

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861335

研究課題名(和文) 子宮内膜症におけるアポトーシス受容体DR6の発現低下と病態形成への関与

研究課題名(英文) attenuated DR6 expression in endometriosis

研究代表者

甲斐 健太郎 (KAI, Kentaro)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90457622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣子宮内膜症間質細胞とそのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤刺激群(バルプロ酸)とを比較したcDNAマイクロアレイによって抽出されたdeath receptor (DR) 6について子宮内膜症の病態形成への関与を検討した。対照群には正常子宮内膜間質細胞を用いた。DR6タンパクおよびmRNAの発現は卵巣子宮内膜間質細胞で低下していた。バルプロ酸刺激でDR6プロモーター領域ヒストンH4のアセチル化が起こり、卵巣子宮内膜間質細胞におけるDR6タンパク発現は増強した。正常子宮内膜間質細胞のDR6遺伝子のノックダウンによって、細胞増殖亢進及びアポトーシス耐性が認められた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to evaluate the involvement of death receptor (DR) 6 in the pathogenesis of endometriosis. Endometriotic cyst stromal cells (ECSCs) and normal endometrial stromal cells (NESC) were isolated from ovarian endometriotic tissues and the eutopic endometrial tissues. The expression of DR6 mRNA and protein in ECSCs and NESC were also examined. DR6 expression was attenuated in ECSCs and in endometriotic tissues, and its expression was upregulated by VPA stimulation. VPA treatment resulted in an accumulation of acetylated histone H4 in the promoter region of the DR6 gene. DR6 knockdown directed the stimulation of cell proliferation and the resistance to apoptosis in NESC. The present findings suggested that DR6 is involved in the pathogenesis of endometriosis by creating the proliferative and anti-apoptotic characteristics of endometriosis. The results also suggest that histone deacetylase inhibitors are promising agents for the treatment of endometriosis.

研究分野：産婦人科学

キーワード：生殖内分泌学 子宮内膜症 DR6 エピジェネティクス ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 アポトーシス 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

(1)子宮内膜症は妊娠可能女性の約 10%に発症する、子宮内膜が子宮外で増殖する良性疾患である。卵巣では卵巣子宮内膜症性嚢胞と呼ばれる腫瘍が発生し、月経困難症や不妊の原因になる。我々はこの卵巣子宮内膜間質細胞の二次元培養に成功し、正常子宮内膜間質細胞を対照とした実験系を確立した。

(2)健常女性では、月経時に腹腔内に逆流した子宮内膜細胞はアポトーシスに陥る。しかし子宮内膜症では、アポトーシスに陥る細胞が減少し異所性に子宮内膜細胞が生存・生着し、子宮内膜症が発生すると考えられる。したがって、子宮内膜症における異所性子宮内膜細胞の増殖能並びに生存能の亢進(アポトーシス耐性)のメカニズムが、子宮内膜症の病態解明に必須である。

(3)子宮内膜症の発症に関与する遺伝子変異の報告はあるが、いずれも表現型への寄与は小さい。そこで我々は、子宮内膜症の発症にエピジェネティック機構の異常が関与するとの仮説を立てた。エピジェネティック機構とは、DNA のメチル化やクロマチンの再構築を介して生じる遺伝子の発現制御機構である。クロマチンの再構築は、ヒストンの翻訳後修飾によって生じ、アセチル化・メチル化・ユビキチン化・リン酸化などがあり、これにより DNA の一次配列の変化を伴わない遺伝情報の発現制御が行われていると考えられている。我々は、ヒストンの脱アセチル化によって発現低下する遺伝子が、異所性子宮内膜細胞のアポトーシス耐性を惹起し、子宮内膜症の発症と病勢進行に関わる可能性を考え、培養卵巣子宮内膜間質細胞(endometriotic cyst stromal cells: ECSCs)に脱アセチル化酵素阻害剤(バルプロ酸)を添加し、発現が亢進する遺伝子をマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析によって抽出した。この遺伝子群にアポトーシス受容体 Death Receptor (DR) 6 遺伝子が含まれていたことから、この DR6 がエピジェネティック異常によって発現低下し、異所性子宮内膜細胞のアポトーシスを妨げ、子宮内膜症の発症に関与するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

アポトーシス受容体 DR6 遺伝子が子宮内膜症の病態形成へ関与するかを検討する。

3. 研究の方法

(1)患者の同意を得て手術検体から採取した正常子宮内膜組織及び卵巣子宮内膜組織から、正常子宮内膜間質細胞(normal endometrial stromal cells: NESCs)及び卵巣子宮内膜間質細胞 ECSCs を分離培養した。

