

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462568

研究課題名(和文) てんかん症例のバルプロン酸誘導多嚢胞性卵巣症候群のエピジェネティクス研究

研究課題名(英文) Epigenetic mechanisms of valproate-induced polycystic ovary syndrome in epilepsy patients

研究代表者

遠藤 俊明 (Endo, Toshiaki)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90213595

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)：本研究では、てんかん合併女性においては、抗てんかん薬でかつHistoneの脱アセチル化阻害剤でもあるVPAを幼小児期から投与された場合、卵巣形態はPCOSになっていた。また胎児期にVPAに暴露されたラットの場合も同様の卵巣形態だった。インスリン抵抗性を合併するZucker fa/faラットの卵巣がDNAのmethylationが報告されているが、そのPCO形態がPioglitazone投与で改善した。また胎児期にアンドロゲンに暴露された場合、生まれてからのDNAのhypermethylationが起こっていることが報告されているが、今回の研究では雌仔の卵巣がPCO形態だった。

研究成果の概要(英文)：Valproic acid(VPA) is well known to be a HDAC inhibitor. When women have taken VPA for epilepsy from their childhood, their ovarian morphology revealed to be polycystic ovary. When VPA was given for pregnant rats, their daughters' ovary revealed to be PCO. Hypermethylation of DNA of the daughter's rats is reported when androgen is given them during pregnancy. In this study, the daughter's ovary revealed to be polycystic ovary. Zucker fa/fa rats with insulin resistance is reported to have hypermethylation of DNA and have polycystic ovary. When we gave pioglitazone(a PPAR activator) for Zucker fa/fa rats, we succeeded in reduction of small follicles in their ovary. In these results, we realized the existence of very curious relationship between PCOS and epigenome.

研究分野：産婦人科

キーワード：多嚢胞性卵巣症候群 PCOS androgen insulin resistance epigenetics valproic acid HDAC inhibitor

1. 研究開始当初の背景

多嚢胞性卵巣症候群 polycystic ovary syndrome (PCOS)は生殖年齢女性の5~10%に存在する頻度の高い疾患である。Etiologyとしては高アンドロゲンやインスリン抵抗性の存在が有力視されているが、未だ明確にはなっていない。2次性のもとしては思春期までにアンドロゲン産生腫瘍に罹患したり、幼少期から抗てんかん薬であるバルプロ酸 VPA(valproic acid)を服用していた場合に、PCOS になりやすいとの報告も散見する。18~45歳までの238症例に、平均投与期間9年の症例をまとめた New England Journal of Medicine の報告があり、20歳前にバルプロン酸の投与を受けた80%に多嚢胞があるいはテストステロン上昇がみとめられている(Isojarvi J et al, 1993)。

一方、成人してからアンドロゲンを投与した性同一性障害症例などでは卵巣は PCO 形態をとらない。

このような報告をつなぎ合わせて考えると、何らかの原因で DNA が修飾されることで表現型が変わる epigenetics が etiology の候補として浮かぶ。可能性が高いのは VPA 服用による2次性の PCOS で、ヒト莢膜細胞のバルプロン酸の添加実験の報告もあり、P450c17、P450scc のタンパクレベルが上昇した。また histone H3 のアセチル化や P450c17-hydroxylase mRNA が増加することも確認している。結果として dehydroepiandrosterone、androstenedione が増加し、このように卵巣への直接作用も確認されている(Nelson-DeGrave et al, 2004)。また、上記のようなエピソードがないのが通常の PCOS である。動物実験としては、妊娠アカゲザルにアンドロゲンを投与すると、生まれた雌ザルは性成熟期以降に PCOS になるという報告がなされており胎児環境の重要性が明らかになっている。ただインスリン抵抗性のある Zucker fa/fa ラットは DNA の hypermethylation が報告されている(Williams KT et al., 2012)。

また妊娠中に testosterone を投与すると、生まれた雌ラットの卵巣では、DNA に著しいメチル化が認められた。さらに、マウスでは、epigenome に関連する代謝異常を PPAR を活性化することにより改善できるという報告もある(Raymond ES et al, 2017)。このような報告から PCOS を epigenome の観点から本研究を実施した。

