

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861329

研究課題名(和文) 低酸素応答遺伝子HIF2のエピジェネティック異常と子宮筋腫発症への関与の検討

研究課題名(英文) Involvement of the epigenetic aberration of hypoxia inducible factor 2 (HIF2) in development of uterine leiomyoma

研究代表者

前川 亮 (MAEKAWA, Ryo)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90598749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：子宮筋腫発症のマスター遺伝子を探すべく、網羅的発現データでネットワーク解析を行い更にDNAメチル化異常を有する遺伝子を絞り込み、筋腫低発現のHIF2と高発現のNRG1を得た。子宮平滑筋細胞(UtSMC)においてHIF2のノックダウン、NRG1の強制発現を行いこれら遺伝子の作用を検討した。HIF2はUtSMCでの発現が低く検討が困難であった。NRG1を強制発現した細胞では、TGFシグナリングやWnt/カテニンシグナリングなどの子宮筋腫で活性化されているpathwayが活性化されていた。これらpathwayは細胞増殖に関与しており、子宮筋腫の発症や進展におけるNRG1の関与を示唆している。

研究成果の概要(英文)：To obtain master gene candidates that may have key roles in the development of uterine leiomyomas (ULs), we first performed network analysis by combining genome-wide mRNA expression data, protein-protein gene interaction network data and genome-wide DNA methylation data. Then we obtained 5 master gene candidates. Of 5 candidate genes, we focused on HIF2 and NRG1. In ULs, HIF2 expression is downregulated with DNA hypermethylation and NRG1 is upregulated with DNA hypermethylation. Force expression of NRG1 in uterine smooth muscle cells (UtSMCs) showed several signaling pathways such as TGF-beta signaling and Wnt/beta-catenin signaling, that has been shown to be upregulated in ULs. Knockdown of HIF2 was not succeeded because the UtSMCs did not show enough levels of HIF2 expression. The results suggest that NRG1 is involved in the pathogenesis and development in ULs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：DNAメチル化 NRG1 子宮筋腫 EGR HIF2

## 1. 研究開始当初の背景

子宮筋腫は成熟女性の 20-70%が罹患しているとされ、最も発症頻度の高い腫瘍性疾患である。子宮筋腫は重度の月経痛や貧血を引き起こし、性成熟期婦人の QOL の極度の低下を引き起こすだけでなく、不妊症の原因ともなりうる。子宮筋腫は初経後に発症し閉経後に縮小することから、エストロゲン及びプロゲステロン依存性に発症することが知られている。また平滑筋腫瘍として子宮に限定した発症頻度の高さから、初経開始後の子宮収縮によってもたらされる低酸素環境暴露が子宮筋腫の発症・進展に関与していることが従来から推測されている。

子宮筋腫発症のリスク因子として、人種（アフリカ系）、高 BMI、早期の初経開始、高血圧、肉食などが挙げられ、一方でリスクを下げる因子として、経口避妊薬の使用、喫煙、多産、菜食等が挙げられる。これらのことから、遺伝的背景（ジェネティック）だけではなく、後天的な要因であるホルモン環境、栄養、生活環境が大きく影響していることが予想される。つまり、エピジェネティックな影響が関与している可能性がある。このエピジェネティクスは、DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子機能について研究する学問領域であり、DNA のメチル化とヒストン修飾が中心となる。ゲノム全域のエピジェネティクス情報はエピゲノムと呼ばれ、エピジェネティクス系の異常が糖尿病、自己免疫疾患、癌など、様々な異常の原因になっていることが明らかになりつつある。

