

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07839

研究課題名(和文)新規網羅的RNA解析技法を用いた性腺体細胞の転写分子制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating comprehensive transcriptional network of gonadal somatic cells by a novel transcriptome strategy

研究代表者

鹿島田 健一 (Kashimada, Kenichi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80451938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎仔性腺体細胞のeRNA活性の定量化を利用し、卵巢特異的因子(Wnt4, Rspo1, Foxl2, Bmp2, Fst)のうち、Wnt4およびRspo1のエンハンサーとおもわれる領域の同定した。ヒトにおいても相同性が保たれている領域で、早発閉経や、46,XX 性分化疾患患者における同領域の検索を行ったところ稀な多型を見出し、同疾患の病態の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

性腺発生における転写ネットワーク制御解析において、eRNAを利用したエンハンサー候補領域の同定はまだ試みられなかったことがない。我々の研究は比較的簡便なeRNAを利用し、エンハンサー候補領域の同定が可能であることを示すものであり、今後卵巢発生の制御機構の解明へ大きく推し進めることが期待される。さらに治療法予防法が明らかでない卵巢機能不全患者(早発閉経を含む)に対する早期医療介入などの治療法、予防法確立にも寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：By quantifying enhancer RNAs from mouse ovarian granulosa cells, we identified two possible enhancer regions of the ovarian key genes, Wnt4 and Rspo1. The sequences of the regions were substantially conserved with those of human. Further, in human diseases due to impaired ovarian development, such as premature ovarian failure and 46,XX DSD, we identified rare variants, suggesting that the region would be involved in ovarian development.

研究分野：小児科

キーワード：エンハンサー 転写制御 卵巢 生殖医療

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療の領域では人工的に精子、卵子を作成する試みが行われており、マウスにおいてはすでに系が確立している。ただし、この分化誘導の系では、マウス性腺体細胞を胎仔から採取し人工的に作成した生殖細胞と共培養、利用することが前提となっている。即ち現状では、性腺体細胞を人工的に分化誘導する系は確立しておらず、それが生殖細胞のヒトへの再生医療応用の技術的限界として立ちはだかっている(Nat Protcol, 2016, Vol12, No. 9 1733-1744)。近年になり、性腺の体細胞発生は、精巣発生プログラムと卵巣発生プログラムが相互に拮抗し合っていること、また精巣卵巣発生に必要な遺伝子(精巣での SOX9、卵巣での WNT4)と、それらを維持して行く上で必要な遺伝子(精巣での DMRT1、卵巣での FOXL2)が異なることが判明している(図 1)。この事は性腺体細胞分化誘導を in vitro で安定して行うには、性腺体細胞分化の機構解明のみでは不十分であり、分化と維持における分子機構の双方の解明、およびその変化を制御する機構の解明が必要であることを意味する。このためには、縦断的かつ網羅的な遺伝子の転写制御機構の解析が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、幹細胞 (ES 細胞) からの安定した性腺体細胞の作製法の開発、性腺機能不全患者における臨床応用を行なうことを最終目標とし、特に少量の細胞から解析でいる方法として eRNA に注目し、卵巣特異的分子の cis エンハンサー領域の同定を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) eRNA を利用した cis エンハンサー領域の同定

● PCR-CAGE 法の開発と利用

eRNA は活性のある cis エンハンサー領域で産生され、その多くは両方向性であることが特徴である。このため通常の RNA-seq ではなく、5'側の RNA を cap する方法を利用した CAGE 法(Cap-trapped Analysis of Gene Expression 法)がより適している。CAGE 法の問題点は、必要とするサンプル量が多いことであり、胎生期マウスの特定の細胞などを解析する上では不向きであった。これを解決するためにライブラリー作成前に、RNA から作成した cDNA ライブラリーを、さらに PCR 法で増幅し、利用する方法を検討した。

