

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号： 15501
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22591825
 研究課題名（和文） 子宮内膜症の病態に関するゲノムデオキシリボ核酸メチル化プロファイルの網羅的解析
 研究課題名（英文） Genome-wide DNA methylation profile analysis relating pathogenesis of endometriosis
 研究代表者
 山縣 芳明 (YAMAGATA YOSHIAKI)
 山口大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号： 30363120

研究成果の概要（和文）：本研究のゲノムワイド DNA メチル化プロファイルにより、子宮内膜症由来の細胞は、多くの DNA メチル化異常が生じていることが明らかとなった。また、トランスクリプトーム解析結果と照合すると、それらの一部は mRNA 発現とも関連しており、子宮内膜症の病態に関与していることが示された。また、主成分分析を行うと、DNA メチル化プロファイルの方がトランスクリプトームより明確に子宮内膜症細胞を分離できており、DNA メチル化情報はその遺伝的特性をより鋭敏に反映する可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Genome-wide DNA methylation analysis identified numerous aberrant hypermethylated and hypomethylated CpGs present in endometrial stromal cells from chocolate cyst. Taken together with the result of transcriptome, some sets of genes are associated with pathogenesis of endometriosis. Principal component analysis indicated different DNA methylation profile in chocolate cyst cells, whereas transcriptome could not. These findings imply the significance of genome wide DNA methylation analysis rather than transcriptome analysis to clarify development and characterization of endometriosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

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：子宮内膜症、DNA メチル化

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は性成熟期婦人の約 10%が罹患している比較的高頻度の婦人科疾患である。また昨今の初潮の早発化、晩婚化、少子化に伴い、子宮内膜症罹患率は増加している。子宮内膜症の発症機序に関しては、現在まで種々のアプローチがなされているものの、複雑な発症、病態生理を明瞭に説明できているとは言い難い。一方、DNA 塩基配列の変化は伴わずに、DNA メチル化やヒストン修飾の変化によって遺伝子発現が変化する現象が知られており、その異常は各種疾患と密接な関係があることが示唆されている。このエピジェネティックな修飾は、特定の細胞外環境に影響を受ける事が報告されており、ある種の環境刺激が子宮内膜症発症の引き金となっている可能性がある。

2. 研究の目的

ゲノムワイド DNA メチル化情報解析法 (Infinium) で子宮内膜症の DNA メチル化情報を検証する。あわせて、トランスクリプトーム解析等も行い、メチル化との関連性を検討し、子宮内膜症の遺伝学的特性を明らかにする。

また、子宮内膜症との関与が疑われている環境因子が DNA メチル化に及ぼす影響を検討する。具体的には、環境ホルモンであるダイオキシン暴露が培養子宮内膜間質細胞に及ぼす影響について明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は本学倫理委員会の承認のもと、患者からインフォームドコンセントを得て行われた。増殖期の手術摘出標本から子宮内膜と卵巣子宮内膜症性嚢胞壁を採取した。子宮内膜症を有さない患者の子宮内膜から分離培養した子宮内膜間質細胞 (euESCa), 子宮内膜症を有する患者の子宮内膜から分離培養した子宮内膜間質細胞 (euESCb), 卵巣子宮内膜症性嚢胞壁から分離培養した間質細胞 (choESC) をサンプルとして用い、以下の検討を行った (n=3)。

(1) ゲノムワイド DNA メチル化プロファイル解析

DNA を抽出後、約 27,000 CpG (約 14,000 遺伝子) のメチル化を解析する Illumina 社 HumanMethylation27 によりゲノムワイド DNA メチル化プロファイルを作成した。その結果を用いて、階層クラスター解析、主成分分析、GeneOntology 解析、Pathway 解析等を行った。

(2) トランスクリプトーム解析

total RNA を抽出し、GeneChip Gene 1.0 ST Array を用いてトランスクリプトーム解析を行い、DNA メチル化との照合を行った。

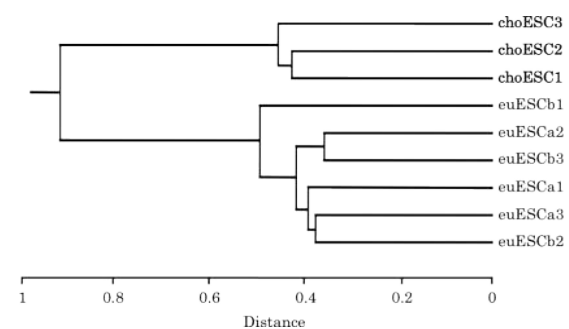
(3) RT-PCR Array

total RNA を抽出し、epigenetic 修飾に関与する遺伝子発現を real time RT-PCR array によって網羅的に解析した。

(4) euESCaを2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin : 10 nM 添加、14日間培養した後、InfiniumによりゲノムワイドDNAメチル化情報解析を行った。

