

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2006～2008
課題番号：18591800
研究課題名 (和文) 子宮内膜症におけるアロマターゼ遺伝子のメチル化修飾による発現制御基盤の解析
研究課題名 (英文) Molecular basis of methylation-dependent expression of aromatase gene in endometriosis
研究代表者 伊沢 正郎 (IZAWA MASAO)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号：50032222

研究成果の概要：

「子宮内膜症細胞にアロマターゼ遺伝子高発現をもたらす分子基盤にはエピジェネティクス制御が関与する」との仮説の検証を通して、子宮内膜症の高濃度エストロゲン環境を生じる分子基盤の解明をめざした。本研究により、子宮内膜症細胞におけるアロマターゼ遺伝子高発現の分子基盤をエピジェネティクス制御の観点より検証した結果、「子宮内膜症はエピジェネティクス制御異常病」という疾患概念への突破口となる新たな知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	570,000	4,070,000

研究分野：生殖内分泌学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：(1)子宮内膜症 (2)アロマターゼ遺伝子 (3)遺伝子高発現 (4)エピジェネティクス制御異常 (5)CpG アイランド (6)DNA 脱メチル化 (7)エストロゲン産生異常 (8)アポトーシス抵抗性

1. 研究開始当初の背景

私共は、独自に確立した子宮内膜症組織由来間質細胞初代培養(以下「子宮内膜症細胞」と略す)をモデルとして子宮内膜症病態の解析を推進している。本研究計画は、子宮内膜症病態の特質の一つであるアロマターゼ遺伝子の高発現に起因する高濃度エストロゲン環境の分子基盤を明らかにすることを最終目標とする。最近、子宮

内膜症細胞におけるアロマターゼ発現がエピジェネティクス制御(塩基配列の変化によらないで、DNAメチル化、ヒストン修飾により遺伝子発現を制御)に起因することを示唆する研究成果を得た(Izawa *et al.* 2004)。即ち、陰性対照(アロマターゼ遺伝子発現が検出限界以下)として用いた正常子宮内膜由来間質細胞初代培養(以下「子宮内膜細胞」と略す)をDNA脱メチル化処理することによりアロマターゼ遺伝

子発現が誘導されたのである。さらに重要なことは、そのアロマターゼ遺伝子発現が子宮内膜症細胞と同一のプロモーターに依存して誘導されたことである。

私共は、これらの予備研究成果にもとづいて、「子宮内膜症細胞にアロマターゼ遺伝子高発現をもたらす分子基盤にはエピジェネティクス制御が関与する」との仮説を立てた。

現在、検証可能な分子メカニズムは以下の①-③であった。

- ① アロマターゼ遺伝子内の抑制的に機能するシス作動性配列の脱メチル化による抑制解除。
- ② アロマターゼ遺伝子を活性化する転写関連因子遺伝子の脱メチル化に依存した発現誘導。
- ③ ①と②の両者が関与。

本研究計画は、上述の仮説の検証を通して、子宮内膜症の高濃度エストロゲン環境を生じる分子基盤の解明をめざす。

2. 研究の目的

上述の仮説にもとずき、「アロマターゼ遺伝子の抑制的に機能するシス作動性配列の脱メチル化による抑制解除」を検証する。子宮内膜症由来間質細胞初代培養(子宮内膜症細胞)と正常子宮内膜由来間質細胞初代培養(子宮内膜細胞)をモデルとして用い、アロマターゼ遺伝子発現の分子基盤をエピジェネティクス制御(脱メチル化)の観点より、以下の3点に焦点を絞り研究を推進する。

- ① アロマターゼ遺伝子の発現へ関与する CpG アイランドを想定しメチル化状態と発現の関連の比較検討。
- ② 子宮内膜症細胞脱と脱メチル化処理をした子宮内膜細胞におけるアロマターゼ遺伝子プロモーターの使用頻度と CpG アイランドのメチル化状況の比較検討。
- ③ ①、②で特定する CpG アイランドのシス作動性配列(エンハンサー、サイレンサーを含む)の機能解析。レポーターアッセイによる検討。

これらのアロマターゼ発現の分子基盤を解析により、「子宮内膜症はエピジェネティクス制御異常病」という新たな疾患概念へ至る可能性もある。

3. 研究の方法

(1) 子宮内膜症患者由来間質細胞初代培養(子宮内膜症細胞)と正常子宮内膜由来間質細胞初代培養(子宮内膜細胞)の調製：
独自に確立している手順に従い子宮内膜

症患者のチョコレート嚢胞と正常子宮内膜由来の間質細胞初代培養を調製し使用する。鳥取大学医学部附属病院女性診療科を受診し、同意の得られた子宮内膜症患者のチョコレート嚢胞と非子宮内膜症患者の正常子宮内膜より組織片を分離する。摘出組織をミンズ後、コラゲナーゼ処理とナイロンメッシュ濾過、遠心により粗細胞を得る。30分間の培養により接着細胞を選別分離する。これにより、98%以上の純度を有する間質細胞初代培養が得る。

