

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10670

研究課題名(和文) ゲノムDNAメチル化修飾を指標とする子宮内膜症の診断分子マーカーの探索

研究課題名(英文) Searching for diagnostic molecular markers of endometriosis using genomic DNA methylation modification as an indicator

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究は、子宮内膜症に特徴的ゲノムDNAメチル化修飾と遺伝子発現との関連を示唆している。本研究は、子宮内膜症細胞の網羅的DNAメチル化解析により同定した93遺伝子上に位置する1,811箇所のDNAメチル化修飾を手がかりに、診断分子マーカー候補遺伝子を絞り込むことを目的とした。主要な成績は、「子宮内膜症細胞に特徴的なエンハンサーのメチル化修飾が、子宮内膜症細胞に特徴的な遺伝子発現をもたらしている」ことを示唆する。子宮内膜症におけるエンハンサーのメチル化修飾の制御下にある遺伝子発現は、子宮内膜症の診断分子マーカー候補となる。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies have suggested a link between genomic DNA methylation modification and gene expression characteristic of endometriosis. The objective of this study was to narrow down the diagnostic molecule marker candidate genes using 1,811 DNA methylation modifications located on 93 genes identified by genome-wide DNA methylation analysis of endometriotic cells. The major results suggest that "methylation modification of enhancer characteristic of endometriotic cells results in gene expression characteristic of endometriotic cells". Gene expression under the control of methylation modification of the enhancer in endometriosis may become a diagnostic molecular marker candidate for endometriosis.

研究分野：生殖内分泌学 分子内分泌学

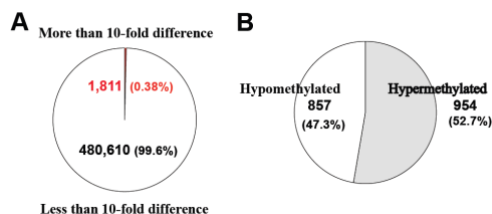
キーワード：子宮内膜症 疾患特異的DNAメチル化修飾 メチル化修飾依存性エンハンサー活性 疾患特異的遺伝子発現 診断分子マーカー

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症病変組織における高濃度エストロゲン環境の一因に、アロマターゼ遺伝子の高発現がある。私共は、この背景に子宮内膜症に特徴的なエピゲノム異常を想定し、遺伝子発現とリンクする DNA メチル化修飾の探索に着手した。この想定を支持すると思われる重要な観察は、アロマターゼ遺伝子発現が検出限界レベルである正所性子宮内膜細胞 (以下「内膜細胞」と略す) を DNA 脱メチル化剤で処理したところ、子宮内膜症細胞 (以下「内膜症細胞」と略す) と同一のプロモーターに依存したアロマターゼ遺伝子発現が誘導されたことである (Izawa *et al.* 2008)。そして、アロマターゼ遺伝子第 2 エキソン上流に、内膜症細胞に特徴的な脱メチル化領域が同定された (Izawa *et al.* 2011)。これらの成績は、内膜症細胞に特徴的なゲノム DNA メチル化修飾と遺伝子発現のリンクを示唆する。

以上の成績により、私共は「子宮内膜症に特徴的なゲノム DNA メチル化修飾とリンクする遺伝子発現」を想定し、その実体解明を目標に、内膜症細胞の網羅的ゲノム DNA メチル化解析に着手した。その結果、対照として用いた内膜細胞と比較し、10 倍以上のメチル化率の差異を有する内膜症細胞に特徴的な 93 遺伝子上のメチル化修飾 1811 箇所の抽出に成功した (図 1、Izawa *et al.* 2014)。このゲノム DNA メチル化情報は、本研究計画を実施するための重要な基盤情報である。

図 1 内膜症細胞に特徴的なゲノム DNA メチル化修飾



A: 内膜症細胞に特徴的なメチル化修飾 B: メチル化修飾の内訳

2. 研究の目的

「ゲノム DNA メチル化修飾を指標とする子宮内膜症の診断分子マーカーの探索」を目的

に、以下の 3 点に焦点を絞り研究を実施した。

- (1) 先行研究 (Izawa *et al.* 2014) により、内膜症細胞に特徴的なハイポメチル化領域を有することが観察された GATA6 遺伝子に着目した。内膜症細胞における GATA6 遺伝子のメチル化修飾と遺伝子発現との関連について、その背景にある分子基盤を検証した。
- (2) GATA6 遺伝子を除く、先行研究で抽出した 92 遺伝子上の DNA メチル化修飾 (Izawa *et al.* 2014) と遺伝子発現との相関を転写物発現により評価した。
- (3) ゲノム DNA メチル化修飾を、メチル化率、遺伝子発現との相関の有無により分類し、診断分子マーカーとしての特性を評価した。

