

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09803

研究課題名(和文) 遺伝子制御ネットワークと数理モデルで見出したマスター遺伝子による子宮内膜症の誘導

研究課題名(英文) Induction of endometriotic cells by the upregulatory gene detected by the 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣チョコレート嚢胞の発症・病態に關与する上流制御因子を同定するため、卵巣チョコレート嚢胞の網羅的遺伝子発現データと公共のネットワークデータを組み合わせて、疾患発症に重要な上流制御遺伝子としてHOXC8を同定した。同定された遺伝子を過剰発現させたeuESCを樹立し、HOXC8の過剰発現が、細胞増殖、遊走、接着、線維化活性を高め、Transforming growth factor (TGF)-シグナルを活性化させ、子宮内膜症細胞に類似した細胞に変化させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、疾患発症に重要な遺伝子としてHOXC8を同定し、HOXC8がTGFシグナリングを活性化させて、増殖、浸潤、癒着、線維化能を実際に促進することを証明した。本研究により、根治的な治療法が存在しない子宮内膜症において、将来的にこの遺伝子を標的とした治療法の開発に発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study is to identify the upstream regulators (URs) involved in the onset and pathogenesis of ovarian endometrioma. We identified HOXC8 as a potential UR in ovarian endometrioma. HOXC8 overexpression significantly enhanced cell proliferation, migration, adhesion, and fibrotic activities, and altered expression statuses of the genes involved in transforming growth factor (TGF)-beta signaling. HOXC8 overexpression also increased the expression levels of phosphorylated SMAD2/SMAD3. The increased adhesion and fibrosis activities by HOXC8 were significantly inhibited by E-616452, a selective inhibitor of TGF-beta receptor type I kinases. Integrated genomic approaches identified HOXC8 as an UR in ovarian endometrioma. The pathological features of ovarian endometrioma including cell proliferation, adhesion, and fibrosis were induced by HOXC8 and its subsequent activation of TGF-beta signaling.

研究分野：子宮内膜症

キーワード：子宮内膜症 HOXC8 疾患上流遺伝子

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基盤となる研究が不可欠であった。

我々は、科研費・若手研究 (B) (平成23-24年 課題番号 23791846 代表 及び平成26-27年 課題番号 26861329 代表) の子宮筋腫の研究において、網羅的遺伝子発現データと、公共のデータベースから入手できる転写制御ネットワークを組み合わせ、疾患の発症において遺伝子発現制御の上流に存在して疾患のマスター遺伝子として機能している遺伝子を推定する解析プログラム（上流遺伝子解析プログラム）を開発した (図1) (論文1, 2)。また、数理モデルを用いた転写制御シミュレーションを用いた治療再現モデルを作成して、特定の遺伝子群の発現変化によって引き起こされる遺伝子全体の発現プロファイルの変化を高精度でシミュレーションできれば、疾患から正常組織へのプロファイル変化を引き起こすマスター遺伝子を効率的に絞り込めるのではないかと考え、ブーリアンネットワークを用いた解析プログラムを独自に作成した (図2) (論文2)。

これらのプログラムを用いることで、子宮内膜症の発症・進展に関与する遺伝子の同定が可能であると考えていた。

2. 研究の目的

本研究では、開発した上流遺伝子探索プログラムを用いて、子宮内膜症で転写因子の上流に位置して、下流遺伝子の発現異常を引き起こして疾患の発症に関与する遺伝子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

A. 転写制御ネットワーク解析によるマスター遺伝子候補の選出

開発した転写制御ネットワーク解析を用いて、子宮内膜症で転写因子の上流に位置して、下流遺伝子の発現異常を引き起こして疾患の発症に関与する遺伝子を同定する。

B. 数理モデルを用いた転写制御シミュレーション解析による候補遺伝子の妥当性の評価

同定した遺伝子を遺伝子発現遷移シミュレーションに投じ、実際に疾患状態から異常発現遺伝子の発現を正常に服することで正常状態に近似させられるかについて検討する。

C. 子宮内膜間質細胞での疾患上流遺伝子の強制発現実験

同定した遺伝子のそれら遺伝子を子宮内膜細胞に強制発現させ、子宮内膜症細胞と同様の遺伝子発

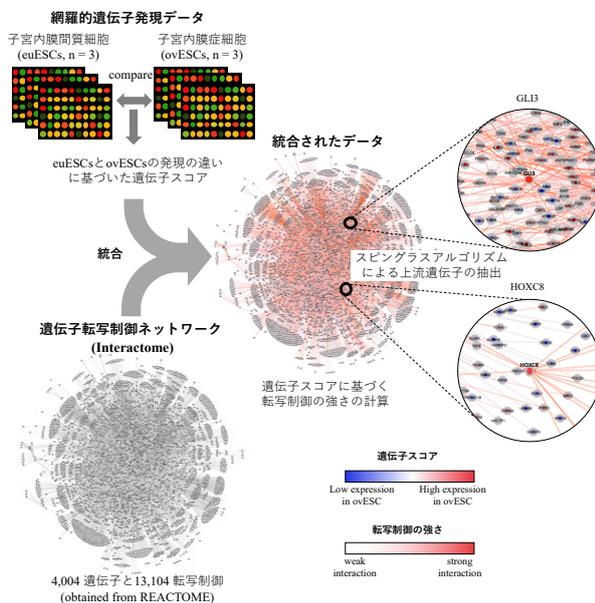


図1.申請者が独自に開発した上流遺伝子解析によるマスター遺伝子の抽出 (BMC Bioinformatics, 2017; J Clin Endocrinol Metab, 2020).

