

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591824

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エピゲノム修飾解析による早期診断法の開発

研究課題名(英文) Epigenetic analysis of aromatase gene toward the advanced early diagnostics in endometriosis

研究代表者

伊澤 正郎 (IZAWA, Masao)

鳥取大学・医学部・特任教授

研究者番号：50032222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：先に、子宮内膜症組織に高濃度エストロゲン環境をもたらすアロマターゼ発現と、アロマターゼ遺伝子のメチル化異常との関連を示唆した(Izawa et al. 2008)。この観察は、子宮内膜症におけるゲノムワイドDNAメチル化の異常を示唆する。本研究では、子宮内膜症の早期診断分子マーカーの開発を念頭に、アロマターゼ遺伝子のメチル化異常を手掛かりとして、子宮内膜症に特徴的なゲノムワイドDNAメチル化の実体を検証した。その結果、早期診断分子マーカー候補となるDNAメチル化領域1800の選別抽出に成功した。これらの候補領域の中から、症例検証による最終的絞り込みが進行中である。

研究成果の概要(英文)：A marked up-regulation of aromatase gene leading to a high estrogen environment in endometriotic tissues has been suggested as the aberrant DNA methylation (Izawa et al. 2008). The observation further suggested the aberrant genome-wide DNA methylation in endometriosis. Toward the advanced early diagnostics in endometriosis, we challenged a genome-wide extraction of aberrant DNA methylation along with the epigenetic analysis of aromatase gene. We finally extracted approximately 1800 CpG sites as the candidates for early diagnostic markers in endometriosis. Case studies are under way toward the final extraction of these candidates.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産科婦人科学

キーワード：子宮内膜症 エストロゲン産生異常 アロマターゼ遺伝子 CpGアイランド DNAメチル化 エピゲノム異常 早期診断分子マーカー

1. 研究開始当初の背景

アロマターゼ遺伝子の高発現は、子宮内膜症病変組織に高濃度エストロゲン環境をもたらす。その一因は、エピゲノム制御の異常、とりわけ DNA メチル化の異常に起因すると考えられる (Izawa *et al.* 2008)。

本研究課題は、アロマターゼ遺伝子高発現を賦与する DNA メチル化異常の実体の解明を手がかりとして、子宮内膜症病態をエピゲノム修飾の視点から理解し、早期診断法の応用開発へ向けた分子基盤を整えることを目標とした。

2. 研究の目的

アロマターゼ遺伝子高発現を賦与する DNA メチル化の実体解明のために、①アロマターゼ遺伝子エクソン 1 上流 20kb に想定された CpG アイランド配列(以下「CpG#1 配列」と略す)に注目して、アロマターゼ遺伝子活性化と CpG#1 配列のメチル化状況との関連について、以下の2点に焦点を絞り、研究を実施した。

- (1) 子宮内膜症細胞の CpG#1 配列メチル化状況の検証。
- (2) CpG#1 配列に想定されるエンハンサー活性と核内結合因子の検証。

さらに、当初の(1)、(2)の研究過程で、子宮内膜症細胞における DNA メチル化の全容を検証することが重要課題となり、網羅的メチル化解析による検証を追加実施した。

これらの研究は、子宮内膜症病変組織にアロマターゼ遺伝子高発現を賦与する DNA メチル化修飾を手掛かりとして、子宮内膜症に特徴的なゲノム DNA メチル化を特定し、早期診断分子マーカーの開発へつなげることを目的とした。

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：
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、モデルシステムとして使用する。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。98%以上の純度を有する間質細胞初代培養を得る。

(2) 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 qRT-PCR により定量する。

(3) 子宮内膜症細胞におけるアロマターゼ高発現への関与が想定される CpG#1 配列のメチル化状況の解析：

CpG#1 のメチル化状況を、メチル化抵抗性酵素(HhaI)とメチル化特異酵素(McrBC)による消化と Bisulfite 法により検討する。

(4) CpG#1 配列のエンハンサー活性解析：

CpG#1 配列を発現ルシフェラーゼベクター(エンハンサー活性用)へクローニング後、COS-7、子宮内膜細胞、子宮内膜症細胞へ一過性導入発現してレポーター分析を行う。CpG#1 配列メチル化の影響を検討する。

