

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18663

研究課題名（和文）プロラクチン受容体解析とエクソーム解析による母乳分泌不全の原因解明

研究課題名（英文）Comprehensive gene mutation analysis using whole-exome sequencing in lactation failure

研究代表者

小林 達也（Kobayashi, Tatsuya）

千葉大学・医学部附属病院・技術職員

研究者番号：00645640

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、母乳分泌不全症例の遺伝子多型についてPRL経路を中心に解析し、母乳分泌不全の原因遺伝子を明らかにすることを目的とした。乳汁分泌が全くみられなかった症例10例と生殖内分泌外来に受診した原因不明の高プロラクチン血症患者のプロラクチン受容体遺伝子をダイレクトシーケンス法によって解析した結果、PRLRのExon上には乳汁分泌と関連すると考えられる遺伝子多型は同定できなかった。一方、哺乳期間が短い健常者のGWAS解析では、表現型と関連が推定されるPRLRの非翻訳領域のSNPsを4カ所とPRLR以外の2つの遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

母乳育児を行うことが社会的にも医学的にも善しとされる傾向があり、母乳が出ない・出にくいことは母親にとって大きなストレスになることがある。しかしながら、なぜ母乳分泌量に差があるのかは不明な点が多い。産後のストレスは、産後うつや育児放棄などの産褥後のトラブルの原因となることが知られている。本研究では母乳分泌能力に遺伝学的な特徴がある可能性を示唆することができた。今後、今回のような研究が発展することにより、産後ストレスの低減や、新規介入方法の開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed genetic polymorphisms in cases of hypolactation, focusing on the prolactin (PRL) pathway, with the aim of clarifying the causative genes of agalactia. We did not find the prolactin receptor (PRLR) gene variant in 10 agalactia or hyperprolactinemia cases. On the other hand, in the GWAS analysis of healthy individuals with a short suckling period, we identified 4 SNPs in the untranslated region of PRLR and two genes other than PRLR, which are presumed to be related to the phenotype.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：乳汁分泌不全 プロラクチン受容体 プロラクチン 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

哺乳類が自然界で繁殖するためには、母乳分泌が必須である。プロラクチン(PRL)は下垂体から分泌されるペプチドホルモンであり、乳腺の発達、母乳合成遺伝子の活性化を通して、母乳分泌を促す。プロラクチン受容体(PRLR)ノックアウトマウスでは、PRLによる母乳合成ができないため、産仔が飢餓状態となり死亡してしまう(Ormandy, Genes Dev.1997)。自然界では母乳分泌ができない表現型は淘汰されてしまい、その遺伝形質は保存されていないと考えられる。申請者は、母乳分泌不全と原発性高プロラクチン血症を合併する患者の遺伝子解析を行った。その結果、この病態はPRLR遺伝子のエクソン領域の多型により、PRLRのタンパク構造に変異が生じ、PRLRの働きが失われていることが原因であるとわかった(Kobayashi et al, New Engl J Med,2018)。したがって、人類は母乳が出ないという問題に対して、乳母制度や人工乳によって対応してきたと考えられ、母親個人が授乳できなくても存続することができた唯一の哺乳類であり、母乳分泌が困難であるという遺伝的形質が継承されているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、母乳分泌不全症例の遺伝子多型についてPRL経路を中心に解析し、母乳分泌不全の原因遺伝子を明らかにすることを目的とした。本研究は母乳の合成量・分泌量の調節因子を遺伝子多型の観点から明らかにすることを目的としている。世界的に見ても母乳育児を行うことが社会的にも医学的にも善しとされる傾向があり、母乳が出ない・出にくいことは母親にとって大きなストレスになることは容易に想像できる。しかしながら、なぜ母乳分泌量に差があるのかは未だに不明な点が多い。産後のストレスは、産後うつや育児放棄などの産褥後のトラブルの原因となることが知られている。母乳分泌能力の個人差を遺伝学的に明らかにすることで、髪質や肌色など、身体的特徴にそれぞれの関連遺伝子が存在するように、「母乳が出ない・出にくいことは、母親のせいではなく、生まれ持った体質である」という概念を作ることができ、産後のストレスを緩和することができるのではないかと考えた。また、本研究で得られる知見は母乳分泌不全に介入する治療法開発の基盤になると考えられる。

3. 研究の方法

2020年からのコロナ禍の影響で、研究室の立ち入り制限、産後妊婦の受診控えなどによって研究活動および症例の蓄積が思うように進まなかった。自身でのデータベース解析や日本他施設共同コホート研究(J-MICC study)との共同研究によるSNPs arrayデータ解析により、疫学的な情報を得ることに専念した。

4. 研究成果

母乳分泌不全症例の収集とプロラクチン受容体遺伝子解析

千葉大学医学部附属病院にて出産し、乳汁分泌が全くみられなかった症例10例と生殖内分泌外来に受診した原因不明の高プロラクチン血症患者のプロラクチン受容体遺伝子をダイレクトシーケンス法によって解析した。その結果、1例でI100Vの遺伝子バリエーションを発見した。STAT5応答遺伝子であるCISHのプロモーターを結合したルシフェラーゼベクター

