

令和元年6月6日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11142

研究課題名(和文) 遺伝子転写制御ネットワーク解析で見出したマスター遺伝子による子宮内膜症細胞の誘導

研究課題名(英文) Induction of endometriotic cells by the master regulatory genes detected with gene regulatory network analysis

研究代表者

前川 亮 (MAEKAWA, Ryo)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90598749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：SMITE解析を施行し、HOXC8をマスター遺伝子の候補として抽出した。HOXC8の機能を明らかにするため、子宮内膜間質細胞でHOXC8の強制発現を行ったところ、582遺伝子の発現が変化していた。Gene ontology解析、KEGG pathway解析により細胞接着や線維化に関するTGF-beta経路が活性化されていた。また、HOXC8の強制発現により、細胞増殖能、遊走能、癒着形成能が亢進した。HOXC8はマスター遺伝子として、子宮内膜症の発症に関与していることが推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、極めて発症頻度の高い子宮内膜症の病態に関与する重要な遺伝子が明らかとなった。このような疾患のマスター遺伝子を同定することは、将来的な治療標的になる可能性があり、本研究が与える学術的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To find the candidate genes of upstream regulatory gene in ovarian endometrioma, we performed SMITE analysis. We focused on HOXC8 as a candidate gene of upstream regulatory gene. To clarify the function of HOXC8, HOXC8-overexpressing cells were established using human endometrial stromal cells. The expression statuses of 582 genes were altered by HOXC8-overexpression. Gene Ontology analysis in these genes revealed that genes associated with cell proliferation, adhesion and composition of extracellular matrix were increased. KEGG pathway analysis indicated nine intracellular signaling pathways were altered. It is known that activation of TGF-beta pathway is characteristic of ovarian endometrioma, and is involved in the cell proliferation, invasion and adhesion. In the functional analysis, cell proliferation, migration and adhesion activities were enhanced in the HOXC8-overexpressing cells. HOXC8 is considered to be an upstream regulatory gene in ovarian endometrioma.

研究分野：産科婦人科学

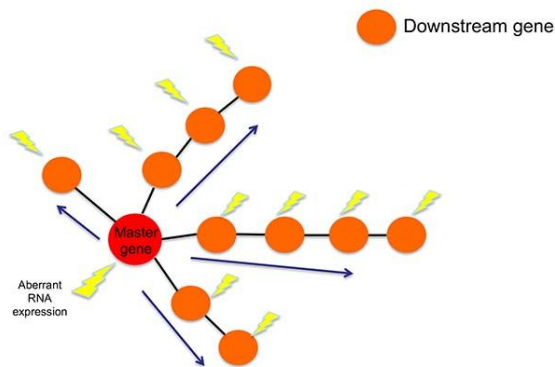
キーワード：子宮内膜症 マスター遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は子宮内膜の類似組織が子宮内腔以外の部位(骨盤腹膜、卵巣)で増殖・浸潤し、周囲組織と癒着を形成するエストロゲン依存性疾患である。生殖年齢女性の15%が罹患し、重度の月経痛、月経過多による貧血を引き起こし、不妊症の原因にもなる。薬物療法や手術療法を行うことで一過性の改善は得られるが、その根治は不可能であり、治療終了後は早期に再燃し、閉経に至るまで長年にわたり生活の質を著しく低下させる。疾患発症や進展の原因を突き止め、それを標的とする治療法の開発が望まれている。我々は、これまでに子宮内膜症の発症や進展に關与する遺伝子を同定するためゲノムワイドな遺伝子発現解析を行い、子宮内膜症では約800遺伝子に発現異常を生じていることを明らかにした。これらの遺伝子には子宮内膜症に特徴的な細胞増殖や細胞接着・浸潤、線維化に關与する多くの転写因子が含まれていた(PLoS One, 2015)。

近年、様々な疾患の発症において疾患発症の鍵となるマスター遺伝子が着目されている。転写因子を主とするマスター遺伝子の異常が下流の遺伝子の発現変化を引き起こして疾患の発症に關与していると考えられている(図1)。環境因子が発症に關与する子宮内膜症では、環境因子によって引き起こされたマスター遺伝子の発現異常が下流遺伝子の発現に影響を与えて子宮内膜症の発症に關与している可能性がある。



Normal tissues: Regulation of gene expression profile

Diseases: Impaired master genes work as pathogenic factor

図1. マスター遺伝子の異常により引き起こされる下流遺伝子の異常.

