

## 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24年5月2日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791534

研究課題名（和文） エストロゲンレセプター $\alpha$ プロモーターの組織特異的なメチル化領域の同定研究課題名（英文） DNA methylation profile of tissue dependent and differentially methylated region in human estrogen receptor- $\alpha$  promoter region

研究代表者

浅田 裕美 (ASADA HIROMI)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90526906

研究成果の概要（和文）：

ER $\alpha$ 発現の高い組織と発現の低い組織におけるER $\alpha$ プロモーター上流領域のDNAメチル化状態は、高発現組織では低メチル化状態、低発現組織では高メチル化状態であった。上流領域のみをメチル化したコンストラクトと非メチル化コンストラクトとでプロモーター活性を比較検討すると、メチル化コンストラクトではプロモーター活性が非メチル化の約5分の1であり、この領域が組織特異的メチル変化領域である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In upstream promoter region of ER $\alpha$  gene, DNA methylation status was unmethylated in tissues with high ER $\alpha$  mRNA levels, endometrium and mammary gland, and methylated in tissues with low ER $\alpha$  mRNA levels, placenta and skin. Using the reporter assay, we demonstrated that DNA methylation at the upstream region of ER $\alpha$  reduced the promoter activity by about 20%. We suggest the upstream region of ER $\alpha$  is tissue dependent and differentially methylated region (T-DMR).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：生殖医学

## 1. 研究開始当初の背景

エストロゲンレセプター $\alpha$  (ER $\alpha$ )は全身の臓器に存在し、その発現量は組織によって様々であり、働きも多岐にわたっているが、ER $\alpha$ 遺伝子発現の調節は十分に解明されていない。我々は、estrogen receptorのアイソフ

ォームのうち、正常子宮筋と子宮筋腫ともに発現し、正常子宮筋と比較して子宮筋腫においてその発現量が高いER $\alpha$ 遺伝子に注目し、正常子宮筋層と子宮筋腫においてER $\alpha$ のプロモーター領域におけるDNAメチル化の状況を調べた。その結果、子宮筋腫では正常子宮

筋層に比べ、プロモーター領域の中の上流領域である -1188~-790 の領域の多くの CpG 部位が低メチル化状態であることを見出した(Asada et al., Mol Hum Reprod, 2008)。さらに子宮平滑筋細胞において実験的に ER $\alpha$  のプロモーター領域を脱メチル化させると ER $\alpha$  mRNA 発現が増加することを示した(Asada et al., Mol Hum Reprod, 2008)。すなわち、ER $\alpha$  のプロモーター領域のメチル化が ER $\alpha$  発現に関与しており、特に-1188~-790 の領域が重要であることを明らかにした(Asada et al., Mol Hum Reprod, 2008)。そこで、この領域が組織特異的にメチル化をうける T-DMR(tissue dependent and differentially methylated region)である可能性を検討するため、子宮内膜と皮膚組織を比較したところ、子宮内膜では脱メチル化されていたのに対し、皮膚組織では完全にメチル化されており、さらに ER $\alpha$  発現も子宮内膜では高い発現であったが、皮膚組織では非常に低発現であった。すなわち、ER $\alpha$  のプロモーター領域の-1188~-790 の領域が T-DMR である可能性がある。

## 2. 研究の目的

ER $\alpha$  遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化状況が組織によって異なり、このことが組織特異的に ER $\alpha$  が発現するという調節機構であることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

今回の実験については、山口大学医学部附属病院の遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の承諾を得ており、インフォームド・コンセントを得た患者から採取した組織を用いた。

(1) ER $\alpha$  遺伝子発現量の異なる組織における ER $\alpha$  遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化状態の解析

ER $\alpha$  遺伝子発現が高い組織として、子宮内膜と乳腺、発現が低い組織として、胎盤と皮膚をそれぞれ3例ずつ用いた。

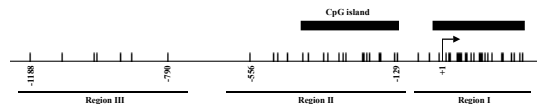
### ① ER $\alpha$ mRNA 発現

Isogen(Nippon Gene)を用いて各組織からの total RNA 抽出を行い、ExCRIPT RT reagent kit(Takara)を用いて1 $\mu$ g の total RNA を加えた20 $\mu$ l の反応液を逆転写反応させて cDNA を合成した。ER $\alpha$  用のプライマー(149bp)はヒト ER $\alpha$  の cDNA 配列より設計し、内部コントロールとして GAPDH 用のプライマー(99bp)を GAPDH の cDNA 配列より設計した。

