

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462492

研究課題名(和文)子宮筋腫の発生・進展に関与する分子の特定 - in vivo筋腫形成モデルの確立 -

研究課題名(英文) Identification of molecules involved in the development and progression of uterine leiomyomas

研究代表者

浅田 裕美 (ASADA, Hiromi)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90526906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではin vivo筋腫形成モデルを確立し、子宮筋腫の発生・進展に関与する分子を特定することを目的とした。DNAメチロームおよびトランスクリプトームデータを用いた統合解析からSATB2およびNRG1を候補遺伝子として抽出し、それぞれの遺伝子発現を改変した細胞株を得た。これらの細胞株における網羅的な遺伝子発現をマイクロアレイで調べ、それぞれの細胞株で発現変化する遺伝子群を抽出した。それらの遺伝子群には正常筋層と比較して筋腫特異的に発現変化する遺伝子が複数含まれていた。現在、両方の遺伝子の発現を同時に改変した細胞株を用いて異種移植により、実際にin vivoで筋腫形成能を検証している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish the model to make the uterine leiomyomas in vivo and to identify molecules involved in the development and progression of uterine leiomyomas. We extracted 2 genes as candidate master gene by DNA methylome analysis and transcriptome analysis. We obtained a cell line in which the gene expression of SATB2 and NRG1 was altered and a cell line in which the expression of both genes was simultaneously altered. Comprehensive gene expression in these cell lines was examined by microarray, and a group of genes whose expression was changed in each cell line was extracted. These gene groups contained a plurality of genes whose expression was changed specifically in the uterine leiomyomas as compared with the normal myometrium. Currently, we are investigating to make the uterine leiomyomas in vivo by xenografts using these cell lines.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：子宮筋腫 DNAメチル化 異種移植

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、不妊症や流産の原因にもなるため、少子化の問題を抱える本邦では看過できない問題である。子宮筋腫治療には妊娠可能な状態で子宮を温存し得る分子標的薬による薬剤療法が理想的である。しかしながら、現在、使用可能な薬剤は子宮筋腫の増殖にかかわるエストロゲンの分泌を抑制するもののみである。これらの薬剤は種々の副作用を伴ううえに効果が一過性なため、治療薬として充分ではなく、新規薬剤の開発が望まれている。有用な分子標的薬の開発には、まず、子宮筋腫の発症・進展に関与する分子機構の解明が必要である。

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、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。

我々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、筋腫の DNA メチル化解析を行ってきた。その結果、筋腫では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明らかにしてきた (Molecular Human Reproduction, 2009、実験医学 28 巻 2537, 2010、J Reprod Dev, 2011)。また、エストロゲンレセプター (ER) 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た (Molecular Human Reproduction, 2008、平成 22~23 年度科学研究費助成事業「若手研究(B)」採択)。また、複数検体で同一患者に由来する筋腫と筋層を用い、ゲノムワイドな DNA メチル化解析(DNA メチローム)およびトランスクリプトーム解析を行い、子宮筋腫特異的に DNA メチル化変異が生じ、mRNA 発現の変化が伴う 120 個の遺伝子を特定した(表 1 PLoS One, 2013、平成 24~25 年度科学研究費助成事業「若手研究(B)」採択)。

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

2. 研究の目的

我々はこれまでに子宮筋腫の発症・進展に DNA メチル化変異が関与するとの仮説を立て、同一患者に由来する子宮筋腫と筋層を用い

て DNA メチローム解析およびトランスクリプトーム解析を行い、子宮筋腫特異的に DNA メチル化変異が生じている領域および発現が増減する遺伝子を特定している。本研究では、子宮筋腫の進行を抑制する新規薬剤あるいは予防法の開発に向けて、その基盤となる子宮筋腫の発生・進展に関わる分子機構の解明を目的とする。まず、先述の筋腫特異的に DNA メチル化および発現変異が生じる遺伝子から子宮筋腫の発生・進展に関与する遺伝子候補を抽出する。現在、*in vitro*で子宮平滑筋細胞が筋腫細胞に変化したことを評価できる有効な培養系がないので、*in vivo*で筋腫様腫瘍を形成する異種移植の系 (*in vivo* 筋腫形成モデル)を確立する。確立した *in vivo* 筋腫形成モデル用いて候補遺伝子の機能解析を行い、子宮筋腫の発生・進展に関与する遺伝子の特定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 子宮筋腫の発症・進展に関する遺伝子候補の抽出

