

＜ ナノポア解析による子宮内膜脱落膜化の統合的理解 ＞

研究年度 令和4年度

研究期間 令和4年度～ 令和6年度

研究代表者名 田中進

共同研究者名 岡田英孝、村田紘未

1. はじめに

ヒト子宮内膜が脱落膜へと分化することにより受精卵の着床と妊娠の維持が可能となる。この脱落膜化は排卵後の卵巣黄体が分泌するプロゲステロンにより促進され、子宮内膜に含まれる脱落膜化した間質細胞 (Endometrial Stromal cells; EnSC) が IL15 ならびに GAL9 を合成・分泌し、それらが子宮特異的 NK 細胞の分化と抗炎症を促し、子宮内膜は免疫寛容 (胚受容能) を獲得する。一方、脱落膜化の異常が着床不全や不育症をもたらすことが知られているが、その発症機序は明らかではなく、そのため治療法も確立されていない。EnSC の脱落膜化プロセスを知るためのアプローチとして、網羅的遺伝子発現解析により脱落膜化に伴い変化する遺伝子群から推測する方法があるが、逆転写/増幅プロセス/ハイブリッドステップ/アダプター等の付加/光学系の検出といったバイアスステップを無視することができず、生理的な状態を捉えているとは言い難いのが現状である。そこで本研究では、これらステップを用いず RNA を RNA のまま塩基配列を決定する

ことが可能であるナノポアシーケンス技術 (図1) を用いて子宮内膜脱落膜化の新規分化機構や新規の機能を同定し、その理解を統合的に深めることを目的とする。この新たな

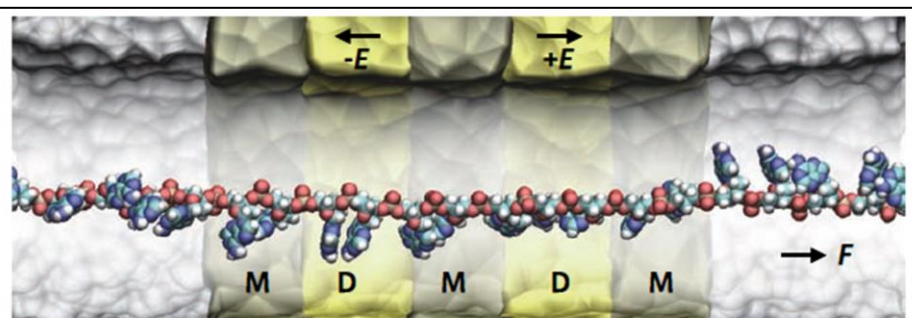


図1：Nanopore内 (DNA一本が通れる程度の穴) に誘電体 (D) により電場 (E) を作成し、核酸 (負の電荷) を一塩基ずつ通す。その時に生じる電場の揺れ (ポアサイズがAGCTそれぞれにより変化する) を検出し塩基配列を決定する。

原理的には未処理の染色体一本を丸々読める。

統合的理解によって、周産期分野を発展させ、妊孕性の向上と女性の健康維持を後押しすることが可能となる。

2. 研究内容

- 2-1. 脱落膜化 EnSC の作成：正常月経周期のある女性 (35 歳～48 歳) から採取した子宮内膜より RNA を抽出する。初代培養ヒト子宮内膜間質細胞を 12 日間エストロゲンとプロゲステロンで処理することにより脱落膜化を誘導し、各 10 検体程度をプールする。
- 2-2. 遺伝子発現プロファイル作成：培養 EnSC から抽出した RNA を用いてナノポアシーケンスにより遺伝子発現プロファイルを作成し、脱落膜化にともない発現が変化する遺伝子群を同定する。遺伝子発現プロファイルの作成にあたり、Minimap2 (long read 用に modify) でのマッピング、FeatureCounts でのリードカウント、Reads per Gene per 10k reads での補

正、ならびに edgeR での発現変動遺伝子を抽出（FDR<0.01 のものを有意とした）を行った（参考文献 1-6）。

3. 研究成果

ナノポア解析により、既知の発現変動遺伝子とともに報告の無い未知の発現変動遺伝子を複数個同定した（図2）。ナノポア解析においても脱落膜化のマーカーとしてもよく知られる IGFBP1 の発現上昇が確認された。

4. おわりに

本研究により、新規に脱落膜化に伴い人子宮内膜で発現変動する遺伝子を同定することが出来た。今後は、ヒト子宮内膜での発現変化の確認、遺伝子破壊による脱落膜化への関与、変異体での検討、周産期合併症患者での検討を行い、脱落膜化への関与を検討する。

5. 参考文献

1. Li H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* (Oxford, England), 34(18), 3094–3100. 【minimap2】
2. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* (Oxford, England), 25(16), 2078–2079.
3. Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(7), 923–930. 【featureCounts】
4. Byrne, A., Beaudin, A. E., Olsen, H. E., Jain, M., Cole, C., Palmer, T., DuBois, R. M., Forsberg, E. C., Akeson, M., & Vollmers, C. (2017). Nanopore long-read RNAseq reveals widespread transcriptional variation among the surface receptors of individual B cells. *Nature communications*, 8, 16027. 【RPG10k】
5. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* (Oxford, England), 26(1), 139–140. 【edgeR】
6. McCarthy, D. J., Chen, Y., & Smyth, G. K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic acids research*, 40(10), 4288–4297. 【edgeR】

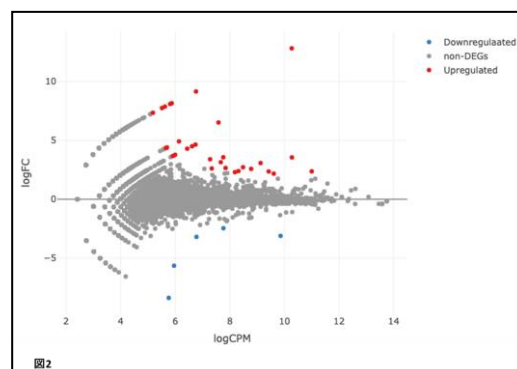


図2

図3: ナノポア解析によるIGFBP1のリードカウント