● WT1 陽性細胞における *Wnt4*, *Rspo1*, *Foxl2*, *Bmp2*, *Follistatin* の enhancer の同定

性腺支持細胞 (精巣ではセルトリ細胞、卵巣では顆粒膜細胞) に発現する WT1 の promoter により mCherry を発現するマウスを用い、WT1 陽性細胞を回収、CAGE 法による網羅的解析を行った。
この際、性分化が開始する時点から、出生時まで 3 つの時期(E13.5, E16.5 P0)でそれぞれ RNA 解析を行い、その発現量を縦断的に比較できるようにした。

(2) ヒト卵巣発生異常による代表的疾患である早発閉経、46,XX DSD 患者におけるエンハンサー候補領域の解析

同定したエンハンサー候補領域における意義を確認する目的で、早発閉経、46,XX DSD 患者における同領域の解析を行う。

4. 研究成果

研究成果は以下の通り

- A: PCR-CAGE 法の開発に成功し、少量のサンプルで再現性のあるデータが得られた(図 1)。これにより、100ng 以下の RNA サンプルでも有効な解析が可能となった。
以上よりマウス胎仔性腺より回収した WT1 陽性細胞を解析した。
- B: CAGE 法により発現が確認された intergenic RNA のうち、以下の条件に合

うものを選定した (図 2)

a: 5 つの遺伝子それぞれ上下流 3Mb 以内に発現する

b: Bidirectional に RNA が産生される領域

c: E13.5 の精巣で発現がない (卵巢特異的に発現)

d: 経時的発現パターンがそれぞれ標的遺伝子と統計的に類似している

上記方法より *Rspo1* *Wnt4* のそれぞれ上流にエンハンサー候補領域を同定した。

In vitro reporter アッセイにより、エンハンサー活性があることを確認した (図 3)。

C: 同領域はヒトでも相同性が保たれており、早発閉経、46,XX DSD 患者の同領域における解析を行ったところ、統計的に有意な rare SNVs をそれぞれ一つずつ同定した。

図 1

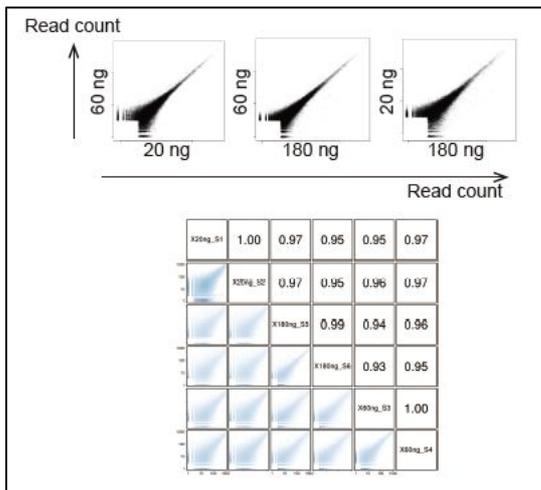


図 2

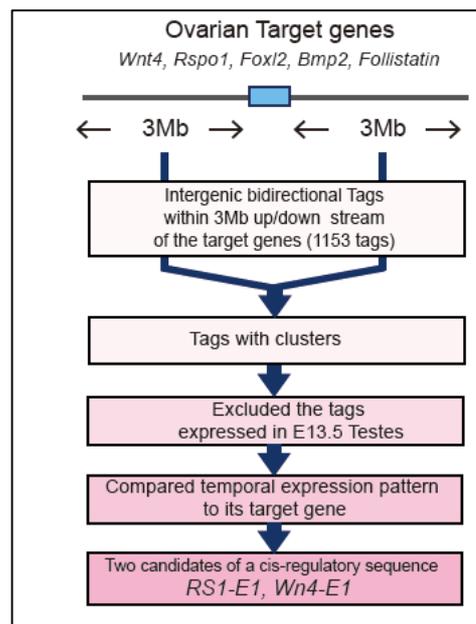


図 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	森尾 友宏 (Morio Tomohiro) (30239628)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

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