

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09755

研究課題名(和文) 原発性卵巣不全患者における減数分裂関連因子異常の探索

研究課題名(英文) Exploring meiosis-related factors in patients with primary ovarian insufficiency

研究代表者

伊藤 史子 (Itoh, Fumiko)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：90648271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、原発性卵巣不全の病態解明のため、ヒト原発性卵巣不全における減数分裂開始に必須のStIP1(=MEIOSIN)およびSTRA8-meiosin制御下遺伝子群の遺伝子異常の可能性を検討すること、未解析因子StIP2の減数分裂における役割を検討することを目的とした。では、研究期間内の基礎研究の成果から解析対象をSTRA8-meiosin制御下遺伝子群に拡大したが、現時点で対象遺伝子の病的変異は同定されていない。今後も検体収集を継続し、候補変異が同定された場合は遺伝子改変マウスを作成し表現型を解析する。StIP2欠損マウスは明らかな減数分裂異常を呈さず、妊孕性異常も認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、原発性卵巣不全に至る卵子枯渇の原因を、臨床と基礎の両面からアプローチすることにより解明しようとする研究である。病態が解明されることで、現在は内分泌学的閉経に対するエストロゲン補充や不妊症に対する卵子提供しかない本疾患の根本的治療への発展が期待される。これまでの解析で原発性卵巣不全患者のSTRA8-meiosin制御下遺伝子に病的変異は同定されておらず、今後も検体収集を継続し、候補変異が同定された場合は遺伝子改変マウスを作成し表現型を解析する。

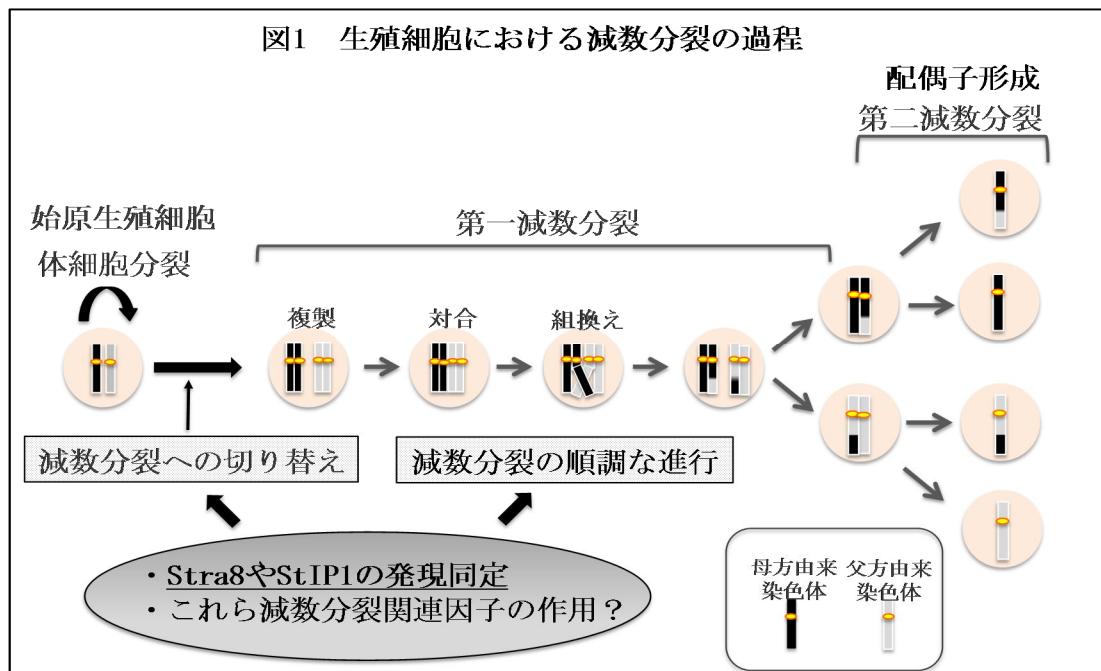
研究成果の概要(英文)：Mutations in meiosis-regulated genes have been postulated as one of the causes of primary ovarian failure. The objectives of this study were (1) to investigate the possibility of genetic abnormalities in StIP1 (=MEIOSIN), a novel factor essential for meiosis initiation in human primary ovarian failure, and in the STRA8-meiosin-regulated gene cluster, and (2) to examine the role of the uncharacterized factor StIP2 in meiosis. In (1), we expanded the scope of analysis to the STRA8-meiosin-regulated gene group based on the results of the parallel basic research. At present, no pathological mutations of the target genes have been identified in patients with primary ovarian failure. We will continue to collect samples, and if candidate mutations are identified, we will generate genetically engineered mice for phenotypic analysis. The StIP2-deficient mice did not show any obvious meiotic abnormalities and fertility abnormalities.