(5) EMSA 法による CpG#1 配列への特異結合因子検索：

CpG#1 配列をプローブとして、子宮内膜細胞、子宮内膜症細胞より核抽出物を調製して核内因子の検索を試みる。平行して、ChIP アッセイを試みる。

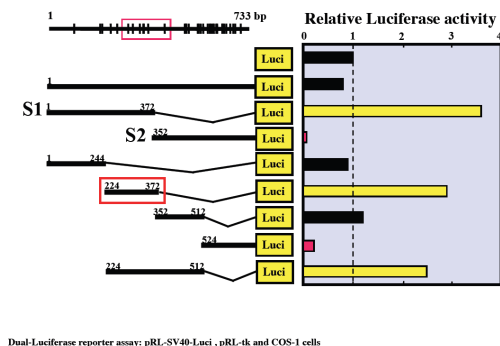
(6) 網羅的ゲノム DNA メチル化解析：

イルミナ 450 メチル化アレイにより、子宮内膜症細胞に特徴的な CpG 配列の選別抽出を実施する。

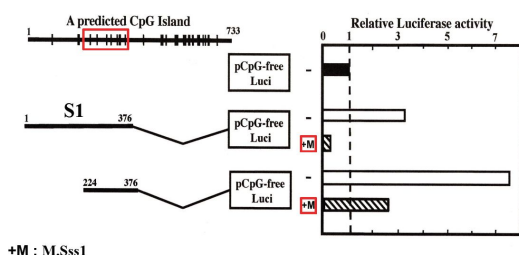
4. 研究成果

(1)アロマターゼ遺伝子第2エクソン上流の 20kb に位置する CpG#1 配列は、子宮内膜細胞ではメチル化されているが、子宮内膜症細胞ではメチル化は観察されない。

(2) エンハンサー活性は、CpG#1 配列の上流に位置し、その下流に位置するサイレンサーとタンデムに繋がっている。この状態でエンハンサー活性は陰性であった。

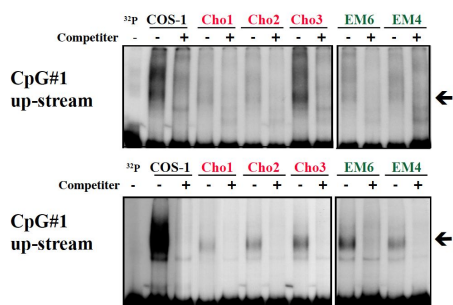


(3) CpG#1 配列のエンハンサー活性はメチル化修飾により抑制された。

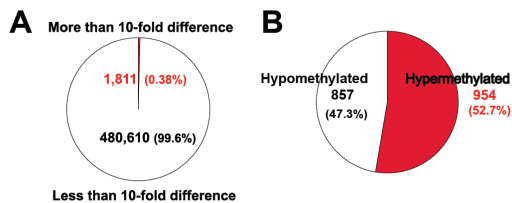


(4) CpG#1 配列は、*in vitro* で子宮内膜症細胞と子宮内膜細胞の核内因子を配列特異的に認識し結合した(EMSA)。結合因子の実体解明は、新たな重要検討課題となった。

EMSA: Nuclear factor(s) in endometriotic and endometrial cells



(5) ChIP アッセイにより、CpG#1 配列が、子宮内膜細胞内でメチル化特異結合タンパクにより認識結合されていることを明らかにした。子宮内膜症細胞での結合は陰性であった。
 (6) 網羅的ゲノム DNA メチル化解析により、子宮内膜症細胞に特徴的なメチル化配列、1811CpGs (A), Hypo-メチル化配列 857、Hyper-メチル化配列 954 (B)を抽出した。



(7)抽出した CpG 配列からプロモーターCpG 配列に焦点を絞り、選別された遺伝子について、DNA メチル化と発現の相関を検証した。

(8)子宮内膜症細胞におけるプロモーターCpG 配列脱メチル化を伴う複数の遺伝子発現亢進を観察した。現在、それらの分子的背景を検討中である。

子宮内膜症細胞におけるアロマターゼ遺伝子のエピゲノム修飾の解析を手掛かりとして、網羅的なメチル化解析を実施し、ゲノム DNA メチル化を新規の診断分子マーカーとして開発するためのロードマップを提案することが出来た。

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6件)

Taniguchi F, Higaki H, Izawa M, Azuma Y, Hirakawa E, Deura I, Iwabe T, Hata K and Harada T. The cellular inhibitor of apoptosis protein-2 is a possible target of novel treatment for endometriosis. *American Journal of Reproductive endocrinology* 71,278-285,2014 査読:有