3. 研究の方法

- (1) 子宮内膜症患者由来間質細胞初代培養 (内膜症細胞) と正常子宮内膜由来間質細胞初代培養 (内膜細胞) の調製: 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子宮内膜より組織片を分離し、確立している以下の手順に従い間質細胞初代培養を調製した。分離組織をミンズ後、コラゲナーゼ処理とナイロンメッシュ濾過、遠心分離により粗細胞を得て、30 分間の培養による接着細胞を回収した。これにより 98% 以上の純度を有する間質細胞初代培養を得た。
- (2) GATA6 遺伝子の発現解析: 内膜症細胞における GATA6 遺伝子の転写物発現を定量 PCR により評価した。同時に、組織・細胞特異的エキソンについて、エキソン特異的 PCR によりアクティブエキソンを検証した。さらに、GATA6 特異抗体を用いたウエスタン解析、免疫組織染色により発現状況を検証した。
- (3) GATA6 遺伝子ハイポメチル化領域のシス活性機能の検証: 内膜症細胞の GATA6 遺伝子内に同定したハイポメチル化領域にシス活性を想定し、ヒストン修飾抗体を用いた ChIP 解析により検証した。
- (4) GATA6 遺伝子を除く 92 遺伝子の内膜症細胞における遺伝子発現の実態の検証: 転写物発現とメチル化修飾 (メチル化率を含む) との相関の有無を検証し、診断分子マーカーとしての特性を評価した。

4. 研究成果

(1) GATA6 遺伝子の発現解析

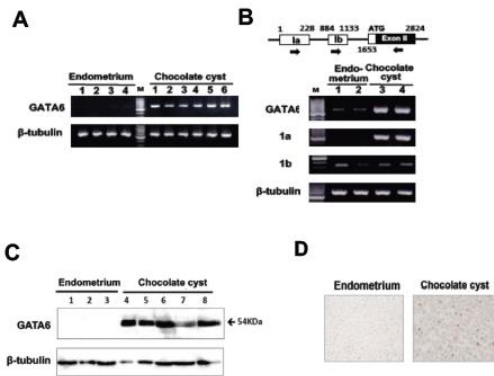
①GATA6 mRNA 発現は、内膜症細胞において高発現であったが、内膜細胞では検出限界レベル以下であった (図 2A)。

②内膜症細胞においては GATA6 1a プロモーター依存性 mRNA 発現が検出されたが、内膜細胞においては検出限界レベルであった (図 2B)。

③抗 GATA6 抗体を用いて内膜症細胞および内膜細胞のウェスタンブロット解析を実施した。野生型 GATA6 の発現は、内膜症細胞において検出されたが、内膜細胞では検出限界レベル以下であった (図 2C)。

④抗 GATA6 抗体を用いた免疫細胞化学染色により、内膜症細胞核に陽性染色像が観察された。内膜細胞は陰性であった (図 2D)。

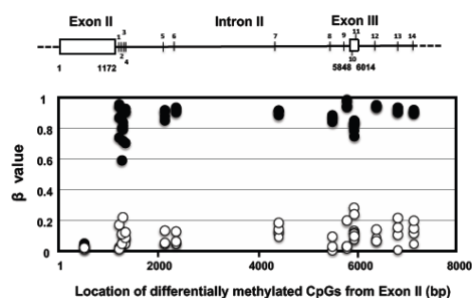
図 2 GATA6 遺伝子の発現解析



(2) 内膜症細胞に同定した GATA6 遺伝子ハイポメチル化領域のシス活性機能の検証

①GATA6 遺伝子のイントロン II からイントロン III の上流に位置する (図 3 上) CpGs のメチル化率は、内膜細胞で約 0.9 (●: ハイパーメチル化) であったのとは対照的に、内膜

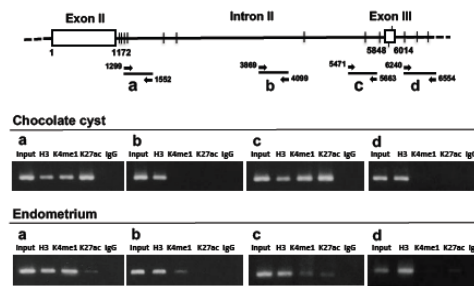
図 3 GATA6 遺伝子内のハイポメチル化領域



症細胞では約 0.1 (○: ハイポメチル化) であった (図 3 下)。

②GATA6 遺伝子メチル化領域 (図 3) の機能として、遺伝子発現を制御するシス作動性エレメントを想定し検証した。エンハンサーマークとして知られるヒストン修飾抗体を用いて ChIP 解析を実施した結果、内膜症細胞のハイポメチル化領域には活性型エンハンサー機能が示唆された (図 4 Chocolate cyst a と c)。内膜細胞では、抑制型エンハンサー機能が示唆された (図 4 Endometrium a と c)。

