

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462560

研究課題名(和文)ダイオキシンが子宮内膜症発症に関与する機序の解明

研究課題名(英文)The effects of dioxin on development of endometriosis

研究代表者

山縣 芳明(YAMAGATA, Yoshiaki)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30363120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症発症メカニズムの一端を明らかにする目的で、ダイオキシンに着目した。培養正所性子宮内膜間質細胞にダイオキシンを添加し、ゲノムワイドDNAメチル化プロファイル変化について検討を行ったが、有意な変化を認めなかった。一方でこれらの解析結果からメチロームはトランスクリプトームより各々の細胞の特質をより鋭敏に表すことを見いだした。本研究ではこのメチロームの性質を利用し、子宮内膜症の由来を探ることを試みた。子宮内膜症組織、正所性子宮内膜、正常卵巣などの組織、細胞をサンプルとしてゲノムワイドDNAメチル化プロファイル解析等を行った結果、卵巣子宮内膜症性嚢胞は卵巣由来で発生している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To reveal the mechanism of endometriosis development, the effect of dioxin on cultured eutopic endometrial stromal cells was first investigated. However, no significant effect was recognized by genome wide DNA methylation analysis. During the analysis we found that methyrome rather than transcriptome illustrate individual cell portraits clearly. To clarify the origins of endometriotic lesions, cluster analysis using methyrome data was secondarily conducted. Samples of ovarian endometriosis cells, eutopic endometrium, and normal ovarian cortex etc. were obtained. Extracted DNA was analyzed using HumanMethylation 27/450 followed by cluster analysis. The cluster dendrogram indicated endometriosis cells have similar features to ovary not to eutopic endometrium. These findings imply endometriotic cell in ovary derives from normal ovary.

研究分野：産科婦人科

キーワード：子宮内膜症 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は性成熟期婦人の約10%が罹患している比較的高頻度の婦人科疾患である。また昨今の初潮の早発化、晩婚化、少子化に伴い、子宮内膜症罹患率は増加している。子宮内膜症の発症機序に関しては、現在まで種々のアプローチがなされているものの、複雑な発症、病態生理を明瞭に説明できておらず、子宮内膜症がどの正常細胞に由来するのかについても不明である。一方、DNA塩基配列の変化は伴わずに、DNAメチル化やヒストン修飾の変化によって遺伝子発現が変化する現象が知られており、その異常は各種疾患と密接な関係があることが示唆されている。このエピジェネティックな修飾は、特定の細胞外環境に影響を受ける事が報告されており、ある種の環境刺激が子宮内膜症発症の引き金となっている可能性がある。子宮内膜症発症に関連する環境因子を同定することは容易ではないが、以前より環境ホルモンであるダイオキシン

(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD))は子宮内膜症発症との関連性が注目されてきた。アカゲザルへのTCDDの投与が高頻度に子宮内膜症を発症するという報告(Rier SE, Fundam Appl Toxicol, 1993)、TCDDによるprogesterone hormone receptor発現の修飾(Igarashi TM, Fertil Steril, 2005)、腹水中のTCDD濃度が子宮内膜症患者では正常人に比べて有意に高い(Cai LY, Hum Reprod, 2011)等、TCDDと子宮内膜症の関連が示唆される一方で、TCDDに暴露された事件に関するコホート調査(Eskenazi B, Environ Health Perspect, 2002)や子宮内膜症患者の脂質中TCDD濃度の測定結果(厚生労働省班研究, 2005)からは、ヒトの子宮内膜症に対するTCDDの関与は否定的とされている。このようにヒトの子宮内膜症に対するTCDDの関与については、一定の見解は得られていない。しかし、例えば受精卵へのTCDD暴露はインプリント遺伝子のDNAメチル化状態を変化させることが報告されており(Wu Q, Biol Reprod, 2004)、TCDD暴露と疾患発症には我々の想像を超えた潜伏期間が存在する可能性がある。即ちTCDD暴露が特定の細胞におけるある遺伝子のepigenetic mutationを惹起し、細胞世代を大きく越えて、思春期以降の性ステロイドホルモン暴露後に、有害な細胞機能を新たに獲得する可能性も否定できない。このような視点から環境因子と子宮内膜症の関連について検討された報告は現在まで存在しない。

