

令和元年6月20日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08603

研究課題名(和文) 雌性生殖機能を調節する新規分子機構の解明

研究課題名(英文) Uncovering the missing link in molecular mechanisms regulating female reproductive function

研究代表者

宮戸 真美 (Miyado, Mami)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・上級研究員

研究者番号：00386252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：モデル動物とヒト疾患患者の解析を通して、雌性生殖機能を調節する新たな分子機構を明らかにすることを目的として本研究を行った。下記の成果が得られた。下垂体ホルモンがマウス卵巣においてMam1d1遺伝子の発現を制御すること、NR5A1変異による精巣形成がヒト特異的な現象であることを見出した。さらに、多嚢胞性卵巣症候群患者における男性化の一因と不妊症患者において加齢による卵の質の低下に關する因子を同定し、子宮内膜上皮細胞におけるCD9の機能を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、遺伝子機能の変化やホルモンバランスの変化が雌性生殖機能に与える影響を明らかにした。さらに、モデル動物と疾患患者の解析を行うことで、生物種間における雌性生殖機能に与える影響の共通性と多様性を見出した。本研究の意義として、単一遺伝子の機能低下により引き起こされる疾患発症機序の解明が挙げられる。本研究の成果は、性分化疾患や不妊症などの内分泌関連疾患の発症機序の解明に結び付くことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to identify missing pieces hidden in already known mechanisms of female reproductive function, we performed this study using a set of disease model animals and samples obtained from patients. Subsequently, we obtained remarkable results as follows: (1) Pituitary hormone regulates the Mam1d1 expression in the mouse ovary; (2) The p.R92W variant of NR5A1/Nr5a1 induces testis formation specifically in women; (3) 11-oxygenated C19 steroids are clinically important as circulating androgens in patients with polycystic ovarian syndrome; (4) Autophagy-disrupted LC3 abundance worsens the oocyte quality with age; and (5) CD9 functions in regenerating the uterine epithelium.

研究分野：分子生物学

キーワード：生殖機能 卵巣ステロイド MAMLD1 NR5A1 非古典的男性ホルモン CD9

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生殖機能には、複数の遺伝子と内分泌環境が深くかかわることが知られている。したがって、遺伝子機能の変化やホルモンバランスの変化は生殖機能に影響を及ぼすと推測される。不妊症患者において血中の性ホルモン濃度は、生体内の状態を把握するマーカーとして一般検査に取り入れられている。しかし、単一遺伝子の機能低下に起因する性ホルモンの産生・代謝の異常については不明な点が多い。

われわれは、これまでの解析から、野生型マウスと比べて、*Maml1* 遺伝子欠損妊娠マウスの血中女性ホルモン(プロゲステロン)濃度は持続高値を示し、その結果として分娩遅延率が増加することを見出した。このことは、単一遺伝子の機能低下が卵巣ステロイドの産生・代謝の異常を介して雌性生殖機能を調節することを示唆する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、モデル動物とヒト疾患患者の解析を通して、雌性生殖機能を調節する新たな分子機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) マウスを用いた解析

過排卵処理によって性周期をそろえた非妊娠野生型マウスの卵巣を用いて、*Maml1* 遺伝子の発現解析を行った。

解剖学的および組織学的な解析を行い、NR5A1 p.R92W 導入マウスの性腺の分化状態を調べた。NR5A1 p.R92W ヘテロ導入 XX マウスの卵巣重量および産仔数を測定した。

マウス子宮内膜上皮細胞と子宮内腔液中における CD9 の動態を解析した。

(2) ヒト検体を用いた解析

液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法にて、多嚢胞性卵巣症候群患者と正常月経女性の血中における男性ホルモン濃度を測定した。

不妊症患者から回収された顆粒膜細胞を用いて、オートファジー機構に関わるタンパク質の発現量と局在を解析した。

黄体中期(着床の最適時期)不妊症患者の子宮内腔液中における CD9 の有無を調べた。

(3) 倫理面への配慮

本研究は、ヒト遺伝子解析研究、遺伝子組換え DNA 実験、動物実験が含まれる。本研究は、必要な倫理委員会における承認を得て、倫理指針を遵守して実施した。資料の管理は倫理指針および倫理委員会の指示に従って適切に行った。