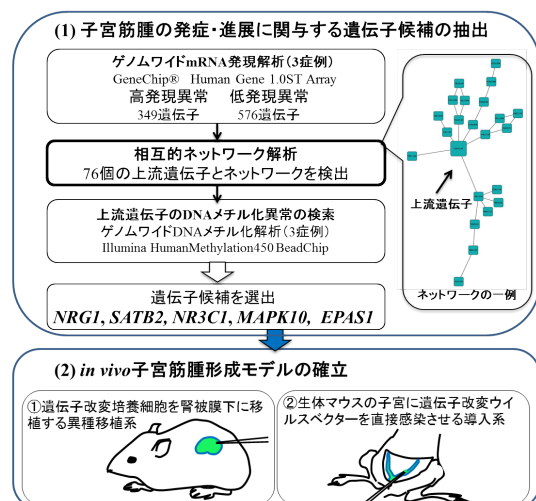
我々は、DNA メチル化変異により発現異常が生じている遺伝子として 120 個の遺伝子を既に出してあり(表 1) さらに相互ネットワーク解析等による統合解析で、細胞内シグナル伝達においてより上流で機能する転写因子等の遺伝子を絞り込む(図 1)。それらについて多症例でメチル化および mRNA 発現の再現性の確認を行い、7 割以上の子宮筋腫検体で共通したメチル化と発現パターンを示した遺伝子を子宮筋腫の発症・進展に関する遺伝子候補として抽出する。

(2) *in vivo* 子宮筋腫形成モデルの確立

(1)で抽出した候補遺伝子の発現を改変したヒト子宮平滑筋細胞を免疫不全マウスの腎被膜下に移植する()あるいは抽出した遺伝子の発現を改変したウイルスベクターを生体マウスの子宮に直接感染させる系()の 2 つの方法について検討し、筋腫様腫瘍を作成する系を構築する(図 1)。

遺伝子改変培養細胞を腎被膜下に移植する異種移植系

図 1. 研究方法の概要



初代培養ヒト子宮平滑筋細胞にヒト *TERT* 遺伝子を導入した細胞株（以下、hTERT UtSMC）を使用する。解析対象が子宮筋腫で高発現ならば対象遺伝子の CDS を組み込んだ発現ベクター、低発現であれば対象遺伝子に対する siRNA を産生する shRNA 発現ベクターを作製する。候補遺伝子を 1 個または適宜複数組み合わせ hTERT UtSMC に導入し、対象遺伝子の発現を改変した安定発現細胞株を得る。発現ベクターには同時に GFP を発現するもの (IRES- AcGFP ベクター) を使用する (図 3)。卵巣除去した雌の免疫不全マウスの一方の腎被膜下に上述の遺伝子改変した細胞塊を、他方にコントロールの細胞塊を移植する (図 1, 3)。細胞の増殖を促進するため恒常的にエストロゲン・プロゲステロンを分泌するビーズを皮下に移植する。移植した細胞塊の生着と腫瘍化は、*in vivo* イメージングシステムを使用し、随時モニタリングを行う。移植細胞の腫瘍の形成を確認した時点で腫瘍を回収し、蛍光実体顕微鏡にて GFP 陽性の子宮筋腫細胞株に由来する細胞が存在するかを確認する。GFP 発現細胞の残存を確認した後、組織学的に筋腫化を評価する。

