

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19584

研究課題名（和文）少数細胞エピゲノミクス技術を利用した子宮内膜症の網羅的エピゲノム解析

研究課題名（英文）Comprehensive epigenomic analysis of endometriosis using small cell epigenomics technology.

研究代表者

秦 健一郎（Hata, Kenichiro）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60360335

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト子宮内膜検体を収集し、病変部から間質細胞と腺細胞を100個～数千個程度精製回収し、ChILT法でエピゲノム解析（H3K27ac, H3K27me3, DNAメチル化）とトランスクリプトーム解析を試験的に行った。その結果、疾患群に特徴的な遺伝子発現変動と、相関するエピゲノム変化を見出した。これらの遺伝子発現変化およびそのエピゲノム変化は、新たな疾患病勢マーカーあるいは治療標的となることが期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜は、性周期にしたがって増殖と分化を繰り返し、妊娠成立に必須であると共に、癌や子宮内膜症などの増殖性疾患の母地にもなり、その病態解明は同疾患の治療にとどまらず広く医学・再生医学に重要な知見をもたらすと期待される。一方で、子宮内膜に限らず、少数細胞を初代培養や株化により増幅して解析すると、遺伝子発現が変化し、それに伴ってエピゲノムも元病変の状態から変化するため、可能な限り生体試料をそのまま解析することが望ましい。そこで、本研究の少数細胞エピゲノミクス技術により、培養を行わずに病変部の状態に近い細胞を解析した。これらの成果は、今後、様々な子宮内膜関連疾患の解析に有用な基盤的知見である。

研究成果の概要（英文）：Human endometrial specimens were collected, and 100s to thousands of endometrial glandular epithelium and stromal cells were purified and recovered from the lesions, and epigenomic (H3K27ac, H3K27me3, DNA methylation) and transcriptomic analyses were performed by ChILT method on a pilot basis. As a result, we found gene expression changes characteristic of the disease group and correlated epigenomic alterations. These gene expression changes and their epigenomic alterations were expected to serve as new markers of disease pathogenesis or therapeutic targets.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：エピジェネティクス

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、生殖可能年齢女性の約1割に認められる罹患率が高い慢性疾患であると共に、特異な性質（異所性着床や様々な発症機序仮説など）を有し、卵巣明細胞がんとの関連が示唆されるなどの様々な特徴から、分子病態の解明は同疾患の治療にとどまらず、がん化のメカニズムや発生分化・異所性分化のドライバー因子など、広く医学・再生医学に重要な知見をもたらすと期待される。子宮内膜症の発症要因の一つとして、エピジェネティックな異常との関連が挙げられている。エピゲノムは細胞系譜特異的なパターンを有するため、エピゲノム解析には標的細胞を90%以上純化した精製細胞を用いなければ正確なデータが得られない。また、100万個程度必要なため、病変組織から大量の標的細胞が生成できない場合は、主に初代培養細胞あるいは株化細胞を用いた研究が行われている。子宮内膜症は、通常病変部から大量の細胞を精製することが困難であるため、これまで多くの報告では病変部間質細胞を培養増殖した試料を用いている。しかし、培養や株化の過程で、病変部特異的なエピゲノム変化が失われ、これらの細胞を用いたエピゲノム解析データは、正確な病変部本来の状態を反映していない可能性が十分に考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、従来法の1,000分の1 - 10,000分の1の細胞数で網羅的エピゲノミクスを可能とする新たなエピゲノム解析手技、ChILT法(Chromatin Integration Labeling Technology)当の手法を用い、精製・培養などの実験操作による遺伝子発現変化を最小限にとどめ、病変部の実像をより正確に反映した子宮内膜症の分子病態を理解することである。一方で、子宮内膜症に限らず、培養の過程で遺伝子発現が変化し、それに伴ってエピゲノムも元の状態から変化するため、可能な限り生体試料をそのまま解析することが望ましい。そこで、本研究の少数細胞エピゲノミクス技術により、培養を行わずに病変部の状態に近い細胞を解析することで、これまで見逃されてきた子宮内膜症のエピゲノム異常を試みる。

3. 研究の方法

子宮内膜症病変部から回収できる数百個程度の標的細胞を、培養せずに、病的エピゲノム状態を保持したまま、少数細胞からエピゲノミクスを可能とするChILT法などの技術を用いてエピゲノム解析（網羅的ヒストン修飾解析）し、世界で初めて、子宮内膜症病変部を直接（培養増殖せずに）、網羅的エピゲノム解析し、正常子宮内膜と比較して内膜症特異的なエピゲノム異常を明らかにする。またこれらのデータと既報告の正常内膜脱落膜化モデルデータを併せ、正常/異常の分化経路分子機構を推定する。

得られた病因因子をRNAiによるノックダウン等の手法により人為的に機能阻害し、正常子宮内膜あるいは内膜症由来の培養細胞で増殖能および脱落膜化への影響の有無を検証する。

具体的手法：研究協力者の九州大学大川恭行教授らは、従来法の1,000分の1 - 10,000分の1程度（100個程度）の細胞数でエピゲノム解析（ヒストン修飾状態のChIP-Seq解析）を可能とする、画期的な少数細胞エピゲノム解析法「ChILT法」を開発した(Harada., Nat Cell Biol. 2019;21:287)。同手法は、ヒストン修飾の特異的抗体に対する二次抗体とトランスポゼース反応を併用し、特異的ヒストン修飾領域のDNA増幅を効率的に行うことで、従来法のChIP-Seqの効率を劇的に向上させた画期的新手法である。本手法により、これまで事実上不可能であった、「子宮内膜症病変部の少数細胞を培養増幅せずに直接網羅的エピゲノム解析すること」が実現する。

