

学位論文審査の結果の要旨

| | | | |
|--|---------|--------|---|
| 審査区分 課・論 | 第 511 号 | 氏 名 | 甲斐 健太郎 |
| 審 査 委 員 会 委 員 | 主査氏名 | 権山 繁生 |  |
| | 副査氏名 | 長谷川 達男 |  |
| | 副査氏名 | 西園 晃 |  |
| 論文題目： Death receptor 6 is epigenetically silenced by histone deacetylation in endometriosis and promotes the pathogenesis of endometriosis (子宮内膜症におけるアポトーシス受容体 DR6 の発現低下と病態形成への関与) | | | |
| 論文掲載誌名： American Journal of Reproductive Immunology | | | |
| 論文要旨： 子宮内膜症の原因として、内膜細胞のアポトーシス抑制と増殖シグナルの活性化が考えられている。本研究では、マイクロアレイで抽出された原因遺伝子候補で、アポトーシスの制御に関わる Death Receptor 6 (DR6) と子宮内膜症の関連性を検討した。 正常子宮内膜間質細胞 (以下、正常細胞) と卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞 (以下、内膜症細胞) における DR6 のタンパク発現 (ウエスタンブロット法と免疫染色)、DR6 mRNA の発現 (リアルタイム PCR 法) の比較検討では、内膜症細胞においてこれらの発現が有意に低下していた。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸 (VPA) で処理した内膜症細胞には、クロマチン免疫沈降法で DR6 プロモーター領域のヒストン H4 にのみアセチル化が認められた。また、VPA 処理および未処理の内膜症細胞における DR6 の蛋白発現 (ウエスタンブロット法) は、処理群で有意に亢進していた。DR6 遺伝子をノックダウンした正常細胞における MTT assay, BrdU incorporation assay, Caspase 3/7 assay, Cell death detection ELISA の検討では、細胞増殖亢進およびアポトーシスの抑制が認められた。 以上の結果より、子宮内膜症には DR6 の脱アセチル化による発現低下があり、VPA による DR6 の発現亢進、すなわちアポトーシスの惹起が子宮内膜症の治療につながる可能性がある。 本論文は、DR6 の低発現 (アポトーシスの抑制) が子宮内膜症の形成機序に関わり、エピジェネティックな機序を介して DR6 を高発現させる VPA が子宮内膜症の治療にも応用できる可能性を示唆するものである。よって、審査員の合議により学位論文に値すると判定した | | | |

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

| | | | |
|--|---------|--|--------|
| 審査区分 (課)・論 | 第 511 号 | 氏 名 | 甲斐 健太郎 |
| 審 査 委 員 会 委 員 | 主査氏名 | 横山 繁生  | |
| | 副査氏名 | 長谷川 英男  | |
| | 副査氏名 | 西園 晃  | |
| <p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質疑・指摘を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 子宮内膜症性嚢胞に内膜組織が含まれている事を確認したか。 2. 内膜間質細胞と卵巣の間質細胞や嚢胞壁の線維芽細胞、筋線維芽細胞との分離・同定をどのように行ったか。 3. 本研究の目的の一つはDR6の機能であるが、先行研究の結果と同じか。 4. Volcano plot, Benjamini-Hochberg adjustment for FDRについて説明せよ。 5. Table 1のデータはGene Expression Omnibusに登録されたものだが、使用した細胞は同じものか。また、個体間でmicroarrayの結果に差はないのか。 6. Table 1で、DR6はupregulate、逆にDR2 (Fas) はdownregulateされているが、その意味をどう考えるか。 7. 本研究では、VPA投与でヒストン4のアセチル化のみがおこっているが、遺伝子の違いによって、アセチル化するヒストンに偏りがあるのか。 8. Fig. 4のNegative controlは、kitに付属したcontrolか。 9. Fig. 5と6の説明にあるcontrolとnegative controlはどのように使い分けているのか。 10. Fig. 5で、DR6 siRNAの投与でDR6特異的mRNAの発現は約1/2に減少しているが、これでノックダウン実験としては充分なのか。 11. DR6のノックダウン実験でDR6 mRNAの発現は約1/2に減少しているが、細胞の生存率や増殖、カスパーゼ活性化やアポトーシスが倍増または半減しないのはなぜか。 12. 子宮内膜症でアポトーシスが抑制されているならば、がんが発生しやすくなると思われるが、実際には子宮内膜症のがんがほとんどない事実をどう考えるか。 13. VPAが増殖因子等の遺伝子にアセチル化を起こし、他臓器に腫瘍を発生させる危険はないか。 <p>これらの質疑・指摘に対し申請者は概ね適切に解答した。よって審査委員の合議の結果申請者は学位取得有資格者と認定した。</p> | | | |

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 甲斐 健太郎

論 文 題 目

Death receptor 6 is epigenetically silenced by histone deacetylation in endometriosis and

promotes the pathogenesis of endometriosis

(子宮内膜症におけるアポトーシス受容体 DR6 の発現低下と病態形成への関与)

要 旨

ア. 諸言 (目的)

子宮内膜症細胞が子宮外で生着、増殖する原因として、アポトーシス制御シグナルの破綻と増殖シグナルの活性化が考えられている。我々は、このシグナル伝達の異常にエピジェネティック機構におけるヒストン修飾が関与することを報告してきた。今回、卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞(endometriotic cyst stromal cells: ECSCs)とそのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤刺激群を比較した cDNA microarray により抽出された候補遺伝子、death receptor (DR) 6 について子宮内膜症の病態形成への関与を検討した。

イ. 研究対象及び方法 (材料を含む)

正常子宮内膜間質細胞(normal endometrial stromal cells: NESCs)、ECSCs において DR6 タンパクの発現をウエスタンブロット法で、DR6 mRNA の発現をリアルタイム PCR 法でそれぞれ比較検討した。正常子宮内膜組織、卵巣子宮内膜症性嚢胞組織における DR6 タンパクの発現を、免疫組織化学染色法で比較

検討した。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤としてバルプロ酸を用い、DR6のプロモーター領域におけるアセチル化をクロマチン免疫沈降法にて検討した。ECSCsをバルプロ酸で処理し、DR6タンパクの発現変化をウエスタンブロット法にて検討した。NESCsにおいて siRNA による DR6 遺伝子のノックダウンを行い細胞増殖への影響を MTT assay、BrdU incorporation assay、アポトーシスへの影響を Caspase 3/7 assay、Cell death detection ELISA にてそれぞれ検討した。

ウ. 結果

DR6 タンパクおよび mRNA の発現は、いずれも NESCs に比べ ECSCs で低下していた。同様に、DR6 タンパクの発現は、正常子宮内膜組織に比べ卵巣子宮内膜症性嚢胞組織で低下していた。バルプロ酸刺激により、DR6 プロモーター領域ヒストン H4 のアセチル化が認められ、ECSCs における DR6 タンパク発現は増強した。NESCs における DR6 遺伝子のノックダウンにより、細胞増殖亢進およびアポトーシス耐性が認められた。

エ. 考察およびオ. 結語 (まとめ)

子宮内膜症においては、DR6 プロモーター領域ヒストン H4 の異常な脱アセチル化により、アポトーシス受容体 DR6 の転写が抑制され、細胞増殖亢進、アポトーシス耐性が起こることが示唆された。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が子宮内膜症の治療薬となりうる可能性が示唆された。

/