図 4 エンハンサーマークヒストン修飾抗体を用いた ChIP 解析



(3) GATA6 遺伝子を除く 92 遺伝子の内膜症細胞における遺伝子発現の実態の検証

転写物発現とメチル化修飾との関連の検証は進行中であるが、内膜症細胞に特徴的なメチル化修飾は、遺伝子発現の亢進または抑制と関連する群と関連を認めない群の 3 群に分類される成績が得られている。

本研究では、先行研究 (Izawa *et al.* 2014) で得られた内膜症細胞の網羅的ゲノム DNA メチル化情報を手掛かりに、「ゲノム DNA メチル化修飾を指標とする子宮内膜症の診断分子マーカーの探索」に挑戦した。本研究により、子宮内膜症に特徴的な遺伝子発現とリンクする DNA メチル化修飾を切り口として用いるストラテジーの実行性を確立した。次段階として、NGS を用いた網羅的検証を予定している。尚、本研究で得られた成績の概要は投稿中 (Izawa *et al.*) である。

<引用文献>

① Izawa M, Harada T, Ohama Y, Takenaka Y, F. Taniguchi F, Terakawa N.

An epigenetic disorder may cause aberrant expression of aromatase gene in endometriotic stromal cells. *Fertil Steril* 89, 1390-1396, 2008

② Izawa M, Taniguchi F, Uegaki T, Takai E, Iwabe T, Terakawa N, 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

③ Izawa M, Taniguchi F, Harada T.

Epigenetics in endometriosis.

(Endometriosis: pathogenesis and treatment, Harada eds. *Springer*) pp107-123, 2014

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

① Azuma Y, Taniguchi F, Nakamura K, Nagira K, Khine YM, Kiyama T, Uegaki T, Izawa M, Harada T.

Lipopolysaccharide promotes the development of murine endometriosis-like lesions via the nuclear factor-kappa B pathway.

Am J Reprod Immunol 77: e12631, 2017 査読有 DOI:10.1111/aji.12631.

② Izawa M, Taniguchi F, Harada T.

Molecular Background of Estrogen Receptor Gene Expression in Endometriotic Cells.

Reprod Sci 23: 871-876, 2016 査読有

[学会発表] (計9件)

① Izawa M, Harada T.

A Stretch of Hypomethylated Region in Aromatase Gene may Function as an Active Enhancer in Endometriotic Cells.

ENDO2018 Chicago March 17~20, 2018

② Izawa M, Taniguchi F, Harada T.

Gene expression associated with aberrant DNA methylation may become a molecular marker of endometriosis lesions.

13th World Congress on Endometriosis (WCE) Vancouver July 18~20, 2017

③ Izawa M, Taniguchi F, Harada T.

Estrogen receptor-dependent gene expression in human endometriotic cells.

ENDO2017 Orland April 1st~4, 2017

④ Izawa M, Taniguchi F, Harada T.

Molecular background of estrogen

receptor-dependent gene expression in endometriotic cells.

Asian Conference on Endometriosis (ACE) Osaka September 22~24, 2016

⑤ Izawa M, Taniguchi F, Harada T.

DNA methylation as diagnostic marker in endometriotic tissues.

Asian Conference on Endometriosis (ACE) Osaka September 22~24, 2016

⑥ 伊澤正郎、谷口文紀、原田省

子宮内膜症におけるエストロゲン受容体を介した応答遺伝子群の検証

第89回日本内分泌学会学術総会(京都)

2016年4月23日

⑦ Izawa M, Taniguchi F, Harada T.

Gene expression profile depending on estrogen receptor in human endometriotic cells.

ENDO2016 Boston April 1st~4, 2016

⑧ 伊澤正郎、原田省

ゲノムワイドメチル化解析により同定した GATA6 遺伝子の子宮内膜症組織における発現

第67回日本産科婦人科学会学術集会(横浜)

2015年4月12日

⑨ Izawa M, Taniguchi F, Harada T.

Intracrine estrogen secretion depending on aromatase expression in human fallopian tube cells.

ENDO2015 San Diego April 5~8, 2015

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・准教授

研究者番号: 40322218

原田 省 (HARADA, Tasuku)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号: 40218649