

主論文の要旨

**Upregulated Ribosomal Pathway Impairs Follicle
Development in a Polycystic Ovary Syndrome Mouse
Model: Differential Gene Expression Analysis of Oocytes**

卵子における網羅的遺伝子解析：
多嚢胞性卵巣症候群モデルマウスにおけるリボソーム経路の
アップレギュレーションは卵胞の発育を阻害する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：梶山 広明 教授)

仲西 菜月

【緒言】

多嚢胞性卵巣症候群 (Polycystic Ovary Syndrome: PCOS) は、月経不順、高アンドロゲン血症、多嚢胞性卵巣などを呈する内分泌疾患である。PCOS は性成熟期の女性の 8-13% で認められ、卵子の発育障害を伴い、不妊症の原因となる。また PCOS は心血管性病変や糖尿病と関連があることが知られており、その病態より全身性の疾患と考えられている。今までに、血液、骨格筋、脂肪細胞、卵巣全体や顆粒膜細胞、莖膜細胞での遺伝子解析が行われ、いくつかの関連遺伝子が指摘されており、これらの遺伝子が内分泌疾患、インスリン抵抗性や高アンドロゲン症状、排卵障害との関連していることが示唆されている。また、PCOS の病態として、視床下部-下垂体-卵巣軸における内分泌ホルモンの異常が考えられているが、PCOS の発症機序は完全には解明されていない。本研究では、ヒトでは解析が困難である卵子に対する PCOS の影響を解析するため、PCOS モデルマウスの卵子を用いて、発現変動遺伝子 (Differentially Expressed Genes: DEGs) および DNA メチル化によるエピジェネティック変化を解析し、病因を特定することを目的とした。

【対象及び方法】

PCOS は子宮内の高アンドロゲン環境が胎児に影響を与え、生殖年齢で PCOS を引き起こすと考えられており、今回、妊娠 16~18 日目の C57BL/6J マウスに、250 μ g/日の 5 α ジヒドロテストステロンを皮下投与し、その子を PCOS モデルマウスとして作成した (Fig.1a)。マウスの表現型は体重、性周期、卵巣組織形態によって評価した。7-9 週齢のマウスから採卵し、対象群、PCOS 群それぞれ 3 群ずつ RNA シークエンスによる卵子の遺伝子発現解析および Post-Bisulfite Adaptor Tagging 法による DNA メチル化解析を行なった。変動遺伝子の解析には DAVID Bioinformatics Resources 6.8 もしくは the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes を用いて解析した。さらにマウスの卵巣組織を用いて Rps21 もしくは Rpl36 タンパクの卵子における免疫組織化学染色を行なった。

【結果】

PCOS モデルマウス群は対象群と比べ、体重変化には差はなく (Fig.1b)、発情周期の異常 (Fig.1c) と多嚢胞様の卵巣形態と黄体の増加 (Fig.1d) を認め、既報と同様にヒトの PCOS と類似していることが確認できた。PCOS モデルマウス群の卵巣では、small antral follicle において形態学的に不健全な卵子の割合 (対象群 vs PCOS モデルマウス群、26.3% \pm 8.4% vs. 44.2% \pm 16.0%, $P < 0.05$) が増加した (Fig.1e)。さらに RNA シークエンスによる変動遺伝子解析の結果、PCOS モデルマウス群では対照群と比較し、90 個の DEGs が発現上昇し、27 個の DEGs が発現低下した (Fig.2a)。遺伝子のオントロジー解析では発現上昇群では免疫に関わるものが、発現低下群では胚着床に関わるものが抽出された (Fig.2b,c)。パスウェイ解析の結果、PCOS マウスの卵子で 5 つの DEGs (Rps21, Rpl36, Rpl36a, Rpl37a, Rpl2211) が、リボソーム関連経路で上昇していた (Table 1)。DNA

