

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861500

研究課題名(和文)子宮内膜症の病態へのがん抑制遺伝子C/EBP の関与

研究課題名(英文)C/EBP alpha is promotes the pathogenesis of endometriosis.

## 研究代表者

川野 由紀枝(KAWANO, YUKIE)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：60516128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症における、がん抑制遺伝子CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)の役割について検討した。C/EBP をノックダウンした正常子宮内膜間質細胞(NESC)では、細胞生存能が高まり、apoptosisに耐性を獲得することが示された。C/EBP を強制発現させたECSCでは、生細胞の減少とapoptosis細胞の増加を認めた。子宮内膜症ではepigeneticな変化によりC/EBP は異常なsilencingを受けており、子宮内膜症の病態形成に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence suggests that various epigenetic aberrations play definite roles in the pathogenesis of endometriosis. Our findings suggest that an epigenetically suppressed tumor suppressor gene is involved in the pathogenesis of endometriosis by creating the proliferative, antiapoptotic, and other disease-specific characteristics of endometriosis. The results also suggest that histone deacetylase inhibitors are promising agents for the treatment of endometriosis.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜症 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症組織と正常子宮内膜組織の分子生物学的機構は大きく異なっている。

アポトーシス抵抗性や過度な増殖能は子宮内膜症組織の特徴である。その機序として、多くのアポトーシス関連因子や増殖関連因子の発現の異常が報告されている。これらの発現異常は子宮内膜症において安定して観察されるため、何らかの機構で細胞に記憶されていると考えられる。

DNA メチル化、ヒストン蛋白修飾（アセチル化、メチル化）に伴うクロマチン構造の変換、マイクロ RNA などのエピジェネティックな異常が子宮内膜症の病態形成に重要な役割を果たしていることに注目した。

2. 研究の目的

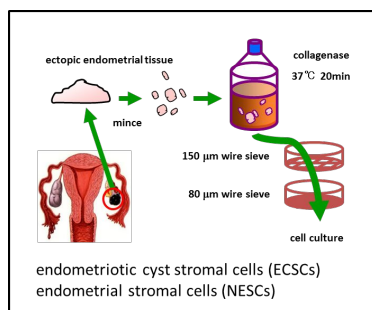
ヒストンのアセチル化はヌクレオソームの構造変化をもたらし、転写因子のゲノムDNAへのアクセスに大きく影響している。

Histone deacetylase inhibitor(HDACI)であるバルプロ酸(VPA)で刺激を行った細胞よりRNAを採取し、マイクロアレイを用いてコントロール群と比較した。ECSCにおいて、異常な silencing を受けており増殖や生存を調節していると考えられる遺伝子群を抽出した。その中から、子宮内膜症の病態形成におけるがん抑制遺伝子 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) の役割について検討した。

3. 研究の方法

手術時に文書による患者の同意を得て嚢胞壁

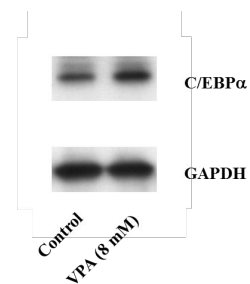
を採取し、ECSCを分離・培養した。同様に子宮筋腫の手術時に子宮内膜を採取し、正常子宮内膜間質細胞(NESC)を分離・培養した。NESCにsiRNAをtransfectionし、C/EBP



をノックダウンした。ECSCにレンチウイルスをベクターとしてC/EBP遺伝子を挿入し、強制発現させた。

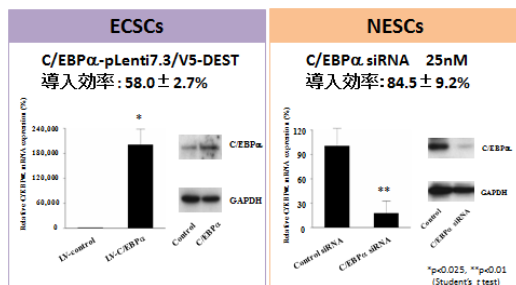
ECSCではC/EBPを強制発現させ、NESCではノックダウンした。細胞増殖の検討にはBrdU incorporation assay, MTS assayを用いた。DNAの断片化、caspase活性を指標としてapoptosisを検討した。C/EBPをノックダウンしたNESCでは、real time PCRを行

