

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 2 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340038

研究課題名(和文) エストロゲン非依存的細胞増殖に寄与するエピジェネティックスイッチの解析

研究課題名(英文) Analysis of an epigenetic switch leading to estrogen-independent cell proliferation

研究代表者

和田 忠士 (Wada, Tadashi)

大阪大学・工学研究科 ・特任教授(常勤)

研究者番号：60262309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス新生仔を合成エストロゲン diethylstilbestrol (DES) で処理すると、膣上皮部分の肥厚化が観察される。本研究により我々は、炎症反応に深く関与する転写因子の活性化がDES処理により生じている可能性を示した。よって、DES依存的な膣上皮の肥厚化は、炎症反応と関係しているのかもしれない。また、CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) 解析によりある種の non-coding RNA の発現上昇がマウスの新生仔期のDES処理により生じていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Neonatal exposure of DES induced persistent hyperplasia of epithelial cells in the vagina of mice. In this study, we showed that inflammatory transcription factor is likely to be activated by neonatally DES exposure, suggesting that DES-dependent hyperplasia may be associated with inflammatory reactions. In addition, CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) analysis revealed that increased expression of certain non-coding RNAs was observed by the DES-exposure at the neonatal stage of mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：エストロゲン 膣 DES 女性ホルモン 遺伝子 転写

1. 研究開始当初の背景

我々は、ヒト培養細胞やミジンコ、ゼブラフィッシュ、あるいはマウスを実験動物として、細胞や個体に影響を及ぼす低分子化合物の影響を分子レベルで理解する試み、いわゆるケミカルバイオロジーを実践してきた。その成果は、遺伝子発現過程の転写や翻訳の制御機構の解明、細胞の分化制御メカニズムの解明、がん化に至る分子メカニズムの解明や性決定の分子機構の解明に貢献するなど多方面で活かされている。これらの経験と実績をベースとして本研究課題では、化学物質が長期的に生物に及ぼす悪影響の実体を解明し、それを防止する対策を講じるための基礎となる情報を提供できるのではないかと考えた。そこで従来 of Developmental Origins of Health and Disease という概念を発展させる目的でマウス膈上皮組織を研究材料として、エピジェネティックスイッチに影響を与える低分子化合物、本研究では合成エストロゲン(DES)を材料として研究を実施した。一方、研究開始当初、ハーバード大学医学部の K. Struhl 博士らのグループでは、炎症状態からがん化に至る過程で作られる調節ループの形成を開始させるスイッチの存在を培養細胞で発見し、がん原遺伝子 c-Src 経由のシグナル伝達経路の活性化がスイッチの役割を果たしていることを報告していた。

成熟期の膈上皮組織のエストロゲン非依存的な増殖や角質化は、新生仔に 1 回の DES 投与では確立できず、生まれてから 5 日間で 5 回の連続した過度な DES 投与を実施する必要がある。これは、上皮細胞の運命維持に携わるメモリーを書き換えるためには、外部からの反復した過度な刺激が必要であることを示唆する。すなわち、エストロゲン非依存性の形質の獲得は、かなりしっかりとした変化であり、DES 投与を繰り返すことで徐々に不可逆性を確立するような反応、例えばフィードバックループ形成を想像させる。この点においては、細胞ががん化する過程で、外部からの反復した変異原の暴露により、その結果としてゲノム上に変異が積み重なり、がん化が進行することに類似している。

まとめると、DES の反復投与による過度の刺激により新規の調節サーキットの確立が生じ、その結果、メモリーの書き換えに見えるような現象が生じているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

発生の比較的初期段階で細胞の運命は決定される。その時期に細胞外から過度な刺激が加わると、細胞は本来の形質を変え、時間経過とともにがん化に至るケースがある。過度な刺激は、エピジェネティックスイッチに影響を与え、調節サーキット形成やクロマチンの物理・化学的な変化を引き起こす。本研究では、エストロゲンに依存した増殖と角質化を特徴とする成熟期のマウス膈上皮組織に焦点を当て、新生仔期の合成エストロゲン

(DES) 暴露がエストロゲン依存性の消失を招く分子機構の解明に挑戦する。胎児期の化学物質影響は、子供のアレルギー症や行動異常などの社会問題と絡む解決すべき危急の課題である。よって、本研究成果の早期還元は、健康な未来実現に欠くことのできない社会的効果を発揮する。

3. 研究の方法

DES の投与は、次の方法に従って実施した。生後 5 日までに毎日 1 回のペースで DES を 5 回マウスに投与する。コントロールとしてオイルを投与する。生後 46 日目にエストロゲンを産生する卵巣を除去する。生後 60 日目に膈を回収し、それぞれの実験の材料とした (neoDES あるいは neoOIL)。また、新生仔期に DES を投与しないで 46 日目に卵巣を除去したマウスを準備し、生後 60 日目に DES を投与して 1 日後に膈を回収した (AdDES)。

DES 投与で形成される調節サーキットやこれに関与する因子群の同定を実施し分子的考察を加えるため、DES 処理したマウス膈上皮細胞から RNA およびタンパク質を抽出して、RT-PCR 法で mRNA や non-coding RNA の解析を行い、ウエスタンブロット法、免疫沈降法やクロマチン免疫沈降法でタンパク質の量、化学修飾状態を検討した。

