

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 19 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2010～2011
課題番号：	22791556
研究課題名（和文）	顆粒膜細胞におけるアンドロゲンレセプター発現は卵胞発育に重要か？
研究課題名（英文）	Analysis of the role of androgen receptor in granulosa cells during the oocyte maturation.
研究代表者	
林 篤史	(Hayashi Atsushi)
大阪医科大学・医学部・助教	
研究者番号：	80411338

研究成果の概要（和文）：

【目的】子宮内膜症が不妊を引き起こす機序は多岐にわたり不明な点が多い。雄性個体においてエストロゲンが生殖機能や脂質代謝など様々な生理機能に重要であることが明らかになりつつあるが、雌性における男性ホルモンの重要性に関しては多くの謎が存在する。アンドロゲンレセプター（AR）は顆粒膜細胞に局在していることから、我々は子宮内膜症の妊孕性に対する影響を検討する目的で、顆粒膜細胞における AR および FSH-R mRNA 発現について解析した。さらに AR プロモーター領域のメチル化の有無を検討した。【対象と方法】2003 年 10 月から 2009 年 9 月までに、当院での採卵時に顆粒膜細胞を得られた 75 例を対象とした。インフォームドコンセントを行い、顆粒膜細胞における AR および FSH-R mRNA 発現を、One Step real time PCR で測定し、子宮内膜症性不妊症（28 例）と対象群を子宮内膜症を有さない男性不妊および卵管性不妊症例（47 例）として $\Delta\Delta$ CT 法を用いて比較検討した。また子宮内膜症性不妊症（5 例）の AR プロモーター領域のメチル化の有無を PCR 法を用いて解析し、非子宮内膜症（11 例）を対象群として検討した。【結果】非子宮内膜症性不妊では妊娠群で有意に AR の発現が高く AR と FSH-R の発現率に相関関係がみられたが、子宮内膜症性不妊ではみられなかった。また子宮内膜症性不妊では非子宮内膜症性不妊に比較して有意に AR 発現率が低く、プロモーター領域もメチル化されていた。【まとめ】非子宮内膜症性不妊では FSH-R による AR 発現の regulation がプロモーター領域のメチル化により阻害されている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

BACKGROUND: Endometriosis is one of the most common gynecological diseases and is frequently associated with infertility. Endometriosis may affect the androgen receptor (AR) mRNA expression in human granulosa cells and the methylation of the promoter region of AR. We investigated 28 patients with endometriosis and 47 subjects without endometriosis undertaking IVF treatment. **METHODS:** Granulosa cells were obtained from 28 patients with endometriosis and 47 subjects without endometriosis as a control, then expression of AR and FSHR mRNA were evaluated by StepOne real-time PCR analysis. The methylation of the promoter region was qualified by methylation-specified PCR (MSP). **RESULTS:** The expression of AR mRNA in endometriosis was statistically lower than control and FSHR mRNA expression in control showed a positive correlation with AR mRNA expression; however, there was no such correlation in endometriosis patients. In the control, AR mRNA expression was statistically higher in pregnant subjects compared with non-pregnant subjects; however, in endometriosis, no significant difference was identified. The promoter of AR was heavily methylated in all cases of endometriosis; however, only 5(45.4%) were methylated in the control. **CONCLUSION:** Lower AR mRNA expression and methylation of the AR promoter region might affect the expression of AR and FSHR in endometriosis, leading to a disturbance of the regulation of AR and FSHR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

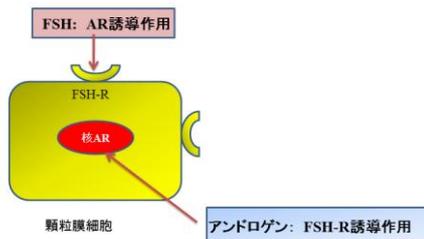
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：不妊症、アンドロゲンレセプター、子宮内膜症

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症が不妊を引き起こす原因は多岐にわたり不明な点が多い。雄性における女性ホルモンの働きは解明されつつあるが、雌性における男性ホルモンの重要性に関しては未だ多くの謎が存在する。しかし近年、アンドロゲンやアンドロゲンレセプター (AR) が卵の発育に重要な役割をしていることが分かってきた。アンドロゲンは卵胞期初期には、卵の分化を刺激し、後期にはエストロゲンの基質として作用する。諸家の報告を合わせると、ヒトにおける AR の発現は成熟卵で最も高いと考えられる。また、アンドロゲンは核内 AR を介して、FSH-R の発現を up regulate し、逆に FSH は FSH-R を介して AR の発現を Up regulate していると報告されている。

卵胞の発育におけるARとFSH-Rの協調関係



一方、子宮内膜症は生殖可能年齢女性の約10%に発症し、月経痛や不妊を首相所とする疾患である。子宮内膜症の発症機序や病態については諸説あるが、未だ不明な点が多く、内膜症患者における epigenetic な変化については、検討が必要と考えられる。

