

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861334

研究課題名(和文)子宮内膜の機能調節における抗ミュラー管ホルモン(AMH)の役割に関する研究

研究課題名(英文)The role of Anti-Mullerian Hormone (AMH) on the factional modulation of human endometrium

研究代表者

谷口 憲 (TANIGUCHI, Ken)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：30714232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト正所性子宮内膜において、AMHの特異的受容体であるAMH Rの発現動態を検討した。腺上皮におけるAMH Rの発現は機能層より基底層で有意に強く、間質では基底層より機能層が有意に強く発現していた。機能層でのAMH Rの発現は子宮内膜の表層部に局限しており、機能層中間層におけるAMH Rの発現は有意に低かった。またAMH Rの発現は増殖期よりも分泌期に強い傾向が認められた。血中および腹水中のAMH濃度は相関関係が認められ、年齢や月経異常・排卵障害の程度により相違し、重症子宮内膜症では年齢によらず低い傾向が認められた。AMHはAMH Rを介して子宮内膜の機能調節に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Anti-Mullerian Hormone (AMH) is originally discovered as an inducer of regression of Mullerian ducts in male fetus. On the other hand, AMH may act as an inhibitory mediator of Mullerian duct derived female tissue, such as endometrium. We investigated spatio-temporal expression of specific AMH receptor (AMH1R). In endometrial glandular cells, AMH1R is more strongly expressed in basal layer than functional layer of endometrium. Stromal AMH1R expression is higher in functional layer. In functional layer, strong AMH1R expression is localized at superficial part of endometrium. AMH1R expression is higher in secretory phase than in proliferative phase. We found positive correlation between serum and intra-peritoneal AMH levels, and it significantly differ according to women's age, severity of ovulatory disorders. AMH levels are significantly lower in women with endometriosis. AMH may have roles in fictional modulations of human endometrium via its specific receptor AMH1R.

研究分野：産婦人科

キーワード：AMH AMH受容体 子宮内膜 月経異常 排卵障害 多嚢胞性卵巣症候群 早発卵巣不全

1. 研究開始当初の背景

本邦における少子化の進行は解決すべき喫緊の社会的課題である。不妊症治療の発展は多くの不妊症女性に福音をもたらし、少子化の解決の一助になっていると考えられる。一方で、不妊症の原因は多岐にわたり、それらのなかには現代の生殖補助医療によっても解決できない難治性不妊症が存在する。

子宮内膜は、胚盤胞まで発育した受精卵を受容し、接着・着床の初期段階の調節する構成因子のなかで重要な位置を占める。これらは、視床下部—下垂体—卵巣による内分泌的調節を受け、卵巣ステロイドホルモンの作用により、月経期から増殖を開始し、排卵後は組織学的に分泌期様変化を呈し着床準備状態に至る。この一連の経過は局所においては、卵巣ステロイドホルモンの作用をメディエートする様々なサイトカインや増殖因子により調節されている。臨床的に、子宮内膜の発育障害を想起させる着床不全が不妊原因と考えられる症例が存在する。これらでは、卵巣からのステロイドホルモンの産生に問題がなくても、排卵後の黄体期までに子宮内膜が十分に肥厚しなかったり、あるいは体外受精・胚移植の際に、形態良好胚を移植しても妊娠にいたらない例が存在する。このような子宮内膜発育不全を呈する女性では、子宮内膜における局所調節因子が関与している可能性がある。

子宮および子宮内膜は胎生期のミュラー管(中腎傍管)に由来し、ミュラー管は体腔上皮(coelomic epithelium)を発生母地とする。抗ミュラー管ホルモン(anti-mullerian hormone, AMH)は、雄性胎児の発生初期に精巣のセルトリ細胞から産生され、その名の如く男児において、女性性器の原基であるミュラー管の退縮に関わる因子である(Jost, 1947; Behringer, 1994)。AMHはTGFβスーパーファミリーに属する2量体ホモダイマーの糖蛋白で、細胞膜表面に存在するAMHtypeIおよびtypeII受容体の複合体を標的とし、typeII受容体は抗原認識に、typeI受容体は細胞内シグナル伝達に関わっている(Josso, 2001)。女性では、卵巣顆粒膜細胞から産生され、その産生量は、加齢とともに減少していく原始卵胞数に依存し、閉経後では検出されない。このため、最近では卵巣予備能の直接的な指標として臨床に用いられている(Rooij, 2002)。

