

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22688

研究課題名（和文）人工知能による遺伝子発現プロファイル解析に基づいた子宮内膜症の新規治療標的の探索

研究課題名（英文）Search for new targets of endometriosis therapy based on gene expression profile by AI

研究代表者

杉野 法広（Sugino, Norihiro）

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10263782

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣チョコレート嚢胞の発症と病因に関与する上流制御因子であるマスター遺伝子を同定した。

卵巣チョコレート嚢胞の間質細胞および正所性の子宮内膜間質細胞のtranscriptomeデータと、公的データベースから入手した遺伝子発現制御ネットワークデータを用いた解析（SMITE法）から12候補遺伝子を抽出した後、Boolean network simulationを行いマスター遺伝子としての妥当性を確認した。この中のHOXC8については、同遺伝子を過剰発現する細胞株を樹立して、実際に細胞増殖、癒着、線維化、TGFシグナル経路の活性化などの卵巣チョコレート嚢胞の特徴を誘導できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症（卵巣チョコレート嚢胞）の発症において鍵となるマスター遺伝子を同定することができ、将来的にそれらを標的とした分子標的治療の開発に役立つ可能性がある。また、バイオインフォマティクスと数理モデルを用いた本研究の研究手法は、疾患における複雑な発現制御ネットワークを明らかにする上で、今後、更に重要となる研究手法である。

研究成果の概要（英文）：The study succeeded to identify the upstream regulators (URs) involved in the pathogenesis of ovarian endometrioma.

An analytic method, SMITE was used with transcriptome data from ovarian endometrioma stromal cells (ovESCs) and eutopic endometrium stromal cells (euESCs) in combination with publicly available gene regulatory network data. Furthermore, Boolean network simulation confirmed that the 12 candidate genes chosen by SMITE are URs. One of the URs, HOXC8, was confirmed to be overexpressed in ovESCs.

HOXC8 overexpression significantly enhanced cell proliferation, migration, adhesion, and fibrotic activities, and also activated the TGF- signaling, which are pathological features of ovarian endometrioma. The increased adhesion and fibrosis activities by HOXC8 were significantly inhibited by E-616452, a selective inhibitor of TGF- receptor.

In conclusions, integrated genomic approaches identified HOXC8 as an UR in ovarian endometrioma.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮内膜症 ネットワーク 卵巣チョコレート嚢胞 マスター遺伝子 HOXC8 遺伝子ネットワーク バイオインフォマティクス プーリアンネ TGF-

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、性成熟婦人の約 15%が罹患し、不妊などの症状を引き起こす。良性疾患であるが、増殖・浸潤し周囲組織と癒着を形成することから、類腫瘍性病変、慢性炎症性疾患と位置づけられているが、未だ病態は解明されておらず、予防法や根治的な治療薬もない。

近年、様々な疾患の発症において中心的な役割を果たすマスター遺伝子が存在することが報告されている[1]。マスター遺伝子は遺伝子発現制御の上流に存在し、自らの発現異常が下流の遺伝子の発現に影響を与えて発症に関与する。炎症や癒着等の多彩な病態を呈する子宮内膜症には多数の遺伝子発現異常が関与していると考えられ、疾患発症に関与し、更には治療標的となるマスター遺伝子群の同定は容易ではない。

従来は、マスター遺伝子の候補となる遺伝子を絞り込み、細胞に一つひとつ強制発現を行って疾患細胞を誘導する手法がとられてきた。単一のマスター遺伝子が細胞変化に関与する場合もあるが、iPS 細胞に代表されるように、複数のマスター遺伝子が関与している場合もある。候補遺伝子数が少ない場合は、全ての組み合わせについて強制発現による実験も可能であるが、子宮内膜症などの多数のマスター遺伝子が発症に関与する疾患では、その数や組み合わせを発見することは不可能な課題と言え、疾患モデルの作成において大きな障壁となっている。

2. 研究の目的

近年、生命科学における生化学反応の数理モデルの構築とそのシミュレーション技術の進歩が著しい。また、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。本研究では、このネットワークデータと我々が有する正常子宮内膜および子宮内膜症の遺伝子発現データを組み込んだ遺伝子制御ネットワークの数理モデルをそれぞれ作成することで、まず正常状態から疾患状態(子宮内膜症)を引き起こすマスター遺伝子の組み合わせをコンピュータシミュレーションで同定する。そして、今度は、逆向きに、疾患状態(子宮内膜症)から正常状態にネットワークを遷移させる遺伝子群をコンピュータシミュレーションで同定し、治療標的となるマスター遺伝子群を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝子発現制御ネットワークをブーリアンネットワークを用いてモデル化する。まず、遺伝子発現の実験データを遺伝子相互作用ネットワークに与える(初期状態)。そして、そこに目的の遺伝子の発現変化を強制的に入力することで、ネットワーク全体の発現プロファイルの収束状態がどのように変化するかをシミュレーションすることができる。