2. 研究の目的

このような研究背景からわれわれは、胎児期あるいは、性成熟期前の環境と PCOS の etiology としての意義を明らかにするのが本研究の目的である。つまり、高アンドロゲン環境と PCOS の関係、性成熟期までのインスリン抵抗性により PCO 化する卵巣をインスリン抵抗性薬で阻止できるか、また胎児期にヒストンの脱アセチル化阻害剤である VPA

を投与された場合の卵巣への影響などを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)研究1 VPA を幼少時から投与されているてんかん症例をフォローし PCOS の発症経過を観察、現病歴、下垂体ホルモン、性ステロイド、インスリン抵抗性、AMH について検討。

(2)研究2 生来インスリン抵抗性をもつ Zucker fa/fa を用いて、インスリン抵抗性改善薬 pioglitazone(Pio)の投与で PCO の表現型の改善を目指して、卵巣形態(卵胞数、閉鎖卵胞数)、AMH、adiponectin の変化を検討。

(3)研究3 妊娠 SD 系ラットにアンドロゲン dehydroepiandrosterone(DHEA)を投与し、生まれた雌仔の成長過程での性周期、卵巣形態、AMH、androstenedione、インスリン値を測定した。

(4)研究4 妊娠ラットに VPA 投与で epigenetic な修飾を目指し、生まれてくる SD 系雌ラットの表現型を観察する。

4. 研究成果

(1)研究1

1) 対象症例

- ・幼少時から VPA を服用し続けていたてんかん女性症例：16 症例
- ・調査時の年齢：14~27 歳 21.23 ± 4.24 歳
- ・VPA の服用開始期間：生後 1 ヶ月~22 歳 10 ヶ月(平均年齢 4 歳 9 か月)
- ・VPA の投与期間：3 年 9 か月~23 年 2 ヶ月
- ・卵巣の MRI：全ての症例において卵巣は PCO 形態を示していた

2) 調査時のゴナドトロピン値

- ・LH 8.69 ± 6.23 mIU/ml 中央値 $7.93(0.87 \sim 22.93)$
- ・FSH 4.61 ± 1.12 mIU/ml 中央値 $4.56(2.12 \sim 6.29)$
- ・LH/FSH 1.77 ± 1.28 中央値 $1.92(0.21 \sim 5.38)$ DHEAS
- ・LH/FSH > 1.0 は 68.8%(11/16)

3) 性ステロイド

- ・testosterone(T) 0.49 ± 0.24 ng/ml 中央値 $0.44(0.27 \sim 1.02)$ T>: 6.3%(1/16)
- ・free T < 0.6 pg/ml: 69%(11/16) Free T > 1.0 pg/ml は 31%(5/16)
- ・androstenedione(A) 5.80 ± 2.24 ng/ml 中央値 $5.55(1.7 \sim 12)$ A > 3.5 は 93.8%(15/16)
- ・DHEAS 102.3 ± 72.36 μg/dl 中央値 $83.5(20.0 \sim 256.0)$

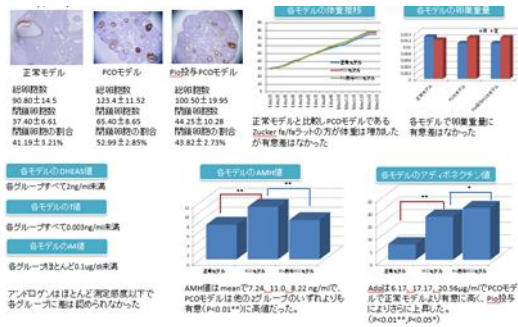
4) その他のホルモン

- ・estradiol 48.41 ± 18.93 pg/ml 中央値 $40.92(28.6 \sim 91.0)$
- ・prolactin 13.80 ± 10.45 ng/ml 中央値

12.0(3.12~46.6)
 ・AMH 63.39±35.98pmol/l 中央値 58.1(18.0~139.0)

(2)研究 2

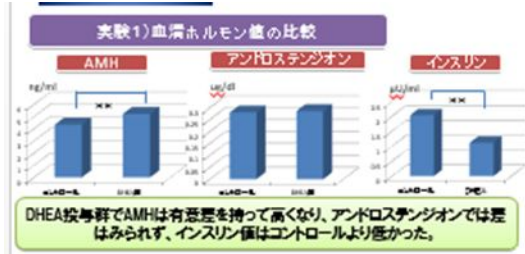
インスリン抵抗性による PCO に対する Pio の影響を検討するため、Zucker +/+ラット(正常モデル)と Zucker fa/fa ラット(PCO モデルラット)に溶媒単独あるいは pioglitazone (2.5mg/ml/kg)(Pio)を 22 日齢から 2 週間投与した(各 5 匹)。36 日齢でサクリファイしこれらの卵胞数、血中アンドロゲン(testosterone T、androstenedione A4、DHEAS)、血中抗ミューラー管ホルモン(AMH)、インスリン感受性 adipocytokine である血中の adiponectin(Adp)を測定した