生体マウスの子宮に遺伝子改変ウイルスベクターを直接感染させる導入系

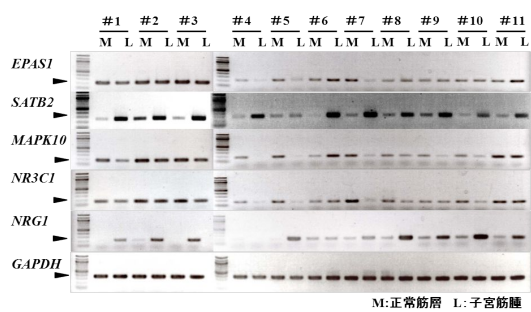
解析対象が子宮筋腫で高発現ならば対象遺伝子の ORF を、低発現ならば対象遺伝子に対する shRNA を増殖能欠損型レンチウイルスベクター用プラスミド (同時に GFP を発現するプラスミドを使用) に挿入する。作製したプラスミドをウイルス構造蛋白・制御因子を発現するベクターとともにパッケージング細胞に導入し、培養上清をレンチウイルスベクターとして回収し、近交系マウス (C57BL/6) の子宮に直接感染させ遺伝子を導入する (図 1)。この系においても複数の対象遺伝子の発現を同時に改変する方針で検討する。腫瘍の形成は前述と同様の方法でモニタリングし筋腫化を評価する。

4. 研究成果

(1) 子宮筋腫の発症・進展に関与する遺伝子候補の抽出

我々は、前述の DNA メチロームとトランスクリプトームデータをもとにネットワーク解析を行い、上流因子の検索を行うことで 76 遺伝子を抽出し、多症例におけるメチル化および mRNA 発現解析から *NRG1*, *SATB2*, *NR3C1*, *MAPK10* および *EPAS1* の 5 遺伝子を子宮筋腫の発症・進展に関与する遺伝子候補として抽出した (図 1, 2)。これらの遺伝子のうち *NRG1* および *SATB2* は筋腫で mRNA が高発現し、*NR3C1*, *MAPK10* および *EPAS1* は筋腫で低発現だった。さらに、それぞれのタンパク発現解析を行ったところ、*MAPK10* および *EPAS1* は hTERT UtSMC での発現が認められず siRNA によるノックダウン (KD) の効果が解析できないので排除し、*NRG1*, *SATB2* および *NR3C1* の 3 遺伝子のみを解析対象として選出した。