同時に膈上皮組織を回収して切片とし、色素による染色や免疫染色法を実施し顕微鏡下で細胞の形態、組織に含まれているタンパク質の量や分布を観察した。また、neoDES マウス、neoOIL マウス、AdDES マウス、AdOIL マウスの膈から全 RNA を回収し、non-coding RNA や mRNA のより詳細な発現解析を CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) 法により実施した。

4. 研究成果

種々の解析を行った結果、炎症性サイトカインの発現上昇が、新生仔期の DES 処理により成熟期の膈の細胞で観察された。背景で示したように細胞のがん化過程では c-Src 経由のシグナル伝達経路によりその下流の NF B の活性化が明らかになっている。実際、新生仔期の DES 処理を実施した成熟期の膈の細胞抽出液中では、リン酸化型 Src を検出することができた。さらに、免疫染色法により NF B のサブユニット p65 のリン酸化状態を観察すると、新生仔期の DES 処理により高頻度にリン酸化 p65 を検出することができた。しかし、再現性を見る必要があり、明確な結果とはなっていない。以上の結果から、膈上皮組織の肥厚化は DES 処理により誘導される炎症反応が関係する可能性が示唆された。

DES 処理や炎症反応、あるいは膈上皮組織の肥厚化と関係する遺伝子の発現を解析する目的で、CAGE 解析を実施した。CAGE では、キャップ構造が付加された RNA について、その転写開始部位の同定ができ、同時に発現量をゲノムワイドに測定することができる。本研究においては、RNA を提供するサンプルとして種々の状態のマウスを準備した。CAGE 解

析の結果、炎症反応に関係することが報告されているいくつかの遺伝子の mRNA の発現上昇が観察された。これに加えて、ある種の non-coding RNA の発現上昇が新生仔期の DES 処理により生じていることを見出した。興味深いことに、AdDES マウスから回収した臍由来の RNA 中ではその non-coding RNA 量は増加していなかった。よって成熟期の DES 処理では発現上昇しないことを考慮すると、新生仔期の DES 処理で発現誘導された non-coding RNA はエンハンサー-RNA として働いているのかもしれない。エンハンサー-プロモーター構造を誘導して、特定の遺伝子の発現に関与し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 1 件)

Ryohei Takata, Gouki Makado, Ayaka Kitamura, Hajime Watanabe, and Tadashi Wada, A novel dual lock method for down-regulation of genes, in which a target mRNA is captured at 2 independent positions by linked locked nucleic acid antisense oligonucleotides. RNA BIOLOGY. 査読有 Doi:10.1080/15476286. 2015. 1119364.

〔学会発表〕(計 4 件)

和田 忠土、北村 彩佳、石川 達也、山上 修平、真門 剛毅、渡邊 肇、細胞記憶のメカニズムを理解するためのモデルシステムとしての新生仔期 DES 処理マウスの臍上皮細胞、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Ryohei Takata, Gouki Makado, Ayaka Kitamura, Hajime Watanabe & Tadashi Wada, Combination of LNA antisense oligonucleotides complementary to 5' - and 3' - UTR ends of mRNA, RNA & Oligonucleotide Therapeutics, 2015 年 4 月 11 日, Cold Spring Harbor Laboratory (New York・USA)

Tadashi Wada, Ayaka Kitamura, Gouki Makado & Hajime Watanabe, Analysis of eRNA expression in the vagina of mice neonatally exposed to diethylstilbestrol, Mechanisms of Eukaryotic Transcription, 2015 年 8 月 28, Cold Spring Harbor Laboratory (New York・USA)

高田 遼平、竹田 圭、真門 剛毅、北村 彩佳、古久保 哲朗、渡邊 肇、和田 忠土、mRNA 3' 非翻訳領域 (UTR) の最末端配列を標的にした新規アンチセンス法、日本核酸医薬学会第 1 回年会、2015 年 12 月 1 日 京都テルサ (京都府・京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：翻訳抑制方法および翻訳抑制剤
発明者：和田 忠土、渡邊 肇、高田 遼平、真門 剛毅、北村 彩佳
権利者：国立大学法人大阪大学および株式会社陽進堂
種類：特許
番号：PCT / JP2015 / 086042
出願年月日：2015 年 12 月 24 日
国内外の別：国内

名称：遺伝子発現制御方法および遺伝子発現制御物質
発明者：和田忠土、渡邊肇、高田遼平、北村彩佳
権利者：国立大学法人大阪大学および株式会社陽進堂
種類：特許
番号：特願 2017-148706
出願年月日：2017 年 7 月 31 日
国内外の別：国内

取得状況 (計 1 件)

名称：mRNA の poly(A) 鎖および/または 3' 末端配列の一部を切断し、翻訳反応を抑制する技術
発明者：和田 忠土、竹田 圭、半田 宏
権利者：公立大学法人横浜市立大学、(株)陽進堂、国立大学法人東京工業大学
種類：特許
番号：特許第 5953617 号
取得年月日：平成 2016 年 6 月 24 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/yd/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 忠土 (WADA Tadashi)

大阪大学・大学院工学研究科・特任教授
研究者番号：60262309

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

渡邊 肇 (WATANABE Hajime)

大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：80212322

小根山 千歳 (ONEYAMA Chitose)
愛知県がんセンター研究所・感染腫瘍学
部・部長
研究者番号：90373208

(4)研究協力者

北村 彩佳 (KITAMURA Ayaka)
高田 遼平 (TAKATA Ryouhei)
真門 剛毅 (MAKADO Goki)