

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21592117
研究課題名（和文）	顆粒膜細胞におけるミトコンドリアDNA欠損が卵発育障害をおこすメカニズムの検討
研究課題名（英文）	Analyzing how defects of Mitochondria DNA affect oocyte maturation.
研究代表者	
	山下 能毅 (Yamashita Yoshiki)
	大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：	50268207

研究成果の概要（和文）：

加齢による卵巣機能の低下は、ミトコンドリア DNA の欠損だけでなく AMH の SNP によって引き起こされる可能性がある。

AMHR (AMHR II-482A>G、ISV 5-6C>T、ISV10+77A>G) の SNP は不妊症の発生に関与している可能性が示唆された。特に AMHR II-482A>G の変異ホモでは受精率の低下が認められたことから、AMHR II-482A>G 変異ホモが卵巣機能低下に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）： SNP of AMH rather than mitochondria DNA defect might affect the infertility caused by the older age. The influence of AMH-SNP on infertility was not apparent, however, SNP of AMHR (AMHR II-482A>G、ISV 5-6C>T、ISV10+77A>G) might cause infertility due to ovarian failure involving lower number of retrieved oocyte and fertilization rate.

Epecially, -482A>G polymorphism is thought to be associated with diminished ovarian failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

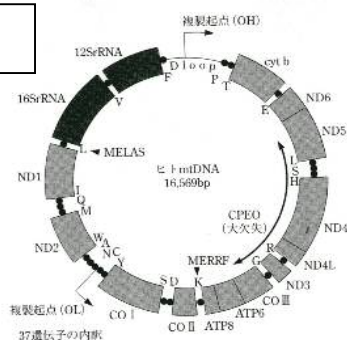
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学

1. 研究開始当初の背景

図 1



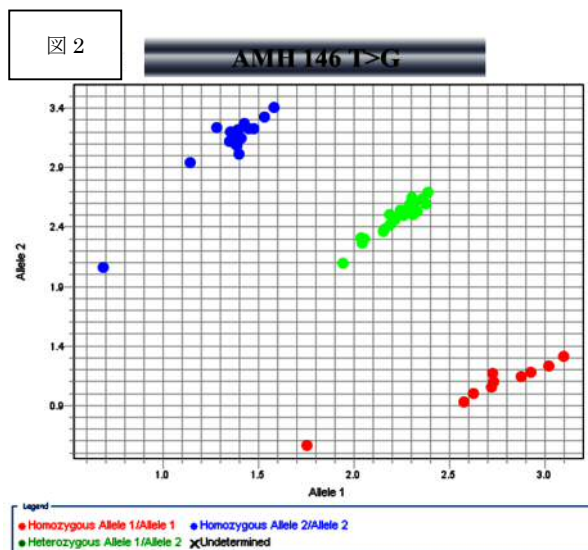
不妊症の原因となる卵胞発育異常、排卵障

害の発生機序の解明を行ってきたが、不明な点が多い。近年、生殖補助医療の発展と晩婚化により体外受精により年間約 1 万人の出生児が誕生しているが、胚移植の周期あたりの妊娠率は 30%弱にとどまっており、妊娠率向上のために更なる研究が必要とされている。35 歳以上の高齢不妊患者における顆粒膜細

胞の mtDNA の点変異や欠損が報告されており、ミトコンドリア異常と不妊症との関連性が注目されつつある。mtDNA は、1 細胞あたり、100~2000 個ぐらい存在し、固有の DNA、リボソーム、tRNA が存在し半独立の増殖系をなしている。16569 塩基対から成り約 1 kb の非翻訳領域を除くと、その大部分が 13 種類のタンパク質とその翻訳に必要な 2 種類のリボソーム RNA と 22 種類の転移 RNA の遺伝子をコードとする領域となっている (図 1)。また、生殖医療においては、補助技術として、Nuclear Transfer (NT) や Cytoplasmic Transfer (CT) があり、これらの技術により、外来性のミトコンドリアが移入され、外来性 mtDNA の問題も指摘されている。さらに、加齢によるミトコンドリア DNA の発現低下と機能低下と不妊との関連も注目されており、定量的 PCR 法を用いた解析が主流になっている。

抗ミュラー管ホルモン (AMH) は TGF-superfamily に属するホルモンで、雌性では顆粒膜細胞より分泌され、体外受精において、妊娠または 4 個以上の採卵を条件とした場合の特異度および感度は AMH が FSH に比較して高いことから、AMH は卵巣機能評価法として FSH 基礎値より優れていると報告されている。しかしながら、卵巣における AMH および AMH receptor (AMHR) の遺伝的発現や多型が卵成熟および胚発育にどのように関与するかはいまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的



