

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592471

研究課題名(和文) 子宮筋腫におけるX染色体のエピジェネティクス変異機構の解析

研究課題名(英文) Potential mechanisms of aberrant DNA hypomethylation on the X chromosome in uterine leiomyomas

研究代表者

佐藤 俊 (SATO, Shun)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10534604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：子宮筋腫ではX染色体全体におけるDNA低メチル化変異が生じている。本研究では、筋腫の発生に筋腫特異的低メチル化変異遺伝子の発現異常あるいは、X染色体不活性化(XCI)に関わる遺伝子の機能異常が関与し得るかを検証した。その結果、X染色体に局在する筋腫特異的低メチル化変異遺伝子を2つ同定したが、これらの遺伝子では発現異常が生じていなかった。XCI関連遺伝子の発現解析により、XISTとSATB1発現の変化は同様の傾向を示し、約半数の筋腫で共通して発現低下することが明らかになった。従って、筋腫検体の一部では、X染色体の低メチル化変異にXIST-SATB1経路の異常が関与する可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Aberrant DNA hypomethylation in the whole X chromosome occurs in the uterine leiomyoma. In this study, we verified whether the aberrant expression of aberrantly hypomethylated genes specific to the leiomyoma or the dysfunction of genes related to the X chromosome inactivation (XCI) might be involved in the development of leiomyoma. As a result, although the two aberrantly hypomethylated genes specific to the leiomyoma on the X chromosome were identified, the aberrant expression did not occur in these genes. The expression analysis of XCI-related genes revealed that the expression of XIST and SATB1 genes tended to be altered similarly and was downregulated simultaneously in about a half of leiomyoma specimens. Therefore, the aberration of XCI-related genes such as SATB1 or XIST may be involved in aberrant hypomethylation on the X chromosome in a certain population of the patients with uterine leiomyomas.

研究分野：分子生物学

キーワード：子宮筋腫 エピジェネティクス DNAメチル化 X染色体不活性化

1. 研究開始当初の背景

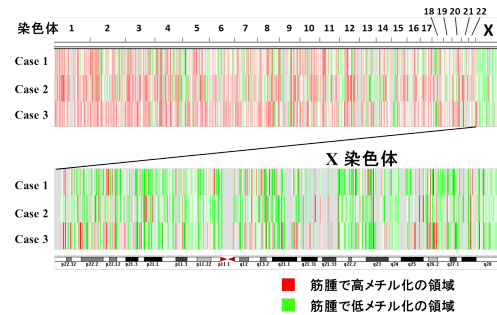
子宮筋腫は子宮平滑筋に由来する良性腫瘍であり、成熟女性の20-30%に認められる最も発症頻度の高い腫瘍性疾患である。子宮筋腫は良性疾患ではあるが重度の月経痛や貧血を引き起こし、不妊症や流産の原因になり、その根治には子宮摘出や筋腫核出が必要であるため、女性の quality of life を著しく損なう。しかしながら、現在、治療や診断に有用な子宮筋腫の発生・進展の機序に関する知見は少ない。

子宮筋腫発症にはアフリカ系の人種に多いといった遺伝的な要因がある一方、早期の初経開始、高BMI、肉食、高血圧等が発症リスクを高め、経口避妊薬の使用、多産、菜食、喫煙等が発症リスクを低下するというように後天的な要因であるホルモン環境、栄養、生活習慣が大きく影響すると予想されている。従って、子宮筋腫発症にはゲノムの後天的な修飾であるエピジェネティクスの変異が大きく関与する可能性がある。エピジェネティクスとは、DNA塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構であり、DNAメチル化とヒストン修飾が中心的な役割を果たしている。このエピジェネティクスの異常が糖尿病、自己免疫疾患、癌等の疾患に関与すること、また、化合物暴露、栄養バランス等の環境がゲノムワイドなエピジェネティクス変異の要因となること等が明らかになってきている。

当研究室はこれまでに、子宮筋腫の発生や進展にエピジェネティクスの変異が関与する可能性を考え、子宮筋腫のDNAメチル化解析をゲノムワイドに行ってきた。Restriction Landmark Genomic Scanning法を用いた解析結果から、子宮筋腫では正常筋層と比較してゲノムワイドにDNAメチル化変異が生じていることを確認した。またMicroarray based DNA methylation analysis with restriction tag-mediated amplification法による解析により、子宮筋腫で約460個の低メチル化変異を呈する遺伝子と、320個の高メチル化変異を呈する遺伝子をそれぞれ検出した。これらの結果は子宮筋腫研究の新たな視点としてエピジェネティクスの重要性を示すものと考えられる。