2. 研究の目的

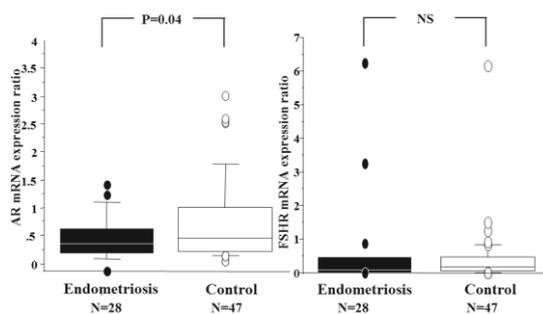
子宮内膜症が不妊を引き起こす機序は多岐にわたり不明な点が多い。これまでにヒトの顆粒膜細胞における AR 発現を検討した報告はなく、我々は子宮内膜症の不妊の機序として AR がどのように関係しているのかを検討した。さらに、子宮内膜症症例における AR の発現にはプロモーター領域のメチル化の有無についての報告はなく、今回我々はプロモーター領域のメチル化についても検討した。

3. 研究の方法

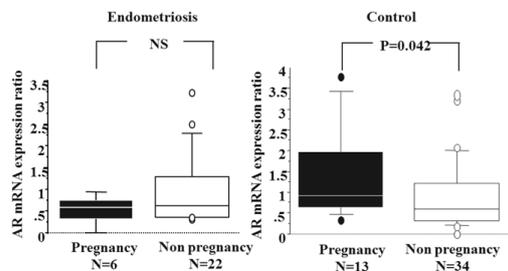
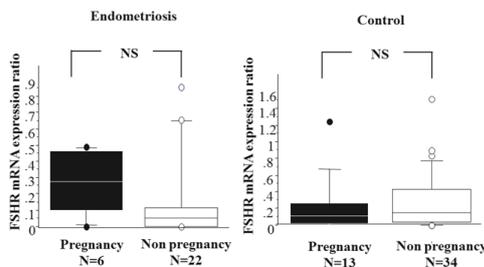
2003年10月から2009年9月までに、当院での採卵時に顆粒膜細胞を得られた75例を対象とした。子宮内膜症症例(28例)の顆粒膜細胞におけるARおよびFSHR mRNAの発現を、One Step real time PCRで測定し、非子宮内膜症症例(47例)を対象群として $\Delta\Delta$ CT法を用いて比較検討した。また、子宮内膜症症例(5例)のARプロモーター領域のメチル化を非子宮内膜症症例(11例)を対称群として検討した。採卵時に得られた顆粒膜細胞から genomic DNA を取り出し、メチル化シトシンと非メチル化シトシンを区別するためバイサルファイト処理を行った後、MSP(Methylation specific PCR)を行った。

4. 研究成果

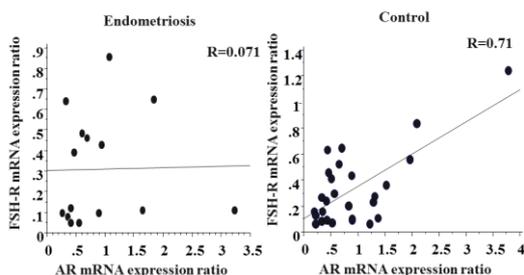
内膜症群では対象群に比較し有意に顆粒膜細胞における AR mRNA の発現が低下しており、FSHR mRNA の発現に差は認めなかった。



内膜症群と対照群をそれぞれ妊娠した群と妊娠しなかった群に分けて検討した。FSHR mRNA の発現は内膜症群、対照群ともに妊娠の有無によって発現に差はみられなかったが、AR mRNA は対照群の妊娠例で非妊娠例よりも発現が高く、内膜症群では妊娠の有無による差はみられなかった。



対象群では AR と FSHR mRNA の発現が正の相関関係を示したが、内膜症群では相関関係を認めなかった。



内膜症群では対象群に比較し有意に AR の発現が低下していたため、AR のプロモーター領域のメチル化の有無について検討した。子宮内膜症症例では対象群に比較して AR のプロモーター領域が有意にメチル化されていた。

	Endometriosis (n=11)	Control (n=11)	p
Methylation	11	5	0.02
Non-methylation	4	6	NS

以上より、子宮内膜症症例では FSH-R による AR の発現の up regulation がプロモーター領域のメチル化により阻害され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 1 件)

- ① Mika Hayashi, Yoshiki Yamashita, Atsushi Hayashi et al. Expression and Epigenetic Change of the AR and FSHR Genes in the Granulosa Cells of Endometriosis Patients. Genetics & Epigenetics ; in press

[学会発表] (計 4 件)

- ① 第 56 回日本生殖医学会学術講演会・総会
平成 23 年 12 月 8 日、パシフィコ横浜
「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 AR プロモーター領域のメチル化の有無の検討」
林美佳、山下能毅、福田真実子、川邊紗智子、荻田正子、林篤史、奥田喜代司、大道正英
- ② 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会
平成 23 年 4 月 15 日、大阪国際会議場
「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 AR プロモーター領域のメチル化の有無の検討」
林美佳、山下能毅、小野賀大、渡邊大督、澤田雅美、広田千賀、中野紗也香、川邊紗智子、荻田正子、林篤史、奥田喜代司、大道正英
- ③ 第 55 回日本生殖医学会学術講演会・総会
2010 年 11 月 11 日、徳島県郷土文化会館
「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 AR プロモーター領域のメチル化の有無の検

討」

林美佳、山下能毅、川邊紗智子、荻田正子、林篤史、奥田喜代司、大道正英

- ④第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会
平成 22 年 4 月 25 日、東京国際フォーラム
「子宮内膜症症例の黄体顆粒膜細胞におけるアンドロゲンレセプター (AR) の発現の検討」
林美佳、山下能毅、山本輝、佐野匠、古形祐平、井川佳世恵、荻田正子、林篤史、奥田喜代司、田辺晃子、大道正英

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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