




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第503号	氏名	阿部 若菜
審査委員会委員	主査氏名	小林 隆志 	
	副査氏名	西園 晃 	
	副査氏名	三股 浩光 	
<p>論文題目 miR-196b targets c-myc and Bcl-2 expression, inhibits proliferation and induces apoptosis in endometriotic stromal cells. (miR-196b は c-myc と Bcl-2 を介して、子宮内膜症間質細胞の増殖を抑制しアポトーシスを促進する)</p> <p>論文掲載雑誌名 Human Reproduction, 2013 Mar;28(3):750-61.</p> <p>論文要旨</p> <p>子宮内膜症は生殖年齢の女性の3-10%に発症するエストロゲン依存性の良性疾患であるが、現行の薬物療法は副作用や高い再発率が問題となっている。近年、DNAメチル化、アセチル化などのエピジェネティック異常が、子宮内膜症の発症に大きく関与していることが報告されている。本研究は、エピジェネティクス機構のひとつとして知られている microRNA (miRNA) に着目し、子宮内膜症間質細胞と正常子宮内膜間質細胞の間で miRNA microarray を用いた網羅的 miRNA 発現解析を行い抽出された miR-196b について子宮内膜症の病態形成との関連を解析したものである。</p> <p>子宮内膜症および子宮筋腫の患者から子宮内膜症間質細胞と正常子宮内膜間質細胞を分離・培養し、RNA を抽出して miRNA microarray 解析を行った。そこで、12種類の miRNA の遺伝子発現に差が認められ、その中から子宮内膜症間質細胞で発現レベルが低下する miR-196b についてさらに解析を進めた。子宮内膜症間質細胞における miR-196b の発現レベルの低下は定量的 RT-PCR 法によって確認された。そこで、miR-196b を子宮内膜症間質細胞に強制発現させると、細胞形態が変化し、細胞増殖が抑制され、Caspase が活性化してアポトーシスが促進された。また、miR-196b は子宮内膜症間質細胞における c-myc と Bcl-2 遺伝子の発現を抑制した。実際に、c-myc の発現レベルは、正常子宮内膜間質細胞に比べ子宮内膜症間質細胞で上昇していることが確認された。</p> <p>一方、miR-196b は子宮の機能制御に重要とされる転写因子 HOXA10 のゲノムの上流域に存在するが、HOXA10 mRNA の発現も miR-196b と同様に正常子宮内膜間質細胞に比べ子宮内膜症間質細胞で低下していることが明らかとなり、2つの遺伝子発現に相関が認められた。さらに、DNA 脱メチル化剤である 5-aza-dC で処理すると、子宮内膜症間質細胞における miR-196b と HOXA10 の遺伝子発現レベルが回復したことから、2つの遺伝子は DNA メチル化によるサイレンシングを受けていることが示唆された。そこで、メチル化感受性 PCR 法によって miR-196b ゲノムのメチル化レベルを調べてみると、子宮内膜症間質細胞においてメチル化が亢進していることが明らかになった。従って、miR-196b は c-myc と Bcl-2 を介して、子宮内膜間質細胞の増殖と生存を制御しており、子宮内膜症ではメチル化による miR-196b の発現低下が引き起こされ、細胞増殖が亢進しアポトーシス耐性が誘導されていることが示唆された。</p> <p>本研究は、miR-196b のエピジェネティック制御による子宮内膜症の病態形成を示したものであり、メチル化制御による新たな子宮内膜症の治療法の確立に資する重要な基盤的研究である。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判断した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 阿部 若菜

論 文 題 目

miR-196b targets c-myc and Bcl-2 expression, inhibits proliferation and induces apoptosis in endometriotic stromal cells

(miR-196b は c-myc と Bcl-2 を介して、子宮内膜間質細胞の増殖を抑制し apoptosis を促進する)

要 旨

諸言

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症の良性疾患である。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、アセチル化といったエピジェネティクス異常が、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クス機構の解明のひとつとして、microRNA (miRNA)の役割について検討した。

研究対象および方法

子宮内膜症および子宮筋腫の手術時に文書による患者の同意を得て子宮内膜症嚢胞壁および正常子宮内膜を採取し、子宮内膜症間質細胞・正常子宮内膜間質細胞を分離・培養した。それぞれの細胞から RNA を抽出し、miRNA microarray による網羅的解析を行った。miR-196b の役割を検討するために、子宮内膜症間質細胞に precursor hsa-miR-196b を導入して、細胞増殖、apoptosis、c-myc および Bcl-2 mRNA の発現などを検討した。また、HOXA10 遺伝子のプロモーター領域に miR-196b 遺伝子が位置

することから、子宮内膜症間質細胞における miR-196b と HOXA10 mRNA 発現を real-time PCR により確認した。さらに miR-196b の発現に対する DNA の脱メチル化剤の影響と、子宮内膜症間質細胞での miR-196b 遺伝子のメチル化の状態を確認した。

結果

miRNA microarray の網羅的解析により、正常子宮内膜間質細胞と比較して、子宮内膜症間質細胞で 8 つの miRNA が減少し 4 つの miRNA が増加していた。子宮内膜症間質細胞において発現が減少していた miR-196b を子宮内膜症間質細胞に強制発現させると、細胞増殖が抑制され、apoptosis が促進した。また miR-196b は子宮内膜症間質細胞における c-myc および Bcl-2 遺伝子の発現を抑制した。また子宮内膜症間質細胞と正常子宮内膜間質細胞における miR-196b と HOXA 10 mRNA の発現に相関が認められた。さらに miR-196b 遺伝子は子宮内膜症間質細胞においてメチル化によって発現が抑制されており、DNA の脱メチル化剤で処理すると子宮内膜症間質細胞における miR-196b の発現が増加した。

考察

今回の研究から、miRNA の異常発現がエピジェネティクス機構を介した子宮内膜症の病態形成に関わっていること、子宮内膜症間質細胞における miR-196b の発現は miR-196b 遺伝子のメチル化によって抑制されていること、さらに miR-196b の発現が抑制されていることが内膜症の増殖能の増強や抗 apoptosis という性質に影響していることが示唆された。miRNA や mRNA のさらなる microarray 解析で子宮内膜症の病態形成において重要な役割を果たす新たな miRNA が発見される可能性があり、今後 miRNA が子宮内膜症の新たな診断マーカーや治療手段となると推測される。