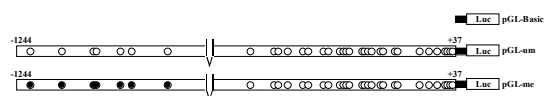
Real-time RT-PCR は LightCycler(Roche Diagnostics)を用いて施行した。計20 $\mu$ l の反応液には、10 $\mu$ l SYBR Premix Ex Taq(Takara)、0.2 $\mu$ M ずつの ER $\alpha$  (あるいは GAPDH)のプライマーセットと2 $\mu$ l の cDNA を混ぜた。PCR 条件は、96 $^{\circ}$ C で10分の後、96 $^{\circ}$ C

で5分、60 $^{\circ}$ C で20秒を40サイクル繰り返した。

② Sodium bisulfite genomic sequencing  
各組織からのゲノム DNA は Genomic DNA kit(Qiagen)を用いて抽出した。Bisulfite 反応では、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、メチル化シトシンは変換しない。まず、2 $\mu$ g のゲノム DNA を制限酵素 Pvu II で切断し、NaOH を加えて42 $^{\circ}$ C で20分反応させて1本鎖化する。次いで2.0M の sodium metabisulfite と0.5mM の hydroquinone (Wako)を加え、55 $^{\circ}$ C で16時間反応させた。NaOH を再度加えて42 $^{\circ}$ C で20分反応させて bisulfite 反応を終了した。ER $\alpha$  遺伝子の転写調節領域(-1,297~+279)を網羅するように、Region I (-126~+279)、Region II (-670~-94)、Region III (-1188~-790)に PCR プライマーを設計した(下図)。2 $\mu$ l の bisulfite 反応後 DNA に、0.5 $\mu$ M ずつのプライマーセット、10 $\times$ PCR バッファー、2mM dNTP ミックス、1.3mM MgCl<sub>2</sub>、1U Immolase(Bioline)を加えて PC-800 (ASTEC)で PCR を施行した。PCR 条件は、95 $^{\circ}$ C で10分の後、94 $^{\circ}$ C で30秒、55 $^{\circ}$ C で30秒、72 $^{\circ}$ C で1分を40サイクル繰り返した後、72 $^{\circ}$ C で10分とした。PCR 産物はアガロースゲルで電気泳動し、QIAquick gel extraction kit(Qiagen)を用いて精製した。精製した PCR 産物は pGEM T-easy vector(Promega)を用いてクローニングし、10以上のクローンを採取して塩基配列を解析しメチル化部位を同定した。塩基配列の解析は BigDye terminator (Applied Biosystem)を用いて ABI automated sequencer で施行した。



### (2) ルシフェラーゼアッセイ



上図(○)は非メチル化、●はメチル化状態)のような ER $\alpha$  プロモーター領域-1244~+37 のフラグメントを作成するために、ゲノム PCR 用プライマーを作成した。forward プライマーには制限酵素 Kpn I の配列を含むアダプターを、reverse プライマーには制限酵素 Hind III の配列を含むアダプターを付加した。PCR 産物はプロモーターのないルシフェラーゼベクターである pGL3-Basic ベクター(Promega)に導入し増幅した(pGL-1244)。pGL-1244 を制限酵素 Kpn I と Bgl II で切断し-1244~-638 のフラグメントを切り出したのち、それを Sss I メチラーゼ(New England

Biolabs)でメチル化させた。メチル化した-1244~-638のフラグメントを再挿入し(pGL-me)、コントロールとして非メチル化フラグメントを再挿入した(pGL-um)。これらのコンストラクトはアガロースゲルによる電気泳動で分離・精製したのち、DNAメチル化状態をSodium bisulfite genomic sequencing法で確認した。