(1) 正常子宮内膜間質細胞および子宮内膜症細胞の網羅的遺伝子発現データの取得

網羅的遺伝子発現データとして、正常子宮内膜間質細胞(Norm)と子宮内膜症細胞(Endo)につき網羅的遺伝子発現データ(マイクロアレイ)を得る。

(2) SMITE 法による候補遺伝子の抽出及びブーリアンネットワークの構築とシミュレーション

REACTOME データベースより遺伝子相互作用ネットワークデータを入手し(Net)、そこに上記(1)の正常子宮内膜の遺伝子発現情報を与えて正常子宮内膜細胞での遺伝子相互作用ネットワークを構築する(Norm-Net)。この解析法は我々が開発したもので、SMITE 法と呼ぶ[2]。同様に、子宮内膜症の遺伝子発現情報を与えて子宮内膜症のネットワークを構築する(Endo-Net)。次に、正常の Norm-Net を内膜症の Endo-Net に変化させることを目的に、Norm-Net 上で特定の遺伝子の発現を強制的に介入入力してシミュレーションを行う。また、逆に、内膜症の Endo-Net を正

常の Norm-Net に変化させる目的で、Endo-Net 上で特定の遺伝子の発現を強制的に介入入力してシミュレーションを行う。それぞれのシミュレーションにより、遺伝子のどの組み合わせにより目的のネットワークが再現できたかの判定は、シミュレーション結果を人工知能(数理モデル)により解析する(プリアンネットワーク)。結果として、Norm-Net から Endo-Net が再現できた遺伝子の組み合わせを疾患マスター遺伝子として抽出できる。また、Endo-Net から Norm-Net が再現できた遺伝子の組み合わせを治療標的マスター遺伝子として抽出できる。

(3) 同定されたマスター遺伝子の機能解析

上記(1)(2)により同定されたマスター遺伝子について、子宮内膜間質細胞にこの遺伝子を導入し過剰発現させる。この遺伝子改変細胞が子宮内膜症の特徴を獲得できているかを、細胞増殖能、遊走能、線維化能、網羅的遺伝子解析、マスター遺伝子導入で活性化される細胞内情報伝達経路によって検討する。

4. 研究成果

(1) マスター遺伝子の同定について

嚢胞子宮内膜症である卵巣チョコレート嚢胞の病態に關与するマスター候補遺伝子を SMITE 法により抽出した。SMITE では 34 個のマスター候補が抽出された。これら 34 個の候補のうち、正常子宮内膜間質細胞と卵巣チョコレート嚢胞の子宮内膜症細胞の間での発現量が2倍以上または0.5倍未満、かつ $p < 0.05$ の遺伝子に絞り込み、発現上昇遺伝子 4 個と発現低下遺伝子 8 個を卵巣チョコレート嚢胞のマスター遺伝子候補として同定した(表 1) [3]。

同定した 12 マスター遺伝子候補を用いプリアンネットワークにより 4,095 万のシミュレーションを実行した。その結果、12 のマスター遺伝子候補全てが上位 0.01%のシミュレーション結果に含まれていることがわかった。つまり、SMITE 解析で抽出された 12 個の遺伝子すべてがマスターとして妥当であることが確認された[3]。

(2) 同定されたマスター遺伝子の機能解析について

本研究では、12 のマスター遺伝子の中で、HOXC8 に注目した。HOXC8 はホメオボックスファミリーに属し、高度に保存された転写因子ファミリーをコードしている。HOXC8 は、近年、癌や肉腫の細胞増殖を活性化することにより、腫瘍形成や転移に關与していることが報告されている。卵巣チョコレート嚢胞は、子宮内膜症細胞の増殖と浸潤、および子宮、卵管、腸を含む骨盤腔内の癒着・線維化を特徴とする疾患である。これらの特徴は、悪性腫瘍の特徴と類似している。そこで我々は、HOXC8 が卵巣チョコレート嚢胞のマスター遺伝子として機能し、卵巣チョコレート嚢胞の増殖、浸潤、癒着・線維化の病態を引き起こしている可能性を検討した。