2. 研究の目的

本研究の本質的な目的は、子宮内膜症の発症メカニズムの一端を明らかにすることである。その中でも子宮内膜症との関与が疑われている代表的な環境因子である

TCDDが子宮内膜症発症に関与するのかどうかDNAメチル化の変化に着目し、その影響を検討する。またゲノムワイドDNAメチル化解析の特性を利用し、そもそも子宮内膜症細胞は本来あるどの正常細胞から発生しているのかという点を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)本研究は当該施設の倫理審査委員会の承認および書面による患者の同意を得て行われた。患者の初代子宮内膜間質細胞培養系にTCDDを添加後、細胞を回収し、DNAを抽出後、infinium法にてゲノムワイドDNAメチル化解析を行った。

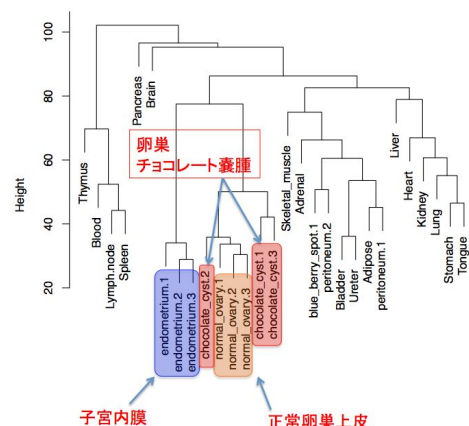
(2)卵巣チョコレート嚢腫組織(CHO)3例、正所性子宮内膜組織(EM)3例、正常卵巣皮質組織(OVA)3例を得て、infinium法を用い、ゲノムワイドDNAメチル化プロファイルを得た。次にGene Expression Omnibusよりヒト正常組織のゲノムワイドDNAメチル化データを得た後、データを統合し、クラスタ解析を実行した。NR5A1遺伝子によってコードされる転写因子SF1(stetoidogenic factor 1)は卵巣チョコレート嚢腫ではかなり高発現であり、子宮内膜症発症の初期段階からの関与が推測される。そこでCHO, EM, OVAのNR5A1遺伝子プロモーター領域(13 CpG)のDNAメチル化状態を知る目的でbisulfite sequence解析を行った。

4. 研究成果

(1)培養正所性子宮内膜間質細胞にTCDDを添加し、ゲノムワイドDNAメチル化プロファイル変化について、infinium法(Humanmethylation450k)を用いて検討を行った。予備検討を含め、様々な条件下で解析を試みたが、最終的に有意な変化は検出できなかった。しかし、このような一連の解析からゲノムワイドDNAメチル化情報はトランスクリプトームより細胞の特性を鋭敏に示すことが示された。

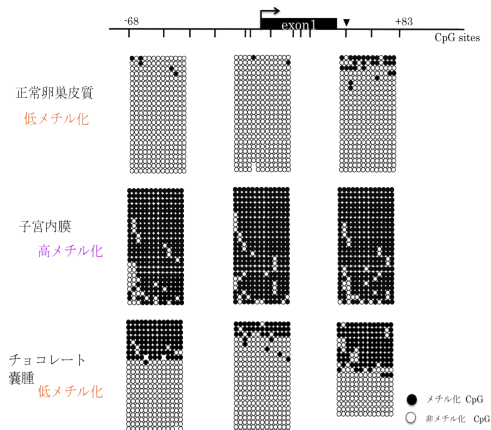
(2)ゲノムワイドDNAメチル化プロファイルを利用したクラスタ解析では、CHOはEMではなく、OVAに近い特徴を有することが判明した(図1)。

図1 ゲノムワイドDNAメチル化プロファイルを利用したクラスタ解析



NR5A1 遺伝子の bisulfite sequence 解析の結果、CHO は低メチル化優位状態、EM はほぼ完全なメチル化状態、OVA はほぼ完全な脱メチル化状態であった。即ち CHO の NR5A1 遺伝子は、EM より OVA に近い DNA メチル化プロファイルを有していた (図 2)。