メチル化解析の結果では、PCOS モデルマウス群で 30 カ所の低メチル化領域、10 カ所の高メチル化領域を認めたと、DNA のメチル化変化は、発現変動遺伝子とは相関を認めなかった。免疫組織化学染色では卵胞の発育段階によって卵子の染色強度が異なり、発育段階の初期の卵胞ほど、Rps21 と Rpl36 の染色強度が有意に上昇していることが明らかになった (Fig.3a,b)。遺伝子発現を Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) 法で検証し、Rps21、Rpl36 どちらも PCOS モデルマウス群で発現量が上昇していた (Fig.3d,e)。また、卵巣全体で Rps21、Rpl36 タンパクの卵子の染色強度を検証し、両タンパクとも染色強度は有意に上昇していた (Fig.3f,g)。卵胞を 4 つの発育段階に分け、染色強度の違いを検証し、PCOS モデルマウスの small antral follicle の段階で有意に上昇していた (Table 2)。また、DNA メチル化解析では低メチル化領域が 30 領域、高メチル化領域が 10 領域検出されたが、今回、DNA メチル化変異領域と発現変動遺伝子の結果からは、メチル化変異領域と近位の転写開始点を持つ遺伝子で、発現変動した遺伝子は認められなかった。

【考察】

本研究では、PCOS モデルマウスを作製し、卵子を用いた遺伝子解析を行なった。PCOS モデルマウスについては、肥満がなく、月経周期の異常と多嚢胞卵胞の所見が認められ、特にアジア圏で認められる PCOS の特徴を模倣しているモデルと考えられた。PCOS は排卵障害、卵子の質の低下のため、臨床において不妊となることが問題となる。排卵障害は卵胞発育が正常に進行せず、小卵胞の段階で発育停止してしまい成熟卵胞とならないことが原因と考えられる。卵胞発育は FSH 非依存性もしくは依存性に発育する段階に分けられ、FSH 非依存性発育の段階の前胞状卵胞から AMH やアンドロゲンが分泌される。AMH の上昇は FSH の作用を抑制し、FSH によってアンドロゲンからエストロゲンへの置換が起こるが、PCOS では前胞状卵胞が増えることで AMH やアンドロゲンが異常に上昇し、FSH が抑制されることでエストロゲンへの置換が起きず高アンドロゲン状態となる。今回 small antral follicle (ヒトの前胞状卵胞に相当) の段階で、Rps21 と Rpl36 蛋白の上昇がみとめられた。これらリボソーム関連遺伝子の発現上昇により、小卵胞の数が増えることで、過剰な AMH が産生され、FSH 感受性をもつ卵胞において FSH に対する感受性が低下し、卵胞成熟を阻害すると考えられた。

また発現変動遺伝子解析では胚着床やタイトジャンクションの機能低下が、卵胞における卵子-顆粒膜細胞の相互作用を阻害することで PCOS における卵子の質が低下し、流産の増加につながる可能性が示唆された。

【結語】

PCOS モデルマウスを作製することで、ヒトでは多数の検体での解析が困難である卵子の解析を行なった。PCOS に特徴的な前胞状卵胞での発育停止に、今回遺伝子解析で抽出されたリボソーム遺伝子群が関連している可能性が示唆され、病態解明の一助となると考えられた。

Table 1. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of differentially expressed genes.

KEGG term name	Genes	P-value
Pathways in which upregulated genes in PCOS group are enriched		
mmu03010: Ribosome	<i>Rps21, Rpl36, Rpl36a, Rpl37a, and Rpl2211</i>	0.0049
Pathways in which downregulated genes in PCOS group are enriched		
mmu04530: Tight junction	<i>Myh15, 4930544G11Rik, Myh7, and Cldn10</i>	0.0284

Table 2. Rps21 and Rpl36 staining intensities in preantral, small antral, large antral, and preovulatory follicles.