研究分野：産婦人科

キーワード：原発性卵巣不全 原発性無月経 減数分裂 不妊症

1. 研究開始当初の背景

原発性卵巣不全は、思春期年齢を迎えても初経がみられない原発性の卵巣性無月経を指し、その本態は卵巣における卵子の枯渇である。原発性卵巣不全の患者では体外受精・胚移植を試みても卵子を得ることができず、難治性の不妊症を呈するが、その発症メカニズムは未だ解明されておらず、根本的な治療法も存在しない。近年、原因の一つとして減数分裂特異的な遺伝子変異が想定されているが、いまだ不明な点が多い。また、一方の減数分裂についても、配偶子形成に必須の過程と考えられているが、その詳細な制御機構については生物種を問わずほとんど解明されていなかった。最近、共同研究を行う熊本大学発生医学研究所染色体制御分野では、マウスの減数分裂開始にかかわる STRA8 の会合因子として、Stra8 interacting protein 1 (StIP1) (= MEIOSIN) を同定し、MEIOSIN が減数分裂開始に必須の転写因子であり、MEIOSIN 異常により生殖細胞が減少して不妊を呈することを明らかとした(図1)。とりわけ MEIOSIN 機能欠損マウスの成体卵巣の病理組織はヒト原発性卵巣不全症例の卵巣と酷似していたことから、原発性卵巣不全の発症に Stra8 および Meiosin 異常が関与している可能性が示唆された。加えて、STRA8 会合因子として同定された Stra8 interacting protein 2 (StIP2) も減数分裂期に特異的な発現がみられており、減数分裂において何らかの役割をもつことが推察された。



2. 研究の目的

本研究は、原発性卵巣不全に至る卵子枯渇の原因を解明しようとする研究である。一般に原発性卵巣不全による生殖機能消失は不可逆的であり、妊孕性の回復は望めないことから、原因を解明し根本的治療へとつなげることは、エストロゲン補充や卵子提供しか治療のない現状において極めて重要な意義をもつ。これまで卵子の減数分裂に着目した卵巣機能研究はみられず、本研究によって原発性卵巣不全の病態が解明されれば、その根本的治療への発展が期待される。また、新規因子である StIP2 の減数分裂における役

割の解明においては、MEIOSIN 機能欠損マウス作成の技術を応用することが可能である。StIP2 が雌雄マウスのいずれの生殖細胞にも発現がみられていることから、減数分裂において何らかの役割を来している可能性が考えられ、いまだ不明な点の多い減数分裂制御機構の解明の一助となることが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、原発性卵巣不全における減数分裂制御遺伝子の異常を検討し、原因を解明することを目的として、以下の2つを行った。

ヒト原発性卵巣不全患者における *Stra8*、*Meiosin* 変異の検討

当施設で管理している原発性卵巣不全患者の末梢血液検体より DNA を抽出し、*Stra8* ならびに *Meiosin* のヒトホモログを対象としてターゲットシーケンスを行った。ターゲットシーケンスの範囲は *Stra8* ならびに *Meiosin* ヒトホモログをコードするゲノム遺伝子の該当エキソンと周辺イントロンの DNA 配列情報に限定し、これらのターゲット領域を PCR 法により増幅し配列決定を行った。ヒトゲノム配列データベースと比較し、得られた遺伝子変異に対して、病的変異の可能性について検討した。