PCO モデルの Zucker fa/fa ラットで総卵胞数が増加し、閉鎖卵胞の割合が有意に増加した。PCO モデルに Pio を投与すると(PCO モデル+Pio)有意に総卵胞数は減少し、閉鎖卵胞の割合が減少した。コントロールと比較して PCO モデルの体重が増加する傾向にあったが、有意差まではなかった。PCO モデル+Pio 投与でも差はなかった。コントロール、PCO モデル、PCO モデル + Pio の間に卵巣重量に差はなかった。血中アンドロゲンはほとんどが測定感度以下で各グループに差はなかった。血中 AMH はコントロール、PCO モデル、PCO モデル+Pio で mean で 7.24、11.0、8.22ng/ml で PCO モデルが他の 2 グループよりも有意に高値だった。血中 Adp はコントロール、PCO モデル、PCO モデル+Pio で mean で 6.17、17.17、20.56ug/ml でコントロールよりも PCO モデル、PCO モデルよりも PCO モデル + Pio が有意に高値だった。

(3)研究 3

SD 系ラットに対し妊娠 15 日目~19 日目の間に DHEA1mg /0.2ml(溶媒) 100gBW を連日皮下注射した DHEA モデルと溶媒 0.2ml /100gBW を連日皮下注射したコントロールモデルの出生後 60-70 日の仔雌それぞれ 1 5 匹ずつの週数毎の体重、性周期、卵巣形態、血中 AMH、アンドロステンジオンについて検討

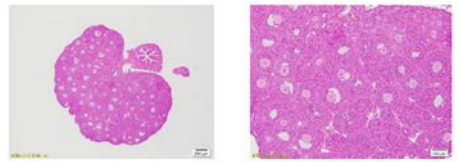
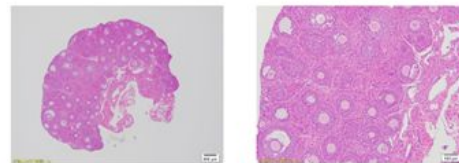


妊娠ラットに DHEA を投与することにより、生まれた雌ラットの性周期不順ラットの割合が有意に増えた。妊娠ラットに DHEA を投与することにより、生まれた雌ラットの卵巣形態が PCO をとるものが有意に増えた。

(4)研究 4

妊娠 9 日目に VPA を投与して、ラットの体重、卵巣重量、卵巣形態について検討した。

群	動物数	妊娠日	体重 (g)		卵巣重 (g)		子宮重 (g)		
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
1. Control	5	妊娠日	1-5	25.86	0.076	0.052	0.030		
			5-8	27.29	0.095	0.050	0.017		
			1-7	24.96	0.047	0.044	0.026		
			1-7	41.29	0.060	0.065	0.061		
			8-5	26.46	0.072	0.045	0.020		
			8-5	41.11	0.069	0.072	0.072		
			Mean	27.73	0.076	0.061	0.040		
2. バルプロ酸 600mg/kg	5	妊娠日	1-5	24.11	0.038	0.013	0.003		
			5-8	26.49	0.041	0.020	0.026		
			8-5	27.07	0.032	0.032	0.020		
			1-7	22.25	0.011	0.032	0.018		
			8-5	28.64	0.028	0.025	0.028		
			10-9	37.74	0.025	0.020	0.028		
			Mean	41.12	0.024	0.024	0.027		
Mean	24.87	0.047	0.044	0.011					
	24.80	0.042	0.027	0.027					
Mean	4.895	0.014	0.023	0.002					



妊娠ラットに VPA を投与しても生まれた雌ラットはコントロールラットと比較して体重、卵巣重量、子宮重量に変化はなかった。卵巣組織はコントロールと比較して、妊娠ラットに VPA 投与を投与して生まれた雌ラットの卵巣は PCO 形態をとるものが

