

令和 4 年 8 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18632

研究課題名（和文）多嚢胞性卵巣症候群のアンドロゲン過剰症に関わる遺伝内分泌学的基盤の解明

研究課題名（英文）Elucidation of endocrinological and genetical basis of androgen excess of polycystic ovary syndrome

研究代表者

齊藤 和毅 (Saito, Kazuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座助教

研究者番号：90830125

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）：Covid-19の流行による一般外来の縮小、コロナ感染症への対応、バイオバンクでの検体収集の停止、他施設との交流の制限などの理由により患者検体の収集が極めて困難であった。研究実施期間には先の見通しが立たず、検体の収集が可能となった後を見据えて解析の準備として解析対象遺伝子を文献検索し、その妥当性につき *in silico* 解析で検討した。最終的に研究機関内に当施設のバイオバンクでの検体収集が不可能であったことから研究を終了した。また既存の多嚢胞性卵巣症候群の検体を利用してアンドロゲンと精神症状の関連につき共同研究を行い、アンドロステンジオンとうつや不安障害などの精神障害が関連することを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多嚢胞性卵巣症候群は生殖年齢女性の1、2割程度に認める疾患である。従来は排卵障害に伴う不妊症の他、肥満や糖尿病との関連を対象とした治療が行われてきたが、近年海外を中心に精神症状との関連が着目されるようになった。わが国においても若年性の他嚢胞性卵巣症候群と不登校などの関連などが報告されるようになり、今後他嚢胞性卵巣症候群と精神症状の関連を示す知見が蓄積するものと思われる。本研究はこの精神症状の背景に本症特有のアンドロゲン過剰症状が存在することを示唆し、発症機序の解明および効果的な介入方法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：It was extremely difficult to collect patient samples due to the reduction of general outpatients due to the Covid-19 epidemic, work around corona infections, suspension of sample collection at biobanks, and restrictions on interaction with other facilities. Because the prospect was unclear, we picked target genes from literature in preparation for analysis after when samples could be collected. Their validity was examined by *in silico* analysis. Finally, the research was terminated because it was impossible to collect samples at our biobank within the research institute. We also conducted a joint study on the relationship between androgen and psychiatric symptoms using our own polycystic ovary syndrome specimens. We reported that androstenedione is associated with psychiatric disorders such as depression and anxiety.

研究分野：reproductive medicine

キーワード：内分泌 生殖 不妊症 多嚢胞性卵巣症候群

1. 研究開始当初の背景

PCOS は、生殖年齢女性の 10%程度に認められる原因不明の疾患である。本症は月経異常、排卵障害、アンドロゲン過剰を三主徴とし、しばしば肥満、糖代謝異常や精神症状を伴う。その表現型には個人差や民族差があり、わが国では肥満やアンドロゲン過剰を伴う患者の割合が少ないことが知られている。また様々な疾患で PCOS に類似した表現型を示すことから、従来の診断基準により PCOS に分類される患者群の中には、多様な病態が混在すると考えられている。発症には遺伝学的素因が関わり、複数の疾患関連遺伝子が報告されている。しかし未だ、個々の遺伝子が病態形成にどのような影響を与えるかは明らかにされていない。近年研究者は液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) を用いた血中ステロイドの包括的解析を行い、本邦の PCOS 患者において、古典的アンドロゲン産生経路以外に複数の非古典的経路が機能していることを明らかとした。この非古典的経路では、従来アンドロゲン過剰症の診断指標とされてきたテストステロンを介さずに、最も強力なアンドロゲンであるジヒドロテストステロンが合成される。また、近年新たにヒトの主要なアンドロゲンであると報告された 11 ケト-ステロイドについても解析を行い、PCOS 患者の一部、とくに肥満を合併する症例で増加していることを明らかとした。このことは、これまでアンドロゲン過剰症がないと判断されていた PCOS 患者においても、アンドロゲン過剰が存在する可能性があることを明示する。また前述の非古典的アンドロゲン産生経路では、食欲調節およびうつ、不安症状に関与する神経ステロイドが産生されるため、この経路の働きは PCOS 患者の肥満や精神症状の発症と関連する可能性がある。しかし、これまで PCOS 患者ではアンドロゲン過剰症の有無が問題となるものの、個々のアンドロゲンの働きやアンドロゲン合成過程における中間産物が病態にどのような影響を及ぼすかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PCOS 患者における多様なアンドロゲン合成経路が病態形成に与える影響を明らかとし、その遺伝学的背景を解明することである。本研究では、これまでアンドロゲン過剰症として包括されていた病態をアンドロゲン合成経路に基づいて細分類化することで、より詳細に病態を分析することが可能となる。LC-MS/MS による包括的なステロイド測定はステロイド代謝障害の病態を詳細に評価することを可能とする。さらにステロイド代謝に関わる遺伝子の網羅的解析を組み合わせることで代謝障害の原因を究明する手法は世界的に見ても独自性が高い。一方で多因子疾患である本症の解析には、多数の検体を対象に解析を行う、既知疾患関連遺伝子の同定と新規遺伝子の探索を平行して行う、ならびに 変異に起因する微細な表現型の変化を認識して解析を行う能力が求められる。本研究で PCOS におけるアンドロゲン過剰症の発症メカニズムがより詳細に明らかとなることにより、疾患概念が整理され、病態の解明が進むことが期待される。さらに、肥満や精神症状などの周辺症状とアンドロゲン過剰症の関連が明らかになることにより、病態形成機序が解明されるのみならず、効果的な医学的介入法の開発が期待できる。