当研究室はこれまでに子宮筋腫の発生・進展にエピゲノム異常が関与するという仮説のもと、子宮筋腫の DNA メチル化解析を行ってきた。その結果、子宮筋腫では正常筋層と比較してゲノムワイドに DNA メチル化異常が生じていることを RLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning) 法、及び D-REAM(microarray-based DNA methylation analysis with restriction tag-mediated amplification)法を用いて明らかにし、また子宮筋腫では X 染色体に低メチル化異常遺伝子が有意に集積していることを明らかにした (Molecular Human Reproduction, 2009: 実験医学 28 巻 2537, 2010; Journal of Reproduction and Development, 2011)。更に、先年の学術研究助成基金助成金(平成 23-24 年、課題番号 23791846)において、3 症例の子宮筋腫に対してゲノムワイドな DNA メチル化解析法である Illumina HumanMethylation450 BeadChip (Illumina 社、USA)と GeneChip® Human Gene 1.0ST Array

(Affymetrix, USA)を用いた mRNA 発現解析を施行し、子宮筋腫において DNA メチル化異常と発現異常の両者を有する 120 遺伝子を明らかにした(PLOS ONE, 2013)。それら遺伝子の中には下流の遺伝子に影響を与えうる転写因子が多数含まれていた。

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関与していると考えられている。環境因子が発症に関与する子宮筋腫では、環境因子によってもたらされたマスター遺伝子の DNA メチル化異常と発現異常が、下流遺伝子の発現に影響を与えて子宮筋腫発症に関与している可能性がある。

我々は子宮筋腫において発症の鍵となるマスター遺伝子を探索するため、前述の発現解析データから得られた 925 の発現異常遺伝子において相互的ネットワーク解析を行って、遺伝子の相互関係とネットワークの最上流に位置する遺伝子の検索を行った。その結果 76 のネットワークと上流遺伝子が検出された。これら 76 の上流遺伝子のうち、5 つが DNA メチル化異常を呈していることがわかった。我々はその中で、転写因子である Hypoxia Inducible Factor 2(HIF2) と Neureglin1(NRG1)を上流遺伝子とした遺伝子群に着目した。HIF2 遺伝子群は低酸素応答や酸化ストレスへの反応に関与する遺伝子群である。HIF2 は DNA 高メチル化・mRNA 低発現であり、下流遺伝子も低発現傾向を呈していた。HIF2 は低酸素環境下で活性化される低酸素応答システムで中心的な役割を果たす遺伝子であり、赤血球造成や血管新生への関与が知られている。また、低酸素環境下ではミトコンドリアから酸化ストレスの主要因である活性酸素が産生されるが、HIF2 は活性酸素の消去に関わっていることが明らかとなっている。活性酸素は元来、老化や細胞障害において重要な役割を果たしていると考えられてきたが、一方で細胞内シグナル伝達機構や細胞増殖において促進的に作用することが近年報告されている。子宮筋腫組織においては活性酸素の濃度が周囲の正常子宮筋層と比較してより高いことがこれまでに報告されている。また、筋腫培養細胞への活性酸素の暴露実験により EGF 経路(上皮成長因子経路)が活性化されて細胞増殖が引き起こされることが最近報告された。NRG1 は子宮筋腫において高メチル化、高発現されていた遺伝子である。NRG1 は、EGF 経路においてその経路の起点となる EGF 受容体に対してそれ自身が ligand として働くことが報告され

ている。これらのことから、HIF2の高メチル化異常と発現低下、NRG1の高メチル化、高発現異常が、初経開始後に子宮筋腫細胞内で活性酸素の蓄積を招き、相互的にEGF経路を活性化させて筋腫細胞の増殖に関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

HIF2/NRG1のDNAメチル化異常と発現異常が子宮筋腫の増殖に与える影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