### 2. 研究の目的

本研究では、子宮内膜症発症の原因となるマスター遺伝子を独自に開発した上流遺伝子解析により同定する。そして、それら遺伝子が細胞への強制発現により、子宮内膜症と同様の細胞変化を引き起こすかについて検討する。

### 3. 研究の方法

我々はこれまでにゲノムワイド解析データを用いた転写制御ネットワーク解析により、

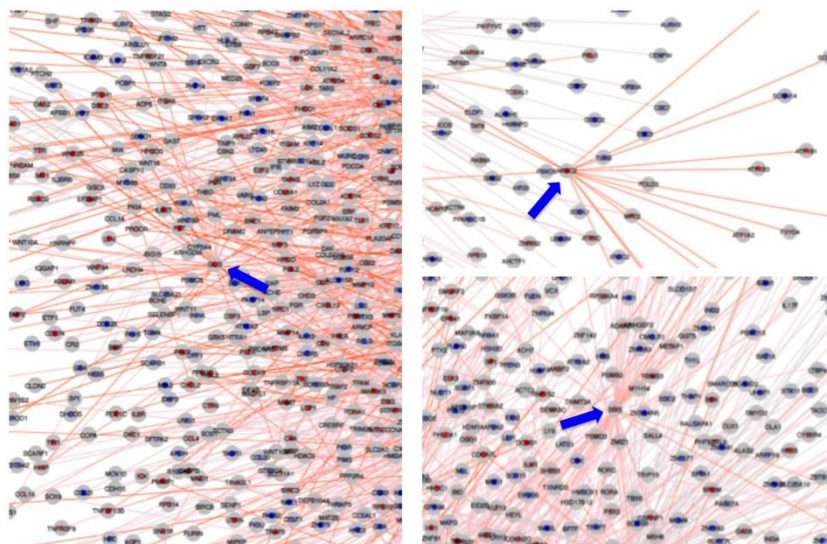


図2. SMITE解析により、局所の異常ネットワークで異常の中心となっている遺伝子をスピングラスアルゴリズムで同定する.

マスター遺伝子候補を同定するプログラムを独自に開発した (SMITE, Significance-based Modules Integrating the Transcriptome and Epigenome; 前川 平成 28-30 年度 基盤研究(C); BMC Bioinformatics 2017)。この解析により子宮内膜症で有意な発現異常を呈し、且つ転写制御の最上流に位置して下流遺伝子の発現異常を引き起こしている遺伝子を同定した。

抽出された遺伝子のうち、HOXC8 遺伝子について、強制発現ベクター (pGL3 vector) に HOXC8 を挿入して発現ベクターを作成した。この発現ベクターを子宮内膜間質細胞に導入 (transfection) して HOXC8 を強制発現させ、誘導された遺伝子発現変化について、マイクロアレイ (GeneChip Human Gene 2.0 ST Array, Affymetrix, USA) による発現解析を行った。また、同強制発現細胞において、増殖能、浸潤能、細胞遊走能 (migration assay/wound healing assay)、3次元コラーゲンゲルを用いた細胞接着・収縮能の解析 (3D gel contraction assay) を行った。

表1. SMITE解析により抽出されたマスター遺伝子候補.

Gene	Description	Location	Function
NR3C2	Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 2	nucleus, endoplasmic reticulum, cytosol	Nuclear receptor, Transcription regulator
CEBPD	CCAAT Enhancer Binding Protein Delta	nucleus	Transcription regulator
HOXC8	Homeobox C8	nucleus, cytoskeleton	Transcription regulator
GLI3	GLI Family Zinc Finger 3	nucleus, cytosol, cytoskeleton	Transcription regulator
ESR1	Estrogen Receptor 1	nucleus, plasma membrane	Nuclear receptor, Transcription regulator
ETS2	ETS Proto-Oncogene 2, Transcription Factor	nucleus, cytosol, plasma membrane	Transcription regulator
MAPK8	Mitogen-Activated Protein Kinase 8	nucleus, cytosol, mitochondrion	Serine/threonine-protein kinase
TFAP2C	Transcription Factor AP-2 Gamma	nucleus, cytosol, mitochondrion	Transcription regulator
PRDM1	PR/SET Domain 1	nucleus	Transcription regulator
HOXA9	Homeobox A9	nucleus	Transcription regulator