4. 研究成果

(1) 非妊娠野生型マウス卵巣のステロイド産生・代謝に関与する因子の同定

過排卵処理によって性周期をそろえた非妊娠野生型マウスでは、排卵後(排卵当日)の卵巣に比べて、排卵前日の卵巣における *Maml1* 遺伝子の発現量が有意に高値であることを見出した。このことから、非妊娠時マウス卵巣の MAMLD1 は、下垂体ホルモンによって制御されており、機能していると推測される。

(2) ヒト 46,XX 精巣性分化疾患の原因となる新たな遺伝子変異(NR5A1 p.R92W)の同定

46,XX 精巣性分化疾患で見られた症状(遺伝的女性が精巣を持つ)がマウスで観察されるか否かを調べるため、患者で同定された NR5A1 p.R92W 変異を導入したマウスを作製し、その性腺について形態学的な解析を行った。p.R92W ホモ導入およびヘテロ導入の XX マウスでは、卵巣から精巣への変化は認められなかった。このことから、NR5A1 変異による精巣形成はヒト特異的な現象であることが明らかになった。また、同変異ヘテロ導入 XX マウスの卵巣重量および産仔数は野生型と同等であった。半年を過ぎても、ヘテロ導入 XX マウスの妊孕性低下は認められなかった。このことから、同変異はマウスの妊孕性に影響を与えないことが明らかになった。

(3) 女性における非古典的男性ホルモン(11-oxygenated C19 steroid)の役割の解明

11-oxygenated C19 steroid は、ヒトに存在することが近年同定された非古典的男性ホルモンである。多嚢胞性卵巣症候群は生殖年齢女性の 10% 程度に認められる疾患である。本症患者群と正常月経女性群の血中男性ホルモン濃度を測定し、患者の男性化症状には古典的男性ホルモンのみならず非古典的男性ホルモンが関与することを見出した。本症患者における非古典的男性ホルモンの蓄積が男性化の一因であることを明らかにした。

(4) ヒト顆粒膜細胞におけるオートファジー機能不全を招く機構の解明

オートファジーは、ジャンク・タンパク質や機能異常を起こした細胞内小器官をリサイクルする機構として知られる。不妊症患者から回収された顆粒膜細胞を用いて、微小管結合タンパク質であり、オートファゴソームの形成初期に働く LC3 とその前段階に関わる ATG7 の発現量および細胞内局在を調べ、それらが顆粒膜細胞が細胞死に至ることを予測するための

バイオマーカーになり得ることを見出した。顆粒膜細胞におけるオートファジー機構の破綻は、加齢による卵の質の低下の一因になることが明らかになった。

(5) ヒトおよびマウスの子宮内膜再生における CD9 の機能解明

膜貫通型タンパク質 CD9 は、エクソソームよりさらに微細な細胞外微粒子(マイクロエクソソーム)の構成因子として働く。マウス子宮内膜上皮細胞と子宮内腔液中の CD9 の動態を調べ、性周期に応じた CD9 の再配置が起こることを見出した。さらに、野生型と比較して *Cd9* 遺伝子欠損マウスの子宮内膜上皮細胞では、微絨毛が粗かつ短小化しており、子宮内膜上皮細胞内のミトコンドリア数が優位に減少していた。子宮内膜上皮細胞の CD9 の再配置と細胞外分泌が、子宮内膜上皮細胞の膜構造とミトコンドリア数に影響を及ぼし、さらに子宮内膜の再生により内膜機能を制御することを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 27 件)

