、TCDD 10nM 添加 24 時間後に GLUT4 蛋白発現の減弱を認めたが、添加 48 時間後には control と同程度の蛋白発現に復帰した。

#### D. 考 察

TCDD 添加による細胞増殖能の変化は JAR および JEG-3 両細胞株で認めなかったが、細胞あたりの  $\beta$ hCG 分泌量においては JAR 細胞株の添加 24 時間で増加を認めることから、TCDD は細胞増殖には影響がないものの細胞分化の面では一時的に分化促進に働く傾向のあることが示唆された。

JAR および JEG-3 両細胞株の GLUT1、3 および 12 m-RNA 発現において、今回用いた TCDD 濃度・作用時間ではその発現に変化のないことから、TCDD は今回実験に用いた濃度ではこれら GLUT に対する作用はないと考えられた。GLUT9 m-RNA 発現において、細胞株による発現の違いが示唆された。

一方で、JEG-3 細胞株において、TCDD1 および 10nM 添加 24 時間後に一時的に GLUT4 m-RNA 発現低下を認めたことより、TCDD 添加によるインスリン抵抗性の誘導が示唆された。GLUT4 蛋白発現も同様の变化を認めている。しかし、TCDD 添加 48 時間後では、どちらの濃度においても control と同程度の GLUT4 m-RNA および蛋白発現に復帰したこ

とから、インスリン抵抗性の誘導は一時的なものと推測された。

#### E. 結 論

TCDD は、増殖・分化能に影響のない低濃度であっても、胎盤の糖取り込みに影響を及ぼす可能性のあることが示唆された。これらの結果から、環境ホルモンの胎盤に対する糖輸送能の微妙な変化は、正常な胎児発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表  
準備中

#### E. 知的所有権の取得状況

なし

## 多嚢胞性卵巣症候群における遺伝子多型に関する研究

分担研究者 遠藤 俊明 札幌医科大学医学部産科周産期科・生殖内分泌科 准教授

### 研究要旨

インスリン感受性ならびに性ステロイド代謝に関与する遺伝子の多型を解析し、多嚢胞性卵巣症候群に関連のある疾患候補遺伝子を探索する。また、候補遺伝子の多型が、インスリン抵抗性や BMI、男性ホルモン値などの臨床パラメーターにどのように影響するのかを明らかにする。

### 【研究協力者】

馬場 剛

札幌医科大学産婦人科講師

### A. 研究目的

多嚢胞性卵巣症候群（以下 PCOS）は生殖年齢女性の 5～10%程度に存在するとされ、その特徴として①卵巣の多嚢胞状形態、②月経不順、③高アンドロゲンがある。また、その病態にインスリン抵抗性が関与することも明らかにされつつあり、メタボリック症候群のリスク群としても認識されている。従って、本疾患の解明は厚生行政においても有意義であると考えられる。

インスリン抵抗性に関しては、生活習慣としての環境因子はもとより遺伝的因子が大きく関与している可能性が考えられている。これらは複数の遺伝要因があるため、従来の遺伝子病のような疾患遺伝子の単離は不可能である。近年、一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism: 以下 SNP）が注目されており、PCOS においても多数の遺伝子について SNP の報告がある。

そこで、インスリン抵抗性に関与する Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)、Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1)、Resistin (RETN)、Adiponectin (apM1) について、SNP と PCOS との関連を検討した。

### B. 研究方法

症例は札幌医科大学附属病院婦人科で診断された PCOS 症例 123 例、対象は北海道大学医学部附属病院を受診した正常産後症例 380 例とした。EDTA を含んだ採血管に末梢血を採血した全血から DNA を抽出し、TaqMan PCR 法で SNP を検出した。PCOS 症例については、身長と体重計測に加え、月経 3-5 日目に採血して Follicle stimulating hormone (FSH)、Luteinizing hormone (LH)、Estradiol、Prolactin、Total testosterone、Free testosterone、Androstenedione、Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)、Fasting plasma glucose (FPG)、Fasting insulin (IRI)、Adiponectin 値を測定した。インスリン抵抗性の診断は、homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) を用い、 $HOMA-IR \geq 2.0$  をインスリン抵抗性ありと診断した。なお、HOMA-IR の計算式は以下となる： $HOMA-IR = FPG (mg/dl) \times IRI (\mu IU/ml) \div 405$ 。

また、ホルモン値など臨床パラメーターの比較のため、出産例以外の健常者を新コントロール群として抽出し、PCOS 群と非出産健常コントロール群とで新たに検討することとした。

### （倫理面への配慮）

全対象者に文書による説明を行い、同意を得た。研究対象者の人権は最大限に保護されなければならないので、個人名及び個人のデータの公表は

いかなる形でも行わない。また、研究者からの個人データの漏洩については、データの管理保管に適切な保管場所を確保するなどの方法により行うとともに、研究者の道義的責任に基づいて個人データをいかなる形でも本研究の研究者以外の外部のものに触れられないように厳重に保管するものとする。そのために、研究者とは別に個人情報管理者を置く。

### C. 研究結果

インスリン抵抗性関連遺伝子のうち、IRS-1 に関してはPCOS症例で有意に variant allele 陽性例が多いことが判明した(10.6% vs. 4.8%, OR:3.31, 95% CI:1.49-7.35)。RETN に関しては、homozygous variant genotype が PCOS 症例において有意に多いことが判明した(15.4% vs. 8.4%, OR:2.03, 95% CI:1.05-3.92)。一方、ENPP 1、apM1 の genotype 頻度に関しては、PCOS 症例とコントロール症例において、有意差は認められなかった。

PCOS 症例において、IRS-1、RETN genotype と BMI、FPG、IRI、Adiponectin、Total-testosterone、DHEAS、Androstenedione の値について検討したところ、RETN homogeneous variant genotype において有意に BMI 高値、IRI 高値、HOMA-IR 高値、Adiponectin 低値であったが、IRS-1 genotype による差異は認められなかった。

PCOS 群と非妊娠健常コントロール群との各種パラメーターの比較に関しては、現在コントロールの症例を蓄積中でまだデータは得られていない。

### D. 考察

本邦の PCOS 患者における predisposing factor として、インスリン抵抗性に関与する遺伝子である IRS-1 と Resistin の遺伝子多型が同定された。このことは、インスリン抵抗性改善薬が PCOS の排卵障害や高アンドロゲン血症の治療

のひとつであることを裏付ける知見といえる。

今回の検討では、出産症例をコントロールとして用いたため、排卵障害の影響を極力排除することが可能であったが、BMI 値が非妊時のデータを用いることが困難だった点、また妊娠の影響のため各種ホルモン値の比較が困難だった点が問題となり、現在前述した新コントロール群の症例を蓄積中である。

### E. 結論

本邦の PCOS 患者背景に IRS-1、Resistin 遺伝子の多型が関与していることが示唆された。また、PCOS 患者における Resistin 遺伝子多型は BMI、FPG、HOMA-IR、Adiponectin 値に関与していることが判明した。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Life Sci. 2007 Aug 16;81(10):850-4.  
Epub 2007 Aug 7

#### 2. 学会発表

1) 第 59 回日本産科婦人科学会（2007 年 4 月）。

### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

#### 1. 特許取得

予定なし。

#### 2. 実用新案登録

予定なし。

#### 3. その他

特になし