標的細胞は、すでに我々が発表した方法に従い(Masuda., J Reprod Dev. 2016;62:213-218., Katoh., Epigenomics. 2018;10:1243-1257)子宮内膜間質細胞の精製回収を行う。子宮内膜症病変部とともに、術前麻酔下に正常子宮内膜組織の生検を行い、同一個体で病変部と正常組織を比較する。調製した少量の細胞は、培養・継代を行わず、直ちにChILT法によるヒストン修飾状態の網羅的解析、DNAメチル化アレイを用いたメチローム解析、トランスクリプトーム解析、を行う。

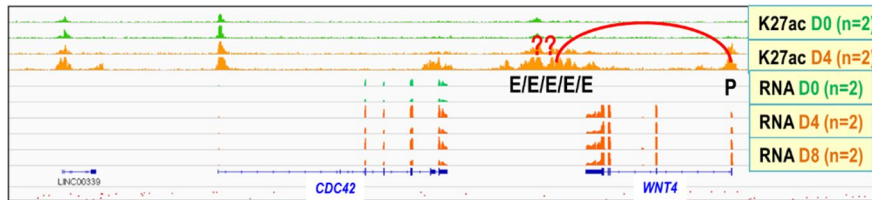
初年度に、10例以上の子宮内膜症検体を収集し、病変部から間質細胞と腺細胞を100個～数千個程度精製回収し、ChILT法でエピゲノム解析（H3K27ac、H3K27me3、DNAメチル化）とトランスクリプトーム解析を行う。一検体当たりの解析コストは8万円未満であり、症例と正常コントロールを合わせて上限20例程度の解析は十分可能である。得られた結果は、すでに報告済みの培養増幅させた子宮内膜間質細胞100万個程度で行った通常のChIP-Seq解析結果(Epigenomics. 2018;10:1243-1257)と比較し、手技特異的なデータの偏りの有無を検証する。

次年度度は、初年度の解析で同定した、内膜症で特異的なエピゲノム修飾を受けている遺伝子の発現変化を、実際の子宮内膜症サンプルと正常内膜で比較する。また同遺伝子を、子宮内膜間質細胞のin vitro脱落膜分化モデルを用い、RNAiによる当該遺伝子のノックダウンを行い、細胞機能への影響を検証する。

4. 研究成果

対照として、正常ヒト子宮内膜検体を収集し、病変部から間質細胞と腺細胞を 100 個～数千個程度精製回収し、ChILT 法でエピゲノム解析 (H3K27ac、H3K27me3、DNA メチル化) とトランスクリプトーム解析を試験的に行った。その結果、疾患群に特徴的な遺伝子発現変動と、相関するエピゲノム変化を見出した。これらの遺伝子発現変化およびそのエピゲノム変化は、新たな疾患病勢マーカーあるいは治療標的となることが示された。

これらの細胞を *in vitro* でエストロゲン存在下に分化させ、分化に伴うエピゲノム変化および遺伝子発現変化データを網羅的に収集し、統合解析を行った。その一例として、子宮内膜症の GWAS 解析 (Nat Commun. 2017 doi: 10.1038/ncomms15539.) により感受性遺伝子として知られる WNT4 遺伝子を例にとると、感受性領域と一致して、同遺伝子下流に H3K27ac のシグナル増強



を認め、従来の解析 (エピゲノム情報を伴わない解析) では原理的に同定が不可能であった遺伝子調節領域である可能性が示唆

される (図の E/E/E/E 領域がエンハンサーとして遠位のプロモーターに作用している可能性が示唆される)。

以上の結果は、論文成果として報告した (Oshina K et.al., Front Med 2023 doi: 10.3389/fmed.2023.1185284.)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 Nakabayashi K, Yamamura M, Hasegawa K, Hata K	4. 巻 2577
2. 論文標題 Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS).	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 39-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2724-2_3	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 秦 健一郎	4. 巻 36
2. 論文標題 【エピゲノムで新たな解明が進む「先天性疾患」】(第4章)周産期疾患・DOHaD 環境によるエピゲノムの 変化と次世代への影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 遺伝子医学MOOK	6. 最初と最後の頁 177-181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 秦 健一郎	4. 巻 39
2. 論文標題 日本人の疾患と健康のためのバイオバンクとデータベース活用法 試料と情報の的確な探し方と使い方。 (第5章)各疾患領域での実例 成育疾患研究におけるNCCHDバイオバンクの活用例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 1148-1151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Oshina Kyoko, Kuroda Keiji, Nakabayashi Kazuhiko, Tomikawa Junko, Kitade Mari, Sugiyama Rikikazu, Hata Kenichiro, Itakura Atsuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Gene expression signatures associated with chronic endometritis revealed by RNA sequencing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2023.1185284	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大科恭子, 中林一彦, 黒田恵司, 北出真理, 板倉敦夫, 秦健一郎
2. 発表標題 不妊・不育症リスク因子としての慢性子宮内膜炎のトランスクリプトーム解析.
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会・第28回日本遺伝子診療学会大会
4. 発表年 2021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
---------	---------