

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462581

研究課題名(和文)抗ミュラー管ホルモン遺伝子多型とプロモーター領域のメチル化の卵巣予備能への関与

研究課題名(英文) Analyzing the possible involvement of anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone receptor II single nucleotide polymorphism in infertility

研究代表者

山下 能毅 (Yamashita, Yoshiki)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50268207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：AMHR -482A>Gの変異Homoの卵獲得率は28.5%で、Wildに比較し有意に低く、AMHR ISV1+149T>A、AMHR ISV5-6C>T、AMHR ISV10+77A>Gの変異Homoと比較しても有意に低かった。AMHR -482A>Gの変異Homo 3例はAMHR ISV5-6C>Tも変異Homoであり 2例は難治性排卵障害であった。自然妊娠におけるAMHR -482A>G変異Homoは3例認められ、3例ともAMHR ISV5-6C>Tの変異Homoを伴っていた。以上より、AMHR -482A>Gの変異Homoは、卵巣機能低下による不妊症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, -482 A>G homozygote mutation was associated with ISV5-6 C>T homozygote mutation, and the oocyte retrieval rate of -482 A>G homozygote mutation was statistically lower than in the control group and in other SNPs, despite the result that total dose of hMG/FSH for oocyte retrieval in -482A>G homozygote mutation cases showed no statistical difference compared with the wild type. These results suggest that -482 A>G homozygote mutation could cause poor follicular development. In the normal pregnancy group, all cases of -482 A>G homozygote mutation were associated with ISV5-6 and showed poor obstetric outcome. In conclusion, additional replication and functional studies are necessary to secure definite conclusions as to the effect of AMHR II -482 A>G polymorphism on infertility and obstetric outcome. However, this study revealed the possible involvement of AMHR II -482 A>G polymorphism on the malfunction of follicular development in Japanese women.

研究分野：生殖医学

キーワード：AMH AMH: 146 T&gt;G -482 A&gt;G IVS1+149 T&gt;A IVS5-6 C&gt;T AMHR

## 1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療(ART)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%弱にとどまっている。これは ART を受ける患者の高齢化や、子宮内膜症などの合併による採卵数や受精率の低下が低い妊娠率の要因と考えられている。抗ミュラー管ホルモン(AMH)は TGF-super family に属する蛋白ホルモンで、原始卵胞の発育開始を抑制し、発育卵胞への FSH の作用を抑制する作用を有しており、血中 AMH 値が卵巣予備能の指標として期待されている。AMH は前胞状卵胞内の顆粒膜細胞で作られ、血清 AMH が胞状卵胞数に強く相関し排卵前期卵母細胞を予測する因子として有用であると考えられており、近年、血中 AMH の測定が卵巣予備能の予測する指標の一つとなりつつある。卵胞発育においては、前胞状卵胞から成熟卵胞になるまで FSH に依存し、FSH の分泌が亢進し LH surge により排卵が起こる。体外受精において、4 個以上の採卵を条件とした場合、血清 AMH の特異度および感度は 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。近年、AMH および AMH receptor (AMHR)の一塩基多型(SNP)として、AMH の 1 種類の SNP (AMH: 146 T>G)と AMHR の 4 種類の SNP (AMHR: -482 A>G, IVS1+149 T>A, IVS5-6 C>T, IVS10+77 A>G) が報告されているが、卵成熟および胚発育への関与はいまだ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

今回、SNP 解析を大量のサンプルで行うために、TaqMan 法でタイピング(変異型ホモ、ヘテロ、野生型ホモ)し、自然妊娠の妊婦 DNA をコントロールとして、不妊患者の SNP 解析を行い、AMH および AMHR の SNP の両群における発現率を比較し、SNP が卵胞発育不全

