

平成21年 5月22日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 - 2008

課題番号：19790279

研究課題名 (和文) Fragile X syndrome に起因する卵巣機能不全の病態解明

研究課題名 (英文) Analysis of premature ovarian failure in fragile X syndrome

研究代表者

大塚 紀幸 (OTSUKA NORIYUKI)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00447046

研究成果の概要：Fragile X 症候群で高率に見られる卵巣機能不全の病態解明を目的として、三塩基リピートの増幅を有するマウスモデルの解析を行った。モデルマウスの三塩基リピート数に依存する産仔数の減少傾向、卵胞の発育動態の変動傾向が認められたが、有意差を得るには至らなかった。また、卵巣の形態学的変化（卵胞数の変動）、発現遺伝子・蛋白の差異について検討を行ったが明確な差は検出されなかった。挿入遺伝子の動態予測が困難であるものの、三塩基リピートによる卵巣機能への影響が示唆されることから、さらなる研究の進展が望まれる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：医歯薬学

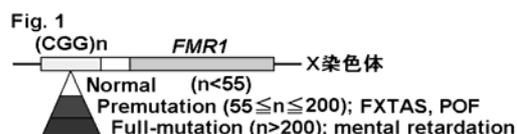
科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：Fragile X 症候群, 三塩基リピート病, CGG repeat, POF, 卵巣

1. 研究開始当初の背景

Fragile X syndrome は精神遅滞を引き起こす遺伝疾患の中で最も頻度の高い疾患である。Fragile X mental retardation 蛋白 (FMRP) をコードする *FMR1* 遺伝子の untranslated region (UTR) に存在する通常 55 未満である CGG リピートが、Fragile X syndrome 患者では 200 以上に増幅されて

おり methylation による gene silencing のために FMRP 発現が消失し精神症状を引き起こすとされている (Fig.1 参照)。



このCGGリピートが55以上200以下である保因者はpremutation域にあり、次世代以降にfull mutation域に増幅しFragile X syndrome患者が生まれる可能性があるとして分類されてきた。近年、このpremutation域の保因者が、遺伝的にFragile X syndromeの前段階にあるだけでなく、神経症状Fragile X tremor/ataxia syndrome (FXTAS)と軽度の精神遅滞、さらに高率(20%)にPremature ovarian failure (POF)を発症することが明らかになってきた(POF発症率は通常女性において1%とされる)。FXTASについては、増幅したCGGリピートのmRNA産生に伴う神経細胞変性、軽度の精神遅滞は軽度のFMRP発現低下に起因することが明らかになりつつある。一方、多くのPOF症例で原因を特定されない現状の中で、Fragile X premutationに起因するPOFの占める割合は高いと考えられており、不妊治療を考える際に着目に価する。しかし、前二者の精神・神経症状と比較してPOFのメカニズム解明は依然進んでおらず、多くのpremutation患者・家族および不妊治療専門医からは、全容の解明と治療法・遺伝カウンセリングの確立が待ち望まれている。

2. 研究の目的

疾患の性質上、ヒト材料を利用したの解析や研究には大きな制約がある。Fragile X syndromeにおける神経症状に対しては動物モデルや細胞培養系が用いられて解明が進んでいる一方で、POFの側面については基礎研究報告に限られている。動物モデル及びin vitroの実験系を用いて、Fragile X premutationが卵巣機能に影響を与えるメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

NIDDK (NIH, 米国)では、X染色体に存在するマウス*Fmr1*遺伝子上流のUTRにCGGリピートを増幅させたマウスモデルが樹立された。このマウスモデルは、premutationに相当する120-150のCGGリピートが通常のCGGリピート部に挿入・置換されたノックインマウスであり、ヒトにおけるCGGリピート