図 2. 多症例における候補遺伝子の mRNA 発現解析: RT-PCR



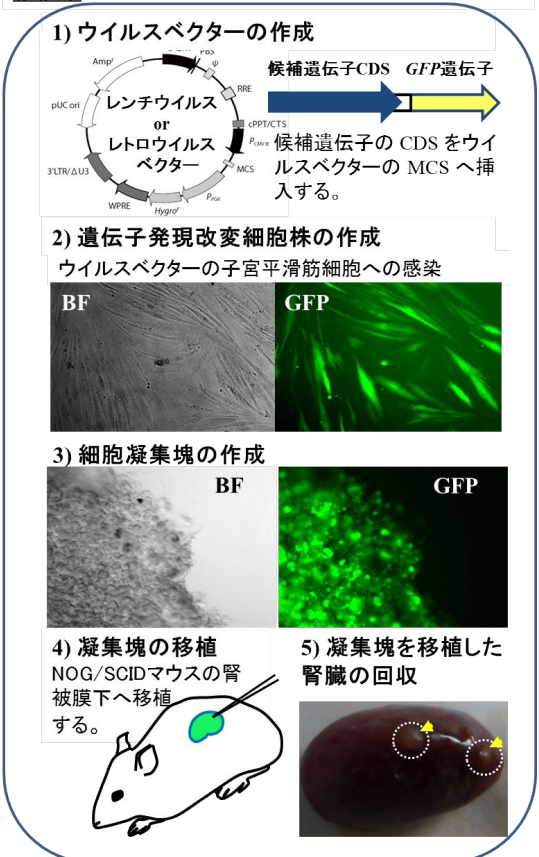
(2) *in vivo* 子宮筋腫形成モデルの確立

遺伝子改変培養細胞を腎被膜下に移植する異種移植系

候補遺伝子の発現改変細胞株の作成: 候補遺伝子として、筋腫で高発現した *NRG1* および *SATB2* と筋腫で低発現だった *NR3C1* を選出し、*NRG1* および *SATB2* のそれぞれを過剰発現、および *NR3C1* を KD した hTERT UtSMC の安定発現細胞株を作成した (図 3)。作成したそれぞれの細胞株について、改変した遺伝子の発現をウェスタンブロットにてタンパクレベルで確認したところ、*NRG1* および *SATB2* 過剰発現株ではそれぞれの発現増加が確認された一方で、*NR3C1* KD 細胞株では技術的な問題で発現が減少できていなかった。そこで、KD の系は諦め、子宮筋腫で高発現する *NRG1* および *SATB2* の 2 遺伝子の過剰発現に解析を絞った。これまでに、それぞれの遺伝子を単独で過剰発現した細胞株および両方の遺伝子を同時に過剰発現した細胞株を得ている。

図 3. *in vivo* 子宮筋腫形成モデルの確立

① 遺伝子改変培養細胞を腎被膜下に移植する異種移植系



免疫不全マウスを用いた異種移植系の検討：個体の安価さと飼育および手術時の扱いやすさから、免疫不全マウスとしてヌードマウスを選択した。hTERT UtSMC の親株およびモック導入細胞株を用いて、ヌードマウスの腎被膜下へ移植した(図3)。細胞塊を移植後8週間で移植腎臓を回収したが、回収した全ての腎臓で腫瘍は確認されなかった。さらに、GFPを発現するモック導入細胞株を移植した腎臓については、蛍光実体顕微鏡にてGFP発現細胞の有無も確認した。その結果、移植腎臓の約1/4でのみGFP発現細胞が認められたが、その数は極めて少なかった。これらの結果から、この細胞株はヌードマウスにはほとんど生着できないと考えられた。その一方で、最近、重度免疫不全であるNOD/SCIDマウスを使用した異種移植実験では、ヒト子宮平滑筋の初代培養細胞が約55%の確率で腎被膜下に生着するという情報を得ている(私信)。そこで、現在、NOD/SCIDマウスを用いてNRG1およびSATB2の2遺伝子を同時に過剰発現した細胞株について異種移植を行っている。

生体マウスの子宮に遺伝子改変ウイルスベクターを直接感染させる導入系

予備的実験として、レンチウイルスがどの程度、子宮に直接導入可能かを検討するためにGFPのみを発現するプラスミドを用いてレンチウイルスベクターを作成し、C57BL/6マウスの子宮に暴露した。レンチウイルス暴露後4週間で子宮を回収し、蛍光実体顕微鏡によりGFP発現細胞の有無を確認したが、GFP発現細胞は全く検出されなかった。さらに、回収した子宮の凍結切片を作成し、免疫染色でGFPの検出を試みたが陽性細胞は確認されなかった。これらの結果はレンチウイルスベクターが子宮平滑筋細胞に感染できなかったことを示唆している。レンチウイルスベクターのタイターを上げることで感染させられる可能性はあるが、現状よりもタイターを上げることは技術的・経済的に困難であるため、ウイルスベクターを直接感染させる導入系の検討はこれ以降行わなかった。

(3) 特定した遺伝子の作用機序の検証：トランスクリプトーム解析

in vivo 子宮筋腫形成モデルにおける腫瘍形成能の解析だけでは、機能解析が不十分なので、特定した遺伝子の下流で働く分子機構を推察するため、トランスクリプトーム解析を行った。NRG1およびSATB2のそれぞれの遺伝子発現を改変した細胞株について、マイクロアレイによる網羅的なmRNA発現解析を行った。その結果、モック細胞株と比較して、これらの細胞株で発現変化する566および626遺伝子をそれぞれ抽出した。抽出した遺伝子群についてパスウェイ解析等を行い、遺伝子改変により発現に影響を受けるシグナル経路およびその経路に含まれる遺伝子の機能を特定し、さらに、正常筋層と子宮筋腫の比較をもとにした子宮筋腫特異的に発現変化する遺伝子群およびシグナル経路と照合し