(2) 子宮内膜症細胞と子宮内膜細胞におけるアロマターゼ転写物発現の検討：

子宮内膜症細胞と子宮内膜細胞におけるアロマターゼ転写物発現を RT-PCR により半定量する。

(3) 子宮内膜症細胞におけるアロマターゼ転写物発現に関与するプロモーターの検討：

アロマターゼ遺伝子配列上に報告のある7つの組織・細胞特異的な Exon I について、ExonI 特異的 RT-PCR サザン分析法を用いて、アクティブプロモーターを特定し、ダイレクトシーケンシングにより確定する。

(4) 子宮内膜細胞の脱メチル化処理によるアロマターゼ発現誘導の解析：

子宮内膜細胞を 5-azadeoxycytidine 処理することによりアロマターゼ遺伝子発現が誘導される。その分子基盤について、子宮内膜症細胞におけるアロマターゼ発現を陽性コントロールとして用い、発現に関与するアクティブプロモーターを同定する。ExonI 特異 RT-PCR サザン分析を用いる。5' -RACE 法による全長アロマターゼ転写物のクローニングとダイレクトシーケンシングにより ExonI を確定する。

(5) アロマターゼ発現制御へ関与する CpG アイランド配列の検索：

(3), (4)の研究により特定される ExonI のプロモーター配列に仮想上の CpG アイランドを CpG アイランドサーチャー (UC San Francisco) を用いて想定する。分離精製したジェノム DNA をメチレーション抵抗性制限酵素 (HhaI) とメチレーション特異制限酵素 (McrBC) による完全消化後、想定した CpG アイランド領域を PCR 増幅し、増幅の有無をアガロースゲル電気泳動により判定することにより仮想上の CpG アイランドのメチル化状況を知る。

(6) アロマターゼ発現制御へ関与する CpG アイランドの特定：

① (5)の結果をもとに、想定された CpG アイランド領域のジェノミック PCR 増幅断片をクローニングし塩基配列を決定する。

② 子宮内膜細胞 DNA、5-azadeoxycytidine 処理正常子宮内膜由来間質細胞 DNA、子宮

内膜症細胞 DNA をそれぞれ調製し 2 分する。一方はそのまま鋳型とし、他方は bisulfite 処理により非メチル化シトシンをチミンへ変換後、PCR 増幅へ供する。増幅産物をクローニング後、塩基配列を決定する。これにより、CpG アイランド内のメチル化シトシンの実体を知る。

(7) CpG アイランド配列の機能解析：

上記(6)の研究により特定される CpG アイランド配列を PCR 増幅分離後、メチル化酵素 SssI 処理により *in vitro* メチル化する。発現ルシフェラーゼベクター(プロモーター活性化用、エンハンサー活性化用)へクローニングする。COS-7、HeLa へ一過性導入発現し、レポーター発現を検討することにより、アロマターゼ遺伝子転写制御へ関与する CpG のメチル化・脱メチル化の意義が推定可能となる。

(8) Electro-mobility shift assay 法による CpG アイランド特異結合因子の検索：

(6)、(7)の研究により子宮内膜症細胞におけるアロマターゼ発現へ関与することが想定される CpG 配列をプローブとして、トランス作動性因子の検索を試みる。子宮内膜細胞、子宮内膜症細胞への遺伝子導入発現は困難であることからこの研究は重要なアプローチとなる。

以上の研究により、子宮内膜症細胞におけるアロマターゼ発現のエピジェネティック制御の概容が明らかとなり、次段階で検討する転写制御因子群の実体解明へ向けた重要な知見を得ることが期待される。

4. 研究成果

本研究は、「子宮内膜症細胞にアロマターゼ遺伝子高発現をもたらす分子基盤にエピジェネティクス制御の異常が関与する」との仮説のもとに、その検証を通して、子宮内膜症組織に高濃度エストロゲン環境を生じせしめる分子基盤の実体解明をめざしたものである。子宮内膜症由来間質細胞初代培養(子宮内膜症細胞)と正常子宮内膜由来間質細胞初代培養(子宮内膜細胞)をモデルとして用い、アロマターゼ遺伝子発現の実体を検証し以下の成果が得られた。