顆粒膜細胞におけるミトコンドリア DNA の発現および欠損が、卵胞発育異常や、卵の受精能低下を引き起こすメカニズムの解明す

る。現在報告されている AMH の SNP は数種類あるが、今回報告されている 5 つの SNP AMH, AMHR II -482A>G, AMHR II IVS1+149 T>A, ISV 5-6C>T, ISV10+77A>G に関して不妊疾患別にその発現について検討する。

3. 研究の方法

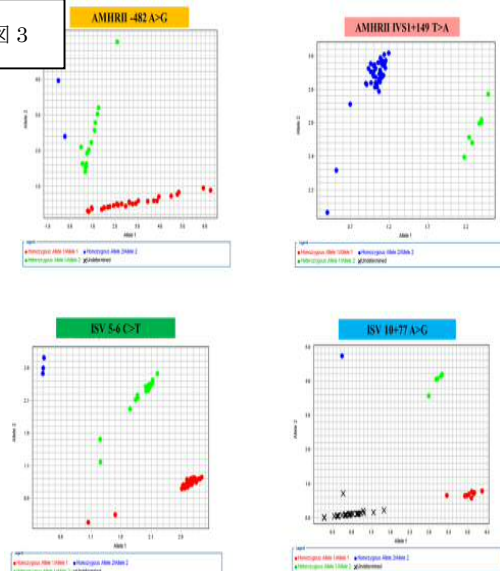
顆粒膜細胞における mtDNA の発現について、Real time PCR 法で定量し、mtDNA の発現が加齢により影響を受けるかまた、卵胞発育および胚発育にどのように関与するかを検討する。

AMH の SNP については TaqMan 法による SNP タイピングを行った。

4. 研究成果

mtDNA の発現と加齢および卵成熟の相関が明らかでなかった。しかし、hMG 投与群に

図 3



において recombinantFSH 投与群と比較し顆粒膜における mtDNA の発現が高かったことから、hMG 製剤の LH 含有が顆粒膜細胞における mtDNA の発現を促進する可能性が示唆された。AMH (図 2) および AMH レセプター (AMHR II -482A>G, AMHR II IVS1+149 T>A, ISV 5-6C>T) (図 3) の 4 つの SNP について、不妊症における各 SNP の発現率を各不妊原因疾患別について検討した。結果、変異ホモにおいて AMHR II の受精率は ISV5-6, ISV10+77 に比較し有意に低値であった。AMHR II -482A>G, ISV 5-6C>T の変異ホモはすべて子宮内膜症であった。AMHR II の SNP の 3 例中 2 例が DOR の症例であった。(結論)ミトコンドリアの発現が卵成熟および胚発育に及ぼす影響については不明であ

ったが、刺激法の違いでも発現に差があることから今後検討が必要である。

AMHR (AMHR II-482A>G、ISV 5-6C>T、ISV10+77A>G) の SNP は不妊症の発生に関与している可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 16 件)

1) Does advanced-stage endometriosis affect the gene expression of estrogen and progesterone receptors in granulosa cells? Karita M, Yamashita Y, Hayashi A, Yoshida Y, Hayashi M, Yamamoto H, Tanabe A, Terai Y and Ohmichi M. *Fertil Steril*. 2011; 95:889-894.

2) Impact of platinum-based chemotherapy on the progression of atherosclerosis. Sekijima T, Tanabe A, Maruoka R, Fujishiro N, Fujiwara S, Yuguchi Y, Yamashita Y, Terai Y and Ohmichi M. *Climacteric* 2011;14 :31-40.

3) Prognostic effect of epidermal growth factor receptor gene mutations and the aberrant phosphorylation of Akt and ERK in ovarian cancer. Yoshimichi Tanaka, Yoshito Terai, Akiko Tanabe, Hiroshi Sasaki, Tatsuharu Sekijima, Satoe Fujiwara, Yoshiki Yamashita, Masanori Kanemura, Masatsugu Ueda, Michio Sugita, Wilbur A. Franklin and Masahide Ohmichi. *Cancer Biol Ther* 2011;11:50-57

4) Requirement of evading apoptosis for HIF-1 α -induced malignant progression in mouse cells. Hayashi M, Yoo YY, Christensen J, Huang LE. *Cell Cycle*. 2011;10:2364-2372.

5) MTX could be First-Line Therapy Even in Cases where hCG Level is Greater than 5,000 IU/ml. Yoshiki Yamashita, Sousuke Katoh, Yoko Yoshida, Satoe Fujiwara, Sachiko Kawabe, Mika Hayashi, Atsushi Hayashi, Yoshito Terai and Masahide Ohmichi. *Ectopic Pregnancy -Modern Diagnosis and Management*. 2011.