我々は後者の解析結果から、子宮筋腫の低メチル化変異がX染色体に高頻度で検出されることを見出した。このX染色体の低メチル化変異が筋腫に共通して生じる現象であるかを検証するために、新たに3症例の筋腫と正常筋層のメチル化状態をゲノム上の45万カ所以上のCpG配列について解析できるillumina社のHumanMethylation450ビーズチップ(illumina HumMeth450)でゲノムワイドに解析し比較した。その結果、これら3症例ではいずれも、X染色体で低メチル化変異が高頻度で検出され、その他の染色体ではむしろ高メチル化変異の頻度が高いことが明らかになった(図1)。

図1.子宮筋腫における染色体毎のDNAメチル化変異領域の分布



→子宮筋腫において低メチル化変異はX染色体で高頻度で生じていることを明らかにした。

これまでに腫瘍とゲノムワイドなメチル化変異の関連については、広範な腫瘍でゲノムワイドな低メチル化が染色体の不安定を引き起こし、それに伴う染色体の過剰や欠失ががん化の発症機序になり得るという報告がある。また、雌性のがん由来細胞株および乳がん、遺伝子量補正のため不活性化されているX染色体が欠失し、活性型X染色体が重複することでX染色体の低メチル化が生じているとの報告がある。一方で、我々が使用した検体はいずれもマイクロサテライトを利用した多型解析により、両親由来のX染色体に欠失がないことを確認している。従って、このX染色体の低メチル化変異はこれまでに報告のない知見であり、子宮筋腫に特異的である可能性がある。

子宮筋腫におけるX染色体の低メチル化変異は、上述のようにX染色体の欠失、重複を伴わないことから、X染色体の不活性化機構(XCI)の異常により生じていることが示唆される。そこで本研究では、筋腫の発生・進展の機序に(1)XCIの破綻によるX染色体上の遺伝子の発現異常、あるいは(2)XCIに関わる因子の機能異常が関与しているかを検証する。

2. 研究の目的

子宮筋腫発症には遺伝的な要因がある一方、ホルモン環境、栄養、生活習慣等の環境要因が大きく影響することから、我々は筋腫の発生・進展にゲノムの後天的な修飾であるエピジェネティクスの変異が関与するという仮説を立て、ゲノムワイドなDNAメチル化解析を行ってきた。これまでに、筋腫では共通してX染色体全域での低メチル化変異が検出され、その変異にXCIの異常が関与することを示唆する結果を得た。

本研究では筋腫の発生・進展の機序に、XCIの破綻によるX染色体上の遺伝子の発現異常、あるいはXCIに関わる因子の機能異常が関与する可能性を考え、(1)筋腫で共通して低メチル化変異を呈する遺伝子の検索、(2)XCIの異常に関わる因子の特定の2点について検証する。この研究結果より、筋腫の発生・進展の機序の一端が明らかになり、さらに、子宮筋腫の診断に利用できるバイオマーカーおよび薬剤治療の標的分子等が得られることを期待する。

3. 研究の方法

(1) 筋腫で共通して低メチル化変異を呈する X 染色体上の遺伝子の特定

X 染色体上にある筋腫特異的低メチル化変異遺伝子の候補の選出

低メチル化変異遺伝子候補の選出には、3 症例の同一症例から採取した子宮筋腫組織と正常子宮筋の illumina HumMeth450 によるメチロームデータを使用した。症例毎に各 CpG 配列のメチル化率を筋腫と筋層で比較し、筋腫でメチル化率が30%以上低いCpG配列を低メチル化変異 CpG として抽出する。抽出した低メチル化変異 CpG を遺伝子内あるいは近傍 2kb 以内に含む遺伝子を低メチル化変異遺伝子として選出する。選出した遺伝子のうち、3 症例で低メチル化変異が共通する遺伝子について、メチローム解析に用いた 3 検体で COmbined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)法と bisulfite sequence 法によるメチル化解析を行い、メチロームデータの結果が再現された遺伝子を筋腫特異的低メチル化変異遺伝子の候補として選出する。

多症例でのメチル化解析による筋腫特異的低メチル化変異遺伝子の特定

上記で選出した筋腫特異的低メチル化変異遺伝子の候補について、多症例(約 20 症例)において COBRA 法によるメチル化解析を行い、候補遺伝子の低メチル化変異が筋腫特異的であることを検証する。さらに筋腫特異的低メチル化変異遺伝子と特定したものについては、RT-PCR による mRNA 発現解析を行い、低メチル化変異と遺伝子発現の相関を調べる。

(2) 子宮筋腫において XCI の異常に関わる因子の特定

XCI は、大別すると以下 3 段階のエピジェネティック修飾を経た後、DNA メチル化が生じて確立される。1) 雌性細胞内の 2 つの X 染色体のうち不活性化される一方の X 染色体から non-coding RNA である *XIST* が発現し、発現した X 染色体全域を覆うように局在する。2) ポリコム複合体 PRC2 が *XIST* を認識し、X 染色体に誘導されることで、PRC2 による X 染色体全域のヒストン H3K27 のトリメチル化 (H3K27me3) が生じる。3) ポリコム複合体 PRC1 が H3K27me3 を認識し X 染色体に誘導され、不活性化型ヒストン macroH2A をモノユビキチン化することで、ヒストン H2A との置換を促進する。また、これらの過程で生じる *XIST*, H3K27me3, macroH2A の X 染色体への局在は不活性化型 X 染色体のマーカーとして一般的に使用されている。

本研究では、どの修飾段階で XCI の異常が生じているかを以下の方法を検証する。

不活性化型 X 染色体マーカー染色による XCI の異常に関与する因子候補の選出

ゲノムワイド解析を行った 3 症例の筋腫と筋層で *XIST*, H3K27me3, macroH2A の染色像を比較し、筋腫での XCI の異常がどの修飾段階で生じたかを検証する。結果的に筋層・筋

腫組織での免疫染色・FISH による各分子の局在解析が上手くいかなかったため、の発現解析に方針を変更した。

子宮筋腫検体におけるゲノム刷込み DMRs のメチル化解析

XCI と同様に long non-coding RNA とポリコムグループ(PcG)により片親アレル発現が制御されているゲノム刷込み遺伝子でも同様に低メチル化異常が生じているかを調べることで、PcG 機能に異常が生じているかを検証する。代表的な 3 つのゲノム刷込み differentially methylated regions (DMRs; KvDMR1, *GNAS* XL DMR, IG-DMR) について bisulfite sequence 法により、メチル化状態を解析する。

XCI に関与する遺伝子の発現解析

X 染色体で生じる低メチル化変異が XCI 機構の異常に起因するかを検証するため、その機構に関与する分子の発現について調べる。*XIST*の他に近年 XCI への関与が明らかになった *HNRNPU*, *SATB1*, *SMCHD1* の 3 遺伝子を選択し、RT-PCR により 11 検体について筋腫と筋層間で mRNA の発現量を比較する。

4. 研究成果

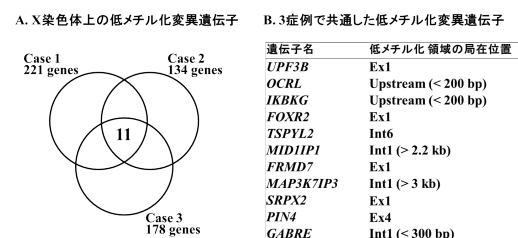
(1) 筋腫で共通して低メチル化変異を呈する X 染色体上の遺伝子の特定

X 染色体上にある筋腫特異的低メチル化変異遺伝子の候補の選出

まず、3 症例の子宮筋腫と正常子宮筋を使用した HumMeth450 によるメチロームデータを利用し、X 染色体で生じている低メチル化変異の特徴づけを行った。子宮筋腫における X 染色体上の低メチル化変異は、症例 1, 2, 3 のそれぞれで 221, 134, 178 遺伝子検出され(図 2)、一方で、ゲノム全体における低メチル化変異はそれぞれ 2386, 1327, 3078 遺伝子で検出された。HumMeth450 において解析対象となっている遺伝子数は、X 染色体上およびゲノム全体のそれぞれで 814 および 20565 なので、低メチル化異常は X 染色体上では 16.5-27.1% の遺伝子で、ゲノム全体では 6.4-15% の遺伝子でそれぞれ生じていた。従って、X 染色体では低メチル化変異の頻度はゲノム全体の約 1.5-2.5 倍高い。

一方、X 染色体で低メチル化変異は高頻度で生じているにもかかわらず、3 検体の筋腫で共通して低メチル化状態にある X 染色体上の遺伝子数は 11 個のみだった(図 2)。これらの 11 遺伝子は全て筋層で 40-50% のメチル化率

図2.筋腫特異的低メチル化変異を呈するX染色体上の遺伝子候補



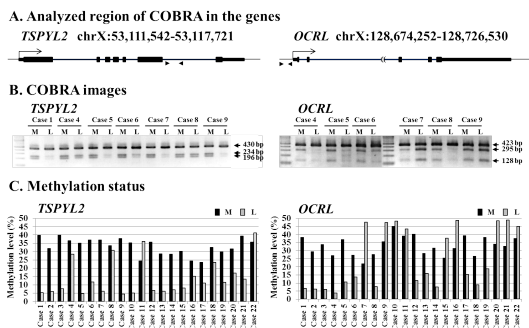
→ 筋腫検体間で共通したX染色体上の低メチル化変異遺伝子は11個のみだった。

を示していることから、XCI の制御下にあると予想された。これらの遺伝子のうち、COBRA 法に使用できる制限酵素配列が低メチル化変異 CpG の近傍に存在した 7 遺伝子 (*UPF3B*, *OCRL*, *IKBK*, *FOXR2*, *TSPYL2*, *MID1P1*, *FRMD7*) について、メチローム解析に用いた 3 症例でメチル化状態を確認した。その結果、Testis-specific Y-encoded-like protein 2 (*TSPYL2*)、Oculocerebrorenal syndrome of Lowe (*OCRL*) の 2 遺伝子では筋腫特異的な低メチル化が確認されたが、それ以外の 5 遺伝子では確認できなかった。従って、上記 2 遺伝子を筋腫特異的な低メチル化変異遺伝子の候補として選出した。

多症例でのメチル化解析による筋腫特異的な低メチル化変異遺伝子の特定

次に、候補遺伝子として選出した *TSPYL2* と *OCRL* について 22 症例から得た筋腫と筋層で COBRA 解析を行った。筋層においてこれらの領域のメチル化率は、どちらも平均約 33% (*TSPYL2*; 24-40%, *OCRL*; 22-45%) で、全ての検体で 50% を超えないことから、これらの遺伝子領域は XCI の影響下にあることが示唆された (図 3)。低メチル化変異は *TSPYL2* では 17 症例の筋腫 (77.3%; 17/22), *OCRL* では 13 検体の筋腫 (59.1%; 13/22) でそれぞれ生じていた (図 3)。

図3. *TSPYL2*と*OCRL*の多症例におけるCOBRA法によるメチル化解析



次に、メチル化状態と発現の相関を調べるため、これらの mRNA の発現を解析したが、RT-PCR および発現アレイデータのどちらにおいても、筋腫特異的な発現の増減はみられなかった。従って、筋腫ではこれらの領域の低メチル化変異は近傍遺伝子の発現に関与していないことが示唆される。

筋腫検体における *MED12* の変異解析

TSPYL2 と *OCRL* の低メチル化変異は発現に関与しないようだが、高頻度に生じるため、筋腫特異的なバイオマーカーになる可能性がある。現在、最も信頼できる筋腫マーカーとして *MED12* 遺伝子のエクソン 2 の突然変異があり、約 7 割の筋腫検体で認められることが報告されている。そこで次に、この *MED12* 遺伝子の変異と *TSPYL2* および *OCRL* の低メチル化変異の頻度を比較するため、本研究で使用した筋腫検体で *MED12* の変異解析を行った。その結果、既知の報告と同等の 68.2% の検体で (22 検体中 15 検体) で突然変異が検出された (図 4)。この結果により、*TSPYL2* と *OCRL*

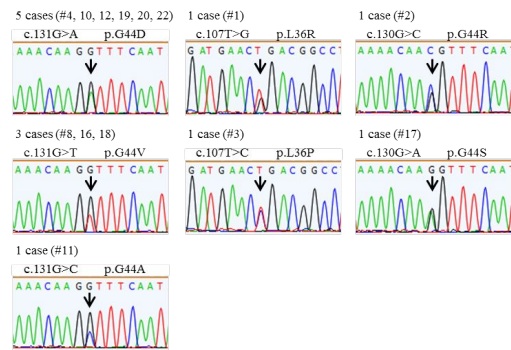
の低メチル化変異は *MED12* 変異と同頻度で生じていることが示された。従って、*TSPYL2* および *OCRL* の低メチル化変異は *MED12* 変異と同程度に信頼できるバイオマーカーになると考えられる。

図4. 子宮筋腫検体における*MED12* 遺伝子の変異解析

A. 解析結果のまとめ

Genotype	Number of cases (case #)	Nucleotide change
Point mutation	14 cases (#1, 2, 3, 4, 8, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 22)	Detail in Fig.2 B
Deletion	1 case (#5)	c.133_141del9
Normal	7 cases (#6, 7, 9, 13, 14, 15, 21)	-

B. 各筋腫検体で生じていた一塩基置換



(2) 子宮筋腫において XCI の異常に関わる因子の特定

子宮筋腫検体におけるゲノム刷込み DMRs のメチル化解析

まず、bisulfite sequence 法により、代表的な 3 つのゲノム刷込み DMRs; KvDMR1, *GNAS* XL DMR, IG-DMR のメチル化状態を解析した。その結果、いずれの領域においても筋腫で低メチル化変異は生じていないことが確認された。

次に、3 検体の HumMeth450 によるメチロームデータを利用して、それぞれの DMR のメチル化状態を、筋腫と筋層間で比較した。この解析ではヒトでこれまでに登録されている 26 のゲノム刷込み DMRs を対象とした。筋腫で低メチル化変異が生じていた DMRs は各検体でそれぞれ 2-3 個だった (図 5)。ゲノム刷込み DMRs の低メチル化変異頻度 (7.7- 11.5%) は、各筋腫検体で生じているゲノム全体の低メチル化変異頻度 (6.4-15%) とほぼ変わらなかった。従って、筋腫においてゲノム刷込み DMRs には低メチル化変異が濃縮していないことが示唆される。

図5. ゲノム刷込み遺伝子群 (DMRs) のメチル化解析

・3症例における 26 個の刷込み DMRs の低メチル化変異

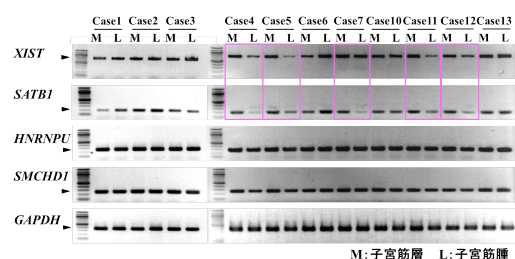
Case1	Case2	Case3
DIRAS3		
NAP1L5		
PLAGL1		
IGF2R2		
GRB10 (g)		
GRB10 (S)		
PEG10		
MEST		
INPP5F 12		
H19/IGF2		
KVDMR1		
WT1-AS		
RBI		
DLK		
MEG3		
NDN		
SNURE/SNRPN		
ZIM2		
USP29		
MCF22		
NNAT		
L3MBTL		
NESP		
NESP-AS		
GNAS XL		
GNAS LA		

低メチル化変異頻度
 ・刷込み DMRs: 7.7-11.5%
 (2/26-3/26)
 ・ゲノム全体: 6.5-15.0%
 ・X染色体: 16.5-27.1%

→ 低メチル化変異の頻度はゲノム全体と同程度で、ゲノム刷込み DMRs に低メチル化変異は蓄積していない。

XCI 機構に關与する遺伝子の発現解析
XIST, *HNRNPU*, *SATB1*, *SMCHD1* の 4 遺伝子を選
 択し, RT-PCR により 11 検体について筋腫と
 筋層間で mRNA の発現量を比較した。その結
 果, *HNRNPU* と *SMCHD1* では検体毎に筋腫と筋
 層間で発現量にほとんど差がみられず, 検体
 間においても一様に発現していた (図 6)。