Rps21		Staining intensity		
Follicle type		(1+)	(2+)	(3+)
Preantral follicle	Control			159 (61.2%)
	PCOS			145 (60.7%)
Small antral follicle *	Control		42 (16.2%)	21 (8.1%)
	PCOS		24 (10.0%)	36 (15.1%)
Large antral follicle	Control	33 (12.7%)		
	PCOS	32 (13.4%)		
Preovulatory follicle	Control	5 (1.8%)		
	PCOS	2 (0.8%)		

Rpl36		Staining intensity		
Follicle type		(1+)	(2+)	(3+) %
Preantral follicle	Control			87 (62.6%)
	PCOS			70 (59.3%)
Small antral follicle *	Control		14 (10.1%)	20 (14.4%)
	PCOS		3 (2.5%)	29 (24.6%)
Large antral follicle	Control	17 (12.2%)		
	PCOS	10 (8.5%)	3 (2.5%)	
Preovulatory follicle	Control	1 (0.7%)		
	PCOS	2 (1.7%)	1 (0.8%)	

Note: Values represent oocyte number (%) at each follicle stage.

* $P < 0.01$. The Mann-Whitney U-test

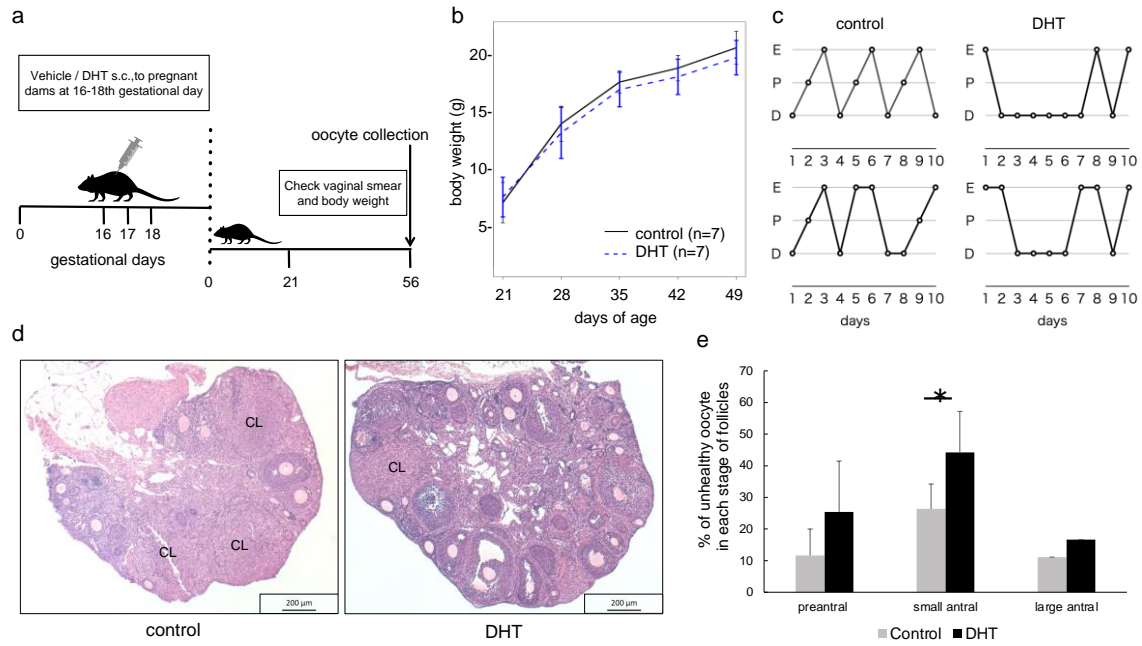


Fig.1 Assessment of bodyweight, estrous cycle, and ovarian morphology in polycystic ovary syndrome (PCOS) mouse model. **a** Schematic illustration of oocyte retrieval. s.c., subcutaneously. **b** Evaluation of bodyweight. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean. **c** Representative estrous cycles. E, estrus; P, proestrus; and D, diestrus. The PCOS mouse model mostly exhibited irregular estrus cycles. **d** Morphology of the ovaries. Bars, 200 μ m. CL, corpora lutea. **e** Percentage of unhealthy oocytes in each follicle stage. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 10$). * $P < 0.05$