Izawa M, Taniguchi F, Terakawa N and Harada T. Epigenetic aberration of gene expression in endometriosis. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed)* 5, 900-910,2013 査読:有

伊澤 正郎, 谷口 文紀, 寺川 直樹, 原田 省 子宮内膜症におけるアロマターゼ遺伝子発現とエピジェネティック制御 日本エンドメトリオーシス学

会誌 33,103-105, 2012

Izawa M, Taniguchi F, Terakawa N and Harada T. Genome-wide profiling of DNA methylation in endometriotic cells. Journal of Endometriosis 4, 147, 2012 査読:有

Izawa M, Taniguchi F, Uegaki T, Takai E, Iwabe T, Terakawa N and Harada T. Demethylation of a promoter-distal CpG island in the aromatase gene may cause the aberrant up-regulation in endometriotic tissues Fertil Steril 95, 33-39, 2011 査読:有

Taniguchi F, Kaponis A, Izawa M, Kiyama T, Deura I, Ito M, Iwabe T, Adonakis G, Terakawa N and Harada T. Apoptosis and endometriosis Frontiers in Bioscience 3, 648-662, 2011 査読:有

[学会発表](計12件)

伊澤 正郎、谷口 文紀、原田 省、子宮内膜症におけるアロマターゼ発現とエピゲノム異常、第86回日本生化学会シンポジウム、2013年9月13日、横浜市
Izawa M, Taniguchi F, Terakawa N and Harada T. DNA methylation profiles associated with aberrant gene expressions in endometriosis. The Endocrine Society Annual Meeting & Expo, June 17, 2013, San Francisco
Taniguchi F, Takai E, Izawa M, Terakawa N and Harada T. Parthenoide reduces cell proliferation and PGE2 synthesis in human endometriotic stromal cells and inhibits development of endometriosis in murine model. The Endocrine Society Annual Meeting & Expo, June 17, 2013, San Francisco

伊澤 正郎、谷口 文紀、原田 省、子宮内膜症に特異的なゲノムDNAメチル化修飾の検証、第17回日本生殖内分泌学会学術総会、2012年12月8日、東京都
伊澤 正郎、子宮内膜症におけるエスト

ロゲン受容体システム分子基盤解析、日本レチノイド研究会第23回学術集会、2012年11月20日、米子市

Izawa M, Taniguchi F and Harada T. Genome-wide profiling of DNA methylation in endometriotic cells. The 2nd Asian Conference on Endometriosis, November 10, 2012, Istanbul

Izawa M, Taniguchi F, Kiyama T, Terakawa N and Harada T. Re-Evaluation of estrogen receptor expression in endometriotic cells. The 94th Annual Meeting of Endocrine Society June 23, 2012, Houston

伊澤 正郎、原田 省、子宮内膜症におけるエストロゲン受容体システム分子基盤解析、第85回日本内分泌学会学術総会、2012年4月19日、名古屋市

Izawa M, Taniguchi F, Terakawa N and Harada T. A hypomethylated CpG island in the aromatase gene may cause up-regulation in endometriotic cells. The 11th World Congress on Endometriosis September 6, 2011, Montpellier

Izawa M, Taniguchi F, Iwabe T, Terakawa N and Harada T. A hypomethylated CpG island in the aromatase gene may cause up-regulation in endometriotic cells. The 93rd Annual Meeting of Endocrine Society June 6, 2011, Boston

Izawa M, Taniguchi F and Harada T. Epigenetic disorder and up-regulation of aromatase gene in endometriotic cells. The 1st Asian Conference on Endometriosis October 16, 2010, Shanghai

伊澤正郎、原田省、谷口文紀、岩部富夫、寺川直樹、子宮内膜症間質細胞におけるアロマターゼ遺伝子のエピゲノム障害：非プロモーター領域CpGの異常な脱メチル化、第4回日本エピジェネティクス研究会、2010年5月27日、米子市

〔図書〕(計1件)

Izawa M, Taniguchi F and Harada T.
Springer,
Epigenetics in endometriosis
(in endometriosis-pathogenesis and
treatment) 2014 印刷中

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊澤 正郎 (IZAWA Masao)
鳥取大学・医学部・特任教授
研究者番号：50032222

(2)研究分担者

谷口 文紀 (TANIGUCHI Fuminori)
鳥取大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40322218

(3) 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