卵巣チョコレート嚢胞における HOXC8 の発現

表1 卵巣チョコレート嚢胞のマスター遺伝子

	Mean expression level (log2)		P value (Student t-test)	Fold change (ovESCs/euESCs)
	euESCs	ovESCs		
Upregulated in ovESCs				
GLI3	8.317 ± 0.643	9.766 ± 0.449	0.039	2.729
HOXC8	6.991 ± 0.231	8.202 ± 0.328	0.009	2.315
CEBPD	10.130 ± 0.369	11.301 ± 0.119	0.023	2.251
NR3C2	6.488 ± 0.162	7.499 ± 0.138	0.001	2.014
Downregulated in ovESCs				
HOXA10	9.433 ± 0.320	8.287 ± 0.242	0.004	0.452
MAPK8	11.612 ± 0.339	10.222 ± 0.027	0.019	0.381
ETS2	11.422 ± 0.352	9.758 ± 0.255	0.004	0.316
GATA2	9.905 ± 0.320	7.845 ± 0.188	0.002	0.240
ESR1	9.378 ± 0.642	7.063 ± 0.175	0.019	0.201
HOXA9	10.402 ± 0.194	7.281 ± 0.111	0.000	0.115
TFAP2C	9.753 ± 0.692	5.995 ± 0.300	0.005	0.074
PRDM1	12.365 ± 0.253	7.616 ± 0.548	0.001	0.037

^aovESCs indicates endometriotic stromal cells obtained from ovarian endometrioma.

実際に、卵巣チョコレート嚢胞で HOXC8 発現が上昇しているかについて、定量的 RT-PCR、および Western blotting によって検討したところ、HOXC8 の mRNA の発現とタンパク質の発現レベルは、正常子宮内膜の間質細胞 (euESC) に比べ、卵巣チョコレート嚢胞の間質細胞 (ovESC) で有意に高いことを確認した (図 1) [3]。

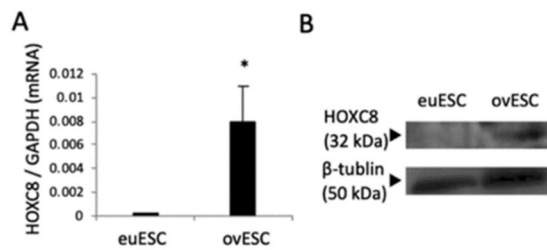


図1 卵巣チョコレート嚢胞における HOXC8 の発現

HOXC8 過剰発現細胞株における細胞増殖能、遊走能、線維化能について

HOXC8 過剰発現細胞は、コントロール細胞に比べ、細胞増殖能 (細胞増殖アッセイ)、遊走能 (細胞遊走アッセイ、創傷治癒アッセイ)、線維化能 (コラーゲンゲル収縮アッセイ) は有意に高かった (図 2) [3]。

HOXC8 過剰発現細胞株における網羅的遺伝子解析

HOXC8 過剰発現細胞の transcriptome 解析を行った。HOXC8 の過剰発現により 582 遺伝子の mRNA 発現が変化した (発現増加 303 遺伝子、低下 279 遺伝子)。変化した 582 遺伝子の Gene Ontology (GO) 解析を行ったところ、47 の GO term が同定された。この 47 の GO term と我々がすでに実際の卵巣チョコレート嚢胞で同定している 56 の GO terms を比較したところ [4]、卵巣チョコレート嚢胞で特徴的な細胞増殖、細胞遊走、細胞接着、細胞外マトリックスなど、12 の term が共通していることがわかった [3]。即ち、HOXC8 の過剰発現により、卵巣チョコレート嚢胞に特徴的な機能が亢進される可能性があることを示している。

