

胎生期環境に由来するエピジェネティック変化に着目したPCOS (polycystic ovary syndrome: 多嚢胞性卵巣症候群) 新規治療ターゲットの検討

名古屋大学大学院医学系研究科 産婦人科学教室 大須賀 智子

要 約

多嚢胞性卵巣症候群(以下PCOSと略す)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(Dihydrotestosterone、以下DHTと略す)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。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、性周期の異常や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 sequencing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 sequencingにおける発現変動遺伝子 ($|\text{Fold change}| > 2, p < 0.05$) 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。肝臓で遺伝子発現変動のみられたアディポカイン・ヘパトカインとしてRBP4が検出され、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)にて血清濃度の上昇が確認された。これらの遺伝子群や遺伝子の変化が、当モデルのPCOS様表現形や全身性疾患としてのPCOSの病態に関連する可能性があり、排卵障害等の主要症状との直接の関連についての検討を行うことで、PCOSの新規治療ターゲットの同定に寄与することが期待される。

緒 言

多嚢胞性卵巣症候群(polycystic ovary syndrome, 以下PCOSと略す)は、排卵障害による不妊症に加え、糖質・脂質代謝異常も呈し、女性の健康を生涯にわたって害する疾患である。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、病態の解明には複数臓器での解析が必須であるが、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る。したがって、適切な動物モデルの作成と、それら動物モデルを用いた解析が有用であるといえ

る。PCOSモデル動物としては、ホルモン投与モデル、遺伝子改変動物モデル、環境因子によるモデルなどがあり、とくにホルモン投与モデルが複数種類報告されている(1)。当教室ではこれまで、出生後や出生前にアンドロゲンであるdihydrotestosterone(以下DHTと略す)投与したPCOSモデルラットの作成、そのPCOS様表現型の確認と、視床下部弓状核における神経ペプチド発現異常を見出し報告している(2)。近年、胎生期環境がエピジェネティック変化、とくにDNAメチル化異常をきたし、成人期の疾患の発生にかかわることが示されつつある(3)。前述のモデルラットが、胎生期アンドロゲン投与により作成した疾患モデルであることから、そのPCOS様表現型や神経ペプチド発現異常に、エピジェネ

ティック機構、とくにDNAメチル化変異が関わっている可能性が考慮される。本研究では、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ため、DNAメチル化とRNA sequencing(以下RNA-Seqと略す)による遺伝子発現の網羅的な解析を行った。

方法

1. PCOSモデルラット作成

動物実験は、当施設の実験動物部門の規定に沿って行った。PCOSモデルラットは、妊娠16-19日齢のWister rat にDHT (3mg/body/日、またはvehicle (40mL 100% ethanol and 160mL sesame oil)を投与し、出生仔をPCOSモデルラットとして解析した。モデルラットは、日齢63-78でイソフルレンの吸入麻酔下に心臓血採血を行いeuthanizedとした。血清は、3000g、10分間の遠心を2回行い、血清と分離し使用まで-80度保存とした。視床下部、肝臓を採取し、一部は液体窒素で急速冷凍とし、測定まで-80度で保存した。

2. DNA 回収とDNAメチル化解析

DNAは凍結組織(各群n=4)よりDNeasy[®] Blood & Tissue(QIAGEN)を用いて回収し、Agilent 2100 Bioanalyzerによる解析とアガロース電気泳動により、品質検定を行った。EpiXplore[™] Methylated DNA Enrichment Kit(Clontech)を用いてCpGメチル化DNA濃縮を行い、TruSeq ChIP Library Preparation Kitにてシーケンスライブラリーを製作した。作成したシーケンスライブラリーの品質をAgilent 2011 Bioanalyzer を用いて確認した。シーケンス解析はHiSeq PE Cluster Kit v4 を用い、HiSeq 2500(HiSeq2500, Illumina, USA)にて行った。シーケンス解析によって得られたリード配列をゲノム配列にマッピングし、各検体において、エンリッチされている領域を検出した。その後、各エンリッチ領域の近傍10k bp以内のRefSeq検索を行い、ヒットしたRefSeq遺伝子とEntrez Gene IDの基本情報でエンリッチ領域のアノテーションを行った。参照配列には、ラットのゲノム配列としてRGSC Rnor_6.0/rn6(rn6.fa.gz, UCSC)を、ラットの遺伝子情報として、refFlat.txt.gz(UCSC)を、解析にはGeneData Expressionist for Genomic Profiling(ver 9.1.4a)を用いた。Gene ontology解析には、DAVID