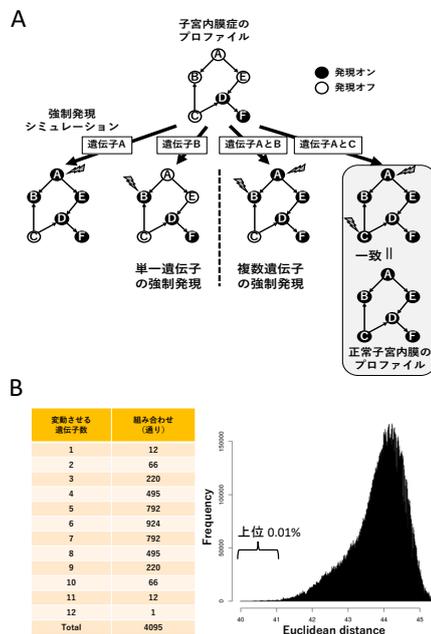


図2. 子宮内膜症での強制発現シミュレーション  
A. 元来のプロファイルから、特定の遺伝子、またはその組み合わせに強制的な変化を与え、ネットワークのシミュレーションを行う。結果の発現プロファイルを正常子宮内膜のプロファイルと比較して、正常子宮内膜のプロファイルが誘導される組み合わせを治療標的となるマスター遺伝子群とする。B. 12遺伝子に子宮内膜症細胞と逆のプロファイルを単独もしくは組み合わせで与えて、シミュレーションする(合計4095通りを10000回施行)(左)。正常内膜組織に近い上位0.01%の組み合わせに含まれる各遺伝子の頻度を計算し、12遺伝子が全て含まれることを確認した (右)(J Clin Endocrinol Metab, 2020)。

現プロファイル、細胞機能を再現できるかについて検討する。

#### 4. 研究成果

##### A. 転写制御ネットワーク解析によるマスター遺伝子候補の選出

子宮内膜症細胞の網羅的発現データと REACTOME データベース (Reactome.org.) から入手した転写制御ネットワークを統合し、我々が開発した転写制御ネットワーク解析プログラムを実行し、子宮内膜症で有意な発現異常を呈し、且つ転写制御の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 12 遺伝子を同定した (図 1) (論文 2)。

##### B. 数理モデルを用いた転写制御シミュレーション解析による候補遺伝子の妥当性の評価

上流遺伝子解析で同定した 12 遺伝子の中から更に着目すべき遺伝子に絞り込むことを目的として、数理モデルによるシミュレーション解析を行なった。近年、分子生物学分野では遺伝子の相互的な発現制御関係が次々と明らかになっており、それらを統合した発現制御ネットワークデータが公表されている。この解析では将来的な治療標的となり得る遺伝子に絞り込むことを主眼に据えて解析を行った。即ち、このネットワークデータと我々が有する疾患状態 (子宮内膜症) の全遺伝子の発現プロファイルを統合して疾患のネットワークを再現し、そこから 12 遺伝子の発現を単独もしくは組み合わせで変化させてコンピュータシミュレーションによりネットワークを遷移させ、最も正常状態に近い発現プロファイルに収束する遺伝子の抽出を行った (図 2)。その結果、子宮内膜症での有力なマスター遺伝子の一つとして HOXC8 を抽出した (図 2) (論文 2)。HOXC8 は疾患発症・進展に中心的に関与している可能性があり、更には将来的な治療標的となり得る。

HOXC8 は乳癌や肺癌において TGF $\beta$  シグナリングの活性化を介して癌細胞の増殖や浸潤・転移に関与することが報告されている。また、近年の研究で子宮内膜症の線維化や増殖・癒着、浸潤に TGF $\beta$  シグナリングの活性化が関与していることが報告されている。本検討により、増殖・浸潤、癒着を特徴とする子宮内膜症において、HOXC8 がマスター候補遺伝子として抽出されたことは興味深い。これらの遺伝子がマスター遺伝子として最上流に位置し、ゲノムワイドに下流遺伝子の発現異常を引き起こして子宮内膜症の発症・進展に関与していると考えられる。

