

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16857

研究課題名(和文)子宮内膜症において発現が亢進しているmiR-100の意義に関する研究

研究課題名(英文)Study on the significance of miR-100, which is upregulated in endometriosis

研究代表者

竹林 兼利 (Takebayashi, Kanetoshi)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10794563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症において発現が亢進しているmiR-100を用いて正常子宮内膜間質細胞が子宮内膜症の特徴的な形質が発現するかどうか研究を行った。その結果miR-100の下流のシグナル経路にSMARCD1、MMP1の関連があることを発見した。今回の研究ではmiR-100はSMARCD1を阻害することにより、MMP1を活性化させ、正常子宮内膜間質細胞の遊走能、浸潤能を増強させることが判明した。子宮内膜症において発現が亢進しているmiR-100は子宮内膜症の進展様式に類似した作用を示したことから、子宮内膜症の病因の一つとしてエピジェネティックなメカニズムが関与していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の子宮内膜症の治療はホルモン療法が主体であり、効果はあるものの副作用の観点、また不妊治療には適さないなど問題がある。今回の研究において遺伝子レベルでの子宮内膜症の病態の一端を解明することができた。これにより子宮内膜症の病態に焦点を合わせた新たな治療薬の開発が見いだせる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using miR-100, which is upregulated in endometriosis, we investigated whether normal endometrial stromal cells express the characteristic traits of endometriosis. As a result, it was discovered that SMARCD1 and MMP1 are related to the signal pathway downstream of miR-100. In this study, it was found that miR-100 activates MMP1 by inhibiting SMARCD1 and enhances the migration and infiltration ability of normal endometrial stromal cells. These findings suggest that enhanced miR-100 expression in endometriosis is involved in promoting the acquisition of endometriosis-specific characteristics during endometriosis development. Our present findings on the roles of miR-100 may thus contribute to understand the epigenetic mechanisms involved in the pathogenesis of endometriosis.

研究分野：産婦人科

キーワード：miR-100 SMARCD1

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は生殖年齢の女性のおよそ3~10%に発症し、月経困難症・慢性骨盤痛や不妊症の原因となる疾患である。子宮内膜症は、類腫瘍性病変、慢性炎症性疾患と位置付けられており、内分泌学的要因、遺伝性素因、免疫学的要因など様々な病因が考えられているが、その本体はいまだ不明である。microRNA (miRNA) は約22塩基のnon-coding RNAで、ウイルス、植物を含め多くの生物で発見されている。ひとつのmiRNAは100個以上の遺伝子を標的にするとされ、タンパク質をコードする遺伝子全体の約30%がmiRNAの調節を受けているとの推定もある。miRNAは発生、分化、癌化などにおいて様々な役割を果たすことが近年明らかとなっている。子宮内膜症においてもmiRNAの発現異常が報告され(Lin et al. 2012, 2014, Shen et al. 2013, Adamek et al. 2013, Shi et al. 2014, C. Hsu et al. 2014, Okamoto et al. 2015, Hirakawa et al. 2016)、子宮内膜症の病態解明の手掛かりになることが期待されている。

このことから我々は以前より子宮内膜症におけるmiRNAの研究分野において勢力的に研究を行い、様々な報告を行ってきた。その結果複数の学会からの学会賞も授与されている。

我々の研究では子宮内膜症間質細胞および正所性子宮内膜間質細胞を分離・培養し、micro RNA microarrayによる網羅的解析を行い、発現量の差が認められるmiRNA群を抽出した(Abe et al. Hum Reprod 2013)。その結果、miRNAに関して子宮内膜症間質細胞と正所性間質細胞の間では発現パターンが異なっていることがわかった。子宮内膜間質細胞で発現が亢進しているmiRNAとして、hsa-miR-210、hsa-miR-100、hsa-miR-132、hsa-miR-181aを同定した(表1)。