6) Remarkable Lethal G-to-A Mutations in vif-Proficient HIV-1 Provirus by Individual APOBEC3 Proteins in Humanized Mice. Kei Sato, Taisuke Izumi, Naoko Misawa, Tomoko Kobayashi, Yoshiki Yamashita, Masahide Ohmichi, Mamoru Ito, Akifumi Takaori-Kondo, and Yshio Koyanagi *J Virol* 2010;4:9546-9556.

7) Topotecan as a molecular targeting agent which blocks the Akt and VEGF cascade in platinum-resistant ovarian cancers. Tsunetoh S, Terai Y, Sasaki H, Tanabe A, Tanaka Y, Sekijima T, Fujioka S, Kawaguchi H, Kanemura

M, Yamashita Y, Ohmichi M. *Cancer Biol Ther* 2010;10:1137-114.

8) A Case of Concomitant Pregnancy Following Supplement of Mestranol and Norethisterone to Control the Menstrual Cycle. Tomohito Tanaka, Yoshiki Yamashita, Sousuke Kato, Takashi Kato, Yoshito Terai and Masahide Ohmichi *Bull OMC* 2010;56:91-94.

9) Mature cystic teratoma of the fallopian tube. Satoe Fujiwara, Yoshiki Yamashita, Yoko Yoshida, Yoshito Terai, Kiyoji Okuda, Masahide Ohmichi. *Fertil Steril* 2010;92:2708-2709.

10) Vascular endothelial growth factor is a promising therapeutic target for the treatment of clear cell carcinoma of the ovary. Mabuchi S, Kawase C, Altomare DA, Morishige K, Hayashi M, Sawada K, Ito K, Terai Y, Nishio Y, Klein-Szanto AJ, Burger RA, Ohmichi M, Testa JR, Kimura T. *Mol Cancer Ther*. 2010;9:2411-2422.

11) Effectiveness of laparoscopic surgery against antibiotics-resistant pelvic inflammatory disease. Yamashita Y, Okuda K., Hayashi A, Terai Y, Ohmichi M. *Bull of OMC* 2009;15:1-7.

12) A case of an MTX-resistant ectopic pregnancy where Dactinomycin was effective as a second-line chemotherapy. Fujioka S., Yamashita Y, Asano M., Hayashi A, Ohmichi M. *Fertil Steril*. 2009;91:929 e13-15

13) Long-term follow-up of neoadjuvant intraarterial chemotherapy using an original four-lumen double-balloon (4L-DB) catheter for locally advanced uterine cervical cancer. Terai Y, Kanemura M, Sasaki H, Tsunetoh S, Tanaka Y, Yamashita Y, Yamamoto K, Sasaki H, Yamashita Y, Kanemura, Ohmichi M. *Int J Clin Oncol*. 2009;14: 56-62.

14) Successful pregnancy after conservative surgery for stage IA endometrial cancer in a young woman. Yasuda M, Terai Y, Sekijima T, Sasaki H, Yamashita Y, Kanemura M, Ohmichi M *Fertil Steril*. 2009;91: 936 e13-15.

15) A case of a methotrexate-resistant ectopic pregnancy in which dactinomycin was effective as a second-line chemotherapy. Fujioka S, Yamashita Y, Kawabe S, Kamegai H, Terai Y, Ohmichi M. *Fertil Steril*. 2009;91: 929 e13-15.

16) mTOR is a promising therapeutic target both

in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant clear cell carcinoma of the ovary. Mabuchi S, Kawase C, Altomare DA, Morishige K, Sawada K, Hayashi M, Tsujimoto M, Yamoto M, Klein-Szanto AJ, Schilder RJ, Ohmichi M, Testa J R, Kimura T. Clin Cancer Res 2009; 15: 5404-5413.

〔学会発表〕（計3件）

1) 子宮内膜症合併不妊症の黄体化顆粒膜細胞における AMH および AMHR mRNA 発現への影響

2) 体外受精治療下黄体化顆粒膜細胞における BMP15, GDF9 mRNA の発現の臨床的検討
以上 2012 年 4 月 日本産婦人科学会 神戸

3) 子宮内膜症症例の顆粒膜細胞におけるアンドロゲンレセプター (AR) の発現とメチル化の有無の検討

以上 2011 年 12 月 生殖医学学会 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 能毅 (Yamashita Yoshiki)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：50268207

(2) 研究分担者

大道 正英 (Ohmichi Masahide)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：10283764

寺井 義人 (Terai Yoshito)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：90278531

田辺 晃子 (Tanabe Akiko)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：70454543

林 篤史 (Hayashi Atushi)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：80411338