た。その結果、NRG1およびSATB2のそれぞれの発現を改変した細胞株においても、子宮筋腫特異的に変化する遺伝子群およびシグナル経路のいくつかは共通して変化しており、これらの2遺伝子が子宮筋腫の発生・進展にそれぞれ関与し得ることが示唆された。

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6件)

Tamura H, Kawamoto M, Sato S, Tamura I, Maekawa R, Taketani T, Asada H, Takaki E, Nakai A, Reiter RJ, Sugino N. Long-term melatonin treatment delays ovarian aging. *J Pineal Res.* 2017 Mar;62(2). doi: 10.1111/jpi.12381. (査読有)

Sato S, Maekawa R, Yamagata Y, Tamura I, Lee L, Okada M, Jozaki K, Asada H, Tamura H, Sugino N. Identification of uterine leiomyoma-specific marker genes based on DNA methylation and their clinical application. *Sci Rep.* 2016 Aug 8;6:30652. doi: 10.1038/srep30652. (査読有)

Okada M, Lee L, Maekawa R, Sato S, Kajimura T, Shinagawa M, Tamura I, Taketani T, Asada H, Tamura H, Sugino N. Epigenetic Changes of the Cyp11a1 Promoter Region in Granulosa Cells Undergoing Luteinization During Ovulation in Female Rats. *Endocrinology.* 2016 Sep;157(9):3344-54. doi: 10.1210/en.2016-1264. (査読有)

Maekawa R, Lee L, Okada M, Asada H, Shinagawa M, Tamura I, Sato S, Tamura H, Sugino N. Changes in gene expression of histone modification enzymes in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation. *J Ovarian Res.* 2016 Mar 15;9:15. doi: 10.1186/s13048-016-0225-z. (査読有)

Maekawa R, Sato S, Okada M, Lee L, Tamura I, Jozaki K, Kajimura T, Asada H, Yamagata

Y, Tamura H, Yamamoto S, Sugino N. Tissue-Specific Expression of Estrogen Receptor 1 Is Regulated by DNA Methylation in a T-DMR. *Mol Endocrinol.* 2016 Mar;30(3):335-47. doi: 10.1210/me.2015-1058. (査読有)

Yamagata Y, Takaki E, Shinagawa M, Okada M, Jozaki K, Lee L, Sato S, Maekawa R, Taketani T, Asada H, Tamura H, Nakai A, Sugino N. Retinoic acid has the potential to suppress endometriosis development. *J Ovarian Res.* 2015 Jul 31;8:49. doi: 10.1186/s13048-015-0179-6. (査読有)

〔学会発表〕(計 14 件)

佐藤俊, 前川亮, 田村功, 李理華, 岡田真紀, 城崎幸介, 三原由実子, 品川征大, 白蓋雄一郎, 竹谷俊明, 浅田裕美, 田村博史, 杉野法広「DNA メチル化パターンを指標とした子宮筋腫特異的バイオマーカーの確立と臨床診断への応用」, 第 21 回日本生殖内分泌学会学術集会, 2017 年 1 月 14 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

岡田真紀, 李理華, 前川亮, 佐藤俊, 品川征大, 白蓋雄一郎, 三原由実子, 田村功, 城崎幸介, 竹谷俊明, 浅田裕美, 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」, 第 21 回日本生殖内分泌学会学術集会, 2017 年 1 月 14 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

前川亮, 佐藤俊, 城崎幸介, 田村功, 白蓋雄一郎, 三原由実子, 品川征大, 岡田真紀, 浅田裕美, 竹谷俊明, 田村博史, 杉野法広, 「ESR1 の組織特異的発現は DNA メチル化により制御される」, 第 21 回日本生殖内分泌学会学術集会, 2017 年 1 月 14 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