すでに我々は上記のうちhsa-miR-196b、hsa-miR-503、hsa-miR-210について検討している。その結果、癌原因遺伝子であるc-mycおよびBcl-2の発現増加はhsa-miR-196bの減少によるものであることを明らかとした。また、hsa-miR-196b、hsa-miR-503ともに子宮内膜症における発現減少により、子宮内膜症間質細胞の細胞増殖は亢進し、アポトーシス抵抗になることも解明した。一方、子宮内膜症間質細胞におけるhsa-miR-196bの発現減少はhsa-miR-196b、hsa-miR-503遺伝子のメチル化により生じている可能性が示唆された(Abe et al. Hum Reprod 2013, Hirakawa et al. Hum Reprod 2016)。また正所性子宮内膜間質細胞に hsa-miR-210をtransfectionした群とコントロール群で比較検討した。STAT3は hsa-miR-210の標的因子であり、hsa-miR-210の発現亢進により子宮内膜間質細胞の細胞増殖は亢進し、アポトーシスの抑制を引き起こしており、子宮内膜症に特徴的な形質の獲得に関与している可能性が示唆されている。これによりSTAT3のインヒビターは子宮内膜症における治療薬となりうるということが考えられ、子宮内膜症の病態形成における意義の報告をしている(Okamoto et al. Hum Reprod 2015)。

以上より、今回の研究では、子宮内膜症の病態メカニズムを解明するべく、miRNAの発現異常、今回はその中でも hsa-miR-100 が発現亢進していることに着目し、その意義を検討することで、子宮内膜症の病態の解明、そして治療の可能性まで検討することとした。

## 2. 研究の目的

子宮内膜症は、内分泌学的要因、遺伝性素因、免疫学的要因など様々な病因が考えられているが、その本体はいまだ不明である。子宮内膜症において miRNA の発現異常が報告され、子宮内膜症の病態解明の手掛かりになることが期待されている。

本研究では子宮内膜症間質細胞において発現が増加している miR-100 の意義を明らかにすることを目的とした。

。

## 3. 研究の方法

正常子宮内膜間質細胞 (normal endometrial stromal cells (NESCs)) が子宮内膜症の性質を持つ細胞へと変化するか検討する目的で、子宮内膜症を伴わない NESCs を分離・培養を行い、NESCs に hsa-miR-100-5p をトランスフェクションし、マイクロアレイ解析、Ingenuity pathway analysis を用いて hsa-miR-100-5p の下流のシグナル経路の解析を行った。また invasion assay、wound repair assay により、浸潤能の機能解析を行った。

#### 4 . 研究成果

hsa-miR-100-5p をトランスフェクションすることにより SWItch/sucrose non-fermentable-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 1 (SMARCD1) の発現を減弱させ、更にその下流に存在する matrix metalloproteinase 1 (MMP1) の mRNA、活性化 MMP1 の蛋白の発現を増強させることが判明した。また機能的解析を invasion assay、wound repair assay を用いて行った結果、hsa-miR-100-5p は NESCs の浸潤能、遊走能を優位に増幅させることが明らかになった。

我々は hsa-miR-100-5p の下流のシグナル経路に SMARCD1、MMP1 の関連があることを発見した。hsa-miR-100-5p は腫瘍細胞に対して抑制的に作用し、他の様々な癌腫に役割を果たしていることが報告されている。今回の研究では hsa-miR-100-5p は SMARCD1 を阻害することにより、MMP1 を活性化させ、NESCs の遊走能、浸潤能を増強させることが判明した。今回の研究の limitation は子宮内膜症間質細胞と子宮内膜症を持たない正所性子宮内膜間質細胞を比較した点である。子宮内膜症をもつ正所性の子宮内膜のサンプリングは臨床的に困難であることから、この点については検討が必要と考える。

今回の研究で、子宮内膜症において発現が亢進している hsa-miR-100-5p は NESCs においても子宮内膜症の進展様式に類似した作用を示したことから、子宮内膜症の病因の一つとしてエピジェネティックなメカニズムが関与していることが判明した。以上の研究を今回行うことができた。当初の予定していた子宮内膜症モデルのヌードマウスの作成を開始してはいるが、時間、研究費の関係上今回の研究では報告することができなかった。

今後はヌードマウスを用いての実験を進めていき、子宮内膜症の新たな治療薬の発見につなげていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takebayashi Kanetoshi, Nasu Kaei, Okamoto Mamiko, Aoyagi Yoko, Hirakawa Tomoko, Narahara Hisashi	4. 巻 18
2. 論文標題 hsa-miR-100-5p, an overexpressed miRNA in human ovarian endometriotic stromal cells, promotes invasion through attenuation of SMARCD1 expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproductive Biology and Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12958-020-00590-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹林 兼利
2. 発表標題 子宮内膜症の病態形成におけるmiR-100の発現亢進の意義
3. 学会等名 第70回日本参加婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹林 兼利
2. 発表標題 子宮内膜症の病態形成におけるmiR-100の発現亢進の意義
3. 学会等名 第49回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------