

## 培養子宮内膜症細胞に対するバルプロ酸のエピジェネティック修飾効果についての検討

大分大学医学部産科婦人科学教室

川野由紀枝, 奈須 家栄, 津野 晃寿, 高井 教行  
黎 海莉, 安達 正武, 吉田 俊恵, 河野 康志, 楢原 久司

### 緒 言

子宮内膜症は生殖年齢の女性の約10%に認められ, 慢性骨盤痛や月経困難症, 不妊症の原因となる。良性疾患でありながら悪性腫瘍と同様に転移や播種, 再発を起し, 炎症や癒着, 癭痕を形成するため, 子宮内膜症は類腫瘍性疾患, 類炎症性疾患と位置づけられている。

その発症機序は未だ不明であるが, 広く支持されているのは月経血逆流による子宮内膜移植説である [1]。しかし子宮内膜症を発症していない健常女性では, 逆流した子宮内膜細胞は apoptosis に陥り増殖しない。一方, 子宮内膜症では apoptosis の制御に異常が生じ, 子宮内膜症細胞が異所性に生存・増殖し, 子宮内膜症が発生すると考えられる [2-4]。

治療薬として用いられる GnRH アゴニストをはじめとするホルモン剤は効果的であるが, 長期投与による副作用や再発率が高い点で問題があり [5, 6], 新しい機序による治療薬の開発が求められている。

子宮内膜症の患者において DNA のメチル化, アセチル化がその発症に関与していると報告され [7, 8], 病態形成におけるエピジェネティックな変化が注目されるようになった。今回, ヒストンのアセチル化に注目し, histone deacetylase (HDAC) inhibitor であるバルプロ酸 (VPA) の子宮内膜症に対する作用について検討した。

### 方 法

卵巣子宮内膜症性嚢胞の嚢胞核出もしくは付

属器切除時に, 文書による患者の同意を得て嚢胞壁を採取し, 卵巣子宮内膜症間質細胞を分離・培養した。分離した細胞は免疫染色により抗 vimentin 抗体, 抗 CD10 抗体陽性, 抗 cytokeratin 抗体陰性であり, 子宮内膜症間質細胞であることを確認した。

培養細胞を VPA (0.5-16 mM) にて刺激を行った。増殖能への影響は BrdU の取り込みを用いて評価した。細胞周期に対する影響については flow cytometry を用いて検討した。Internucleosomal DNA fragment assay, annexin V を用いて細胞増殖, 細胞周期, apoptosis について検討し, また, クロマチン免疫沈降を用いてアセチル化ヒストンが関与する遺伝子の解析を行った。

### 成 績

子宮内膜症間質細胞の細胞増殖に対する効果についての検討では, BrdU の取り込みは 0.5 mM から有意に抑制された (図 1)。

子宮内膜症間質細胞の細胞周期に対する VPA の効果については, 子宮内膜症性嚢胞間質細胞を VPA 酸 8 mM 存在下に 72 時間培養した後, flow cytometry を用いて細胞周期を解析した。コントロールと比して VPA 添加後では G0/G1 期の細胞数が有意に増加しており, それに伴い S 期の減少を認めた。VPA の刺激により G0/G1 cell cycle arrest が誘導されることがわかった (図 2)。

VPA 添加後に annexin V と PI にて染色を行い, flow cytometry にて解析した結果, コント

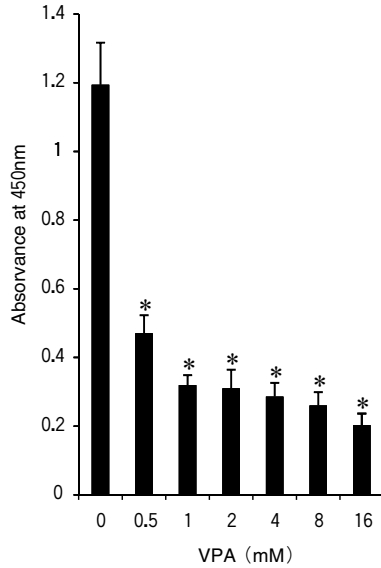


図1 子宮内膜症細胞のBrdU取り込みに対するVPAの効果  
\* $p < 0.0001$  vs. untreated controls (Bonferroni/Dunn test)

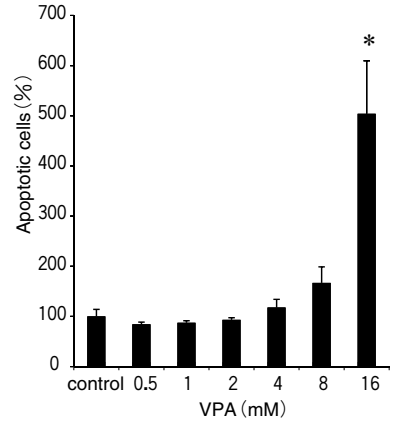


図3 VPAによる子宮内膜症細胞のapoptosisの誘導  
\* $p < 0.0001$  vs. untreated controls (Bonferroni/Dunn test)