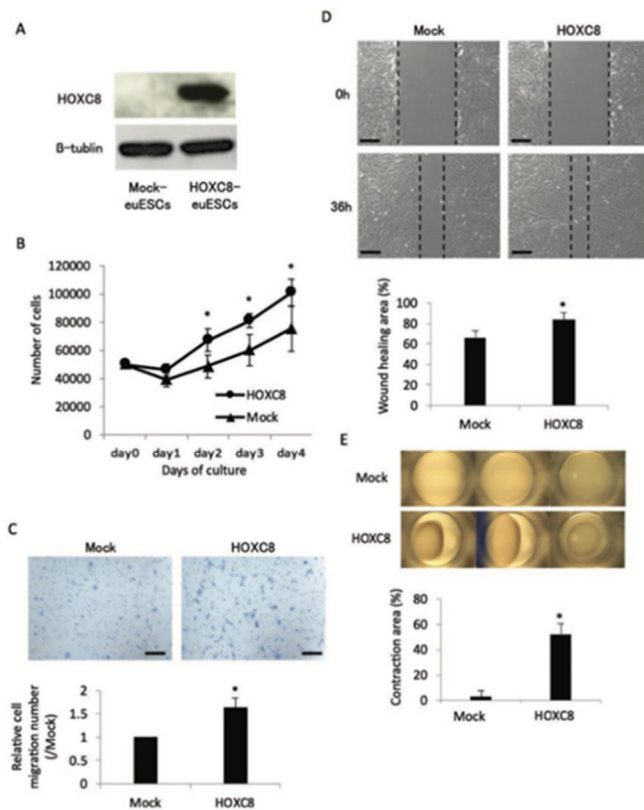


図2 HOXC8過剰発現細胞の機能解析

HOXC8 過剰発現で異常発現となる 582 遺伝子での KEGG pathway 解析では、18 の pathway が同定された。GO 解析と同様に、我々がすでに実際の卵巣チョコレート嚢胞で同定している 26 の pathway と比較したところ、子宮内膜症で活性化が確認されている TGFβ シグナル経路が含まれていた。

HOXC8 で活性化される細胞内情報伝達経路について

上記の transcriptome 解析で、HOXC8 が TGFβ シグナル経路の遺伝子発現を変化させていたことから、次に、HOXC8 過剰発現細胞で TGFβ シグナル経路が実際に活性化されるかどうかを検討した。その結果、リン酸化 SMAD2/SMAD3 の発現レベルは、コントロール細胞と比較して HOXC8 過剰発現細胞において有意に高く、HOXC8 が TGFβ シグナル経路を実際に活性化させていることが明

らかになった。また、HOXC8 によるコラーゲン収縮能の増加、即ち線維化能の亢進は、TGFβ 受容体 I 型キナーゼの選択的阻害剤である E-616452 によって有意に阻害された。この結果から、HOXC8 が TGFβ シグナル経路を介して線維化に関与していることがわかった (図 3) [3]。

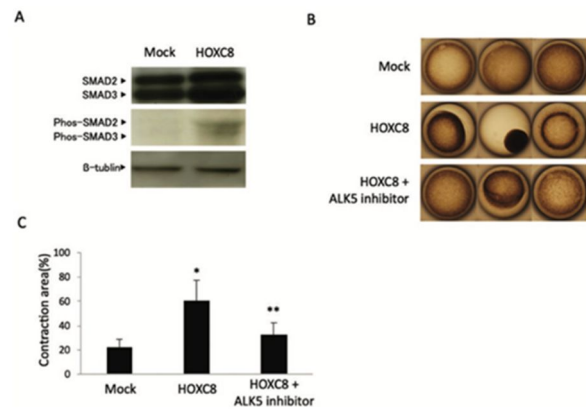


図3 HOXC8によるTGFβシグナルの活性化

(3) まとめ

本研究では、SMITE 法により卵巣チョコレート嚢胞のマスター遺伝子候補を世界で

初めて同定した[3]。同定された候補遺伝子がマスター遺伝子として妥当であるかについて、ブーリアンネットワーク・シミュレーションによる検討を行った。本シミュレーションでは、卵巣チョコレート嚢胞の異常な遺伝子発現状態から、マスター遺伝子の発現状態のみを正常な状態に強制的に変化させ、下流の遺伝子発現の変化をコンピュータシミュレーションにより遷移させた。そして、シミュレーション後の全体の遺伝子発現状態が正常子宮内膜と同様の状態に還元されるかについて検討した。即ち、疾患の発現状態からマスター遺伝子の発現を変化させることにより、遺伝子発現全体が正常な発現状態に還元できるかを調べることによって、同定された遺伝子がマスター遺伝子として妥当であることを示した[3]。

さらに、同定された遺伝子の一つ HOXC8 に着目し、同遺伝子を過剰発現する細胞株を樹立して、実際に細胞増殖、癒着、線維化などの卵巣チョコレート嚢胞の特徴を誘導できることを示し、機能的にも同マスター遺伝子が卵巣チョコレート嚢胞のマスター遺伝子であることを示した。

本研究により、卵巣チョコレート嚢胞の発症において鍵となるマスター遺伝子を同定することができ、将来的にそれらを標的とした分子標的治療の開発に役立つ可能性がある。また、バイオインフォマティクスと数理モデルを用いた研究手法は、疾患における複雑な発現制御ネットワークを明らかにする上で、今後、更に重要となる研究手法である。