や受精率低下などの不妊原因となり得るかについて検討した。

A, ISV 5-6C>T, ISV10+77A>G

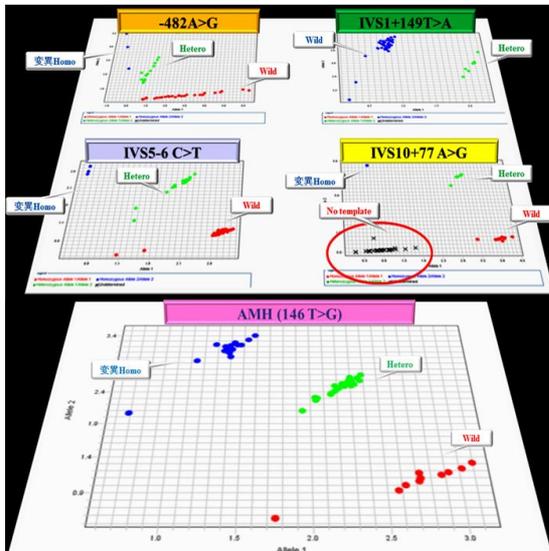
に関して不妊疾患別にその発現について検討する。

## 3. 研究の方法

2010 年 3 月から 2013 年 3 月までに大阪医科大学産婦人科でインフォームドコンセントを取得後に、体外受精治療を受けた不妊患者 80 例(不妊群: 高齢不妊症 51 例、子宮内膜症 18 例、男性不妊症 69 例)を対象とした。採血した検体から Genomic DNA を High Pure PCR Template Preparation Kit<sup>R</sup> (Poche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany)を用いて末梢血より抽出し、Taqman 法により SNP タイピングを行い、AMH (AMH146T>G) および AMH receptor (AMHR -482A>G、AMHR ISV1+149T>A、AMHR ISV5-6C>T、AMHR ISV10+77A>G) の各 SNP の Homo、Hetero および Wild の発現頻度と、それらの体外受精治療の臨床経過(卵獲得率、受精率、妊娠率)に及ぼす影響について、自然妊娠後に分娩に至った 28 名をコントロールとして比較検討した。

## 4. 研究成果

不妊症群において、変異 Homo は、AMHR -482A>G が 3 例、AMHR ISV5-6C>T が 5 例、AMHR ISV10+77A>G が 2 例認められた。コントロール群では AMH で 1 例、AMHR ISV5-6C>T で 1 例に変異 Homo が認められたが、AMHR -482A>G、AMHR ISV1+149、AMHR ISV10+77 では認めなかった(図)。AMH の変異 Homo の卵獲得率、受精率、妊娠率は Wild と有意差はなく、AMHR の変異 Homo と Wild の間にも受精率、妊娠率に有意



差を認めなかった。しかし、AMHR -482A>G の変異 Homo の卵獲得率は 28.5% で、Wild に比較し有意に低く、AMHR ISV1+149T>A、AMHR ISV5-6C>T、AMHR ISV10+77A>G の変異 Homo と比較しても有意に低かった(表)。

Polymorphism (N=80)	変異	穿刺卵胞数	採卵数	卵獲得率(%)	受精率(%)	妊娠率(%)
-482A>G	Homo (n=3)	21	6	28.5 <sup>a, b</sup>	64.9	0
	Wild (n=45)	503	276	54.8 <sup>a</sup>	54.0	28.1
IVS5-6 C>T	Homo (n=5)	49	22	44.8 <sup>b</sup>	64.9	0
	Wild (n=36)	436	245	56.8	54.0	19.4
IVS10+77 A>G	Homo (n=3)	17	7	41.1 <sup>b</sup>	64.9	33.3
	Wild (n=21)	249	126	50.6	54.0	14.2

Chi-square test a, b, p<0.05

AMHR -482A>G の変異 Homo 3 例は AMHR ISV5-6C>T も変異 Homo であり、全例が子宮内膜症合併で、そのうち 2 例は難治性排卵障害であった。不妊群と自然妊娠群のアレル頻度の比較についての検討では、有意差を認めなかった。自然妊娠における AMHR -482A>G 変異 Homo は 3 例認められ、3 例とも AMHR ISV5-6C>T の変異 Homo であった。内訳は、2 例が反復流産、1 例が胎児発育不全であった。

(結論) AMHR -482A>G の変異 Homo は、卵巣機能低下による不妊症に関与している可

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4件)

- Analyzing the possible involvement of anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone receptor II single nucleotide polymorphism in infertility. Yoshida Y, Yamashita Y, Saito N, Ono Y, Yamamoto H, Nakamura Y, Hayashi A, Terai Y, Ohmichi M. J Assist Reprod Genet. 2014 ;31:163-8.(査読あり)
- Decorin induced by progesterone plays a crucial role in suppressing endometriosis. Ono YJ, Terai Y, Tanabe A, Hayashi A, Hayashi M, Yamashita Y, Kyo S, Ohmichi M. J Endocrinol. 2014;223:203-16. (査読あり)
- Associations between the pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain with pregnancy outcomes in Japanese women. Tanaka T, Ashihara K, Nakamura M, Kanda T, Fujita D, Yamashita Y, Terai Y, Kamegai H, Ohmichi M. J Obstet Gynaecol Res. 2014;40:1296-303. (査読あり)
- Compared with cystectomy, is ovarian vaporization of endometriotic cysts truly more effective in maintaining ovarian reserve? Saito N, Okuda K, Yuguchi H, Yamashita Y, Terai Y, Ohmichi M. J Minim Invasive Gynecol. 2014;21:804-10. (査読あり)

## 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

林 昌美 (Hayashi Masami)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 00551748