- (1) 子宮内膜症細胞にけるアロマターゼ高発現が *in vitro* で初めて証明された。
- (2) エピジェネティクス制御(DNA脱メチル化)の観点より研究を推進した結果、「子宮内膜症はエピジェネティクス制御異常病」という新たな疾患概念へつながる状況証拠を得た。
- (3) 子宮内膜症細胞にアロマターゼ遺伝子高発現をもたらすエピジェネティクス制御基盤について解析した結果、非プロモーター領域に位置する一つのCpGアイランド配列の脱メチル化を観察し、そのアロマターゼ遺伝子高発現との関連を示唆した。

(4) そのCpG配列はシス要素活性を有し、核内未定因子を特異的に認識し結合する。

(5) アロマターゼ遺伝子高発現に起因する局所高濃度エストロゲンとPKC活性化との関連を示唆する重要な観察が得た。

(6) エストロゲンと子宮内膜症細胞のアポトーシス抵抗性との関連について状況証拠を得た。

以上の研究成果は、トランスレーショナル研究として子宮内膜症病態と病因の解明へ向けて新たなブレイクスルーをもたらした。

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 5 件)

① Izawa M, Harada T, Deura I, Taniguchi F, Iwabe T, Terakawa N.

Drug-induced apoptosis was markedly attenuated in endometriotic stromal cells Human Reproduction 21, 600-6004, 2006

査読:有

② Harada T, Taniguchi F, Izawa M, Ohama Y, Takenaka Y, Tagashira Y, Ikeda A, Watanabe A, Iwabe T, Terakawa N.

Apoptosis and endometriosis Frontiers in Bioscience 12, 3140-3156, 2007

査読:有

③ Izawa M, Harada T, Taniguchi F, Ohama Y, Takenaka Y, Terakawa N.

An epigenetic disorder may cause aberrant expression of aromatase gene in endometriotic stromal cells Fertility and Sterility 89, 1390-1396, 2008

査読:有

④ Izawa M, Inoue M, Osaki M, Ito H, Harada T, Terakawa N, Ikeguchi M.

Cytochrome P450 aromatase gene (*CYP19*) expression in gastric cancer cells Gastric Cancer 11, 103-108, 2008

査読:有

⑤ Taniguchi F, Watanabe A, Izawa M, Harada T, Terakawa N.

Anti-apoptotic characteristics of endometriotic cells may provoke their abnormal survival World Endometriosis Society e-Journal 11, 6-8, 2009

査読:有

査読:有

[学会発表] (計 6 件)

① Izawa M, Harada T, Taniguchi F, Iwabe T, Terakawa N.

Epigenetic disorder and up-regulation of

aromatase gene in endometriotic cells.
The 89th Annual Meeting of Endocrine Society

2007年6月3日 Toronto, Canada

◎伊沢正郎、原田省、谷口文紀、岩部富夫、寺川直樹

子宮内膜症細胞におけるアロマターゼ発現とエピジェネティック制御異常

第80回日本内分泌学会総会

2007年6月14日東京

◎Izawa M, Osaki M, Ito H, Terakawa N, Ikeguchi M.

Cytochrome P450 aromatase gene (*CYP19*) expression in gastric cancer.

67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association

2008年10月28日 名古屋

◎Izawa M, Inoue M, Osaki M, Ito H, Harada T, Terakawa N, Ikeguchi M.

Intracrine estrogen secretion in gastric cancer: a role in the PKC-dependent resistance to apoptosis.

The 90th Annual Meeting of Endocrine Society

2008年6月15日 San Francisco, USA

◎Watanabe A, Taniguchi F, Harada T, Iwabe T, Izawa M, Terakawa N.

Aberrant survivin expression may cause resistance to drug-induced apoptosis in human endometriotic stromal cells.

The 90th Annual Meeting of Endocrine Society

2008年6月16日 San Francisco, USA

◎伊沢正郎、原田省、谷口文紀、岩部富夫、寺川直樹

子宮内膜症細胞におけるアロマターゼ遺伝子高発現に関するエピジェネティック制御基盤：非プロモーター領域 CpG 配列脱メチル化の検証

第13回日本生殖内分泌学会

2008年11月29日大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊沢 正郎 (IZAWA MASAO)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：50032222

(2) 研究分担者

原田 省 (HARADA TASUKU)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：40218649

(3) 研究分担者

寺川 直樹 (TERAKAWA NAOKI)

鳥取大学・名誉教授

研究者番号：90163906