Bioinformatics Resources 6.8を用いた。

3. RNA回収とRNA-Seqによる網羅的遺伝子発現解析

RNAは凍結組織(各群n=4)よりRNeasy Plus Mini Kit(Qiagen, Germany)を用いて回収し、Nanodrop、電気泳動、Agilent 2100 Bioanalyzerにより品質検定を行った後、オリゴ(dT)ビーズを用いて、mRNAを濃縮、断片化の後、ランダムヘキサマーと逆転写酵素を用いてcDNAを合成、第一鎖合成後、dNTPs、RNase H、大腸菌ポリメラーゼIを含むカスタム第二鎖合成バッファーを加え、ニックトランスレーションにより第二鎖を生成精製後、末端修復、A-tailing、シーケンシングアダプターのライゲーション、サイズセレクション、PCRエンリッチメントを経て、最終的なcDNAライブラリーを作成し、HiSeq 2500によりシーケンスを行った。ラットのリファレンスゲノム(Rnor_6.0/rn6)にマッピングを行い、遺伝子発現レベルはFPKM(fragment per kilo-base of exon per million mapped reads)により定量化した。発現変動遺伝子の解析には、edgeR (R-packages)を用い、p-value < 0.05、|fold change| > 2を発現変動とした。発現変動遺伝子の機能解析は、GO seqを用いたGene Ontology解析と、KOBASを用いたKyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)パスウェイ解析により行った。

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

RBP4 ELISA (Retinol Binding Protein-4, Mouse/Rat, Dual ELISA Kit, AG-45A-0012YEK-KI01, Adipogen)により、ラット血清中RBP4濃度測定(vehicle群 n=18、DHT群 n=20)を使用 방법에沿って行った。統計はGraph pad prism 9.0を用い、マンホイットニーU検定を用いた。

結果

1. PCOS様表現型の確認

作製したPCOSモデルラットにおいて、既報(2)と同様の性周期異常、卵巣の多嚢胞化所見を確認した。また、両群間でいずれの週数でも体重差は認められなかった。

2. DNAメチル化解析

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、低メチル化を示した遺伝子は視床下部で424、肝臓で186であり ($|\text{Fold change}| > 2, p < 0.05$)、いずれも低メチル化を示した遺伝子の数が多かった。プロモーター領域に変化を示した遺伝子のうち、視床下部と肝臓で共通していた遺伝子数は、低メチル化で20、高メチル化で12であった(図1)。

これらの遺伝子を用いて行ったGene ontology

解析では、視床下部で低メチル化を示した遺伝子群からは、Neurotransmitter receptor、G-protein coupled receptor protein signaling pathwayなど、神経内分泌に関連する機能が検出された。また、肝臓で低メチル化を示した遺伝子群からは、Regulation of cellular protein metabolic process、Negative regulation of macromolecule metabolic processなどの代謝に関連する機能が検出された。