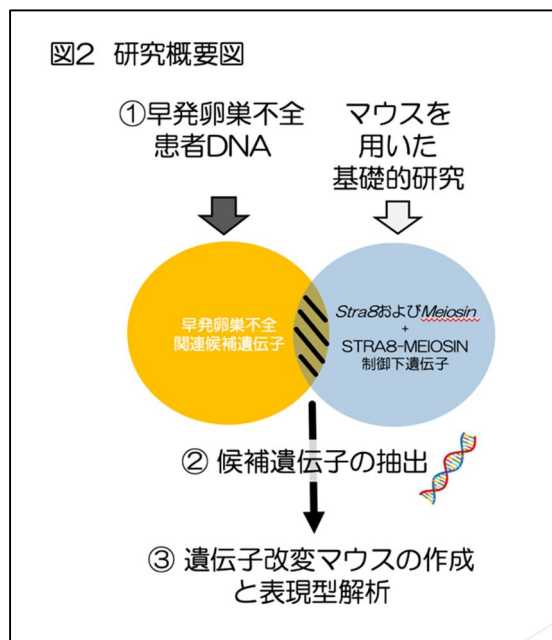
マウスモデルを用いた StIP2 の減数分裂における役割の解析

Crispr-Cas9 を用いて StIP2 機能欠損マウスを作製して精巣ならびに卵巣を採取し、組織学的ならびに免疫組織学的手法を用いて減数分裂の正常な進行の有無について評価した。また、StIP2 機能欠損マウスの雌雄それぞれについて、妊孕性の評価を行った。

研究成果

研究に同意が得られた原発性卵巣不全患者から DNA を抽出し施行した、*Stra8* ならびに *Meiosin* のヒトホモログを対象としたターゲットシーケンスでは、病的変異と推定される新規変異は同定されなかった。しかし、本研究期間における基礎的研究の中で、*STRA8/MEIOSIN* 制御下にあると推定される約 300 の遺伝子の中から、複数の新規減数分裂制御遺伝子が相次いで同定され報告されたことから、対象遺伝子を *STRA8-MEIOSIN* 制御下遺伝子群に拡大した(図 2)。また、減数分裂特異的遺伝子の改変マウスは配偶子形成の欠損に至らず

とも、妊孕性の低下や早期喪失といった幅広い病態を呈することが明らかとなったことから、対象を続発性無月経症例を含めた早発卵巣不全症例に拡大した。その結果、より遺伝的な因子が示唆される同胞発症例を含む、22 例の早発卵巣不全症例を集積し得た。次世代シーケンス法を用いて、これらの対象遺伝子群に限ったエクソーム解析を行い、ヒトゲノム配列データベースと比較したところ、複数の症例で SNP として報告されていないアミノ酸置換を伴う新規変異が認められた。現時点で



病的変異と推察される変異は同定されておらず、今後も新規変異の病的意義について検討を継続し、遺伝子改変マウスの作成と表現型解析を予定したい。また、研究協力機関と連携し症例の集積を継続する。

STRA8 の会合因子である StIP2 の減数分裂における役割の解析を目的とし、Crispr-Cas9 を用いて StIP2 機能欠損マウスを作成した。StIP2 機能欠損マウスの減数分裂について、精巣ならびに卵巣を採取し組織学的ならびに免疫組織学的解析を行ったところ、雌雄いずれにおいても明らかな減数分裂の異常はみられなかった。また雌雄ともに妊孕性が認められ、野生型と比較しても妊孕性の低下はみられなかったことから、本研究は終了とした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石黒 啓一郎 (Ishiguro Kei-ichiro) (30508114)	熊本大学・発生医学研究所・准教授 (17401)	
研究分担者	大場 隆 (Ohba Takashi) (50244132)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	
研究分担者	片淵 秀隆 (Katabuchi Hidetaka) (90224451)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	
研究分担者	小寺 千聡 (Kodera Chisato) (80879940)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・研究員 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関