(2)正常子宮内膜間質細胞 NESCs に DR6 siRNA を導入し、遺伝子発現抑制を行った(ノック

ダウン)。DR6 遺伝子ノックダウンによって、アポトーシス刺激に対する耐性の獲得が起こるかどうかを、カスパーゼ 3/7 アッセイ及び細胞死 ELISA を用いて評価した。細胞増殖の評価については、生細胞数アッセイと BrdU 取り込みアッセイを行った。

4. 研究成果

(1)バルプロ酸処理によって DR6 mRNA 及びタンパクの発現は亢進した。これはマイクロアレイの結果と一致した。

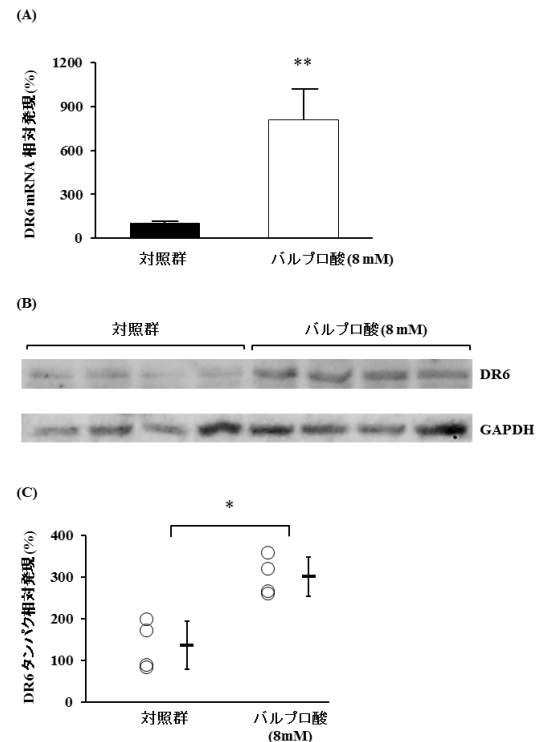
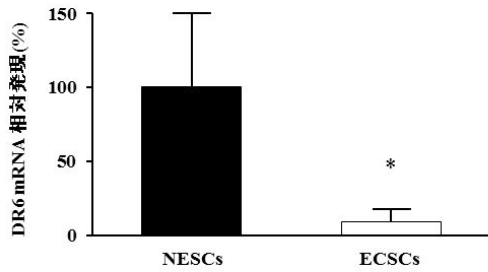


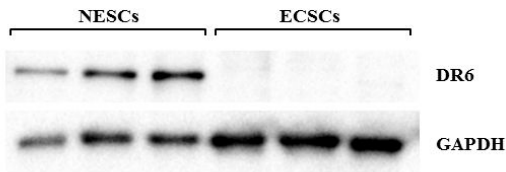
図 1 卵巣子宮内膜間質細胞 ECSCs におけるバルプロ酸処理による DR6 の発現変化

(2) DR6 mRNA 及びタンパクの発現は、正常子宮内膜間質細胞 NESCs では認められたが、卵巣子宮内膜間質細胞 ECSCs では認めなかった。

(A)



(B)



(C)

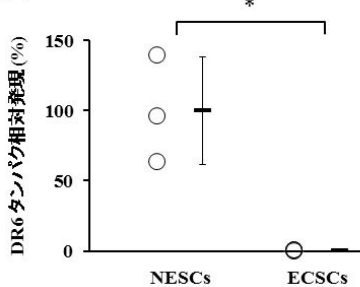


図2 正常子宮内膜間質細胞 NESCs、卵巣子宮内膜間質細胞 ECSCs における DR6 の発現比較

(3) DR6 タンパク発現は、正常子宮内膜組織においては、腺管上皮に強く間質細胞に中等度に、一方、卵巣子宮内膜組織においては、腺管上皮にも間質細胞にもわずかだった。

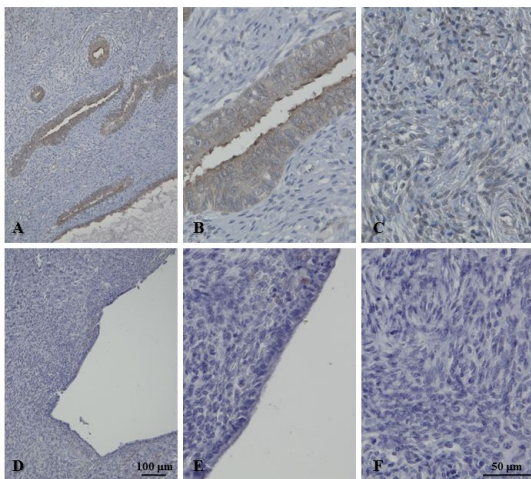


図3 組織切片を用いた免疫組織化学染色

(4) 無刺激の卵巣子宮内膜間質細胞 ECSCs では、DR6 プロモーター領域にアセチル化は認めなかった。一方、VPA 処理により、DR6 プロモーター領域ヒストン H4 のアセチル化を認めた。