プロモーター領域にDNAメチル化変化を認めた遺伝子数

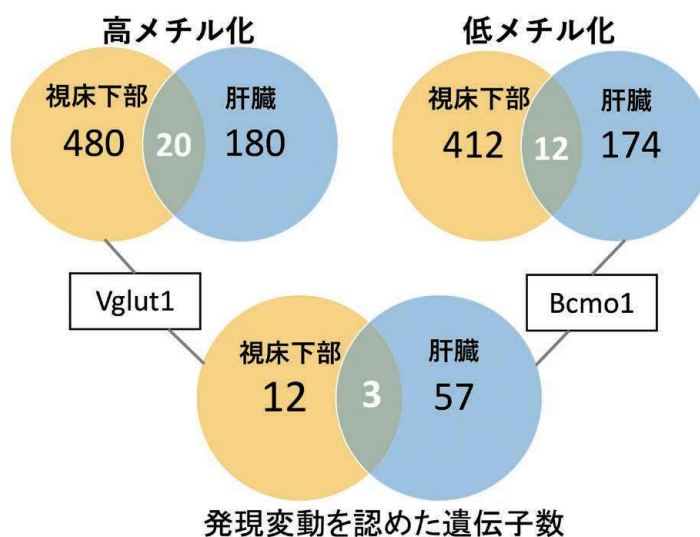


図1. DNAメチル化変化と発現変動遺伝子のまとめ

上段が、DNAメチル化解析にて、プロモーター領域にメチル化変化を認めた遺伝子数、下段が、RNA-Seqで発現変動を認めた遺伝子数を示す。ベン図において重なった部分が、視床下部と肝臓で共通した遺伝子数を示す。

3. RNA-seq解析と validation

RNA-seqにおける発現変動遺伝子 ($|\text{Fold change}| > 2, p < 0.05$) 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)、肝臓では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(4)(5)。またBCMO1の遺伝子多型とPCOSの関連が報告されている(6)。

Gene ontology解析の結果検出された機能としては、視床下部では、hormone binding、hormone

activity、hormone transport等ホルモンに関するプロセスや機能が検出された。肝臓においては、上位にlipid biosynthetic process、fatty acid metabolic processなど、脂質代謝に関連するプロセスが多く検出された。

視床下部では有意な遺伝子発現変化を示した遺伝子数が少なく、パスウェイ解析では有意な結果が得られなかった。肝臓における発現変動遺伝子のパスウェイ解析結果を表1に示す。脂肪や脂肪酸代謝、インスリンシグナリングに関連するパスウェイの変動が検出された。

また、肝臓で $q < 0.05$ の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にてPCOSモデル動物における血清濃度の上昇が確認された(図2)。

Description	Corrected P-value
AMPK signaling pathway	0.008
Fatty acid metabolism	0.008
Fatty acid biosynthesis	0.010
Fat digestion and absorption	0.042
Insulin signaling pathway	0.042

表1. 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

PCOSモデルラットの肝臓において、コントロールに比して有意な変動遺伝子のパスウェイを示す。

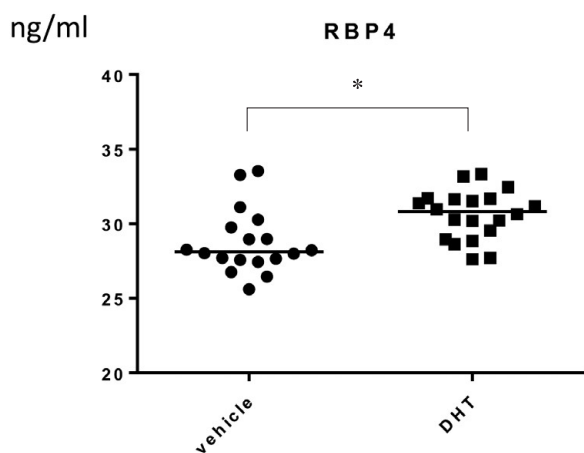


図2. PCOSモデル群とコントロール群の血清中のRBP4濃度の比較

vehicle; コントロール群 (n=18)、DHT; PCOSモデル群 (n=20)。*p<0.05 (マンホイットニーUテスト)。Barは中央値を示す。

考 察

胎生期にアンドロゲンであるDHTを投与することにより作成したPCOSモデルにおいて、視床下部と肝臓のDNAメチル化解析と、RNA-Seqによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。今回の網羅的な解析では、モデル動物において、視床下部と肝臓に共通するDNAメチル化の変化と、遺伝子発現変動の直接の関連は示されなかったが、視床下部では、GnRHニューロンの制御に関連するVglut1が、肝臓では、PCOS患者における遺伝子多型や、PPAR γ と関連の報告されているBcm1が、それぞれ、メチル化変化と発現変動を示した遺伝子として検出された。また、GO解析やパスウェイ解析では、メチル化解析/遺伝子発現変動解析ともに、視床下部では神経内分泌に関連した機能、肝臓では脂質代謝やエネルギー代謝に関連した機能の変化が検出されており、胎生期のDHT投与と、性成熟期以降のPCOS様

