

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16844

研究課題名(和文)胎児環境によるエピジェネティック変化を標的としたPCOS新規治療法の開発

研究課題名(英文) Epigenetic alteration of prenatal-androgenized PCOS models and its application for the new treatments

研究代表者

大須賀 智子 (Osuka, Satoko)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30778296

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)：胎生期アンドロゲン(DHT: Dihydrotestosterone)投与により作成した多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)モデルについて、DNAメチル化変化に着目し、これまでヒトやモデル動物で網羅的な解析が行われていない臓器である視床下部と肝臓における解析を行った。

視床下部と肝臓では、臓器間に共通するようなDNAメチル化変化を伴う発現変動を認めるような遺伝子は認められなかったが、各臓器において、発現変動を伴うメチル化変化を示した遺伝子が検出された。

各臓器の解析から、モデルにおいて変化の認められた分子が、PCOSの新規治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PCOSは、不妊症のみでなく、2型糖尿病、高脂血症などの代謝異常や、子宮体がん、さらには妊娠高血圧腎症、妊娠糖尿病などの周産期合併症の増加に関連するが、病因の詳細は不明である。PCOSの基本症状は、多嚢胞性卵巣、排卵障害、無月経、高アンドロゲン血症、下垂体ゴナドトロピン分泌異常であり、これらに着目した病態の解析や対症療法が行われてきた。しかし、本疾患の根本的な治療法の開発には至っていない。今回は、複数臓器のエピジェネティック変化に着目した解析により、新規治療標的候補を同定した。これらを対象とした治療法開発により、不妊症のみならず、女性のQOL向上に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To find the new therapeutic target of PCOS, we conducted experiments with rat models of PCOS. Hypothalamus and livers were analyzed for differentially expressed genes (DEGs) using RNA-Seq, and DNA methylation were analyzed using MBD (Methyl-CpG-binding domain) -seq methods. DNA methylation analysis showed 424 hypomethylated and 500 hypermethylated promoter regions in the hypothalamus, 186 hypomethylated and 200 hypermethylated promoter regions in the liver of the PCOS models. RNA-seq revealed that 12 DEGs in the hypothalamus and 47 DEGs in the liver ($|\text{Fold change}| > 2$, $P < 0.05$) of the PCOS models. In these genes, Vgut1 showed hypermethylated status of promoter region and down-regulated expression in the hypothalamus, Bcno1 showed hypomethylated status in promoter region and down-regulated expression in the liver. Some genes coding hepatokines including Lect2 and Rbp4 were upregulated in the livers. These molecules could be expected to be the therapeutic target for PCOS.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：多嚢胞性卵巣症候群 エピジェネティック変化

1. 研究開始当初の背景

PCOS (polycystic ovary syndrome) は、排卵障害による不妊症に加え、肥満・糖尿病・高脂血症などの代謝異常も呈し、女性の生殖および代謝機能に重大な影響を及ぼす。このため、女性の健康を生涯にわたって害する疾患である。性成熟期女性の 5-10%程度に認められ、近年日本でも増加傾向にある。しかし根本的な病因は不明であり、治療法は排卵障害に対する排卵誘剤剤など、対症療法のみである。PCOS は卵巣におけるアンドロゲン分泌亢進、下垂体におけるゴナドトロピン分泌異常、インスリン抵抗性などに代表されるように、特徴的な病態を多臓器で示す全身性疾患であり、病因は単一でないと考えられる。このため、病態の解明には複数臓器での解析が必須である。しかし、ヒト検体から多数の臓器を一度に採取することは困難であり、PCOS の病態解明および根治的な治療法の開発には適切な動物モデルの作製が極めて重要であり、世界的に様々な動物モデルが作成されている。

2. 研究の目的

若年の不妊症の原因となる PCOS は排卵障害に加えて糖質・脂質代謝異常も呈し、その病態は複雑である。このため病因は解明されておらず、根本的な治療法は確立されていない。私たちは、胎生期薬物投与による PCOS モデルラットの作成に成功し、視床下部生殖内分泌中枢における神経ペプチド発現異常を確認した。近年、胎生期環境による DNA のエピジェネティック変化が成人期疾患の発症にかかわることが示されてきている。これより、研究代表者は胎生期薬物投与モデルでえられた PCOS 表現型とエピジェネティック変化の関連を着想した。本研究の目的は、エピジェネティック機構のひとつである DNA メチル化と遺伝子発現の網羅的な解析により、複数臓器に異常をきたす PCOS の根本治療にむけた新規治療標的の探索を行う。