図6. XCI関連遺伝子の発現解析:RT-PCR



→11症例中5症例の筋腫検体で *XIST* と *SATB1* の低発現がみられた。

XIST および *SATB1* では, 筋腫と筋層間の発現
 の強弱は同様の傾向を示し, 特に 11 症例中 5
 症例では筋腫で共通して発現低下していた
 (図 6)。従って, 筋腫検体の一部では, X
 染色体の低メチル化変異に *XIST-SATB1* 経路
 の異常が關与する可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Tamura I, Ohkawa Y, Sato T, Suyama M, Jozaki K, Okada M, Lee L, Maekawa R, Asada H, Sato S, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol*. 2014 Jul 29;me20141117. doi: 10.1210/me.2014-1117 (査読有)
2. Sato S, Maekawa R, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Okada M, Tamura H, Sugino N. Potential Mechanisms of Aberrant DNA Hypomethylation on the X Chromosome in Uterine Leiomyomas. *J Reprod Dev*. 2014; 60:47-54. (査読有)
3. Yamagata Y, Nishino K, Takaki E, Sato S, Maekawa R, Nakai A, Sugino N. Genome-wide DNA methylation profiling in cultured eutopic and ectopic endometrial stromal cells. *PLoS One*. 2014; 9:e83612. doi: 10.1371/journal.pone.0083612. (査読有)
4. Tamura I, Sato S, Okada M, Tanabe M, Lee

L, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Importance of C/EBP Binding and Histone Acetylation Status in the Promoter Regions for Induction of IGFBP-1, PRL, and Mn-SOD by cAMP in Human Endometrial Stromal Cells. *Endocrinology*. 2014;155:275-86.

doi: 10.1210/en.2013-1569. (査読有)

5. Maekawa R, Sato S, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Okada M, Tamura H, Takaki E, Nakai A, Sugino N. Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. *PLoS One*. 2013;8(6):e66632.

doi: 10.1371/journal.pone.0066632. (査読有)

6. Lee L, Asada H, Kizuka F, Tamura I, Maekawa R, Taketani T, Sato S, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Changes in Histone Modification and DNA Methylation of the StAR and Cyp19a1 Promoter Regions in Granulosa Cells Undergoing Luteinization during Ovulation In Rats. *Endocrinology*. 2013;154:458-70.

doi: 10.1210/en.2012-1610. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 前川亮, 佐藤俊, 浅田裕美, 品川征大, 岡田真紀, 李理華, 山縣芳明, 田村博史, 杉野法広, 「子宮筋腫におけるトランスクリプトームとエピゲノムを統合した蛋白質間相互ネットワーク解析」, 生殖内分泌学会, 2015年1月10日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)
2. 岡田真紀, 李理華, 品川征大, 前川亮, 浅田裕美, 佐藤俊, 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 Cyp11a1(P450scc) 遺伝子発現の epigenetics 制御」, 生殖内分泌学会, 2015年1月10日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)
3. 杉野法広, 田村功, 城崎幸介, 品川征大, 岡田真紀, 李理華, 浅田裕美, 前川亮, 佐藤俊, 山縣芳明, 田村博史, 「次世代シーケンサーを用いたヒト子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化に伴うエピ

ゲノム変化の解析」,日本繁殖生物学会,2014年8月21-24日,帯広畜産大学(北海道・帯広市)

4. 城崎 幸介, 田村 功, 品川 征大, 岡田真紀, 李 理華, 浅田 裕美, 前川 亮, 佐藤俊, 山縣 芳明, 田村 博史, 杉野 法広, 「ヒト子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化に伴いヒストン修飾と mRNA 発現が上昇した遺伝子の検討」, 日本繁殖生物学会, 2014 年 8 月 21-24 日, 帯広畜産大学 (北海道・帯広市)

5. 佐藤俊, 前川亮, 山縣芳明, 浅田裕美, 田村功, 李理華, 岡田真紀, 田村博史, 杉野法広, 「子宮筋腫における X 染色体の低メチル化機構」, 生殖内分泌学会, 2013 年 12 月 7 日, 東京砂防会館 (東京都・千代田)

6. 佐藤俊, 前川亮, 浅田裕美, 田村功, 李理華, 岡田真紀, 山縣芳明, 田村博史, 杉野法広, 「ヒト ESR1 の組織特異的な転写開始点の使い分けに組織特異的 DNA メチル化可変領域が関与する」, 日本エピジェネティクス研究会, 2013 年 5 月 30-31 日, 奈良県新公会堂 (奈良県・奈良市)

7. 佐藤俊, 前川亮, 浅田裕美, 田村功, 李理華, 山縣芳明, 杉野法広, 「ヒト ESR1 の発現制御に関与する組織特異的 DNA メチル化可変領域の同定」, 日本エピジェネティクス研究会, 2012 年 5 月 14-15 日, 学術総合センター (東京都・千代田)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 俊 (SATO, Shun)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10534604