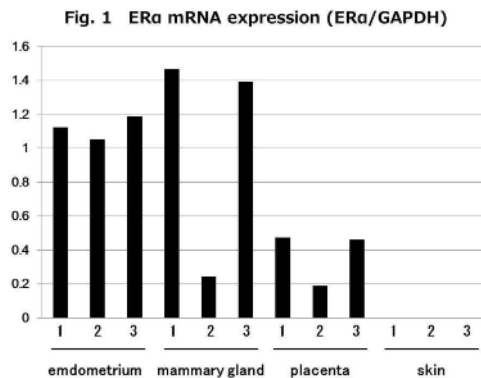
培養ヒト子宮平滑筋細胞(Cambrex)を24-wellプレートに1wellあたり $8 \times 10^4$ 細胞となるように培養しLipofectamine(Invitrogen)を用いてpGL-meとpGL-umをそれぞれ $0.4 \mu\text{g}$ ずつpRL-TKとともにトランスフェクションした。ルシフェラーゼ活性は、Dual-Luciferase reporter assay system(Promega)を用いて、ライセートを調整し、トランスフェクションの24時間後にルミノイメジャーアナライザーで測定した。プロモーター活性はRenillaルシフェラーゼ活性で補正した。

#### 4. 研究成果

(1)ER $\alpha$  遺伝子発現量の異なる組織におけるER $\alpha$  遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化状態の解析

##### ①ER $\alpha$ mRNA 発現

ER $\alpha$  mRNA 発現は、子宮内膜(endometrium)、乳腺組織(mammary gland)では非常に高く、胎盤(placenta)ではわずかに認め、皮膚(skin)では認めなかった(Fig. 1)。



②Sodium bisulfite genomic sequencing  
各組織ともに、ER $\alpha$ プロモーター下流領域(-556~+229, Region IとII)の49 CpG部位ではいずれの組織においても非メチル化状態(O)であったが、プロモーター上流領域(-1,188~-790, Region III)では、ER $\alpha$  mRNA発現の高い子宮内膜と乳腺では非メチル化状態である(平均メチル化率は子宮内膜 1.3%、乳腺 8.8%)のに対し、ER $\alpha$  mRNA発現の少ない胎盤と皮膚では高メチル化状態(平均メチル化率は胎盤 57.1%、皮膚 72.5%)であった(Fig. 2, 3)。

Fig. 2 ER $\alpha$  promoter 領域の DNA メチル化状態

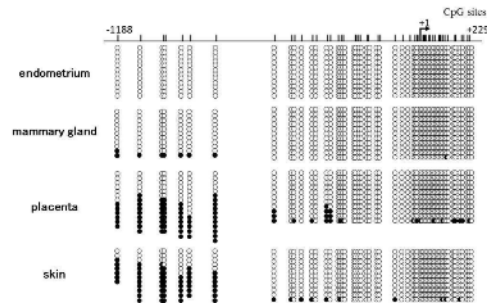
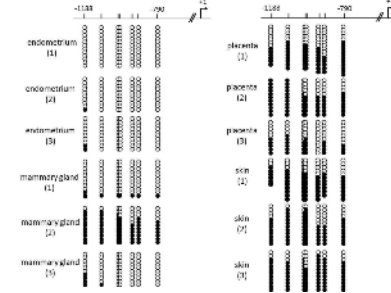


Fig. 3 ER $\alpha$  promoter 上流(-1188~-790) CpG群位領域の DNA メチル化状態



##### (2)ルシフェラーゼアッセイ

ER $\alpha$ プロモーター上流領域をメチル化させたコンストラクトは非メチル化コンストラクトに比べ、ルシフェラーゼ活性が5分の1まで低下した(Fig. 4)。しかし、これは単回の結果であり、検討を重ねる必要がある。

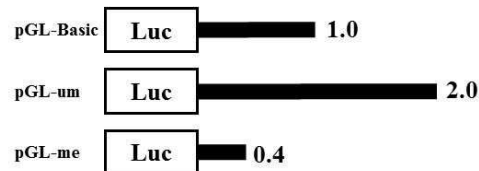


Fig. 4 Relative luciferase expression levels

#### 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)

① Disease-dependent differently methylated regions (D-DMRs) of DNA are enriched on the X chromosome in Uterine Leiomyoma. J Reprod Dev 査読有 57: 604-612. 2011. Maekawa R, Yagi S, Ohgane J, Yamagata Y, Asada H (他3名、5番目).