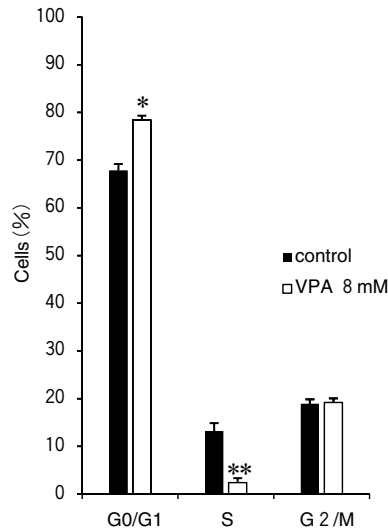


図2 子宮内膜症細胞の細胞周期に対するVPAの効果  
\* $p < 0.0001$  vs. untreated controls  
\*\* $p < 0.001$  vs. untreated controls (Bonferroni/Dunn test)

ロールと比してVPA 8 mM添加後ではapoptosis細胞が13%に増加しており、16 mM添加後では33%に増加した。さらに、VPAのapoptosisへの影響をcell death detection ELISA assayにて検討を行ったところ、VPAの濃度に依存してapoptosis細胞の増加がみられた。コントロールに比してVPA 16 mM添加後ではapoptosis細胞は約3倍に増加しており、有意差を認めた(図3)。VPAの刺激によりapoptosisが誘導されることがわかった。

抗アセチル化ヒストンH3, H4に対する抗体を用い、クロマチン免疫沈降を行った。免疫沈降物からDNAを精製し、p21のプロモーター領域を鋳型としてPCRを施行した。結果よりVPA 8 mMで処理したものでアセチル化ヒストンの凝集がより高いことが示された。同様に免疫沈降物からp16のプロモーター領域のPCRを行った結果、p16についても、同様の結果が得られた(図4)。

### 考 察

近年、DNAのメチル化やヒストン脱アセチル化、リン酸化をはじめとするエピジェネティクス異常が腫瘍や炎症性疾患などの発症に関わることが明らかになりつつある。ヒストンのN末端はヒストンテールと呼ばれ、リン酸化、アセチル化、メチル化などの修飾のターゲットと

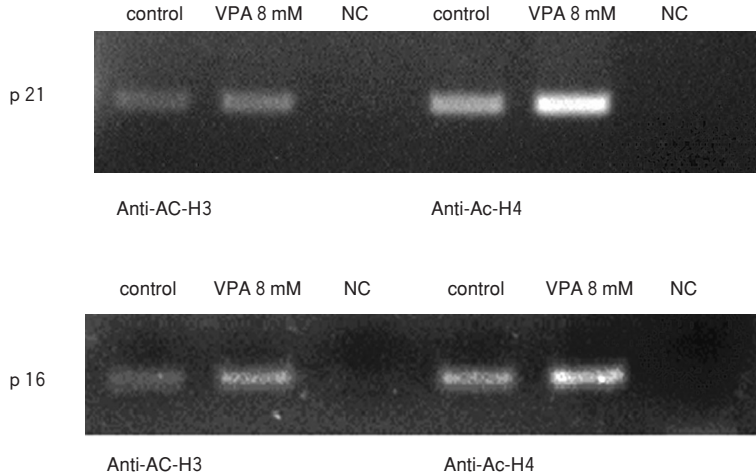


図4 クロマチン免疫沈降

なり，遺伝子の転写における活性制御において重要な役割を果たすと考えられている [9]。子宮内膜症においても，エピジェネティクスの関与が示唆されている [7, 8]。

今回使用したVPAは抗てんかん薬として用いられてきたが，近年ヒストン脱アセチル化酵素の阻害によるエピジェネティックな作用を有することが報告されている [10]。今回の結果から，VPAは子宮内膜症性間質細胞に対して細胞増殖抑制，G0/G1期での細胞周期停止，apoptosisを誘導することが判明した。さらに，クロマチン免疫沈降の結果，VPA刺激でp21, p16のプロモーター領域におけるクロマチン構造の変化が誘導されることが示された。

われわれの検討から，VPAは子宮内膜症の増殖抑制に関与することが示され，新しい薬剤として有効である可能性が示唆された。今後さらに，VPAを含むヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の子宮内膜症治療薬としての可能性および作用機序について検討を行う予定である。

#### 文 献

[1] Halme J et al. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 151-154  
 [2] Nishida M et al. Endometriotic cells are resistant

to interferon- $\gamma$ -induced cell growth inhibition and apoptosis: a possible mechanism involved in the pathogenesis of endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2004; 11: 29-34

- [3] Harada M et al. Detection of apoptosis in human endometriotic tissues. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 307-315  
 [4] Watanabe A et al. The role of survivin in the resistance of endometriotic stromal cells to drug-induced apoptosis. *Hum Reprod* 2009; 24: 3172-3179  
 [5] Bergqvist A et al. A comparative study of the acceptability and effect of goserelin and nafarelin on endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2000; 14: 425-432  
 [6] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis and infertility. *Fertil Steril* 2004; 81: 1441-1446  
 [7] Wu Y et al. Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2007; 87: 24-32  
 [8] Masao I et al. An epigenetic disorder may cause aberrant expression of aromatase gene in endometriotic stromal cells. *Fertil Steril* 2008; 89: 1390-1396  
 [9] Mai A et al. Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev* 2005; 25: 261-309  
 [10] Göttlicher M et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001; 20: 6969-6978