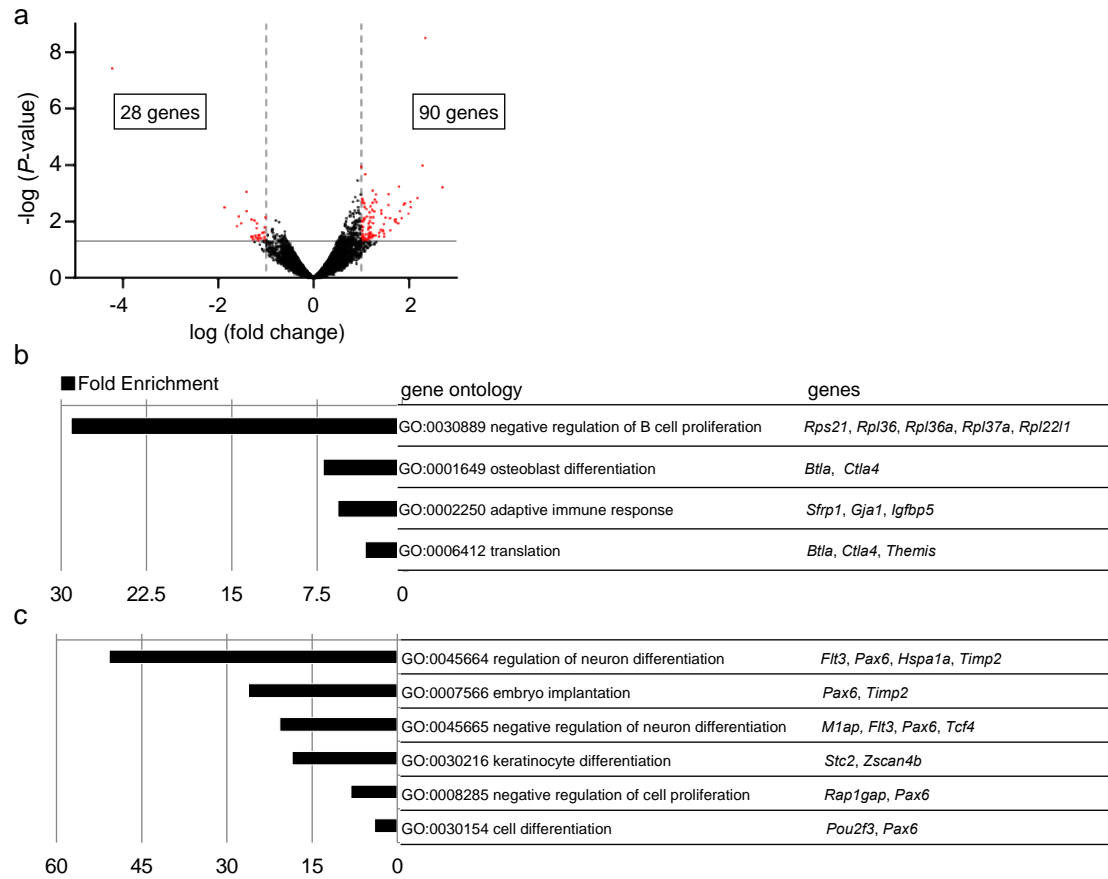


Fig. 2 Differentially expressed genes in oocytes from a polycystic ovary syndrome (PCOS) mouse model. (a) Volcano plot with default log (fold-change) thresholds of -1 and 1 and an adjusted p-value threshold of 0.05 . The expression of 90 genes was upregulated ($> \log$ (fold-change) thresholds of 1), whereas the expression of 28 genes was downregulated ($< \log$ (fold-change) thresholds of -1). (b,c) Results of gene ontology (GO) analysis performed using DAVID Bioinformatics Resources 6.8. GO terms in which the upregulated (b) and downregulated (c) genes are enriched.