- (1) Ogushi K, Hattori A, Suzuki E, Shima H, Izawa M, Yagasaki H, Horikawa R, Uetake K, Umezawa A, Ishii T, Muroya K, Namba N, Tanaka T, Hirano Y, Yamamoto H, Soneda S, Matsubara K, Kagami M, Miyado M and Fukami M. DNA methylation status of *SHOX*-flanking CpG islands in healthy individuals and short stature patients with pseudoautosomal copy-number variations. *Cytogenet Genome Res.* in press. DOI: 10.1159/000500468. 査読有.
- (2) Miyado M and Fukami M. Losing maleness: Somatic Y chromosome loss at every stage of a man's life. *FASEB BioAdv.* 1 (6): 350–352, 2019. <https://doi.org/10.1096/fba.2019-00006>. 査読有.
- (3) Miyado M, Fukami M, Takada S, Terao M, Nakabayashi K, Hata K, Matsubara Y, Tanaka Y, Sasaki G, Nagasaki K, Shiina M, Ogata K, Masunaga Y, Saito H and Ogata T. Germline-derived gain-of-function variants of *Gsα*-coding *GNAS* gene identified in nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. *J Am Soc Nephrol.* 30 (5): 877–889, 2019. DOI: 10.1681/ASN.2018121268. 査読有.
- (4) Tanase-Nakao K, Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Hara M, Matsumoto K, Matsubara Y, Igarashi M, Miyado M and Fukami M. Dihydrotestosterone induces minor transcriptional alterations in genital skin fibroblasts of children with and without androgen insensitivity. *Endocr J.* 66 (4): 377–383, 2019. DOI: 10.1507/endocrj.EJ18-0494. 査読有.
- (5) Iwai M, Hamatani T, Nakamura A, Kawano N, Kanai S, Kang W, Yoshii N, Odawara Y, Yamada M, Miyamoto Y, Saito T, Saito H, Miyado M, Umezawa A, Miyado K and Tanaka M. Membrane protein CD9 is repositioned and released to enhance uterine function. *Lab Invest.* 99 (2): 200–209, 2019. DOI: 10.1038/s41374-018-0145-1. 査読有.
- (6) Iwai M, Harada Y, Miyabayashi R, Kang W, Nakamura A, Kawano N, Miyamoto Y, Yamada M, Hamatani T, Miyado M, Yoshida K, Saito H, Tanaka M, Umezawa A and Miyado K. Chemotactic behavior of egg mitochondria in response to sperm fusion in mice. *Heliyon.* 4 (11): e00944, 2018. DOI: 10.1016/j.heliyon.2018.e00944. 査読有.
- (7) Nakamura A, Kawano N, Motomura K, Kuroda A, Sekiguchi K, Miyado M, Kang W, Miyamoto Y, Hanai M, Iwai M, Yamada M, Hamatani T, Saito T, Saito H, Tanaka M, Umezawa A and Miyado K. Degradation of phosphate polymer polyP enhances lactic fermentation in mice. *Genes Cells.* 23 (10): 904–914, 2018. DOI: 10.1111/gtc.12639. 査読有.
- (8) Kang W, Ishida E, Yamatoya K, Nakamura A, Miyado M, Miyamoto Y, Iwai M, Tatsumi K, Saito T, Saito K, Kawano N, Hamatani T, Umezawa A, Miyado K and Saito H. Autophagy-disrupted LC3 abundance leads to death of supporting cells of human oocytes. *Biochem Biophys Res.* 15: 107–114, 2018. DOI: 10.1016/j.bbrep.2018.08.002. 査読有.
- (9) Yoshida T, Matsuzaki T, Miyado M (共同第一著者), Saito K, Iwasa T, Matsubara Y, Ogata T, Irahara M and Fukami M. 11-oxygenated C19 steroids as circulating androgens in women with polycystic ovary syndrome. *Endocr J.* 65 (10): 979–990, 2018. DOI: 10.1507/endocrj.EJ18-0212. 査読有.
- (10) 宮戸真美, 深見真紀. 停留精巣の原因遺伝子と環境因子—ゲノム解析の現況と未来. *臨床泌尿器科 (医学書院)* 72 (10): 836–839, 2018. <https://webview.isho.jp/journal/detail/abs/10.11477/mf.1413206389>. 査読無.
- (11) Miyado M, Muroya K, Katsumi M, Saito K, Kon M and Fukami M. Somatic acquired isodicentric Y and mosaic loss of chromosome Y in a boy with hypospadias. *Cytogenet Genome Res.* 154 (3): 122–125, 2018. DOI: 10.1159/000488162. 査読有.
- (12) Nakamura S, Kobori Y, Ueda Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, Katsumi M, Saito K, Nakamura A, Ogata T, Okada H, Nakai H, Miyado M (共同責任著者) and Fukami M. *STX2* is a causative gene for nonobstructive azoospermia. *Hum Mutat.* 39 (6): 830–833, 2018. DOI: 10.1002/humu.23423. 査読有.
- (13) Yoshida K, Kang W, Nakamura A, Kawano N, Hanai M, Miyado M, Miyamoto Y, Iwai M, Hamatani T, Saito H, Miyado K and Umezawa A. Ubiquitin-activating enzyme E1 inhibitor PYR-41 retards sperm enlargement after fusion to the egg. *Reprod Toxicol.* 76: 71–77, 2018. DOI:

- 10.1016/j.reprotox.2018.01.001. 査読有.
- (14) Ohsako S, Aiba T, Miyado M, Fukami M, Ogata T, Hayashi Y, Mizuno K and Kojima Y. Expression of xenobiotic biomarkers CYP1 family in preputial tissue of patients with hypospadias and phimosis and its association with DNA methylation level of SRD5A2 minimal promoter. Arch Environ Contam Toxicol. 74 (2): 240–247, 2018. DOI: 10.1007/s00244-017-0466-x. 査読有.
 - (15) Fukami M, Suzuki E, Igarashi M, Miyado M and Ogata T. Gain-of-function mutations in G-protein coupled receptor genes associated with human endocrine disorders. Clin Endocrinol (Oxf). 88 (3): 351–359, 2018 (Review). DOI: 10.1111/cen.13496. 査読有.
 - (16) Saito K, Fukami M, Miyado M, Ono I and Sumori K. Case of heterotopic cervical pregnancy and total placenta accreta after artificial cycle frozen-thawed embryo transfer. Reprod Med Biol. 17 (1): 89–92, 2018. DOI: 10.1002/rmb2. 査読有.
 - (17) Nakamura S, Miyado M (共同第一著者), Saito M, Katsumi M, Nakamura A, Kobori Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, Okada H, Hata K, Nakabayashi K, Okamura K, Ogata H, Matsubara Y, Ogata T, Nakai H and Fukami M. Next-generation sequencing for patients with non-obstructive azoospermia: implications for significant roles of monogenic/oligogenic mutations. Andrology. 5 (4): 824–831, 2017. DOI: 10.1111/andr.12378. 査読有.
 - (18) Fukami M and Miyado M. Next generation sequencing and array-based comparative genomic hybridization for molecular diagnosis of pediatric endocrine disorders. Ann Pediatr Endocrinol Metab. 22 (2): 15–19, 2017 (Review). DOI: 10.6065/apem.2017.22.2.90. 査読無.
 - (19) Miyado M, Yoshida K, Miyado K, Katsumi M, Saito K, Nakamura S, Ogata T and Fukami M. Knockout of murine *Mamld1* impairs testicular growth and daily sperm production but permits normal postnatal androgen production and fertility. Int J Mol Sci. 18 (6): pii: E1300, 2017. DOI: 10.3390/ijms18061300. 査読有.
 - (20) Fukami M, Suzuki E, Izumi Y, Torii T, Narumi S, Igarashi M, Miyado M, Katsumi M, Fujisawa Y, Nakabayashi K, Hata K, Umezawa A, Matsubara Y, Yamauchi J and Ogata T. Paradoxical gain-of-function mutant of the G-protein coupled receptor PROKR2 promotes early puberty. J Cell Mol Med. 21 (10): 2623–2626, 2017. DOI: 10.1111/jcmm.13146. 査読有.
 - (21) Miyado K, Kang W, Yamatoya K, Hanai M, Nakamura A, Mori T, Miyado M and Kawano N. Exosomes versus microexosomes: Shared components but distinct functions. J Plant Res. 130 (3): 479–483, 2017. DOI: 10.1007/s10265-017-0907-7. 査読有.
 - (22) Yamatoya K, Saito K, Saito T, Kang W, Nakamura A, Miyado M, Kawano N, Miyamoto Y, Umezawa A, Miyado K and Saito H. Birth weights and Down syndrome in neonates delivered after frozenthawed embryo transfer: The 2007-2012 national registry data in Japan. Reprod Med Biol. 16 (2): 228–234, 2017. DOI: 10.1002/rmb2.12033. 査読有.
 - (23) Saito K, Miyado K, Yamatoya K, Kuwahara A, Inoue E, Miyado M, Fukami M, Ishikawa T, Saito T, Kubota T and Saito H. Increased incidence of post-term delivery and Cesarean section after frozen-thawed embryo transfer during a hormone replacement cycle. J Assist Reprod Genet. 34 (4): 465–470, 2017. DOI: 10.1007/s10815-017-0869-7. 査読有.
 - (24) Miyado M, Miyado K, Nakamura A, Fukami M, Yamada G and Oda SI. Expression patterns of *Fgf8* and *Shh* in the developing external genitalia of *Suncus murinus*. Reproduction. 153 (2): 187–195, 2017. DOI: 10.1530/REP-16-0231. 査読有.
 - (25) Igarashi M, Takasawa K, Hakoda A, Kanno J, Takada S, Miyado M, Baba T, Morohashi KI, Tajima T, Hata K, Nakabayashi K, Matsubara Y, Sekido R, Ogata T, Kashimada K and Fukami M. Identical *NR5A1* missense mutations in two unrelated 46,XX individuals with testicular tissues. Hum Mutat. 38 (1): 39–42, 2017. DOI: 10.1002/humu.23116. 査読有.
 - (26) Miyado M, Inui M, Igarashi M, Katoh-Fukui Y, Takasawa K, Hakoda A, Kanno J, Kashimada K, Miyado K, Tamano M, Ogata T, Takada S and Fukami M. The p.R92W variant of *NR5A1/Nr5a1* induces testicular development of 46,XX gonads in humans, but not in mice: phenotypic comparison of human patients and mutation-induced mice. Biol Sex Differ. 7: 56, 2016. DOI: 10.1186/s13293-016-0114-6. 査読有.
 - (27) Naiki Y, Miyado M, Horikawa R, Katsumata N, Onodera M, Pang S, Ogata T and Fukami M. Extra-adrenal induction of *Cyp21a1* ameliorates systemic steroid metabolism in a mouse model of congenital adrenal hyperplasia. Endocr J. 63 (10): 897–904, 2016. DOI: 10.1507/endocrj.EJ16-0112. 査読有.