② Differential effects of progesterone on COX-2 and Mn-SOD expressions are associated with histone acetylation status

of the promoter region in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 査読有 96: E1073-1082.

2011. Tamura I, Taketani T, Lee L, Kizuka F, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H (他 2 名、7 番目).

③ Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells. *J Pineal Res* 査読有 51: 207-213. 2011. Taketani T, Tamura H, Takasaki A, Lee L, Kizuka F, Tamura I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H (他 3 名、9 番目).

④ Luteal blood flow in patients undergoing GnRH agonist long protocol.

*J Ovarian Res* 査読有 4:2 (doi:10.1186/1757-2215-4-2). 2011. Takasaki A, Tamura I, Kizuka F, Lee L, Maekawa R, Asada H (他 5 名、6 番目).

⑤ Prostaglandin F<sub>2</sub>α stimulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin F<sub>2</sub>α synthesis through NF-κB activation via reactive oxygen species in the corpus luteum of pseudopregnant rats. *Reproduction* 査読有 140: 885-892. 2010. Taniguchi K, Matsuoka A, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H (他 3 名、7 番目).

⑥ Progesterone Increases Manganese Superoxide Dismutase Expression via a cAMP-Dependent Signaling Mediated by Noncanonical Wnt5a Pathway in Human Endometrial Stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 査読有 95: E291-299. 2010. Matsuoka A, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Taniguchi K, Asada H (他 3 名、6 番目).

[学会発表] (計 6 件)

① 山縣芳明、西野光一郎、田邊 学、李 理華、田村 功、前川 亮、竹谷俊明、浅田裕美、佐藤 俊、田村博史、杉野法広。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オーシス学会。2012 年 1 月 21 日。長崎。ホテルニュー長崎。

② 李 理華、浅田裕美、田邊 学、木塚文恵、田村 功、前川 亮、竹谷俊明、山縣芳明、田村博史、杉野法広。ラット顆粒膜細胞の黄体化に伴う Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) 遺伝子、Cyp19a1 (aromatase) 遺伝子発現の epigenetics 制御の関与。第 16 回日本生殖内分泌学会。2011 年 11 月 19 日。東京。シェーンバッハ・サボー。

③ 前川 亮、山縣芳明、浅田裕美、田村 功、李 理華、田邊 学、竹谷俊明、田村博史、杉野法広。子宮筋腫では DNA 低メチル化異常を呈する遺伝子が X 染色体に集積する。第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会。2011 年 8 月 30 日。大阪。リーガロイヤルホテル大阪および大阪国際会議場。

④ 田村 功、浅田裕美、田邊 学、李 理華、木塚文恵、前川 亮、竹谷俊明、山縣芳明、田村博史、杉野法広。ヒト子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化によって誘導される IGFBP-1、PRL 遺伝子発現における epigenetic 調節機構の関与。第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会。2011 年 8 月 30 日。大阪。リーガロイヤルホテル大阪および大阪国際会議場。

⑤ I. Tamura, H. Asada, T. Taketani, H. Tamura, N. Sugino. DNA methylation and histone acetylation status in the promoter regions of IGFBP-1 and PRL in human endometrial stromal cells. 27th Annual meeting of the Wuropean Society of Human Reproduction and Embryology. 2011 年 7 月 3 日。ストックホルム。スウェーデン。

⑥ 田村 功、木塚文恵、李 理華、前川 亮、浅田裕美、竹谷俊明、山縣芳明、田村博史、杉野法広。ヒト子宮内膜間質細胞 (ESC) において脱落膜化により特異的に発現する IGFBP-1 遺伝子の promoter 領域の DNA メチル化とヒストンアセチル化の解析。第 28 回日本受精着床学会学術講演会。2010 年 7 月 28 日。横浜。パシフィコ横浜。

[図書] (計 1 件)

杉野法広、前川 亮、浅田裕美、山縣芳明。実験医学。子宮筋腫のゲノムワイドDNAメチル化プロファイル解析。2010.

Vol. 28: 217-225.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅田 裕美 (ASADA HIROMI)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90526906