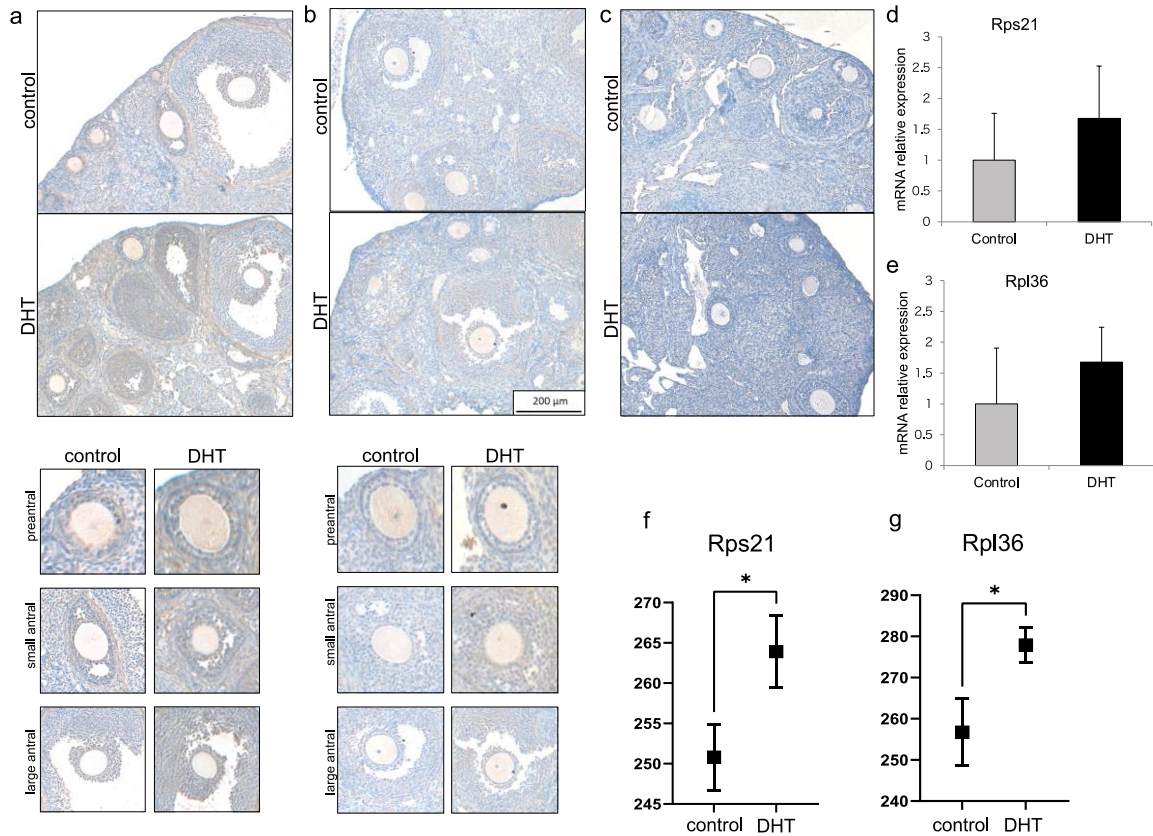


Fig. 3 Immunostaining of Rps21 and Rpl36 in the ovary.

(a) Rps21 and (b) Rpl36 immunohistochemical staining intensities in the oocytes of the preantral, small antral, and large follicles from control and PCOS groups. Bars, 200 μm . (c) Negative control for immunostaining. Relative mRNA expression levels of (d) *Rps21* and (e) *Rpl36* were quantified by qRT-PCR. Expression levels are shown relative to β -actin expression. Data are shown as the mean \pm SEM of assays conducted in duplicate obtained from four ovaries from the control and PCOS groups. Histology scores of (f) Rps21 (n = 260 oocytes for the control group; n = 239 oocytes for the PCOS group) and (g) Rpl36 (n = 137 oocytes for the control group; n = 118 oocytes for the PCOS group) immunohistochemical staining intensities in different follicles of the ovary. Data are represented as the mean \pm standard error of the mean. * $P < 0.05$ using the Mann-Whitney U-test.