〔学会発表〕(計6件)

- (1) 吉田朋子, 松崎利也, 宮戸真美 (代理発表), 齊藤和毅, 岩佐 武, 松原洋一, 緒方 勤, 苛原 稔, 深見真紀. 多嚢胞性卵巣症候群における非古典的アンドロゲンの意義. 第52回日本小児内分泌学会学術集会, 2018年10月5日, ホテルイースト21東京(東京・江東区).
- (2) 宮戸真美. スンクスの外性器形成過程について. 第12回スンクス研究会, 2018年3月27日, 日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学第一校舎(東京・武蔵野市). 招待講演.

- (3) 宮戸真美, 吉田 薫, 宮戸健二, 勝見桃理, 齊藤和毅, 中村 繁, 緒方 勤, 深見真紀. *Maml1* 遺伝子欠損は精巣サイズ減少と一日精子産生数減少を招く. 第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会 合同大会, 2017 年 12 月 8 日, 神戸ポートアイランド (兵庫・神戸).
- (4) 宮戸真美, 乾 雅史, 五十嵐麻希, 福井由宇子, 玉野萌恵, 宮戸健二, 緒方 勤, 高田修治, 深見真紀. NR5A1 ミスセンス変異 p.R92W は, ヒトとマウスに共通する 46,XY 精巣形成不全とヒト特異的 46,XX 精巣形成を招く. 第 21 回日本生殖内分泌学会学術集会, 2017 年 1 月 14 日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪・大阪).
- (5) 宮戸真美. MAMLD1: マウスの分娩開始時期を支配する新たな因子. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日, パシフィコ横浜 (神奈川・横浜). シンポジウム招待講演.
- (6) Miyado M, Yoshida K, Miyado K, Katsumi M, Saito K, Nakamura S, Ogata T and Fukami M. Genetic knockout of *Maml1* reduces testicular size but permits normal fertility in adult male mice. The 9th Biannual Meeting of Asia Pacific Pediatric Endocrine Society (APPES) jointly held with the 50th Scientific Meeting of Japanese Society for Pediatric Endocrinology (JSPE), November 18, 2016, 東京国際フォーラム (東京・千代田区). 国際学会.

6. 研究組織
該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。