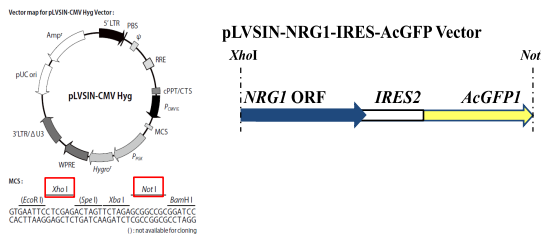
NRG1遺伝子を強制発現させる発現ベクターを作製した。実験には京都大学産婦人科より分与されたhTERT導入不死化子宮平滑筋細胞(hTERT UtSMC)、及び強制発現ベクター(pLVSI-NRG1-IRES-AcGFPベクター)を用いた(当初はpCCALL2ベクターを使用予定であった)。強制発現ベクターの作製は、cDNAライブラリを作製した後にNRG1遺伝子のmRNA全長をPCRにて増幅し、pLVSIベクターに挿入して行った。また、HIF2遺伝子の発現を抑制するsiRNAをhTERT UtSMCに作用させ、HIF2遺伝子の発現抑制を行った。得られた細胞において、マイクロアレイ(GeneChip Human Gene ST Array, Affimetrix)によるゲノムワイドmRNA発現解析を行い、さらにIngenuity Pathway Analysis (IPA)を行って、遺伝子の発現抑制、強制発現の影響を検討した。

## 4. 研究成果

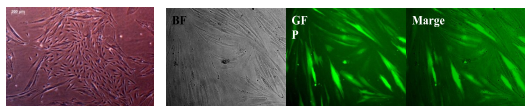
### (1)NRG1安定発現細胞株の作成

当初、pCCALL2ベクターにNRG1を導入してNRG1を過剰発現するhTERT UtSMCを作成する予定であった。しかし、恒常的にNRG1を過剰発現する安定発現細胞株を用いて実験する方針とし、導入方法をレンチウイルスベクター(pLVSI-NRG1-IRES-AcGFP vector)に変更した。NRG1過剰発現レンチウイルスベクターを作製したのち、hTERT UtSMCへ感染させ、NRG1

#### ◆NRG1過剰発現レンチウイルスベクター



#### ◆レンチウイルスベクターのヒト不死化子宮平滑筋細胞への感染



hTERT UtSMC:京都大学産婦人科より分与

### 図1.NRG1安定発現細胞株の作製

安定発現細胞株を作成した(図1)。

### (2)NRG1安定発現細胞におけるゲノムワイドmRNA発現解析

NRG1安定発現細胞において、NRG1強制発現を行わなかったhTERT UtSMC(mock)と比較して発現が1.5倍以上変化する遺伝子は624遺伝子であり、発現増加359遺伝子、発現低下265遺伝子であった(図2)。

	発現増加 遺伝子数	発現低下 遺伝子数	発現変動した 遺伝子数
NRG1安定発現細胞株	359	265	624

### 図2.NRG1安定発現細胞株で発現が変化した遺伝子

### (3)NRG1安定発現細胞で発現が変化した遺伝子のIPAによるpathway解析

これら発現が変化した遺伝子において、IPAによるpathway解析を行った。その結果、Hepatic fibrosis、Human Embryonic Stem Cell Pluripotency、Role of Osteoblasts、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway、G-Protein Coupled Receptor Signaling、Adipogenesis Pathway、Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates、Wnt/ -catenin Signalingなどのpathwayが有意に検出された(図3)。興味深いことに、これらのpathwayのうちHepatic Fibrosis、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway、Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates、Wnt/ -catenin Signalingのpathwayは、我々のこれまでのデータで正常平滑筋と比較して子宮筋腫で変化が有意に生じているpathwayであった。さらにこれらのpathwayにに含まれる遺伝子を詳細に観察すると、Wnt2BとTGFB3遺伝子が高い頻度で含まれていた。これらの遺伝子はいずれも子宮筋腫で正常平滑筋と比較して発現変化が生じている遺伝子であった。NRG1を強制発現させた細胞において、これらの遺伝子の発現変化が生じ、さらにこれらの遺伝子が含まれているpathwayが変化していることは極めて興味深い。Wnt/ -catenin signalingとTGFをkey factorとするsignalingは、細胞増殖に関与することが知られている。DNAのメチル化異常が生じた上流に位置する遺伝子であるNRG1が、発現異常を介して下流遺伝子であるWNT2B、TGFB3やそれらに関連する遺伝子の発現変化を引き起こして、筋腫の発症や進展に関与している可能性がある。