##### C. 子宮内膜間質細胞 (ESC) での HOXC8 過剰発現による細胞機能の変化

HOXC8 について ESC を用いた過剰発現実験を行い、HOXC8 の発現変化が ESC において、子宮内膜症細胞に特徴的な細胞機能や遺伝子発現プロファイルを誘導するかについて検討した。HOXC8 発現ベクター (pGL3-HOXC8 vector) を作製し、HOXC8 過剰発現 ESC (HOXC8-ESCs) を樹立した。HOXC8-ESCs で cell proliferation assay (細胞増殖能)、cell migration assay (遊走能)、3D gel contraction assay (線維化能) を検討したところ、HOXC8 が実際に細胞増殖、細胞遊走、線維化を促進した (図 3) (論文 2)。また、HOXC8-ESCs でマイクロアレイ (GeneChip<sup>®</sup> Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix, USA)) による網羅的 mRNA 発現解析を行ったところ、HOXC8 の過剰発現により、TGF $\beta$  シグナリングの阻害薬である ALK5 インヒビターを添加すると、3D gel contraction assay において、HOXC8 による線維化能が有意に抑制された。我々は、子宮内膜症細胞での網羅的遺伝子発現解析の検討においても TGF $\beta$  シグナリングに含まれる遺伝子が発現異常を呈することを確認している (論文 2, 3)。即ち、我々は HOXC8 は子宮内膜症細胞で認める特徴的な細胞機能や遺伝子発現を実際に誘導することをこれまで明らかにした。

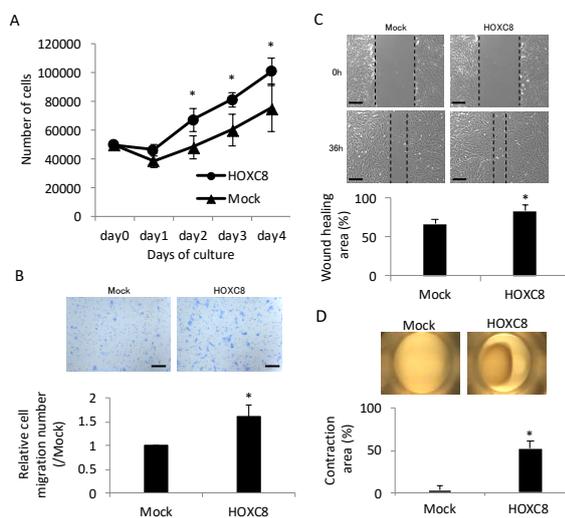


図3. 細胞機能解析

HOXC8の過剰発現がESCに及ぼす細胞機能の変化を評価した。A. Cell proliferation assay (細胞増殖能)。B. Cell migration assay (細胞遊走能)。C. Wound healing assay (細胞増殖及び遊走能)。D. 3D collagen gel contraction assay (線維化能) (J Clin Endocrinol Metab, 2020)。

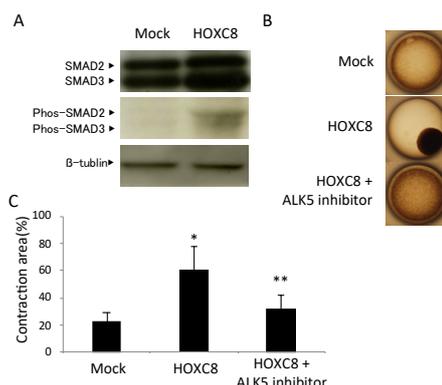


図4. HOXC8によるTGF $\beta$ シグナリングの活性化

HOXC8の過剰発現がTGF $\beta$ シグナリングに与える影響を評価した。A. Western blottingでHOXC8によるSMAD2/3及びリン酸化SMAD2/3の増加を評価した。B及びC. ALK5インヒビターによるTGF $\beta$ シグナリングの阻害により、HOXC8により活性化された線維化能の阻害を評価した (J Clin Endocrinol Metab, 2020)。

<参考論文>

1. Wijetunga NA, Johnston AD, Maekawa R, Delahaye F, Ulahannan N, Kim K, et al. SMITE: an R/Bioconductor package that identifies network modules by integrating genomic and epigenomic information. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):41.
2. Mihara Y, Maekawa R, Sato S, Shimizu N, Doi-Tanaka Y, Takagi H, et al. An Integrated Genomic Approach Identifies HOXC8 as an Upstream Regulator in Ovarian Endometrioma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(12).
3. Maekawa R, Sato S, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, et al. Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. *PLoS One*. 2013;8(6):e66632.

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 Yumiko Mihara, Ryo Maekawa, Shun Sato, Natsuko Shimizu, Yumiko Doi-Tanaka, Haruka Takagi, Yuichiro Shirafuta, Masahiro Shinagawa, Isao Tamura, Toshiaki Taketani, Hiroshi Tamura, Takeshi Abe, Yoshiyuki Asai, Norihiro Sugino	4. 巻 105
2. 論文標題 An Integrated Genomic Approach Identifies HOXC8 as an Upstream Regulator in Ovarian Endometrioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 e4474-4489
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/clinem/dgaa618	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0件

〔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
---------	---------