

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09620

研究課題名(和文) 減数分裂の異常に起因することが推測される女性不妊患者の遺伝的要因の解明

研究課題名(英文) An elucidation of the genetic factors among infertile women who may exhibit abnormalities during meiosis

研究代表者

大月 純子(Otsuki, Junko)

岡山大学・生殖補助医療技術教育研究センター・准教授

研究者番号：00573031

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)：不妊患者の約20%は原因不明不妊であり、原因解明が求められている。本研究では体外受精反復不成功患者を対象に、遺伝子変異による不妊の存在を明らかにすることを目的とした。患者群と8.3KJPNデータベースの対照群間のアレル頻度において、ADAM33、CEP89、CRIPAK、LGALS9B、PDZRN3、RAET1E、およびSPATA31A3に有意差が検出された。また、完全不妊が存在しない状態でハーディワインベルグ平衡が成立すると仮定した場合、ADAM33、CEP89、OR2T29、OR52J3、RABL2A、RNF17、SPATA31C1、およびWWTR1遺伝子の変異が不妊原因の候補となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵成熟機構には未解明の部分が存在し、不妊原因が卵の異常に起因する場合には現在の医療では治療できないことが多い。卵成熟過程にはさまざまな遺伝子や分子が関与しており、これらの関連する遺伝子の異常が雌性不妊を惹起することが近年の研究により明らかになってきている。遺伝子変異が原因の場合、体外受精を行っても妊娠に至ることはほぼ不可能であり、実際、10回を超える体外受精を繰り返し行うも妊娠できない患者は少なく、金銭面のみならず精神面の負担も非常に大きい。本研究結果は原因不明不妊原因の一部が明らかとなり、その学術的意義は大きいだけでなく、将来的な不妊症の治療法開発にも貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Approximately 20% of infertility is idiopathic, and many patients remain infertile, experiencing recurrent failures in assisted reproductive technology (ART). This study aimed to explore genetic mutations that may be associated with repeated ART failures in women. The study found that the allele frequencies of ADAM33, CEP89, CRIPAK, PDZRN3, RAET1E, and SPATA31A3 in the patients were significantly lower than those in 8.3KJPN. Additionally, the calculated Hardy-Weinberg equilibrium of ADAM33, CEP89, OR2T29, OR52J3, RABL2A, RNF17, SPATA31C1, and WWTR1 in these patients were significantly lower than those in the Human Genetic Variation Database. These findings may provide potential diagnostic markers for patients with recurrent ART failures and help us understand the genetic basis of female infertility.

研究分野：生殖医学、遺伝学

キーワード：体外受精 減数分裂 遺伝子変異 不妊 生殖医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵成熟機構には未解明の部分が存在し、不妊原因が卵の異常に起因する場合は現在の医療では治療できないことが多い。卵成熟過程にはさまざまな遺伝子や分子が関与しており、これらの関連する遺伝子の異常が雌性不妊を惹起することが近年の研究により明らかになってきている。変異原性薬剤であるENU(N-ethyl N-nitrosourea)を用いて遺伝子変異を起こしたマウスのうち、repro57 マウスは減数分裂中の交叉異常のために不妊を呈し、RNF212 が原因遺伝子であることが判明している。repro57 雄マウスでは、精子形成が起こらず不妊となることが判明しており、RNF212 遺伝子変異をもつ男性不妊患者の存在が泌尿器科医のチームより報告された。男性不妊の場合、無精子症という単純な表現型であるため対象患者の選出が容易であるが、女性不妊患者においては表現型の報告がなく、RNF212 遺伝子変異の存在は不明である。私たちはこれまでに repro57 マウスにて極端な胚発生低下等が起こることを捉えており、同じ表現型を有する患者を対象に、胚発生不良の原因が RNF212 遺伝子変異に起因しているかを明らかにすることは、不妊治療へ新しい展開をもたらすと期待される。また、repro57 マウスの呈する異常のほかに、多前核、卵成熟異常など減数分裂時の異常を呈し、遺伝子変異を強く疑う患者が存在する。実際、10 回を超える体外受精を繰り返し行うも妊娠できない患者は少なくなく、金銭面のみならず精神面の負担も非常に大きい。

2. 研究の目的

本研究では体外受精反復不成功患者を対象に遺伝子の変異がもたらす不妊として減数分裂に関連する遺伝子に焦点を当て、不妊原因となる遺伝子変異を見つけることを目的とした。

3. 研究の方法

体外受精反復不成功患者 25 人と自然妊娠出産者 10 人の血液から DNA を抽出後、次世代シーケンシング (NGS) による遺伝子変異の網羅的解析を行い、減数分裂関連の遺伝子の変異の有無を調べた。また、自然妊娠出産者に存在しない High impact な変異を抽出し、8.3JPN データベースを対象群とした場合のアレル頻度における有意差検定を行った。さらに、ハーディワインベルグ平衡 (HWE) を算出し、Human Genetic Variation Database (HGVD) から算出した HWE との比較検定を行った。