有意に増加した。

研究成果の考察

本研究では、PCOS の etiology を epigenetics の関与を示唆するエピソードを4つの研究から検討した。まず、てんかん合併女性においては、抗てんかん薬でかつHistoneの脱アセチル化阻害剤でもあるVPAを幼小児期から投与された場合、卵巣形態ばかりでなく、内分泌学的にもandrostenedione高値を特徴とするPCOSになっており、PCOSのetiologyとしてepigeneticsの存在が強く示唆された。次に、インスリン抵抗性を合併するZucker fa/faラットは卵巣がPCO形態を呈することをわれわれが報告しているが(Honnma et al, 2010)、一方でDNAのhypermethylationが知られている。今回Pioの投与で卵巣のPCO形態が改善したことから、PioのDNAのmethylationへの影響も期待される結果となった。さらに、胎児期にアンドロゲンに暴露された場合、生まれてからのDNAのhypermethylationが起こっていたことが報告されている。今回の研究では雌仔の卵巣がPCO形態をとったり、AMHの上昇が認められたことから、これらの表現型とepigeneticsとの関連が注目される。さらに胎児期にVPAに暴露されたラットの雌仔の卵巣がPCO形態をとったことからPCOSのetiologyとしてHistoneの脱アセチル化を始めとしたepigeneticsの関与が示唆され、さらにDNAのmethylationなど今後の研究の方向性が示唆される結果となった。

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 3 件)

Honnma H, Asada Y, Baba T, Endo T. Continuous high-dose estrogen controls serum FSH and LH levels: new treatment strategy for extremely low ovarian reserve patients, two case reports. *Gynecol Endocrinol* 30:341-344, 2014. (査読あり)

Ikeda K, Baba T, Morishita M, Honnma H, Endo T, Kiya T, Saito T. Long-term treatment with dehydroepiandrosterone may lead to follicular atresia through interaction with anti-Mullerian hormone. *J Ovarian Res.* 7:46-53, 2014. (査読あり)

Asada Y, Ito F, Honnma H, Takeuchi S, Fukunaga N, Hashiba Y, Baba T, Endo T. Failure of GnRH assisted-triggered oocyte maturation: its cause and management. *J Assist Reprod Genet* 30: 581-585, 2013.(査読あり)

{ 学会発表 } (計 4 件)

Endo T, Morishita M, kuno Y, Honnma H, Baba T, Kiya T, Saito T. Pioglitazone is effective for multiple phenotypes of Zucker fa/fa rats used as a model of ovary of polycystic ovary syndrome with insulin resistance. ESHRE annual meeting 2016 2016.7.03 ~ 7.06 Helsinki, Finland.

森下美幸、遠藤俊明、久野芳佳、馬場剛、逸見博文、金谷美加、木谷保、本間寛之、真名瀬賢吾、齋藤豪. ラットPCOモデルを用いた妊娠時の高アンドロゲンとインスリン抵抗性の雌仔への影響について. 第68回日本産婦人科学会学術講演会 2016.4.22~4.24. 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

森下美幸、遠藤俊明、馬場剛、久野芳佳、池田桂子、本間寛之、逸見博文、木谷保、真名瀬賢吾、金谷美加、幡洋、神谷博文、齋藤豪. 胎児期にアンドロゲンに暴露された雌ラットは性成熟期にPCOSになるか? 第59回日本生殖医学会学術講演会 2014.12.04 ~ 12.05, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

久野芳佳、遠藤俊明、清水亜由美、森下美幸、池田桂子、馬場剛、齋藤豪. バルプロ酸投与てんかん症例に発症した2次性多嚢胞卵巣症候群の特徴について. 第65回日本産婦人科学会学術講演会 2013. 5.10 ~ 5.12、ロイトン札幌他(北海道札幌市)

{ 図書 } (計 2 件)

遠藤俊明 女性不妊症の検査法、柴原浩章、森本義晴、京野廣一編 図説よくわかる臨床不妊症学 一般不妊治療編第3版 中外医学社 東京 pp138-148, 2016.

遠藤俊明、齋藤豪 PCOSの診断 柴原浩章編 不妊・不育診療指針 中外医学社 東京 pp204-209, 2016

{ 産業財産権 }

出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

{ その他 }

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤俊明(ENDO Toshiaki)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 90213595

(2) 研究分担者

鈴木 拓(Suzuki Hiromu)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号： 20381254