ーと PRLR の I100V variant の co-transfection によるプロモーターアッセイ (CISH-assay) の結果、I100V は正常型のプロモーター活性を有することが確認され、乳汁分泌不全との関連性は少ないと推定された。他の受容体活性低下をもたらさうる variant は同定できなかった。今回の調査では、乳汁分泌不全の多くの症例で精神疾患を合併しており、ドパミンの作動薬を内服していた。したがって、多くの乳汁分泌不全症例が薬剤性の乳汁分泌不全であると考えられた。

日本人の PRLR 多型の解析と非授乳症例の PRLR SNPs の解析

東北メディカルメガバンクが公開している、日本人の PRLR 遺伝子の一塩基多型を解析した結果、27ヶ所のアミノ酸変異を

伴う多型が存在し、その合計アレル頻度は 0.0452 であった。

PolyPhen-2, Humber によるタンパク質機能予測解析の結果、27ヶ所のうち 14ヶ所が受容体作用に影響を与える変異であることが推定された。この 14ヶ所の一つは我々が過去に報告した P269L 変異であった(表 1)。これらのアミノ酸変異の合計アレル頻度は 0.0041 であり、PRLR の翻訳領域に変異を持つ症例が極めて少ないことがわかった。

表 1.

Position	Ref/Alt	rs#	Annotation	ToMMo 4.7KJPN allele frequency
5:35065201	G/A		p.Ser620Phe	0.0001
5:35065355	C/T	rs140959267	p.Val569Met	0.0003
5:35065913	G/T		p.Pro383Thr	0.0001
5:35065990	G/C	rs184252713	p.Pro357Arg	0.0003
5:35066021	T/G		p.Thr347Pro	0.0001
5:35066021	T/A		p.Asp344Val	0.0001
5:35066077	A/T	rs1396369277	p.Val328Asp	0.0004
5:35068367	G/A	rs754974807	p.Pro269Leu	0.0003
5:35068936	G/A		p.Leu244Phe	0.0001
5:35072697	C/T	rs762980564	p.Glu175Lys	0.0017
5:35072726	G/A	rs758916277	p.Thr165Met	0.0003
5:35072726	G/T	rs758916277	p.Thr165Lys	0.0001
5:35084575	T/C	rs756419949	p.Ile124Val	0.0001
5:35086311	C/T		p.Gly68Arg	0.0001

つぎに、授乳期間と遺伝子多型との関連について J-MICC study の SNPs array data set を用いて、乳汁期間が 6ヶ月以上の症例とそれ未満の症例の PRLR の SNPs の網羅的比較解析を行った(表 2)。その結果、非翻訳領域に 5ヶ所の SNPs を同定した(投稿準備中)。

表 2.

	allele	サンプル数	授乳なし	授乳あり	% 授乳なし	% 授乳あり	Odds ratio	95% CI	Cochran-armitage test	転写因子結合予測
Chr5:35118927	AA	3312	424	2888	12.80	87.20	-	-		
	AT	245	41	204	16.73	83.27	1.37	0.96-1.94	0.0045	CTCF, RAD21
	TT	4	3	1	75.00	25.00	20.43	2.12-196		
rs149555717	TT	3366	432	2934	12.83	87.17	-	-		
	TC	193	34	159	17.62	82.38	1.47	1.05-2.15	0.0032	-
	CC	2	2	0	100.00	0.00	33.92	1.63-707		
rs117719152	GG	3366	432	2934	12.83	87.17	-	-		
	GA	193	34	159	17.62	82.38	1.47	1.05-2.15	0.0032	EGR1
	AA	2	2	0	100.00	0.00	33.92	1.63-707		
rs115695766	TT	3370	432	2938	12.82	87.18	-	-		
	TC	189	34	155	17.99	82.01	1.51	1.03-2.21	0.0031	-
	CC	2	2	0	100.00	0.00	33.97	1.63-708		
rs12109986	AA	3255	407	2848	12.50	87.50	-	-		
	AC	285	47	238	16.49	83.51	1.38	0.99-1.92	0.0041	YY1
	CC	11	4	7	36.36	63.64	4	1.17-13.7		

母乳分泌と関連が予想される遺伝子の SNPs array による網羅的解析

授乳期間と遺伝子多型との関連について J-MICC study の SNPs array data set を用いて、乳汁期間が 6ヶ月以上の症例とそれ未満の症例の SNPs の網羅的比較解析を行った。その結果、計画当初予定した乳汁分泌不全に関与すると推定していた遺伝子群に特徴的な多型は見つからず、予想しなかった代謝関連遺伝子 X と神経ホルモン Y の 2 遺伝子の遺伝子多型が抽出された。

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 1件）

1. 著者名 Kobayashi Tatsuya, Ishikawa Hiroshi, Ishii Kumiko, Sato Asuka, Nakamura Natsuko, Saito Yoshiko, Hasegawa Hisataka, Fujita Maki, Mitsuhashi Akira, Shozu Makio	4. 巻 11
2. 論文標題 Time-lapse monitoring of fertilized human oocytes focused on the incidence of OPN embryos in conventional in vitro fertilization cycles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98312-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林 達也、碓井 宏和、田中 宏一、生水 真紀夫
2. 発表標題 プロラクチン受容体機能欠損症の遺伝子解析
3. 学会等名 日本生殖医学会
4. 発表年 2019年～2020年

〔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
---------	---------