城崎幸介, 前川亮, 田村功, 白蓋雄一郎, 三原由実子, 品川征大, 岡田真紀, 浅田裕美, 竹谷俊明, 佐藤俊, 田村博史, 杉野法広, 「ゲノムワイド解析による転写因子 C/EBP の脱落膜化過程での遺伝子の発現制御」, 第 21 回日本生殖内分泌学会学術集会, 2017 年 1 月 14 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

佐藤俊, 前川亮, 山縣芳明, 田村功, 李理華, 岡田真紀, 城崎幸介, 浅田裕美, 田村博史, 杉野法広, 「DNA メチル化パターンを指標とした子宮筋腫特異的バイオマーカーの確立と臨床診断への応」, 第 10 回エピジェネティクス研究会, 2016 年 5 月 19 日-2016 年 5 月 20 日, 千里ライフサイエンスセンタ

ー(大阪府・豊中市)

前川亮, 城崎幸介, 佐藤俊, 三原由実子, 品川征大, 浅田裕美, 竹谷俊明, 岡田真紀, 田村博史, 杉野法広, 「ESR1 の組織特異的発現は T-DMR (Tissue-dependent and differentially methylated regions) の DNA メチル化により制御される」, 第 10 回エピジェネティクス研究会, 2016 年 5 月 19 日-2016 年 5 月 20 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

城崎幸介, 前川亮, 佐藤俊, 三原由実子, 品川征大, 浅田裕美, 竹谷俊明, 岡田真紀, 田村博史, 杉野法広, 「次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析による転写因子 C/EBP の脱落膜化過程での役割の検討」, 第 10 回エピジェネティクス研究会, 2016 年 5 月 19 日-2016 年 5 月 20 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

城崎幸介, 田村功, 品川征大, 岡田真紀, 前川亮, 竹谷俊明, 浅田裕美, 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)の脱落膜化におけるグルコースの役割」, 第 20 回日本生殖内分泌学会学術集会, 2016 年 1 月 9 日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

岡田真紀, 李理華, 前川亮, 佐藤俊, 品川征大, 城崎幸介, 浅田裕美, 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」, 第 9 回エピジェネティクス研究会, 2015 年 5 月 25 日-2015 年 5 月 26 日, 学術総合センター一橋講堂(東京都・千代田区)

前川亮, 佐藤俊, 浅田裕美, 竹谷俊明, 品川征大, 城崎幸介, 岡田真紀, 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」, 第 9 回エピジェネティクス研究会, 2015 年 5 月 25 日-2015 年 5 月 26 日, 学術総合センター一橋講堂(東京都・千代田区)

山縣芳明, 西野光一郎, 品川征大, 岡田真紀, 前川亮, 浅田裕美, 城崎幸介, 佐藤俊, 田村博史, 杉野法広, 「ゲノムワイド DNA メチル化解析からみた子宮内膜症の由来」, 第 9 回エピジェネティクス研究会, 2015 年 5 月 25 日-2015 年 5 月 26 日, 学術総合センター一橋講堂(東京都・千代田区)

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」, 第 88 回日本内分泌学会学術総会, 2015 年 4 月 23 日-2015 年 4 月 25 日, ホテルニューオータニ東京(東京都・千代田区)

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」,第 88 回日本内分泌学会学術総会,2015 年 4 月 23 日-2015 年 4 月 25 日,ホテルニューオータニ東京(東京都・千代田区)

城崎幸介, 田村功, 品川征大, 岡田真紀, 李理華, 前川亮, 浅田裕美, 佐藤俊, 山縣芳明, 田村博史, 杉野法広, 「次世代シーケンサーを用いたヒト子宮内膜間質細胞(ESC)の脱落膜化に伴いヒストン修飾と発現が上昇した遺伝子群の検討」,第 88 回日本内分泌学会学術総会,2015 年 4 月 23 日-2015 年 4 月 25 日,ホテルニューオータニ東京(東京都・千代田区)

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・講師

研究者番号: 90526906