#### 4. 研究成果

SMITE 解析により、子宮内膜症のマスター遺伝子候補として 10 遺伝子を抽出した (図 2 および表 1)。我々はこの中で、HOXC8 に着目した。HOXC8 はこれまでに乳がんでの研究で、TGF-beta 経路を活性化させることにより、転移・浸潤に関わることが報告されている (図 3)。癒着と浸潤を特徴とする子宮内膜症では、HOXC8 が重要な役割を果たしている可能性がある。

HOXC8 遺伝子を発現するベクター (pGL3 vector) を作成し、HOXC8 を子宮内膜間質細胞に強制発現させ、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、582 遺伝子の発現が変化していた。これら遺伝子について Gene Ontology 解析および KEGG pathway 解析を行い、子宮内膜症性嚢胞で実際に活性化されているものと比較したところ、細胞接着に関わる遺伝子が共通して活性化されており、TGF-beta 経路も共通していた (図 4)。TGF-beta 経路は子宮内膜症で活性化し、癒着と線維化に関与していることが報告されている。即ち、HOXC8 の強制発現によ

#### HOXC8 (homeobox C8)

- location: 12q13.13, 242 amino acids
- HOXC8 belongs to Homeobox family and is highly conserved transcription factor.
- HOXC8 is expressed in neural tube, somatic mesoderm, and thorax at the stage of embryogenesis, and is involved in cartilage differentiation and development of nervous system.
- After embryonic development, HOXC8 is expressed in fibroblasts, mesenchymal cells such as skeletal muscle and smooth muscle cell, breast tissue and adipose tissue.

#### HOXC8 and invasion and metastasis

- HOXC8, together with SHOX2, are involved in invasion and metastasis of breast cancer through activation of TGF  $\beta$  signaling. (Yong et al, Genes Cancer, 2011; Yong et al, Oncotarget, 2014)

#### Endometriosis and TGF $\beta$ signaling pathway

- In endometriotic tissue, activation of TGF  $\beta$  signaling pathway has an important role in fibrosis, adhesion, and invasion. (Charles et al, Human Reproduction, 2011)
- TGF  $\beta$ , together with TNF  $\alpha$ /EGF/FGF, cause adhesion and fibrosis by inducing the accumulation of extracellular matrix, infiltration and proliferation of fibroblasts. (Arima et al, Cancer Reserch, 2011)

図3. HOXC8遺伝子のこれまでの報告と疾患との関わり.



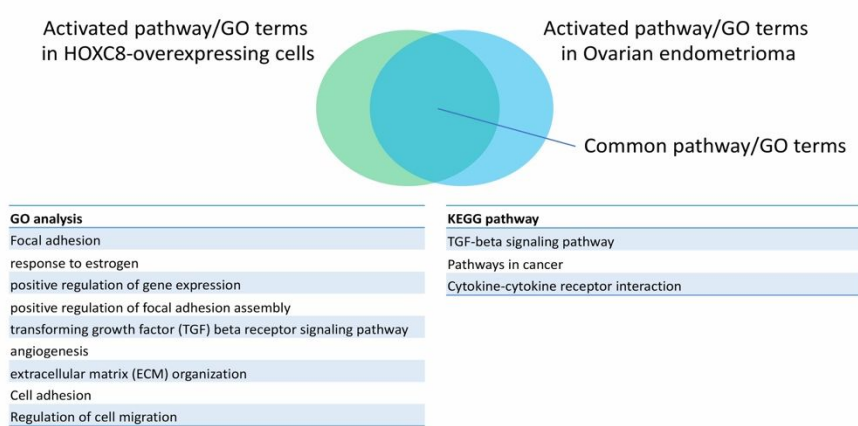


図4. HOXC8を強制発現させた子宮内膜間質細胞と子宮内膜症性嚢胞の間で共通して活性化している Gene OntologyとPathway.

り、子宮内膜症性と同様の所見が部分的に誘導された。

HOXC8 強制発現子宮内膜間質細胞で各種機能解析を行ったところ、細胞増殖能、細胞遊走能およびコラーゲン収縮能（細胞接着・収縮能）はコントロール細胞と比較して HOXC8 強制発現細胞で有意に亢進していた（図5）。