一方、女性におけるAMHの生理的意義については必ずしも明らかでない。卵巣においては卵胞発育の制御因子として働いていることが考えられているが、そのメカニズムの詳細に関しても明らかではない(Jornard, 2004)。AMHtypeII受容体は生殖腺と生殖臓器に発現が認められるため、成人女性ではAMHがミュラー管由来組織においても何らかの働きを持つことが予想される。また、

卵巣癌や子宮癌細胞ではAMHtypeII受容体が発現し、それらの細胞増殖に対してAMHが抑制的に働くことが報告されており(Renuad, 2005; Stephen, 2002)。AMHは生殖臓器を発生母地とした腫瘍性疾患において増殖制御作用を持つと考えられる。しかしながら、女性の生殖臓器に発生する疾患におけるAMHの役割に関する研究は未だ少なく、とくに子宮内膜におけるAMHの働きについては必ずしも明らかでない。性成熟期女性では、卵巣予備能に依存的なAMHレベルの低下に加えて、疾患により血中AMHレベルが異なることが報告されている。

多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)は、月経異常、アンドロゲン過剰症を特徴とした性成熟期女性に最も多い内分泌疾患である。PCOSでは、正常月経あるいはPCOSでない月経異常を呈する女性に比べAMHレベルが高いことが報告されている(Pigny, 2003)。一方で、PCOSではエストロゲンの基礎分泌は保たれており、SHBG(sex hormone binding globulin)の低下と無排卵周期症によるプロゲステロン産生不全もあり、PCOS女性は相対的なエストロゲン過剰状態にある。早発卵巣機能不全(POI)では、年齢に比して早期に原始卵胞が著明に減少するため早発閉経に陥り、このような症例では血中AMHレベルは低下してPCOSでは流産が多く、一方若年のPOIでは卵巣機能の低下に関わらず妊娠例が存在する。このような臨床的知見はAMHが子宮内膜の生理的調節機構に影響している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、子宮内膜に対するAMHの作用のメカニズムを性ホルモンとの関連から明らかにする。(1)正常の整順な月経を有するが子宮内膜が薄い不妊女性、PCOS女性、POF女性および月経整順かつ子宮内膜の発育に臨床的に問題のないコントロール女性から臨床的に得られた子宮内膜におけるAMH受容体の発現・局在と、同一女性での血中エストロゲン、プロゲステロンおよびAMHを測定し、AMHあるいは性ホルモンがAMH受容体の発現動態に及ぼす影響を検討する。(2)これらの子宮内膜におけるin vitroでの性ホルモン受容体の発現動態に及ぼす性ホルモンおよびAMHの作用を検討する。(3)子宮内膜腺上皮細胞、間質細胞の増殖とアポトーシスに対する性ホルモンの作用と、それらにAMHが及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 対象とする疾患と組織検体の採取
多嚢胞性卵巣症候群 PCOS:PCOSは日産婦2007の診断基準により診断する。
早発卵巣機能不全 POI:40才未満で

FSH が 40miu/ml を呈する例

子宮内膜発育不全：不妊治療において分泌期に子宮内膜が 5mm 未満の例

コントロール：月経整順で分泌期子宮内膜が 8mm 以上の例

インフォームドコンセントを得たうえで正所性子宮内膜組織を採取する。

内膜組織の採取は外来で吸引組織採取器具を用いる。

得られた組織の一部は 4%パラホルムアルデヒド固定したのちパラフィン包埋切片を作成し、免疫染色および in situ hybridization に供する。

得られた組織を温生食水中で十分洗浄したのち小片に細切し、DMSO 中で 24 時間培養する。その後各種のホルモン添加実験を行い、組織をパラホルムアルデヒド固定したのちパラフィン包埋切片を作成し、免疫染色および in situ hybridization に供する。