PCOS では、複数臓器において作用する分子の異常、または複数分子の異常が、全身性かつ複雑な病態を示す疾患の要因となっていると考えられる。複数臓器の網羅的な解析により、これらを抽出できると予測される。また、ゲノムワイドな解析を行うことにより、単一遺伝子の解析では得られなかった遺伝子群やパスウェイ単位での変化を明らかにできると期待される。DNA メチル化による発現異常をきたした遺伝子や遺伝子群の関与が示されれば、単一分子を治療標的とする治療法のみならず、DNA メチル化異常を治療標的とした新規治療を検討することができる。これまでの対症療法とは異なる、根本的な治療戦略をもたらし、不妊症の治療による少子化対策だけでなく、PCOS 患者の健康寿命の延長にも寄与できる可能性がある。糖尿病や脂質代謝異常など慢性疾患の改善・減少による医療費の削減という、社会的貢献も期待される。

3. 研究の方法

妊娠 16-19 日齢の Wistar rat にアンドロゲン (DHT) または vehicle を投与することにより、PCOS モデルラットとコントロールラットを作成する。卵巣形態、ホルモン値、性周期の解析をはじめ、視床下部 下垂体系について、性腺からのフィードバック解析を行う。糖代謝に関しては、グルコースやインスリン負荷試験に対する反応性の評価、脂質代謝については脂質マーカーの測定、脂肪量の計測や脂肪肝の組織学的評価等を行う。これら表現型の評価ののち、9-10 週齢に組織採取を行う。専用のキットを用いて同一組織からゲノム DNA、mRNA、タンパクを回収する。ゲノム DNA に対し、バイサルファイト処理後の全ゲノムシーケンシング法を用いたメチル化部位の解析を行う。得られた結果はラットのゲノム情報へのアライメントを行い、モデルラットとコントロールラット間で、DNA メチル化に相違のみられる部分の検出を行う。とくに、プロモーター領域について、DNA メチル化に変化のみられる遺伝子を抽出する。これら遺伝子の Gene ontology 解析やパスウェイ解析等を行い、モデルラットの PCOS 表現型に寄与する可能性のある遺伝子の抽出を行う。

DNA メチル化解析において、プロモーター領域のメチル化状態につき、変化のみられた遺伝子または遺伝子群について、mRNA を用いた定量 PCR による発現解析を行う。また、網羅的な解析として、RNA シーケンシングを行い、DNA メチル化解析の結果との比較を行う。これにより発現変化のみられる遺伝子のうち、DNA メチル化変異を伴うものと伴わない遺伝子の比較や、DNA メチル化変異による遺伝子発現変化から生じるパスウェイ単位での変化を検出できる。発現変化のみられた遺伝子につき、タンパク発現解析をウエスタンブロットティングと免疫染色により行う。

4. 研究成果

PCOS の新規治療ターゲットを解析するため、胎生期アンドロゲン (DHT: Dihydrotestosterone) 投与により作成した PCOS モデルについて、DNA メチル化変化に着目し、これまでヒトやモデル動物で網羅的な解析の行われていない臓器である視床下部と肝臓における解析を行った。

モデルラットは胎生 16-19 日目に経母体 DHT 投与により作成した。PCOS 様表現型として、性周期の異常と血清 LH (luteinizing hormone) 値高値、卵巣の多嚢胞化所見を確認した。視床下部と肝臓について、DNA メチル化解析、RNA-seq による遺伝子発現変動の解析を施行した。プロ