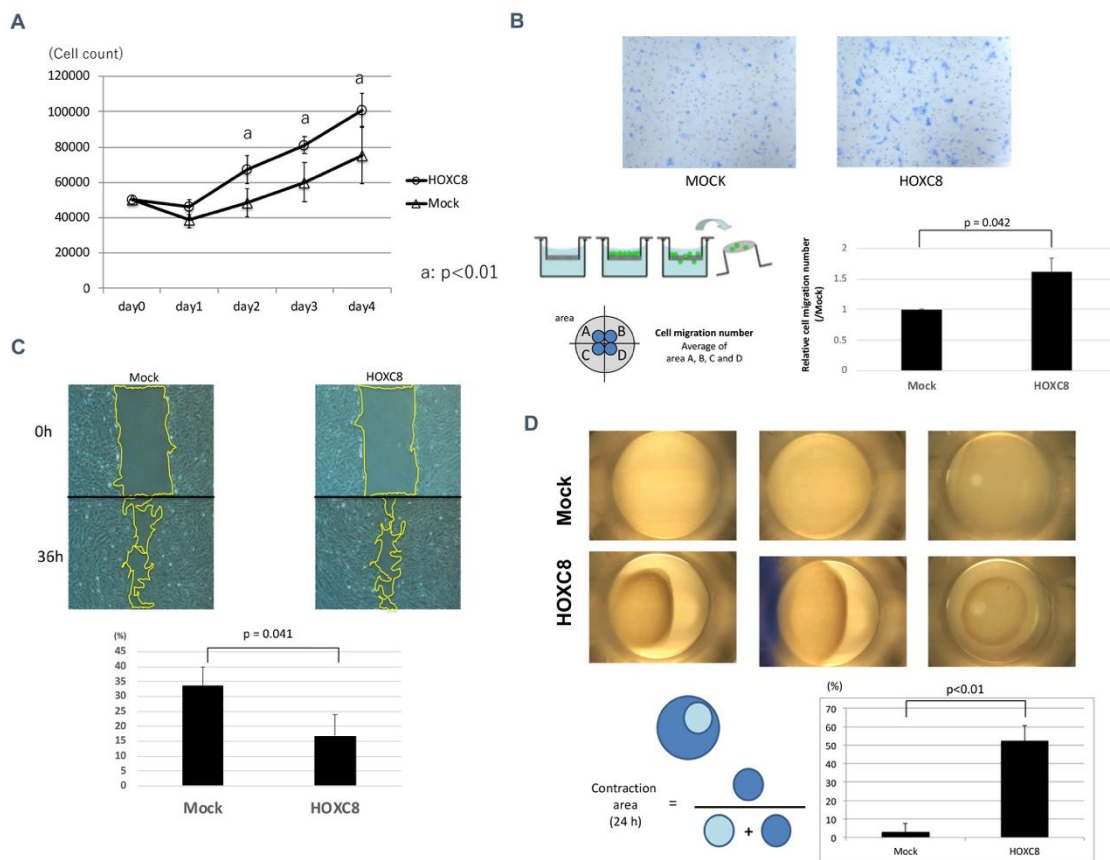


図5. HOXC8を強制発現させた子宮内膜間質細胞における機能解析. A: 細胞増殖アッセイ. B: 細胞遊走アッセイ. C: 創傷治癒アッセイ. D: コラーゲンゲル収縮アッセイ

HOXC8 は子宮内膜症性においてマスター遺伝子として、下流遺伝子の発現異常を引き起こし、疾患の発症に関与していると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Wijetunga, N. A., Johnston, A. D., Maekawa, R., Delahaye, F., Ulahannan, N., Kim, K., and Greally, J. M.; SMITE: an R/Bioconductor package that identifies network modules by integrating genomic and epigenomic information; BMC Bioinformatics, 査読有り; 18, 2017, 41

[学会発表](計 5 件)

Maekawa, Ryo; The role of HOXC8 as an upstream regulatory gene in ovarian endometrioma; American Society for Reproductive Medicine (ASRM) 2018; 2018年

前川 亮; HOXC8 の卵巣チョコレート嚢腫における発症・進展への関与の検討; 第 39 回日本エンドメトリオーシス学会 (シンポジスト); 2018 年

前川 亮; 遺伝子転写制御ネットワーク解析による卵巣チョコレート嚢腫のマスター遺伝子の探索; 第 62 回日本生殖医学会学術講演会・総会 (シンポジスト); 2017 年

前川 亮; 遺伝子転写制御ネットワーク解析による卵巣チョコレート嚢腫のマスター遺伝子の探索; 第 90 回日本内分泌学会学術集会 (シンポジスト); 2017 年

前川 亮; 遺伝子転写制御ネットワーク解析による卵巣チョコレート嚢腫の発症・進展に関与するマスター遺伝子の探索; 第 38 回日本エンドメトリオーシス学会; 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。