のexpansionと同様に、継代によりリピートサイズが増大することが確認されている。これらのことから、本マウスは理想的な実験モデルであると言える。

この動物モデルの卵巣機能の評価、解析を行うことにより、Fragile X premutationにおけるPOFの病因を検討する。

本モデルマウスの性成熟能・性周期の比較検討、breeding assayでの産仔数により生殖・妊孕能の比較を行う。

また、卵胞数、発現遺伝子の比較検討、卵胞の初期培養による卵胞発育に与えるFragile X premutationの影響について検討を加える。

4. 研究成果

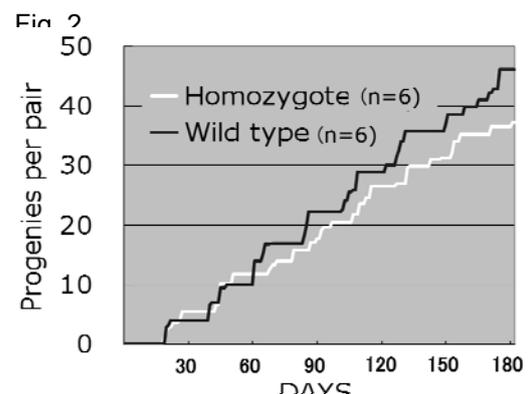
(1) 性成熟と性周期

出生後、膣開口までの日数を計測したが、性成熟に有意な加速や遅滞は見られなかった。

膣スメアの採取と血清中のホルモン測定による性周期の変動、加齢による影響を比較検討した。2群間に有意な差は見られなかった。

(2) Breeding assay

ホモのトランスジェニックマウス雌を野生型マウス雄とペアにして継続的に6ヶ月間の飼育し産仔数を比較した。



両群間では、産仔数に若干の差異がみられ、トランスジェニックマウス雌では、その長期的には生殖能が劣る傾向が認められた。しかしながら、統計学的な有意差は得られなかった。

(3) 卵胞数のカウント

本マウスでは、6 週齢において activated follicles (primary 及び preantral follicles) 数の有意な増加、CGG リピートサイズに依存した卵胞閉鎖 (atretic follicle) の増加が認められた (Fig. 3 & 4)。

本マウスでは、6 ヶ月齢において primordial follicles 数の CGG リピートサイズに依存した減少がみられた。

これらの結果を総合すると、CGG リピートの増加に伴って primordial follicles の activated follicles への動員が増強される一方で、apoptosis による卵胞閉鎖が起き、結果として primordial follicles の枯渇が進んでいることが示唆された。

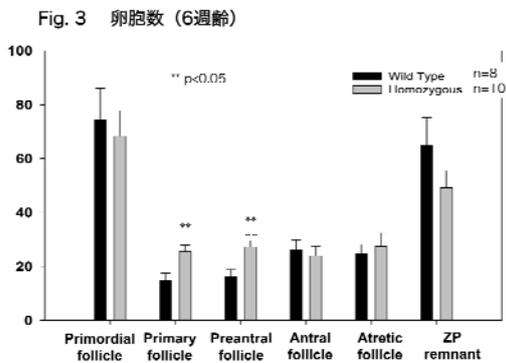
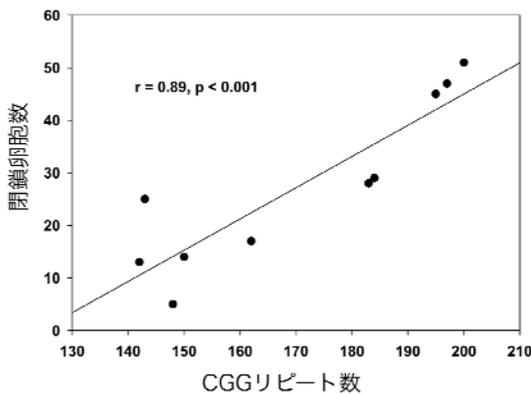


Fig. 4 CGGリピートと閉鎖卵胞数の相関



以上の結果を受けて、モデルマウスの継代を続け、CGG リピート数の増大した群による検証を行った。しかしながら、リピート数の増大に依存しての卵胞数の変動を有意差を持って検証するには至らなかった。

(4) 卵胞における apoptosis 亢進と封入体形成の検索

卵胞数変動のメカニズムの一つとして、卵胞の turn over 亢進による枯渇を考え、TUNEL法による apoptosis の検出を行った。また、apoptosis に関与する遺伝子の発現を比較検討したが、いずれも、有意な変動は検出されなかった。

本モデルマウスでは中枢神経細胞においてリピート配列に起因する核内封入体が認められることから、卵巣における免疫組織化学染色による検出を試みたが、卵細胞及び卵胞細胞に明らかな形態学的変化は見られなかった。

(5) 卵巣における遺伝子発現

モデルマウスの卵巣を摘出、mRNA を抽出し、DNA アレイにより遺伝子発現のプロファイルと比較検討した。

挿入遺伝子由来する遺伝子の発現変動を認めるものの、その他の卵胞発育や卵巣機能に関与する遺伝子に大きな差異を認めることはできなかった。

三塩基リピートによる卵巣機能への影響が示唆されたが、リピート数の増大との相関については明確な因果関係を検証し得なかった。

ヒト Fragile X syndrome においても、POF の症候は三塩基リピート数が premutation 域にある場合に限定される。本マウスでも、リピート数とは必ずしも比例しない相関関係が存在するために、表現型にバラツキが現れている可能性がある。挿入された三塩基リピートの動態の予測は困難であるものの、さらなる研究の進展が望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 紀幸 (OTSUKA NORIYUKI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00447046

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし