

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791704

研究課題名(和文) 子宮筋腫発生に関与する遺伝子の探索 - エピゲノム異常の視点から -

研究課題名(英文) Search for the genes involved in the development of uterine leiomyoma

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：子宮筋腫を有さない症例の子宮筋層組織、子宮筋腫を有する症例の子宮筋層組織、子宮筋腫組織について、それぞれゲノムワイドにDNAメチル化状態を解析した。トランスクリプトーム解析も追加し、子宮筋層と比較して子宮筋腫で発現に違いを認める625遺伝子を同定し、さらに上流因子解析を行い、子宮筋腫で発現が増減する76遺伝子を抽出した。そのうちDNAメチル化異常のある3遺伝子(NRG1, NR3C1, MAPK10)をそれぞれレンチウイルスベクターに挿入した。このベクターを不死化ヒト平滑筋細胞株に導入し免疫不全マウスの腎被膜下へ移植し筋腫化が生じるか研究中である。

研究成果の概要(英文)：Profiles of genome-wide DNA methylation and mRNA expression were investigated in leiomyomas and in myometrium with and without leiomyomas. We identified 625 genes whose DNA methylation and mRNA expression patterns differed between leiomyomas and the adjacent myometrium. We transduced 3 genes (NRG1, NR3C1 and MAPK10) of 76 genes we identified by upstream factor analysis each in lentivirus-vectors. We will transduce these vectors in immortalized human uterine smooth muscle cell and transplant them under the kidney capsule in immunodeficient mice.

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

子宮筋腫は性成熟女性の約30%が罹患しているとされる最も発症頻度の高い腫瘍性疾患である。重度の月経痛や過多月経による貧血を引き起こし、性成熟期女性のQOLを極度に低下させるだけでなく、不妊症の原因ともなりうる。

子宮筋腫発症のリスク因子として、人種、高BMI、早期の初経開始、高血圧、肉食、化学物質などが挙げられ、一方でリスクを下げる因子として、経口避妊薬の使用、喫煙、多産、菜食等が挙げられる。これらのことから、子宮筋腫の発生には、遺伝的背景だけではなく、後天的な要因であるホルモン環境、栄養、生活環境などのエピジェネティックな変化が関与している可能性がある。

当研究室では、これまでに子宮筋腫の発生・進展にエピゲノム異常が関与するという仮説のもと、子宮筋腫のDNAメチル化解析を行ってきた。その結果、子宮筋腫では子宮筋層と比較してゲノムワイドにDNAメチル化異常が生じていることをRLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning) 法やD-REAM (microarray-based DNA methylation analysis with restriction tag-mediated amplification) 法を用いて明らかにしてきた。

さらに、エストロゲンレセプターのプロモーター上流領域 (-1,188~-790bp) では、子宮筋層と比較して子宮筋腫においてDNA低メチル化状態であることを明らかにし、同時に、この領域のDNAメチル化状態は、子宮筋腫を有する症例の正常子宮筋層と子宮筋腫を有さない症例の正常子宮筋層とは異なっていることが判明した。この結果より、子宮筋腫を有する症例の子宮筋層は正常に見えて、実は子宮筋腫発生のpotentialを獲得している可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、子宮筋腫とそれを有する症例の正常子宮筋層の比較だけではなく、子宮筋腫を有さない症例の真の正常子宮筋層と子宮筋腫を有する症例の子宮筋層におけるゲノムワイドなDNAメチル化状態を解析することによって両者の違いを見だし、子宮筋腫の発生に関わる遺伝子を解明することを目的とした。

(1) 子宮筋腫の発生や発育に関与する遺伝子の同定

子宮筋腫を有さない症例の子宮筋層組織(A)、子宮筋腫を有する症例の子宮筋層組織(B)、子宮筋腫組織(C)、それぞれについて、ゲノムワイドにDNAメチル化状態を解析し、Aと比較し、B・Cに共通して認められるDNAメチル化異常遺伝子を同定する。この結果より、これらの遺伝子が、肉眼的に正常に見えるBにおいて子宮筋腫発生のpotentialをもつことを示す遺伝

子であると同定できる。

で同定した遺伝子のうち、プロモーター領域にDNAメチル化異常を有する遺伝子を抽出し、その遺伝子のmRNA発現を解析し、A・Bと比べCで発現に違いを認める遺伝子を同定する。この結果より、これらの遺伝子の発現変化が、子宮筋腫の発生・発育に関与するものと考えられる。

で同定した遺伝子について、正常子宮平滑筋培養細胞を用いて強制発現実験あるいは発現抑制実験を行い、細胞の増殖能及び細胞形態に与える影響を調べ、さらに子宮筋腫の構成成分である細胞外マトリックス(コラーゲンやフィブロネクチン)産生を調べる。

(2) 後天的にエピゲノム異常を引き起こす物質として環境ホルモンに注目し、正常子宮平滑筋培養細胞をダイオキシン添加下で培養し、非添加群とダイオキシン添加群におけるDNAメチル化状態の違いをゲノムワイドに解析し、ダイオキシンによってDNAメチル化異常が実際に引き起こされるのか、また子宮筋腫発生のpotentialをもつBのDNA異常パターンと比較する。

3. 研究の方法

(1) 子宮筋腫の発生や発育に関与する遺伝子の同定

子宮筋腫を有さない症例の子宮筋層組織(A)、子宮筋腫を有する症例の子宮筋層組織(B)、子宮筋腫組織(C)、各組織それぞれ3症例ずつについて、Infinium Human Methylation 450(Illumina社)を用いて、ゲノムワイドにDNAメチル化状態を解析した。各組織から抽出したゲノムDNAにbisulfite処理を施し、メチル化されていないシトシン塩基をウラシルに変換させた。全ゲノムの増幅と断片化処理を行い、メチル化部位と結合するビーズタイプと非メチル化部位に結合するビーズタイプを用いてハイブリダイゼーションを行い、メチル化状態を解析した。14,000以上の遺伝子から選択された27,578のCpG部位について解析した。この手法を用いて、Aと比較しB・Cに共通して認められるDNAメチル化異常遺伝子を同定した。同定した遺伝子のDNAメチル化異常を認めたCpG部位周辺のDNAメチル化状態は、sodium bisulfite sequencing法によって確認した。各組織より抽出したゲノムDNAを制限酵素処理し断片化したのち、bisulfite処理によりメチル化されていないシトシンをウラシルに変換した。bisulfite処理後のDNA配列に特異的なプライマーを設計しPCRを施行する。PCR産物はTAクローニングし、各10クローン以上のsequenceをABIシーケンサーにて解析した。さらに、複数症例によるDNAメチル化状態の確認は、bisulfite restriction mapping法

によって確認した。bisulfite 処理後の PCR 産物を ACGT を認識して切断する制限酵素を用いて切断する。C T 置換の有無で切断しゲル電気泳動により断片の長さからメチル化状態を判定した。

で同定した遺伝子のうち、プロモーター領域に DNA メチル化異常を有する遺伝子を抽出し、その遺伝子発現について、Infinium Human Methylation 450 による解析に用いたサンプルだけでなく、多数症例において、real-time RT-PCR 法で mRNA 発現を解析し、A・B と比べ C で発現に違いを認める遺伝子を同定した。

で同定した遺伝子のうち、A・B と比較して C で高発現異常を呈した遺伝子について、これら遺伝子を強制発現させる発現ベクターを作製した。実験には、当研究室で使用実績のある、正常子宮平滑筋細胞 (TAKARA) および強制発現ベクター (pGL3-basic ベクター) を用いた。強制発現ベクターの作製は、cDNA ライブラリを作製した後に目的遺伝子の mRNA 全長を PCR にて増幅し、pGL3-basic ベクターに挿入して行った。今後は、強制発現による細胞数の変化を観察し、遺伝子が平滑筋細胞の増殖能に与える影響を検討する。低発現異常を来した遺伝子については、遺伝子の発現を抑制する siRNA を正常子宮平滑筋細胞に作用させ、遺伝子の発現抑制を行う。発現抑制による培養細胞数の変化を観察して遺伝子の平滑筋細胞への影響を検討する。検討項目としては、ベクターや siRNA を導入して、48 時間後に細胞がコントロールと比較して増殖しているかについて MTT assay で解析し、細胞形態の変化を位相差顕微鏡で観察する。また、細胞外マトリックスであるコラーゲンやフィブロネクチン産生を解析するために培養液中のこれらのタンパク濃度を ELISA を用いて測定する予定である。

- (2) 正常子宮平滑筋培養細胞を 50%コンフルエントまで培養し、ダイオキシン (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: TCDD) を 10pM~10nM の濃度で添加する。各濃度で 1、2、3、5、7 日後の培養細胞の生存率に対する毒性を調べる。有意な生存率の低下が認められない最大濃度、最長培養時間を TCDD 曝露条件として採用する。細胞分裂に伴う DNA メチル化状態の変化を捉えるため、可能であればなるべく 3 日以上の培養時間を採用する。TCDD 曝露後、細胞を回収し、DNA を抽出後、illumina Human Methylation 450 を用いてゲノムワイドに DNA メチル化パターンを解析し、コントロールと比較して TCDD 曝露により DNA メチル化異常が引き起こされるかを検討し、さらに研究方法(1)で解析した子宮筋腫を有する症例の子宮筋層組織の DNA メチル化パターンと比較し検討する。

4. 研究成果

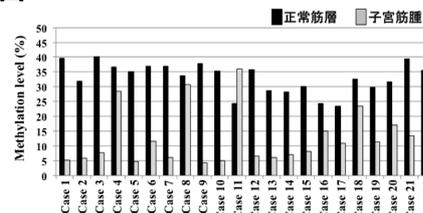
子宮筋腫を有さない症例の子宮筋層組織 (A)、子宮筋腫を有する症例の子宮筋層組織 (B)、子宮筋腫組織 (C)、各組織それぞれ 3 症例ずつにおいて、Infinium Human Methylation 450 でゲノムワイドに DNA メチル化解析 (DNA メチローム) を施行したところ、A と B の DNA メチル化状態に差を認めなかった。しかし A・B と比較し C で特異的に DNA メチル化変異が生じ、さらに mRNA 発現の変化を伴う遺伝子を 120 個特定した (表 1)。

表 1. 筋腫特異的にメチル化および発現変異が生じる遺伝子の候補

DNA methylation	mRNA expression	genes
hypomethylation	upregulated	24
hypermethylation	upregulated	19
hypomethylation	downregulated	12
hypermethylation	downregulated	65

Ontology 解析から、最も優位に抽出された遺伝子機能は癌関連であった。この癌関連の 76 遺伝子を解析対象として、11 症例でメチル化および発現の再現性の確認を行い、7 割以上の子宮筋腫検体で共通したメチル化と発現パターンを示した遺伝子を DNA メチル化変異により発現異常が生じる候補遺伝子として抽出した (図 1: 代表例を示す)。

図 1. DNAメチル化率



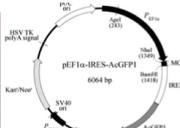
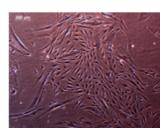
IRS1 遺伝子は 70% 以上の子宮筋腫症例で共通して低メチル化状態にある。

これらの遺伝子のうち DNA メチル化異常のある 5 遺伝子 (EPAS1, NRG1, NR3C1, GATA2,

図 2 in vivo 子宮筋腫形成モデル:

遺伝子改変ヒト細胞株のマウス腎被膜下への異種移植系
マウス子宮へのウイルス感染による遺伝子導入系

hTERT UtsMC を使用した遺伝子発現改変細胞株の作成

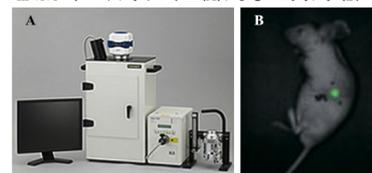


ヒト細胞株の免疫不全マウス腎被膜下への移植

ウイルスベクターのマウス生体子宮への感染



in vivo イメージングシステム(A)によるモニタリング(B)



MAPK10) を抽出した。この 5 遺伝子のうち、11 症例において B と C とで mRNA 発現の異なった 3 遺伝子 (NRG1, NR3C1, MAPK10) を検討に用

いることとした。これらの遺伝子をそれぞれレンチウイルスベクターに挿入した。このベクターを不死化したヒト平滑筋細胞株に導入し免疫不全マウスの腎被膜下へ移植し筋腫化が生じるか研究中有である（図2）。

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5件）

- (1) Potential Mechanisms of Aberrant DNA Hypomethylation on the X Chromosome in Uterine Leiomyomas. J Reprod Dev. 査読有 60: 47-54. 2014. S.Sato, R.Maekawa, Y.Yamagata, H.Asada (他5名、4番目).
- (2) 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. 査読有 155: 275-286. 2014. I. Tamura, S. Sato, M. Okada, M. Tanabe, L. Lee, R. Maekawa, H. Asada (他3名、7番目).
- (3) Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. PLoS One. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0066632. 2013. R.Maekawa, S.Sato, Y.Yamagata, H.Asada (他7名、4番目).
- (4) Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in female rats. Endocrinology. 査読有 154: 458-470. 2013. L. lee, H. Asada (他8名、2番目).
- (5) Induction of IGFBP-1 expression by cAMP is associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells. Endocrinology. 査読有 153: 5612-5621. 2012. I. Tamura, H. Asada (他7名、2番目).

〔学会発表〕（計2件）

- (1) 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変異機構．第 18 回日本生殖内分泌学会学術集会．2013 年 12 月 7 日．東京．シェーンバッハ・サポー．
- (2) 前川 亮、山縣芳明、浅田裕美、田村 功、李 理華、田邊 学、田村博史、杉野法広．子宮筋腫のゲノムワイド DNA メチル化解析．第 85 回日本内分泌学会．2012 年 4 月 19 日．愛知．名古屋国際会議場．

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

(2) 研究分担者

なし