表現型にこれらの変化が関連する可能性が示唆された。また、ヘパトカインの一つであるRBP4 (Retinol Binding Protein-4) は肝臓のRNA-seqにおいて発現変動遺伝子として検出され、また、血清中のRBP4濃度もモデルにおいて高値であった。RBP4は、肝細胞や脂肪細胞から分泌され、インスリン抵抗性を示す肥満患者や2型糖尿病患者で高値であることが示されている(7)。今回のモデルでは、体重変化は認められなかった一方で、同様の胎生期DHT投与マウスモデルでは、脂肪量の増加は認めないものの、脂肪肝の所見が認められるという報告がある(8)。インスリン抵抗性を示すPCOS患者において、インスリン抵抗性改善薬が排卵障害に有効であることが報告されている(9)が、このような機序にRBP4が関連する可能性も示唆され、卵胞発育や排卵に対する作用について検討が必要であると考えられる。

今回の検討で、胎生期アンドロゲン投与によって作成したPCOSモデル動物の視床下部と肝臓における網羅的なDNAメチル化解析とRNA-Seqにより、それぞれ、神経内分泌や、脂肪・エネルギー代謝に関連する遺伝子群の変化が検出された。これらが、本モデルのPCOS様表現形や全身性疾患としてのPCOSの病態に関連する可能性があり、排卵障害などとの直接の関連についての基礎実験等、治療標的としての有用性についての検討を今後追加したい。

参考文献

- Osuka S, Nakanishi N, Murase T, et al. Animal models of polycystic ovary syndrome: A review of hormone-induced rodent models focused on hypothalamus-pituitary-ovary axis and neuropeptides. *Reprod Med Biol.* 2019;18(2).
- Osuka S, Iwase A, Nakahara T, et al. Kisspeptin in the hypothalamus of 2 rat models of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology.* 2017;158(2):367-77.
- Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: Emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet.* 2012;13(2):97-109.
- Hrabovszky E, Molnar CS, Nagy R, et al. Glutamatergic and GABAergic innervation of human gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Endocrinology.* 2012;153(6):2766-76.
- Nicolaysen A, Gammelsaeter R, Storm-Mathisen J, et al. The components required for amino acid neurotransmitter signaling are present in adipose tissues. *J Lipid Res.* 2007;48(10):2123-32.
- Czczuga-Semeniuk E, Galar M, Jarz-bek K, et al. The preliminary association study of ADIPOQ, RBP4, and BCMO1 variants with polycystic ovary syndrome and with biochemical

- characteristics in a cohort of Polish women. *Adv Med Sci.* 2018;63(2):242-8.
7. Meex RCR, Watt MJ. Hepatokines: Linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(9):509-20.
8. Caldwell ASL, Middleton LJ, Jimenez M, et al. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models. *Endocrinology.* 2014;155(8):3146-59.
9. Teede HJ, Misso ML, Costello MF, et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2018;110(3):364-79.
8. Caldwell ASL, Middleton LJ, Jimenez M, et al. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic

Abstract

To find the new therapeutic target of polycystic ovary syndrome, we conducted experiments with rat models of polycystic ovary syndrome. Pregnant dams were subcutaneously injected with dihydrotestosterone or vehicle on the 16th to 19th gestational day, and any female offspring were analyzed as the rat models of polycystic ovary syndrome and control rats. Hypothalamus and livers were analyzed for differentially expressed genes using RNA sequencing, and DNA methylation were analyzed using Methyl-CpG-binding domain-Seq methods. Polycystic ovary syndrome model rats showed irregular estrous cycles and polycystic ovary like morphology. 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 polycystic ovary syndrome models. RNA sequencing revealed that 12 polycystic ovary syndromes in the hypothalamus and 47 polycystic ovary syndromes in the liver (|Fold change|>2, P<0.05) of the polycystic ovary syndrome models. In these genes, *Vgut1* showed hypermethylated status of promoter region and down-regulated expression in the hypothalamus, *Bcmo1* showed hypomethylated status in promoter region and down-regulated expression in the liver. Some genes coding hepatokines including *Rbp4* were upregulated in the livers. These molecules could be expected to be the therapeutic target for polycystic ovary syndrome.