残余の正所性内膜組織の一部を細切・酵素処理したのち、フィルターろ過および分離培養法により腺上皮および間質細胞を分離抽出する。抽出した腺上皮および間質細胞は、ビメンチンあるいはサイトケラチンを用いた免疫染色によりその分離度を確認する。これらは培養実験に用いる。

(2) 免疫組織染色および in situ hybridization

AMH 受容体の発現と局在

AMHtype 受容体 (A AMH R) に対するマウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的手法を用いて、各抽出組織における AMHIIR 蛋白の発現および局在を検討する。

性ホルモン受容体の発現

エストロゲン受容体 (ER) およびプロゲステロン受容体 (PR) に対するマウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的手法を用いて、各抽出組織における ER および PR の発現および局在を検討する。

in situ hybridization

AMHtype 受容体 mRNA に対する TT₃ イー-標識オリゴヌクレオチド DNA プローブを作成し、in situ hybridization 法を用いて各抽出組織における AMHtype 受容体 mRNA の発現および局在を検討する。また、ER および PR に対しても TT₃ イー-標識オリゴヌクレオチド DNA プローブを作成し、同様に組織中の mRNA の発現・局在を検討する。

(3) Bromodeoxyuridine (BrdU) 取り込み能を指標とした培養子宮内膜細胞の増殖性に対する性ホルモンおよび AMH の作用
培養 24 時間後の子宮内膜腺上皮細胞あるいは間質細胞を、96 穴マイクロプレート上で、1 穴当たり 10^4 細胞になるように調製して 24 時間前培養する。その後 AMH を段階的な希釈系列を作成して (10^{-5} ~ 10^{-9} M) BrdU とともに培養液中に添加し 24 時間培養する。

24 時間後 BrdU に対する特異抗体を用いた測定法により培養上清中の BrdU 濃度を測定して BrdU 取り込み能を算出する。同様の培

養系を用いて、段階的な希釈系列を作成した (10^{-5} ~ 10^{-9} M) エストラジオールあるいはプロゲステロンそれぞれ単独で、あるいは同時に AMH とともに培養液中に添加し BrdU 取り込み能の変化を検討する。また、これらの培養系において、抗 AMH 抗体および抗 AMH R 抗体をそれぞれ単独であるいは同時に添加し AMH の作用が拮抗されるかどうか検討する。

(4) 子宮内膜における性ホルモン受容体発現への性ホルモンおよび AMH の影響

子宮内膜を温生食水で十分洗浄したのち DMSO 培地中で 24 時間培養する。ついで段階的な希釈系列を作成した (10^{-5} ~ 10^{-9} M) エストラジオール、プロゲステロン、あるいは AMH をそれぞれ単独で、あるいは同時に培地に添加しさらに 24 時間培養する。その後組織を 4%パラホルムアルデヒド固定したのちパラフィン包埋切片を作成する。培養後固定組織における AMH R, ER および PR 蛋白の発現・局在を前述の免疫組織学的手法で解析し、それら発現動態への AMH および性ホルモンの影響を検討する。また、in situ hybridization 法で、培養後組織中の AMH R, ER および PR mRNA の発現・局在を解析し、蛋白レベルと同様に mRNA レベルでの AMH および性ホルモンの影響を検討する。

(5) 子宮内膜におけるアポトーシスへの性ホルモンおよび AMH の影響

上記の組織におけるアポトーシス動態を TUNNEL 法および免疫組織染色を用いて検討する。

培養し各種ホルモン添加処理を行った子宮内膜組織において TUNNEL 法を用いてアポトーシス細胞を検出する。アポトーシスの程度は一定の細胞数当たりのアポトーシス細胞の数を計測して解析し、それらと AMH および性ホルモンとの関連を検討する。

免疫組織化学的手法で、活性化 caspase3 に対するマウスモノクローナル抗体を用いて、組織中のプロアポトーシス細胞を検出し、その発現動態と AMH および性ホルモンとの関連を検討する。

4. 研究成果

長崎大学病院産婦人科を受診した生殖年齢の女性において、末梢血中 AMH ならびに卵巣ステロイドホルモン (エストラジオール, E2; プロゲステロン, P4), 甲状腺ホルモン (FT3, FT4, TSH), 下垂体ゴナドトロピン (FSH, LH) を測定し、それらで AMH とゴナドトロピンの

測定値から多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS), 早発卵巣機能不全 (POI) などの月経異常を診断し解析した。経膈超音波断層法により種々の月経周期の時点で子宮内膜の厚みを測定しパワードプラ法による血流評価を行った。血中 AMH 値とゴナドトロピン値との関連から、排卵障害の有無あるいは排卵誘発への反応性には血中 AMH 値とのあいだに有意な相

関があることを確認した。また、血中 AMH の値から、顕性 PCOS と PCOS でないその他の排卵障害が鑑別できる可能性が示唆された。子宮内膜の所見と血清 AMH 値ならびにその他の内分泌学的パラメーターとの間に推計学的関連性は明かではなかった。

インフォームドコンセントが得られた症例の一部から正所性子宮内膜を部分搔爬により採取した。それらにおいて AMH の特異的受容体である AMHtypeII 受容体 (AMH R), エストロゲン受容体 (ER) およびプロゲステロン受容体 (PR) の発現を免疫組織化学的手法により検討した。AMH R は子宮内膜腺上皮および間質に発現・局在を認め、症例により子宮内膜腺上皮における発現に差があることが認められた。

多嚢胞性卵巣症候群と早発卵巣不全の症例での子宮内膜組織の採取を予定していたが、実際には早発卵巣不全の症例では、子宮内膜が長期の無月経のために発育しておらず、複数の研究解析に必要な組織量の採取が困難であった。また多嚢胞性卵巣症候群においても、不妊例では子宮内膜組織採取の同意を取るのが困難であり、良性子宮腫瘍で子宮を摘出し、子宮内膜に病理学的な異常を認めない症例で検討を行った。

摘出子宮から得られた正所性子宮内膜全層標本で、AMH R は腺上皮および間質に発現しており、それらの発現を機能層および基底層に分けて検討したところ、子宮内膜腺上皮における AMH R の発現は、機能層より基底層で有意に強く発現しており、間質の発現は基底層より機能層が有意に強く発現していた。機能層での腺上皮および間質における AMH R の発現は子宮内膜の表層部分に限定しており、機能層中間層における AMH R の発現は有意に低かった。また AMH R の発現は増殖期よりも分泌期に強い傾向が認められた。

不妊症患者の腹水中の AMH 濃度を検討したところ、腹水中の AMH 濃度と年齢および血中 AMH 濃度には有意な相関が認められた。多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) での腹水中 AMH 濃度は検体数が少なく十分な解析ができなかったが、PCOS における血中 AMH 濃度は、その他の不妊症や月経周期異常の例に比して有意に高いことが認められた。一方、子宮内膜症では年齢と腹水中 AMH 濃度との相関が認められず、若年で進行した内膜症では腹水中 AMH 濃度が有意に低下していた。これらの結果は、AMH が子宮内膜の増殖調節に関わっている可能性を示唆するものであり、結果の一部は国内外の学会で発表した。今後、血中・腹水中 AMH と子宮内膜の機能調節との関わりについて、さらに検討を進めていきたいと考えている。

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 2 件)

- 1) Kitajima M, Khan KN, Harada A, Taniguchi K, Inoue T, Kaneuchi M, Miura K, Masuzaki H. Association between ovarian endometrioma and ovarian reserve. *Frontiers In Bioscience, Elite*, 10, 92-102, January 1, 2018. (査読あり)
- 2) Inoue T, Kitajima M, Taniguchi K, Masuzaki H. Three-dimensional saline-infusion sonohysterography is useful for the identification of endometrial polyp. *J Obstet Gynaecol Res* 42:855-9, 2016. (査読あり)

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) 村上直子, 北島道夫, 谷口 憲, 塚本大空, 北島百合子, 三浦清徳, 増崎英明. 正所性子宮内膜における AMHR2 の発現動態に関する検討. 第 39 回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会 2018 年 1 月 27-28 日 (京都市, メルパルク京都)
- 2) Masashi Noguchi, Michio Kitajima, Khaleque Newaz Khan, Akira Fujishita, Kiyonori Miura, Hideaki Masuzaki. Clinical evaluations of AMH levels in peritoneal fluids derived from women with and without endometriosis. 13th World Congress on Endometriosis (WCE2017), 17-20 May 2017, Vancouver, Canada.
- 3) 渡邊 灯, 北島道夫, 北島百合子, 塚本大空, 村上直子, 谷口 憲, 三浦清徳, 増崎英明. 月経周期異常を呈する 25 才以下の若年女性における血清 AMH 値の検討. 第 32 回日本女性医学学会学術集会. 2017 年 11 月 4-5 日 (大阪市, リーガロイヤルホテル大阪)
- 4) 谷口 憲, 井上統夫, 北島道夫, 中根秀之, 増崎英明. 男性ホルモン療法中の性同一性障害 FTM 当事者における卵巣機能に関する検討. 第 17 回 GID 学会. 2017 年 3 月 18-19 日 (札幌市, 札幌医科大学記念ホール)
- 5) 谷口 憲, 北島道夫, 村上直子, 井上統夫, 金内優典, 三浦清徳, 増崎英明. 化学療法および放射線療法後に妊娠に至った中枢神経系胚細胞腫瘍の 1 例. 第 34 回日本受精着床学会学術講演会. 2016 年 09 月 15-16 日 (長野県北佐久郡, 軽井沢プリンスホテルウエスト)
- 6) 谷口 憲, 吉田敦, 北里周, 足立智彦, 三浦清徳, 増崎英明. 腹腔鏡下に治療した急性胆嚢炎合併妊娠の 1 例. 第 28 回日本内視鏡外科学会総会 2015 年 12 月 10-12 日 (大阪市, リーガロイヤルホテル大阪)
- 7) 谷口 憲, 北島道夫, 村上直子, 三浦清徳, 増崎英明. 妊孕性温存のため卵子凍結を

- 施行した最重症型再生不良性貧血の1例 . 第33回日本受精着床学会学術講演会 . 2015年11月26-27日 . (東京都, TFTホール)
- 8) 谷口憲, 北島道夫, 村上優子, 原田亜由美, 井上統夫, 平木宏一, 増崎雅子, 三浦清徳, 増崎英明 . ジェノゲストを長期使用した子宮内膜症に関する治療成績および骨密度の検討 . 第30回日本女性医学学会学術集会 . 2015年11月7-8日 (名古屋市, メルパルク名古屋)
- 9) 谷口憲, 北島道夫, 松本加奈子, 平木宏一, 金内優典, 三浦清徳, 増崎英明 . 卵巣チョコレート嚢胞との鑑別が困難であった卵巣粘液性境界悪性腫瘍の1例 . 第55回日本産科婦人科内視鏡学会学術講演会 . 2015年09月10-12日 (横浜市, パシフィコ横浜)
- 10) Ken Taniguchi, Michio Kitajima, Kiyonori Miura, Hideaki Masuzaki. Prognosis of placenta previa between ART pregnancies and non-ART pregnancies. International Federation of Fertility Societies / Japan Society for Reproductive Medicine (IFFS/JSRM) international Meeting 2015. 2015年04月26-29日 (横浜市, パシフィコ横浜)
- 11) 谷口憲, 北島道夫, 井上統夫, 松本亜由美, 平木宏一, 三浦清徳, 増崎英明 . ジェノゲストを長期使用した子宮内膜症に関する臨床的検討 . 第59回日本生殖医学会学術講演会 . 2014年12月4-5日 (東京都新宿区, 京王プラザホテル)

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 憲 (TANIGUCHI, Ken)
長崎大学・病院 (医学系)・助教
研究者番号 : 30714232

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

北島 道夫 (KITAJIMA, Michio)
長崎大学・病院 (医学系)・講師
研究者番号 : 50380845