HIF2 の発現抑制に関しては、hTERT UtSMC において HIF2 の発現を確認したところ、HIF2 の mRNA が検出されず、発現が無いものと考えられた。そのため、本報告書作製時点では発現抑制実験は実現されていない。

Inguinity Canonical Pathways	Molecules
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	<i>TNFSF4, ICAMI, FLT1, FGF2, SMA D3, IL6R, SMAD7, VEGFB, CCL2, CS F1, HGF, IGFBP3, TGFB3, LAMA1, SERPINE1, TNFRSF11B</i>
Human Embryonic Stem Cell Pluripotency	<i>PIK3C2B, BMP4, FGF2, SMAD3, W NT2B, SMAD7, INHBA, NOG, SPHK 1, SIPR1, TGFB3, FGFRL1, TCF7L2</i>
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	<i>SFRP4, PIK3C2B, CTSK, BMP4, SM AD9, WNT2B, ITGA2, ACP5, MAP3K 5, CSF1, TRAF5, DKK1, ADAMTS5, T CF7L2, BIRC2, TNFRSF11B, IL11</i>
Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway	<i>LOX, PIK3C2B, NOTCH3, SNAI2, F GF2, SMAD3, WNT2B, FOXC2, CDH 2, GAB1, HGF, TGFB3, FGFRL1, TC F7L2</i>
G-Protein Coupled Receptor Signaling	<i>PIK3C2B, HTR2B, PDE9A, RGS7, R GS4, ADRA1D, PLCB4, HTR1B, ADRA2A, NPR3, RASGRP1, RGS10, SIPR 1, PDE5A, MAP3K8, ADORA2B, AD CY7</i>
Adipogenesis pathway	<i>TP53, FOXC2, RUNX1T1, BMP4, SM AD9, SREBF1, FGF2, SMAD3, FABP 4, FGFRL1</i>
Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates	<i>BMP4, SMAD9, TGFB3, CDC6, TG FB3, DKK1, NOG, TCF7L2</i>
Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling	<i>TP53, SFRP4, CDH2, GJA1, TGFB3 , WNT2B, RARB, CD44, TGFB3, DKK 1, TCF7L2</i>
Goi Signaling	<i>HTR1B, RALA, NPR3, ADRA2A, RG S7, RGS10, SIPR1, RGS4, ADCY7</i>
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	<i>PIK3C2B, SFRP4, SOCS3, CSAR1, IC AM1, FGF2, WNT2B, IL6R, VEGFB, PLCB4, CCL2, CSF1, DKK1, TRAF5, TCF7L2, TNFRSF11B</i>

図 3. NRG1 安定発現細胞株で発現変化した遺伝子の IPA を用いた pathway 解析

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計3件)

前川亮、佐藤俊、浅田裕美、品川征大、岡田真紀、城崎幸介、山形芳明、田村博史、杉野法広：子宮筋腫におけるトランスクリプトームとエピゲノムを統合した蛋白質相互ネットワーク解析、第 88 回日本内分泌学会学術集会 (2015 年 4 月 23 日、東京都千代田区ホテルニューオータニ)

Ryo Maekawa、Shun Sato、Kosuke Joh、Maki Okada、Masahiro Shinagawa、Lifa Lee、Hiromi Asada、Toshiaki Taketani、Yoshiaki Yamagata、Hiroshi Tamura、Norihiro Sugino：Epigenome-transcriptome approach facilitates the investigation of underlying epigenetical deregulation in uterine leiomyomas、IFFS international meeting 2015 (2015 年 4 月 26 日、神奈川県横浜市 パシフィコ横浜)

前川亮、佐藤俊、浅田裕美、竹谷俊明、城崎幸介、品川征大、岡田真紀、李理華、山縣芳明、田村博史、杉野法広

：子宮筋腫におけるトランスクリプトームとエピゲノムを統合した蛋白質相互ネットワーク解析、第 9 回日本エピジェネティクス研

究会年会 (2015 年 5 月 25 日、東京都千代田区 学術総合センター一橋講堂)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

前川 亮 (MAEKAWA, Ryo)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90598749