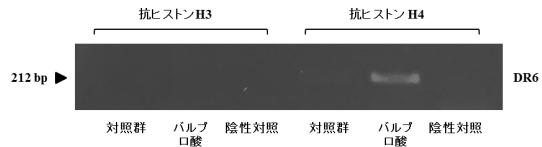
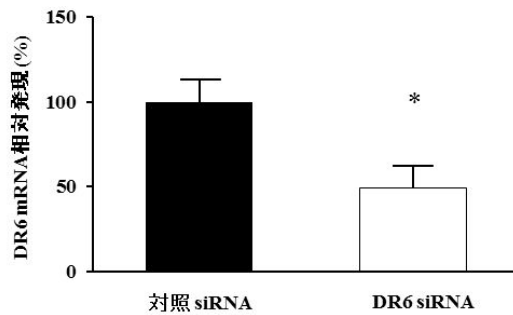


図4 卵巣子宮内膜間質細胞 ECSCs を用いたクロマチン免疫沈降法

(5) DR6 siRNA の導入によって、DR6 mRNA 及びタンパクの発現低下が確認された。対照群は control siRNA を導入した正常子宮内膜間質細胞 NESCs を用いた。

(A)



(B)

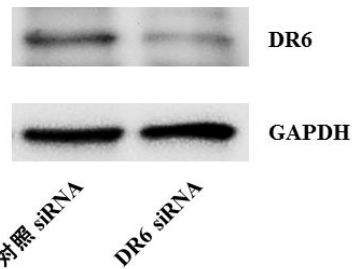


図5 DR6 をノックダウンした正常子宮内膜間質細胞 NESCs から抽出した mRNA 及びタンパクを用いた RT-PCR とウエスタンブロット

(6) DR6 のノックダウンによって、control siRNA 導入群に比較して、生細胞数の増加・細胞増殖の亢進を認めた。またアポトーシス経路の抑制・アポトーシス細胞数の減少を認めた。

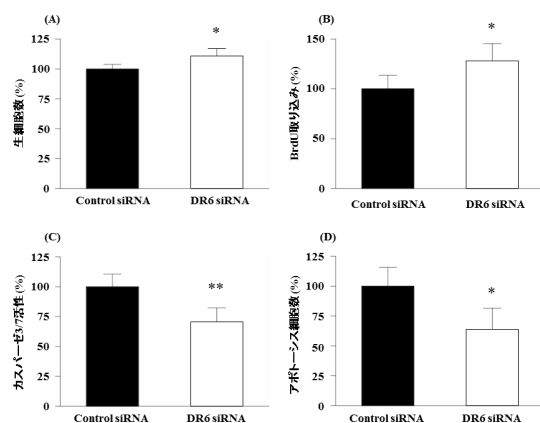


図 6 DR6 をノックダウンした正常子宮内膜間質細胞 NESCs を用いた生細胞数アッセイ (A) と細胞増殖 ELISA (B)、カスパーゼ 3/7 アッセイ (C)、細胞死 ELISA (D) の結果

(7) 以上から、DR6 タンパク及び mRNA の発現は、正常子宮内膜間質細胞 NESCs に比べ卵巣子宮内膜間質細胞 ECSCs でいずれも低下していた。同様に、DR6 タンパクの発現は、正常子宮内膜組織に比べ卵巣子宮内膜組織で低下していた。バルプロ酸刺激によって、DR6 プロモーター領域ヒストン H4 のアセチル化が起こり、卵巣子宮内膜間質細胞 ECSCs における DR6 タンパク発現は増強した。正常子宮内膜間質細胞 NESCs における DR6 遺伝子のノックダウンによって、細胞増殖亢進及びアポトーシス耐性が認められた。

引用文献

Nishida M, Nasu K, Fukuda J, Kawano Y, Narahara H, Miyakawa I: Down regulation of interleukin-1 receptor expression causes the dysregulated expression of CXC chemokines in endometriotic stromal cells: a possible mechanism for the altered immunological functions in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5094-5100.

Zhao H, Yan M, Wang H, Erickson S, Grewal IS, Dixit VM: Impaired c-Jun amino terminal kinase activity and T cell differentiation in death receptor 6-deficient mice. *J Exp Med* 2001; 194: 1441-1448.