3. 研究の方法

検体集積：現在集積済の日本人 PCOS 患者 70 名および正常月経女性各 50 名、ならびに研究期間中に新たに集積する患者検体を対象として研究を行う。PCOS 患者からは病態に特徴的な多嚢胞性卵巣が経腔超音波検査で確認された状態において、また正常月経女性からは卵胞期に採血を行い、血清および白血球由来 DNA を採取する。PCOS 患者にはアンドロゲン過剰症や肥満の程度を評価するほか、糖代謝異常および精神症状などの臨床情報を得る。

ステロイド定量：先行研究で得られた知見をもとに、アンドロゲン合成経路の働きに基づいて PCOS 患者のサブグループ化を行う。各患者で優位に働くアンドロゲン合成経路を明らかとするために、LC-MS/MS などで古典的・非古典的経路由来ステロイド代謝産物、ならびに新規アンドロゲンである 11 ケト-テストステロン等の定量を行う。

臨床解析：患者群をサブグループ化した後、個々のグループで肥満や精神症状などの症状の程度を評価する。グループに特徴的な臨床像は、経路に特異的なステロイドの血中濃度と症状の強さとの相関を検討する。また臨床像と関連する特異的ステロイドおよび排卵周期や排卵誘発や低用量ピル内服などの治療にともなうステロイド濃度の変化を明らかとする。

遺伝学的解析：患者の DNA は、PCOS の病態形成に関わる遺伝学的背景の解析に用いる。解析の対象遺伝子は、既知の PCOS 関連遺伝子および、卵胞発育や肥満、糖代謝異常などに関わる遺伝子とする。とくにアンドロゲン過剰症に関しては、古典的経路および非古典的経路においてアンドロゲン産生に関わる酵素遺伝子群 (CYP11A1, CYP17A1, HSD17B3, HSD3B2, SRD5A1/2, AKR1C2/3/4, POR など) や新規アンドロゲンの合成酵素遺伝子 (HSD11B2 など) の解析を行う。数十のサンプルを対象に数十から百程度の遺伝子の一括解析を行うために、Haloplex などのターゲットエンリッチメントシステムと次世代シーケンサーを組み合わせた網羅的遺伝子解析を行

う。続いて同定された塩基置換の病原性を検討するために、PCOS 群で同定された塩基置換の頻度と、正常月経女性群もしくはデータベースにおける一般集団の塩基置換の頻度を比較する。これにより、一般集団での頻度が極めて低い塩基置換や PCOS 群でのみ高頻度に認められる塩基置換を、疾患関連候補変異として抽出する。抽出された候補変異に対して、対象塩基を含む周辺配列の種を超えた保存性やドメインの情報などから、変異体の機能喪失の有無を予測する。さらに Protein Data Bank など公開されているタンパクの立体構造のデータベースおよび構造解析ソフトを用いて *in silico* 解析を行い、変異体の立体構造とその機能喪失の有無を予測する。これらの手法により抽出された疾患感受性遺伝子の変化について、その遺伝子がコードするタンパクの性質にもとづき、培養細胞を用いた *in vitro* の機能解析を行い、その変異体におけるタンパク機能の変化を検証する。

また PCOS 患者のうち、特徴的な臨床像もしくは内分泌学的所見を示す患者には、全ゲノム解析を含めたより網羅的な遺伝解析を行う。また変異陽性患者に関しては、その変異から予測される他の臨床症状の有無を確認するとともに、妊孕性や長期的な合併症のデータを集積する。さらに細胞実験や *in silico* 解析のデータから、PCOS のアンドロゲン過剰症に関わる遺伝子ネットワークを解明するとともに、アンドロゲン過剰症の多様性の背景にある遺伝学的分子基盤を解明する。研究成果は、学会、研究会、論文発表を通じて発信する。

4. 研究成果

Covid-19 の流行による一般外来の縮小、コロナ感染症への対応、バイオバンクでの検体収集の停止、他施設との交流の制限などの理由により患者検体の収集が極めて困難であった。研究実施期間には先の見通しが立たず、検体の収集が可能となった後を見据えて解析の準備として解析対象遺伝子を文献検索し、その妥当性につき *in silico* 解析で検討した。最終的に研究機関内に当施設のバイオバンクでの検体収集が不可能であったことから研究を終了した。

また既存の多嚢胞卵巣症候群の検体を利用してアンドロゲンと精神症状の関連につき共同研究を行い、アンドロステンジオンとうつや不安障害などの精神障害が関連することを報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida Tomoko, Saito Kazuki, Kawamura Toshihiro, Ishikawa Tomonori, Kato Tsuguhiko, Matsubara Keiko, Miyasaka Naoyuki, Miyado Mami, Fukami Maki	4. 巻 165
2. 論文標題 Circulating steroids and mood disorders in patients with polycystic ovary syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Steroids	6. 最初と最後の頁 108748 ~ 108748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.steroids.2020.108748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------