




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第461号	氏名	川野 由紀枝
審査委員会委員		主査氏名	楊 井 功 
		副査氏名	守山 正胤 
		副査氏名	藤原 正幸 
<p>Application of the histone deacetylase inhibitors for the treatment of endometriosis: histone modifications as pathogenesis and novel therapeutic target. (ヒストン脱アセチル化阻害剤の子宮内膜症治療への応用: 子宮内膜症の病因としてのヒストン修飾と新規薬物療法への可能性) Human Reproduction 126: 2486-98, 2011</p> <p>【背景と目的】 子宮内膜症は生殖年齢の女性の 3~10%に発生するエストロゲン依存性の良性疾患である。現行の薬物療法は副作用や高い再発率の点で問題がある。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ことが報告されている。本研究では、子宮内膜症の病因としてのエピジェネティック機構の解明と histone deacetylase inhibitors (HDACis) の治療効果について検討した。</p> <p>【研究対象および方法】 子宮内膜症手術時に文書による患者の同意を得て採取した嚢胞壁から間質細胞を分離・培養した。培養細胞を valproic acid (VPA) (1~16mM)、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) (1.25~20μM)、apicidin (0.01~100μM) で刺激して細胞増殖能、細胞周期、apoptosis に対する影響を検討した。クロマチン免疫沈降法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い、ヒストンのアセチル化レベルとアポトーシスや細胞周期に関連する蛋白に対する HDACis の影響についても検討した。</p> <p>【結果】 子宮内膜症間質細胞におけるアセチル化ヒストン H3, H4 量は正常子宮内膜間質細胞に比して少なかったが、HDACis はアセチル化ヒストン H3, H4 の発現を増加した。また、HDACis により p16<sup>INK4a</sup>、p21<sup>waf1/Cip1</sup>、p27<sup>Kip1</sup>、checkpoint kinase2 の蛋白発現は亢進し、G0/G1 arrest あるいは G2/M arrest が誘導され、用量依存性に細胞増殖は抑制された。さらに、HDACis により Bcl-X<sub>L</sub> 蛋白の発現は低下し、caspase-9 の発現は増加して用量依存性に apoptosis が誘導された。一方、免疫沈降では HDACis は p16<sup>INK4a</sup>、p21<sup>waf1/Cip1</sup>、p27<sup>Kip1</sup>、chk2 のプロモーター領域においてヒストン H3, H4 のアセチル化を増加させた。</p> <p>【考察】 子宮内膜症間質細胞においてアセチル化ヒストン H3, H4 量が少ないことは内膜症においてヒストンに異常な脱アセチル化があることを示唆している。ヒストンのアセチル化は全ゲノム中 2~20%もの遺伝子の発現に影響しているといわれている。HDACis はヒストンのアセチル化を増加させ、主にクロマチン構造を開いた形に変化させる。その結果、遺伝子発現抑制経路の再活性化や抑制因子の増加により遺伝子の過剰発現を抑制する働きがある。HDACis は多くの腫瘍細胞の apoptosis を誘導するが、子宮内膜症は apoptosis 抵抗性を有しており、増殖抑制や apoptosis を誘導する HDACis は、新しい薬物療法として有効である可能性が示唆された。今後は、cDNA microarray 解析等を行うことにより、子宮内膜症でエピジェネティックに抑制されている遺伝子の全容が解明されると考えられる。</p> <p>間質細胞中のアセチル化ヒストン減少から子宮内膜症をエピジェネティック病としてとらえた本研究は、子宮内膜症の新規治療法の開発ばかりでなく他の疾病の新治療法開発への可能性を示唆するものである。このため、審査委員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 川野 由紀枝

## 論 文 題 目

Application of the histone deacetylase inhibitors for the treatment of endometriosis: histone modifications as pathogenesis and novel therapeutic target

(ヒストン脱アセチル化阻害剤の子宮内膜症治療への応用：子宮内膜症の病因としてのヒストン修飾と新規薬物療法への可能性)

## 要 旨

## 緒言

子宮内膜症は生殖年齢の女性の3~10%に発生するエストロゲン依存性の良性疾患である。現行の薬物療法は副作用や高い再発率の点で問題がある。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ことが報告されている。今回、子宮内膜症の病因としてのエピジェネティック機構の解明と、histone deacetylase inhibitors (HDACIs)の治療効果について検討した。

## 研究対象および方法

子宮内膜症手術時に文書による患者の同意を得て嚢胞壁を採取し、子宮内膜症間質細胞を分離・培養した。培養細胞を Valproic acid (VPA) (1-16mM), Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) (1.25-20  $\mu$ M), apicidin (0.1-100  $\mu$ M)で刺激を行った。細胞増殖能、細胞周期、apoptosisに対する影響を検討した。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。ヒストンのアセチル化レベルとアポトーシス関連蛋白、細胞周期関

連蛋白における HDACIs の影響について検討した。

### 結果

子宮内膜症間質細胞におけるアセチル化ヒストン H3,H4 は正常子宮内膜間質細胞に比して低かった。細胞増殖は HDACIs の刺激で濃度依存性に抑制された。細胞周期解析では G0/G1 arrest あるいは G2/M arrest が誘導された。HDACIs の刺激で p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, Checkpoint kinase 2 の蛋白発現が亢進した。HDACIs は濃度依存性に apoptosis を誘導した。蛋白では Bcl-X<sub>L</sub> の発現は低下し、caspase-9 の発現は増加した。アセチル化ヒストン H3,H4 の発現は HDACIs の刺激で増加した。免疫沈降では HDACIs は p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, chk2 のプロモーター領域においてヒストン H3,H4 のアセチル化を増加させた。

### 考察

子宮内膜症間質細胞においてアセチル化ヒストン H3,H4 が有意に低いことは内膜症においてヒストンに異常なアセチル化があることを示唆している。ヒストンのアセチル化は全ゲノム中 2-20%もの遺伝子の発現に影響しているといわれている。HDACIs はヒストンのアセチル化を増加させ、主にクロマチン構造を開いた形に変化させる。その結果、遺伝子発現抑制経路の再活性化や抑制因子の増加により遺伝子の過剰発現を抑制する働きがある。HDACIs は多くの腫瘍細胞の apoptosis を誘導する。子宮内膜症は apoptosis 抵抗性を有しており、増殖抑制、apoptosis を誘導する HDACIs は、新しい薬物療法として有効である可能性が示唆された。今後は、cDNA microarray 解析を行うことにより、子宮内膜症でエピジェネティックに抑制されている遺伝子の全容が解明されることが考えられる。