図 2 NR5A1 遺伝子 DNA メチル化状態



本研究から子宮内膜症発症メカニズムに関して、環境因子 TCDD の関与について明確な根拠は得られなかった。一方で卵巣チョコレート嚢腫は卵巣由来の細胞で構成されている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Yamagata Y, Takaki E, Shinagawa M, Okada M, Jozaki K, Lee L, Sato S, Maekawa R, Taketani T, Asada H, Tamura H, Nakai A, Sugino N. Retinoic acid has the potential to suppress endometriosis development. *J Ovarian Res* 8:49, 2015. DOI: 10.1186/s13048-015-0179-6. 査読有

Yamagata Y, Nishino K, Takaki E, Sato S, Maekawa R, Nakai A, Sugino N. Genome-wide DNA methylation profiling in cultured eutopic and ectopic endometrial stromal cells. *PLoS One* 9(1):e83612, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0083612. 査読有

[学会発表](計 13 件)

山縣芳明 ゲノムワイド DNA メチル化解析からみた子宮内膜症の由来 第 9 回日本エピジェネティクス研究会 2015.5.26. 東京一ツ橋学術総合センター (東京都千代田区)

Yamagata Y. The origin of

endometriosis based on genome wide DNA methylation analysis. Society of Endometriosis and Uterine Disorder Congress 2015. 2015.5.9. Paris Marriott Rive Gauche Hotel & Conference Center (Paris, France)

山縣芳明 ゲノムワイド DNA メチル化解析からみた卵巣子宮内膜症性嚢胞の由来 第 36 回日本エンドメトリオーシス学会 2015.1.18. ハイアットリージェンシー東京 (東京都新宿区)

山縣芳明 子宮内膜症に対するレチノール酸の効果 第 59 回生殖医学会 2014.12.5. 京王プラザホテル (東京都新宿区)

山縣芳明 子宮内膜症におけるレチノール酸代謝関連遺伝子の DNA メチル化異常とレチノール酸の効果 第 59 回日本人類遺伝学会 2014.11.21. タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

Yamagata Y. The Effects of Retinoic Acid on Cultured Endometrial Stromal Cells. 3rd Asian Conference on Endometriosis. 2014.10.24. The Catholic University of Korea (Seoul, South Korea)

山縣芳明 子宮筋腫と子宮内膜症のゲノムワイド DNA メチル化異常 第 15 回子宮筋層・内膜症病変生検研究会 2014.7.18. ホテル東日本宇都宮 (栃木県宇都宮市)

山縣芳明 子宮内膜症発症・進展における DNA メチル化異常の関与 第 66 回日本産科婦人科学会 2014.4.20. 東京国際フォーラム (東京都千代田区)

山縣芳明 子宮内膜症発症・進展における DNA メチル化異常の関与 第 35 回日本エンドメトリオーシス学会 2014.1.25. 城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市)

山縣芳明 卵巣子宮内膜症性嚢胞における STRA6 と HSD17B2 遺伝子 mRNA 発現と DNA メチル化解析 第 58 回日本人類遺伝学会 2013.11.21. 江陽グランドホテル (宮城県仙台市)

山縣芳明 子宮内膜症のレチノール酸代謝異常に関する研究 第 58 回生殖医学会 2013.11.15. 神戸国際会議場 兵庫県神戸市

Yamagata Y. Genome-wide DNA methylation profiling in cultured eutopic and ectopic endometrial stromal cells. 29th Annual Meeting of the ESHRE

2013.7.10. ExCeL London (London, UK)

山縣芳明 卵巣子宮内膜症性嚢胞における STRA6 と HSD17B2 遺伝子 mRNA 発現と DNA メチル化解析 第 65 回日本産科婦人科学会 2013.5.10. ロイトン札幌 (北海道札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山縣 芳明 (YAMAGATA, Yoshiaki)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 : 30363120