Schmidt CS, Liu J, Zhang T, Song HY, Sandusky G, Mintze K, Benschop RJ, Glasebrook A, Yang DD, Na S: Enhanced

B cell expansion, survival, and humoral responses by targeting death receptor 6. *J Exp Med* 2003; 197: 51-62.

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3件)

Okamoto M, Nasu K, Abe W, Aoyagi Y, Kawano Y, Kai K, Moriyama M, Narahara H. Enhanced miR-210 expression promotes the pathogenesis of endometriosis through activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Hum Reprod*. 2015 Mar;30(3):632-41. doi: 10.1093/humrep/deu332. Epub 2014 Dec 15. PubMed PMID:25516558. 査読有り。

Hirakawa T, Nasu K, Kai K, Aoyagi Y, Ishii T, Uemura T, Yano M, Narahara H. Wisteria floribunda agglutinin-binding glycan expression is decreased in endometriomata. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 Oct 24;12:100. doi: 10.1186/1477-7827-12-100. PubMed PMID: 25344456; PubMed Central PMCID:PMC4219044. 査読有り。

Nasu K, Kawano Y, Kai K, Aoyagi Y, Abe W, Okamoto M, Narahara H. Aberrant histone modification in endometriosis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014 Jun 1;19:1202-14. Review. PubMed PMID: 24896345. 査読有り。

24896345. 査読有り。

24896345. 査読有り。

24896345. 査読有り。

[学会発表](計6件)

3rd Asian Conference of Endometriosis October 24-26, 2014. Songeui Medical Campus, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea. Death receptor 6 is epigenetically silenced by histone deacetylation in Endometriosis and Promotes the Pathogenesis of Endometriosis. Kentaro Kai, Kaei Nasu, Yoko Aoyagi, Yoshiyuki Tsukamoto, Naoki Hijiya, Mamiko Okamoto, Masatsugu Moriyama, Hisashi Narahara 第66回日本産科婦人科学会学術講演会 東京国際フォーラム(東京都千代田区) 2014年4月18-20日 Death receptor 6 is epigenetically silenced by histone deacetylation in endometriosis and promotes the pathogenesis of endometriosis. Kentaro Kai, Kaei Nasu, Yukie Kawano, Wakana Abe, Mamiko Okamoto, Hisashi Narahara 第59回日本人類遺伝学会 タワーホール 船堀(東京都江戸川区) 2014年11月19-22日 Death receptor 6 is epigenetically silenced by histone

deacetylation in endometriosis.
Kentaro Kai, Kaei Nasu, Yoko Aoyagi,
Yoshiyuki Tsukamoto, Naoki Hijiya,
Mamiko Okamoto, Masatsugu Moriyama,
Hisashi Narahara

第29回日本生殖免疫学会 伊藤国際学術
研究センター(東京都文京区) 2014
年12月12-13日 DR6 is epigenetically
involved in the pathogenesis of
endometriosis by creating the
proliferative and anti-apoptotic
characteristics. Kentaro Kai, Kaei
Nasu, Yoko Aoyagi, Yoshiyuki
Tsukamoto, Naoki Hijiya, Mamiko
Okamoto, Masatsugu Moriyama, Hisashi
Narahara

第34回日本エンドメトリーシス学会 栃
木県総合文化センター(栃木県宇都宮
市) 2014年1月18-19日 子宮内膜症
の病態形成におけるアポトーシス受容
体 DR6 の役割についての研究 甲斐健太
郎, 奈須家栄, 川野由紀枝, 阿部若菜,
岡本真実子, 榎原久司

IFFS/JSRM International Meeting 2015
in Yokohama Apr 25-29, 2015. パシフ
ィコ横浜(神奈川県横浜市) Death
Receptor 6 is Epigenetically Silenced
by Histone Deacetylation in
Endometriosis and Promotes the
Pathogenesis of Endometriosis.
Kentaro Kai, Kaei Nasu, Yoko Aoyagi,
Mamiko Okamoto, Hirakawa Tomoko,
Hisashi Narahara

[図書](計1件)

Nasu K, Kawano Y, Nishida M, Tsuno A, Yuge
A, Abe W, Kai K, Okamoto M, Narahara H.
Endometriosis: Pathogenesis and Treatment.
Harada T, editor. Tokyo, Japan: Springer;
2014. Chapter 16, Potential new drugs for
endometriosis: experimental evidence.;
p.235-49. 468p.

6. 研究組織

(1)研究代表者

甲斐 健太郎 (KAI Kentaro)
大分大学産科婦人科・客員研究員
研究者番号: 90457622