4. 研究成果

体外受精反復不成功患者を対象に、減数分裂関連の遺伝子を中心とした次世代シーケンシング (NGS) による遺伝子変異の網羅的解析を行った結果、当初予想していた組み換えに関する遺伝子 (*STAG3*, *MSH5*, *MLH3*)、コヒーシンに関連する遺伝子 (*REC8*, *SMC1B*, *SGO1*, *SGO2*)、対合複合体に関連する遺伝子 (*SYCP3*) に有害な遺伝子変異は本研究の対象患者においては検出されなかったが、これ以外の遺伝子のうち自然妊娠出産者 10 人に存在しない High impact な変異が 57 の遺伝子に存在し、これらの遺伝子のうち、*ADAM33*, *CEP89*, *CRIPAK*, *OR52N4*, *PDZRN3*, *RAET1E* および *SPATA31A3* において、患者群と 8.3KJPN データベースの対照群間のアレル頻度に有意な差が検出された (図 1 参照)。

図 1

Gene name	Effect	Allele frequency			P-value
		p3 1000G EAS	8.3KJPN	Patients	Patients vs 8.3KJPN
<i>ADAM33</i>	frameshift variant	0.114	0.106	0.24	0.009
<i>CEP89</i>	stop lost	0.107	0.075	0.18	0.012
<i>CRIPAK</i>	frameshift variant	0.017	0.006	0.08	0.000
<i>OR52N4</i>	stop gained	0.197	0.164	0.32	0.006
<i>PDZRN3</i>	splice acceptor variant & intron variant	0.001	0.001	0.04	0.001
<i>RAET1E</i>	frameshift variant	0.005	0.002	0.04	0.007
<i>SPATA31A3</i>	frameshift variant	0.008	0.007	0.04	0.045

また、完全不妊が存在しない状態で HWE が成立すると仮定した場合、*ADAM33*, *CEP89*, *OR2T29*, *OR52J3*, *OR52N4*, *RABL2A*, *RNF17*, *SPATA31C1* および *WWTR1* 遺伝子において対象患者における実測値と HGVD からの計算値に乖離が生じていることが判明し、これらの遺伝子の変異が完全不妊となる原因の候補となった (図 2 参照)。

図 2

Gene Name	Human Genetic Variation Database					Patients					P-value (Patients vs HGVD)
	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Total	HWE	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Total	HWE	
<i>ADAM33</i>	1029	136	40	1205	0.79	14	10	1	25	0.36	<0.001
<i>CEP89</i>	1014	180	8	1202	0.72	17	7	1	25	0.52	0.033
<i>OR2T29</i>	680	322	7	1009	0.46	11	12	2	25	0.27	0.003
<i>OR52J3</i>	988	162	14	1164	0.74	17	7	1	25	0.52	0.049
<i>OR52N4</i>	813	351	46	1210	0.50	11	12	2	25	0.27	0.034
<i>RABL2A</i>	716	110	29	855	0.76	14	7	4	25	0.52	<0.001
<i>RNF17</i>	949	234	26	1209	0.65	15	9	1	25	0.41	0.049
<i>SPATA31C1</i>	246	39	32	317	0.77	16	8	1	25	0.46	0.030
<i>WWTR1</i>	932	251	27	1210	0.63	11	13	1	25	0.23	<0.001

これらのうち、生殖細胞の形成過程に重要な役割を有する piRNA 関連遺伝子である *RNF17* において、および胚発生過程において栄養外胚葉と内細胞塊に分化する際に重要な役割を有する Hippo シグナル経路遺伝子である *WWTR1* の変異においては特に不妊原因となる可能性が高いと考えられ、大型データベースを利用した大規模解析による確認が必要となった。本研究は大型データベース利用による解析後、論文発表を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 竹下 百音、田崎 秀尚、大月 純子
2. 発表標題 不妊を呈するrepro57 雌マウスにおける表現型解析
3. 学会等名 第39回日本受精着床学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下 百音、園 菜々美、田崎 秀尚、国枝 哲夫、大月 純子
2. 発表標題 不妊を呈するミュータントマウスにおける染色体分離異常と受精・胚発生との関連
3. 学会等名 第24回日本IVF学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mone Takeshita, Nanami Sono, Hidetaka Tasaki, Tetsuo Kunieda, Junko Otsuki
2. 発表標題 Chromosomal missegregation and low developmental rates in female mutant mice upon the failure of crossing over during meiosis
3. 学会等名 International Symposium on Animal Bioscience 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大月 純子
2. 発表標題 生殖医学の基礎研究や最新技術から見える未来
3. 学会等名 25回日本IVF学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xingqiang Wei, Noritoshi Enatsu, Kunihiro Enatsu, Ai Yamada, Koji Yamada, Nao Hayashi, Yih sien Enatsu, Yuko Tokura, Yuri Mizusawa, Satoshi Yamada, Eri Okamoto, Shoji Koheguchi, Masahide Shiotani, Mikiya Nakatsuka, and Junko Otsuki
2. 発表標題 Genetic mutations in women with recurrent assisted reproductive technology failure
3. 学会等名 39th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------