<引用文献>

1. Sato S, Maekawa R, Tamura I, et al. SATB2 and NGR1: potential upstream regulatory factors in uterine leiomyomas. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(11):2385-2397.
2. Wijetunga NA, Johnston AD, Maekawa R, et al. SMITE: an R/Bioconductor package that identifies network modules by integrating genomic and epigenomic information. *BMC Bioinformatics.* 2017;18(1):41.
3. Mihara Y, Maekawa R, Sato S, et al. An integrated genomic approach identifies HOXC8 as an upstream regulator in ovarian endometrioma. *J Clin Endocrinol Metab* 2020;105(12):1-12.
4. Maekawa R, Mihara Y, Sato S, et al. GO analysis in differentially expressed 795 genes (upregulated 414 and downregulated 381 genes) in ovESCs compared to euESCs. Dryad Digital Repository 2019. Deposited 25 May 25 2020. Doi: 10.5061/dryad.s4mw6m94g.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takagi Haruka, Tamura Isao, Fujimura Taishi, Doi-Tanaka Yumiko, Shirafuta Yuichiro, Mihara Yumiko, Maekawa Ryo, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro	4. 巻 298
2. 論文標題 Transcriptional coactivator PGC-1 contributes to decidualization by forming a histone-modifying complex with C/EBP and p300	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101874 ~ 101874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101874	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamura Isao, Fujimura Taishi, Doi-Tanaka Yumiko, Takagi Haruka, Shirafuta Yuichiro, Kajimura Takuya, Mihara Yumiko, Maekawa Ryo, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro	4. 巻 297
2. 論文標題 The essential glucose transporter GLUT1 is epigenetically upregulated by C/EBP and WT1 during decidualization of the endometrium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101150 ~ 101150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shirafuta Yuichiro, Tamura Isao, Ohkawa Yasuyuki, Maekawa Ryo, Doi-Tanaka Yumiko, Takagi Haruka, Mihara Yumiko, Shinagawa Masahiro, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro	4. 巻 162
2. 論文標題 Integrated Analysis of Transcriptome and Histone Modifications in Granulosa Cells During Ovulation in Female Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endochr/bqab128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamura Isao, Maekawa Ryo, Jozaki Kosuke, Ohkawa Yasuyuki, Takagi Haruka, Doi-Tanaka Yumiko, Shirafuta Yuichiro, Mihara Yumiko, Taketani Toshiaki, Sato Shun, Tamura Hiroshi, Sugino Norihiro	4. 巻 520
2. 論文標題 Transcription factor C/EBP induces genome-wide H3K27ac and upregulates gene expression during decidualization of human endometrial stromal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 111085 ~ 111085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2020.111085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mihara Y, Maekawa R, Sato S, Shimizu N, Doi-Tanaka Y, Takagi H, Shirafuta Y, Shinagawa M, Tamura I, Taketani T, Tamura H, Abe T, Asai Y, Sugino N	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 J Clin Endocrinol Metab	6. 最初と最後の頁 1-12
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamura I, Takagi H, Tanaka-Doi Y, Shirafuta Y, Mihara Y, Shinagawa M, Maekawa R, Taketani T, Sato S, Tamura H, Sugino N	4. 巻 295
2. 論文標題 Wilms tumor 1 regulates lipid accumulation in human endometrial stromal cells during decidualization.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 4673-4683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.012841.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maekawa R, Tamura I, Shinagawa M, Mihara Y, Sato S, Okada M, Taketani T, Tamura H, Sugino N	4. 巻 20
2. 論文標題 Genome-wide DNA methylation analysis revealed stable DNA methylation status during decidualization in human endometrial stromal cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-019-5695-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinagawa M, Tamura I, Maekawa R, Sato S, Shirafuta Y, Mihara Y, Okada M, Taketani T, Asada H, Tamura H, Sugino N	4. 巻 9
2. 論文標題 C/EBP regulates Vegf gene expression in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in female rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9:714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36566-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 5件）

〔図書〕 計5件

〔出願〕 計3件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 子宮平滑筋における腫瘍の診断マーカー	発明者 佐藤俊，杉野法広	権利者 国立大学法人山口大学
産業財産権の種類、番号 特許、658317	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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
研究 分 担 者	浅井 義之 (Asai Yoshiyuki) (00415639)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	

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
---------	---------