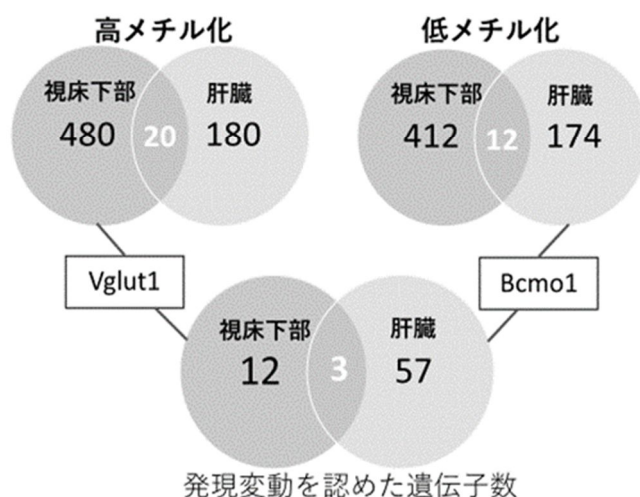
モーター領域の DNA メチル化変化の解析では、モデルにおいてコントロールに比して高メチル化を示した遺伝子は視床下部で 500、肝臓で 200、内共通する遺伝子は 20 であった。低メチル化を示した遺伝子は視床下部で 424、肝臓で 186、内共通する遺伝子は 12 であった ($|\text{Fold change}| > 2, p < 0.05$)。RNA-seq における発現変動遺伝子: DEGs ($|\text{Fold change}| > 2, p < 0.05$) 数は視床下部で 12、肝臓で 57、内共通したものは 3 遺伝子であった。視床下部と肝臓で共通して変化を示した遺伝子では、メチル化変化と発現変動遺伝子との関連は示されなかった。メチル化変化と発現変動を示した遺伝子は、視床下部で Vglut1 (高メチル化/発現低下)、Bcmo1 (低メチル化/発現低下) が認められた。VGLUT1-positive glutamatergic neuron はストレス反応における褐色脂肪細胞の熱産生や GnRH ニューロンの制御に関連するという報告がある。また BCMO1 の遺伝子多型と PCOS の関連が報告されている。視床下部ではメチル化変化を示した遺伝子数は肝臓より多かったが、発現変動を示した遺伝子は少数であった。肝臓における DEGs のパスウェイ解析結果を表に示す。肝臓で遺伝子発現変動のみられたアディポカイン・ヘパトカインに Lect2、Rbp4 が認められた。このうち RBP4 は、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) にて血清濃度の上昇が確認された。RBP4 はヒト PCOS における血中濃度の上昇の報告がある。また Pioglitazone や fenretinide などが降剤として挙げられることから、PCOS の治療薬候補となる可能性が示唆された。

表) PCOSモデルラットの肝臓における
発現変動遺伝子のパスウェイ解析

term	P-value
AMPK signaling pathway	0.00035
Fatty acid metabolism	0.00037
Fatty acid biosynthesis	0.00071
Fat digestion and absorption	0.0049
Insulin signaling pathway	0.0059
Metabolic pathways	0.0427

図) DNAメチル化変化と発現変動のまとめ

プロモーター領域にDNAメチル化変化を認めた遺伝子数



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仲西菜月、吉田沙矢子、村岡彩子、林祥太郎、笠原幸代、永井孝、邨瀬智彦、中村智子、大須賀智子、後藤真紀、吉川史隆
2. 発表標題 多嚢胞性卵巣症候群モデルマウスにおける卵子での発現遺伝子・DNAメチル化解析
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大須賀智子、仲西菜月、岩瀬明、河野友宏、吉川史隆
2. 発表標題 胎生期アンドロゲン投与による多嚢胞性卵巣症候群モデルの生殖細胞に及ぶエピジェネティック変化
3. 学会等名 日本内分泌学会第37回内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Natsuki Nakanishi, Natsuki Miyake, Mayuko Murakami, Sayako Yoshita, Shotaro Hayashi, Ayako Muraoka, Yukiyo Kasahara, Tomohiko Murase, Tomoko Nakamura, Satoko Osuka, Maki Goto, Fumitaka Kikkawa
2. 発表標題 Differential gene expression and DNA methylation analysis of oocytes from a mouse model of polycystic ovarian syndrome
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲西菜月、河野友宏、小林久人、吉川史隆、後藤真紀、中村智子、大須賀智子、邨瀬智彦、岩瀬明
2. 発表標題 多嚢胞性卵巣症候群モデルマウスにおける卵子での発現遺伝子・DNAメチル化解析
3. 学会等名 第36回 日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 グエンシュアンフォック、中村智子、林祥太郎、村岡彩子、仲西菜月、笠原幸代、永井孝、邨瀬智彦、大須賀智子、後藤真紀、岩瀬明、吉川史隆
2. 発表標題 The effect of neuropeptide Phoenixin on folliculogenesis
3. 学会等名 第63回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大須賀智子、林祥太郎、村岡彩子、仲西菜月、笠原幸代、永井孝、邨瀬智彦、中村智子、後藤真紀、岩瀬明、吉川史隆
2. 発表標題 不妊症患者における甲状腺自己抗体と卵巣予備能についての検討
3. 学会等名 第63回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大須賀 智子
2. 発表標題 多嚢胞性卵巣症候群モデルラットにおけるエピジェネティック変異解析
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大須賀 智子
2. 発表標題 モデル動物を用いた多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS: polycystic ovary syndrome) の病態解明への試み -胎生期環境に着目したエピジェネティック修飾変化の解析
3. 学会等名 第62回日本生殖医学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柴原 浩章	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 780
3. 書名 不妊症・不育症診療：その伝承とエビデンス	

〔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
---------	---------