4. 研究成果

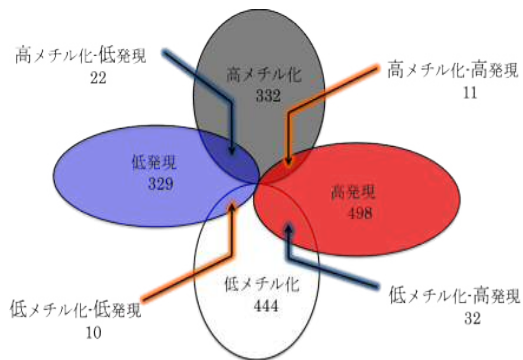
(1) 階層クラスター解析では choESC 群のみが異なるクラスターに分類された (図)。



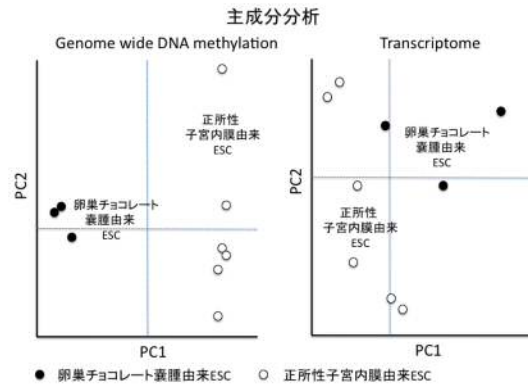
各群のメチル化率の平均値を算出し、20%以上を有意な差とすると、euESCa に比し、choESC では 883 CpG のメチル化に差異が認められた (メチル化 368、脱メチル化 441)。また euESCa-euESCb 間の比較では、17 CpG のみ

に差異があった(メチル化 11, 脱メチル化 6)。euESCa-choESC 間でメチル化が変化していた遺伝子の Gene Ontology 解析を行うと、choESC では Signal transduction、Developmental processes、Cell surface receptor mediated signal transduction 等 (以上 Biological process)、Signaling molecule、Receptor 等 (以上 Molecular function) に関連する遺伝子に変動していた。また KEGG pathway 解析では、Cytokine-cytokine receptor interaction が最上位の term として挙げられた。

(2) 各群の発現の平均が 2 倍以上あるいは 1/2 以下の遺伝子を抽出すると、euESCa と choESC の比較においては、choESC で高発現遺伝子が 498 遺伝子、低発現遺伝子が 329 遺伝子認められた。euESCa と euESCb の比較においては、euESCb で高発現遺伝子が 2 遺伝子、低発現遺伝子が 8 遺伝子認められた。DNA メチル化とトランスクリプトームにおいて、ともに共通して変化していた遺伝子を抽出すると、高メチル化-低発現、低メチル化-高発現、高メチル化-高発現、低メチル化-低発現遺伝子がそれぞれ 22, 32, 11, 10 遺伝子認められた (図)。



また、主成分分析を行うと、DNA メチル化プロファイルの方がトランスクリプトームより明確に choESC を分離できており (図)、DNA メチル化情報は choESC の遺伝的特性をより鋭敏に反映する可能性があると考えられた。



(3) DNA methyltransferases を含む epigenetic 修飾に関与する遺伝子発現には各群間で差は認められなかった。

(4) 比較的少数の CpG でメチル化状態に変化が認められたものの、一定の傾向は認められなかった。

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)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 山縣芳明 卵巣子宮内膜症性嚢胞における STRA6 と HSD17B2 遺伝子 mRNA 発現と DNA メチル化解析 第 65 回日本産科婦人科学会 2013. 5. 10 ロイトン札幌 (札幌市)
- ② 山縣芳明 卵巣子宮内膜症性嚢胞における STRA6 と HSD17B2 遺伝子 mRNA 発現と DNA メチル化解析 第 34 回日本エンドメトリオーシス学会 2013. 1. 18 栃木県総合文化センター (宇都宮市)
- ③ 山縣芳明 卵巣子宮内膜症性嚢胞のゲノムワイド DNA メチル化プロファイル解析 第 57 回日本人類遺伝学会 2012. 10. 25 京王プラザホテル (東京)
- ④ 山縣芳明 卵巣子宮内膜症性嚢胞のゲノムワイド DNA メチル化プロファイル解析 第 6 回日本エピジェネティクス研究会 2012. 5. 14 学術総合センター (東京)
- ⑤ 山縣芳明 卵巣子宮内膜症性嚢胞のゲノムワイド DNA メチル化プロファイル解析 第 64 回日本産科婦人科学会 2012. 4. 14 神戸ポートピアホテル (神戸市)

- ⑥山縣芳明 卵巣子宮内膜症性嚢胞のゲノムワイドDNAメチル化プロファイル解析 第33回日本エンドメトリーオーシス学会 2012.1.21 ホテルニュー長崎(長崎市)
- ⑦山縣芳明 卵巣子宮内膜症性嚢胞のゲノムワイドDNAメチル化プロファイル解析 第56回日本生殖医学会 2011.12.9 パシフィコ横浜(横浜市)
- ⑧山縣芳明 卵巣子宮内膜症性嚢胞のゲノムワイドDNAメチル化プロファイル解析 第16回生殖内分泌学会 2011.11.19 シェーンバツハ砂防(東京)
- ⑨山縣芳明 卵巣子宮内膜症性嚢胞のゲノムワイドDNAメチル化プロファイル解析 第56回日本人類遺伝学会 2011.11.12 幕張メッセ(千葉市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山縣 芳明 (YAMAGATA YOSHIAKI)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30363120