い、細胞周期関連遺伝子、apoptosis関連遺伝子の変化を検討した。apoptosis誘導因子にはstaurosporineを用いた。



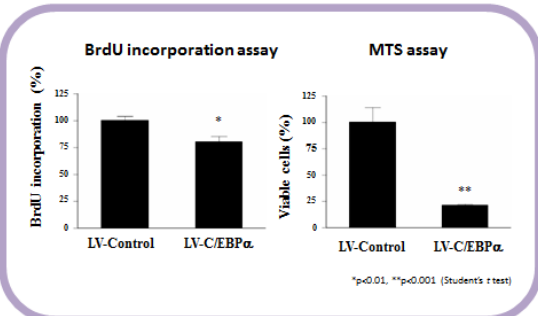
4. 研究成果

C/EBPαの強制発現とノックダウン



ECSCにおいて、VPAの刺激でC/EBPの発現は有意に高まった。C/EBPをノックダウンしたNESCでは、細胞生存能が高まり、apoptosisに耐性を獲得することが示された。C/EBPを強制発現させたECSCでは、生細胞

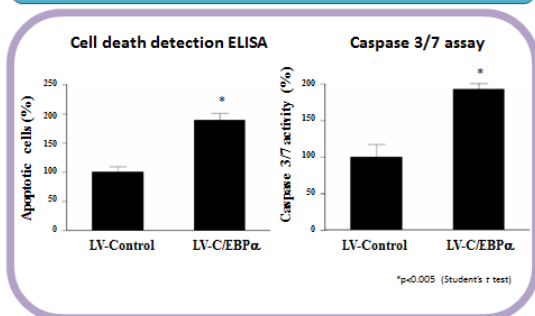
細胞増殖・生存に対する影響



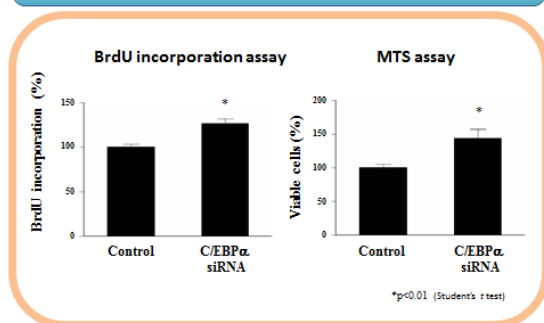
胞の減少とapoptosis細胞の増加を認めた。

C/EBP をノックダウンし staurosporine で刺激した NESC では、p21, p16, cdk2, cdk4 などの発現低下、PPAR $\gamma$ , caspase-10 の発現低下を認めた。

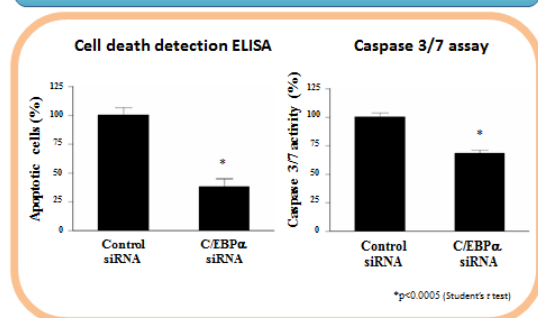
### Apoptosisに対する影響



### 細胞増殖・生存に対する影響



### Apoptosisに対する影響



子宮内膜症において、エピジェネティックに抑制を受けている遺伝子についての研究は、子宮内膜症の病態を解明するための大きな手掛かりになると考えられる。

### 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 1件)

Yukie Kawano, Kaei Nasu, Naoki Hijiya, Yoshiyuki Tsukamoto, Kohei Amada, Wakana Abe, Kentaro Kai, Masatsugu Moriyama, and Hisashi Narahara  
CCAAT/Enhancer-Binding Protein  $\alpha$  is epigenetically silenced by histone deacetylation in endometriosis and promotes the pathogenesis of endometriosis  
J Clin Endocrinol Metab Epub ahead of print, 2013 (査読有)

〔学会発表〕(計 2件)

川野由紀枝、子宮内膜症病態形成におけるがん抑制遺伝子 C/EBP $\alpha$  の関与についての検討、第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会、2013 年 5 月 11 日、ロイトン札幌・ホテルさっぽろ芸文館・札幌プリンスホテル・札幌市教育文化会館(北海道 札幌)

川野由紀枝、子宮内膜症の病態形成におけるがん抑制遺伝子 C/EBP $\alpha$  の役割 第 34 会日本エンドメトリオーシス学会、2013 年 1 月 18 日、栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川野 由紀枝 (KAWANO, Yukie)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：60516128

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：