

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659731

研究課題名(和文) 子宮内膜症組織に発現する新規エストロゲン受容体バリエーション群の分子基盤解析

研究課題名(英文) Molecular basis of novel estrogen receptor variants expressed in endometriotic tissues

研究代表者

原田 省 (Harada, Tasuku)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：40218649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：アロマターゼ遺伝子の高発現は、子宮内膜症病変組織に高濃度エストロゲン環境をもたらしている。このエストロゲン環境と密接にリンクするエストロゲン受容体(ER)の病理的意義は、内分泌療法剤の有効性から認知されている。しかしながら、ER発現の理解は、 $\beta$ 型と $\alpha$ 型の発現量比による議論で停滞している。本研究により、子宮内膜症組織におけるER発現の基本的分子基盤を明らかにした。特に重要と思われる観察は、子宮内膜症細胞に発現する $\alpha$ 型ERは66kDaの野生型とは異なる55kDaのバリエーションであることが示唆された事である。このバリエーション発現の分子メカニズムは新たな重要検討課題となった。

研究成果の概要(英文)：A marked up-regulation of aromatase gene leads to a high estrogen environment in endometriotic tissues. The urgent issue to be clarified is to understand the molecular basis of estrogen action. So far, a higher estrogen receptor (ER) beta and a lower ER alpha endometriotic tissues have been documented to explain the pathophysiology of endometriosis.

We re-evaluated the molecular basis of ER expression in endometriotic tissues. Transcripts for 4 ER beta variants were detectable. Among them, the ER beta 5 was the most dominant. ER alpha mRNA the expression in endometriotic cells was 7-fold lower than that in endometrial cells. Although a single cDNA sequence predicting a wild-type 66kDa ER alpha was detectable, the protein expression was found to be a 55kDa molecule. Findings provide a new facet in understanding the pathophysiological role of high estrogen in endometriosis.

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 アロマターゼ遺伝子 高エストロゲン環境 エストロゲン受容体バリエーション発現 エストロゲン受容体バリエーション 組織特異的プロモーター活性 エストロゲン受容体バリエーション 選択的翻訳

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症組織の病理的特質の一つである高濃度エストロゲン環境形成に、アロマターゼ遺伝子の発現亢進が一翼を担っている。最近、私共は、このアロマターゼ遺伝子発現亢進が、アロマターゼ遺伝子の脱メチル化修飾と密接に関連することを発見した(Izawa M, *et al.* 2008,2011)。一方、この高濃度エストロゲン環境と密接にリンクするエストロゲン受容体(ER)の病理的意義は、内分泌療法剤の有効性からも良く認知されているが、ER発現の詳細は不明であると言うのが現状である。従来国内外における研究は、ER と ER の発現量比による議論で停滞している。従って、エビデンスに基づく新規診断治療法の開発のために、子宮内膜症組織における ER 発現の分子基盤の解明が急務であると考えた。

### 2. 研究の目的

私共は、子宮内膜症組織における ER 発現の分子基盤の解明をめざして予備的研究を開始した。最近、異なる機能性を想定させる一群の ER バリエーション分子発現を観察した。本研究は、ER バリエーション分子発現の実体解明を通して、子宮内膜症組織における ER 発現の概容を明らかにすることを目的に、以下の3点に焦点を絞り研究を推進した。

- 1)新規 ER バリエーション分子の、cDNA クローニングによる同定。
- 2)ER バリエーション分子の発現解析と cDNA クローニングによる同定。
- 3)ER 抗体により免疫組織染色。

これらの研究により、ER 発現の分子基盤の概容を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1)子宮内膜症患者由来間質細胞初代培養(子宮内膜症細胞)と正常子宮内膜由来間質細胞初代培養(子宮内膜細胞)の調製:

独自に確立している手順に従い子宮内膜症患者のチョコレート嚢胞と正常子宮内膜由来の間質細胞初代培養を調製し、モデルシステムとして使用する。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正常子宮内膜より組織片を分離する。摘出組織をミンス後、コラゲナーゼ処理とナイロンメッシュ濾過、遠心により粗細胞を得る。30分間の培養により接着細胞を選別分離する。これにより、98%以上の純度を有する間質細胞初代培養が得る。

#### (2) ER $\alpha$ 、ER $\beta$ の発現解析:

子宮内膜症細胞と子宮内膜細胞における ER 転写物発現を qPCR 並びにスプライスバリエーション特異的 PCR により半定量する。同時に、ウエスタン分析によりタンパク発現を検討する。

#### (3)ER 発現に関与するプロモーターの検討:

5' UTR エキソン特異的 RT-PCR により活性プロモーターを検証する。

#### (4)ER $\alpha$ バリエーション分子の組織細胞特異的発現の検討:

卵巣チョコレート嚢胞組織、対照の子宮内膜組織、それぞれの組織由来間質細胞を用いて ER $\alpha$  バリエーション分子発現の概容を免疫組織細胞染色により検討する。

#### (5)ER $\alpha$ バリエーション分子の質量分析による同定:

子宮内膜細胞に高発現する ER $\alpha$  バリエーション分子を電気泳動的に粗分画後、TOF-MAS 分析を試みる。

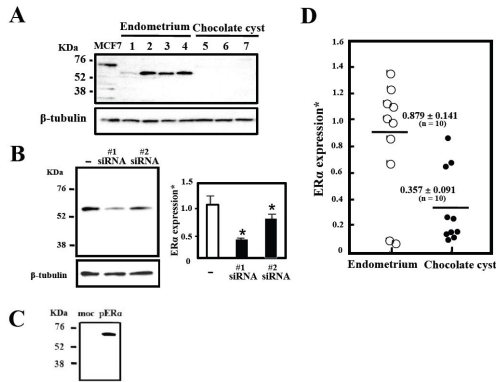
### 4. 研究成果

本研究は、子宮内膜症組織における ER 発現の分子基盤の概容を検証することにより、高濃度エストロゲン環境の病理的役割を解明する糸口を得ることを目標とした。子宮内膜症細胞と子宮内膜細胞をモデルシステムとして用い、ER 発現の検証結果を基に、最終的に病変組織において検証を試みた結果、(1)~(6)の成果を得た。

(1)子宮内膜症細胞における ER $\alpha$  mRNA の発現レベルは子宮内膜細胞の 1/7 以下であった。この発現は主として C プロモーターに依存していた。D ならびに F プロモーターに依存した発現も認められた。

(2)図 1: ER $\alpha$  発現のウエスタンプロットは mRNA 発現と同傾向であったが(D)、新たなバリエーション分子の発現が示唆された(A, B)。

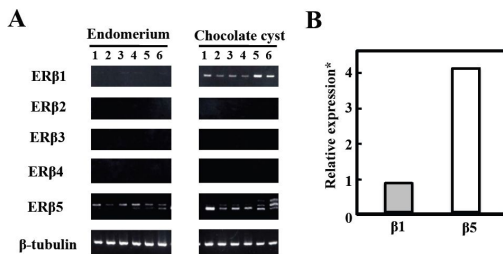
(図 1)



(3)子宮内膜症細胞において ER mRNA の発現亢進を認めた。子宮内膜細胞では低レベルの発現であった。この発現は OK および ON プロモーターに依存していた。

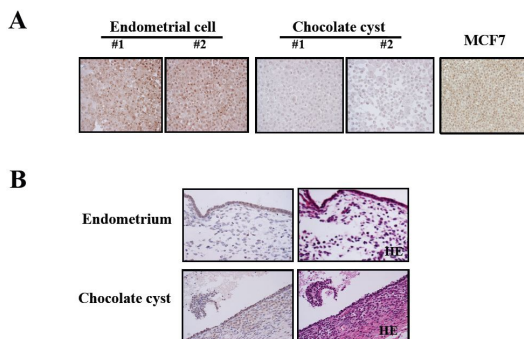
(4)図 2 :子宮内膜症細胞の ER mRNA 発現は 1 と 5 の 2 バリエーション発現であった(A)。5 の発現レベルは 1 の 4 倍であった(B)。

(図 2)



(5)図 3 :子宮内膜症組織における ER 発現は量的、質的に子宮内膜組織と異なり、新規の ER バリエーションの発現(図 2 参照)が示唆された。

(図 3)



子宮内膜症病変組織のエストロゲン環境と密接にリンクする ER の病的意義の理解は、

型と型の発現量比による議論で停滞しているのが現状であった。

本研究により、子宮内膜症組織における ER 発現の分子基盤の概容が明らかとなり、さらに新たなバリエーション分子の発現が示唆された事は、子宮内膜症病態の解明へ向け新たな糸口を提供できた。

### 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 4 件)

Taniguchi F, Higaki H, Izawa M, Azuma Y, Hirakawa E, Deura I, Iwabe T, Hata K, Harada T. The cellular inhibitor of apoptosis protein-2 is a possible target of novel treatment for endometriosis. *American Journal of Reproductive endocrinology* 71,278-285,2014 査読:有

Izawa M, Taniguchi F, Terakawa N, Harada T. Epigenetic aberration of gene expression in endometriosis. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed)* 5, 900-910,2013 査読:有

伊澤 正郎, 谷口 文紀, 寺川 直樹, 原田 省, 子宮内膜症におけるアロマターゼ遺伝子発現とエピジェネティック制御 *日本エンドメトリオーシス学会誌* 33,103-105, 2012

Izawa M, Taniguchi F, Terakawa N, Harada T. Genome-wide profiling of DNA methylation in endometriotic cells. *Journal of Endometriosis* 4, 147, 2012 査読:有

[学会発表](計 8 件)

伊澤 正郎, 谷口 文紀, 原田 省, 子宮内膜症におけるアロマターゼ発現とエピゲノム異常, 第 86 回日本生化学会 シンポジウム, 2013/9/13, 横浜市

Izawa M, Taniguchi F, Terakawa N, Harada T. DNA methylation profiles associated with aberrant gene expressions in endometriosis. The Endocrine Society Annual Meeting & Expo, June 15-17, 2013, San Francisco  
Taniguchi F, Takai E, Izawa M, Terakawa N, Harada T. Parthenoide reduces cell proliferation and PGE2 synthesis in human endometriotic stromal cells and inhibits development of endometriosis in murine model. The Endocrine Society Annual Meeting & Expo, June 15-17, 2013, San Francisco

伊澤 正郎, 谷口 文紀, 原田 省, 子宮

内膜症に特異的なゲノム DNA メチル化修飾の検証、第 17 回日本生殖内分泌学会学術総会、2012 年 12 月 8 日、東京

伊澤 正郎、子宮内膜症におけるエストロゲン受容応答システムの分子基盤解析、日本レチノイド研究会第 23 回学術集会、2012 年 11 月 20 日、米子市

Izawa M, Taniguchi F, Harada T. Genome-wide profiling of DNA methylation in endometriotic cells. The 2<sup>nd</sup> Asian Conference on Endometriosis 2012/11/10, Istanbul

Izawa M, Taniguchi F, Kiyama T, Terakawa N, Harada T. Re-Evaluation of estrogen receptor expression in endometriotic cells. The 94<sup>th</sup> Annual Meeting of Endocrine Society 2012/6/23, Houston

伊澤 正郎、原田 省、子宮内膜症におけるエストロゲン受容体システムの分子基盤解析、第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4 月 19 日、名古屋市

〔図書〕(計 1 件)

Izawa M, Taniguchi F, Harada T. Springer, Epigenetics in endometriosis in endometriosis-pathogenesis and treatment. 2014 印刷中

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原田 省 (HARADA, Tasuku)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号：40218649

(2)研究分担者

伊澤 正郎 (Izawa, Masao)  
鳥取大学・医学部・特任教授  
研究者番号：50032222