

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18682

研究課題名（和文）子宮内膜間質細胞の分化異常に着目した子宮内膜症病態メカニズムの網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of the pathogenic mechanism of endometriosis focusing on the abnormal differentiation of endometrial stromal cells

研究代表者

宮崎 薫（Miyazaki, Kaoru）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：90445370

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：正常子宮内膜間質細胞においては、gata2遺伝子が脱着膜化に関する遺伝子群を制御しており、子宮内膜症間質細胞においてはgata2遺伝子の発現が低下していることが知られている。子宮内膜症では幹細胞の分化メカニズムの障害が発症に寄与していると考えられるため、ヒトiPS細胞が子宮内膜間質細胞に分化する際の遺伝子発現変化を元に、子宮内膜症進展に關与すると思われる転写因子の候補を絞った。そして内膜間質細胞においてgata2遺伝子をノックダウンすることで、Gata2応答性に子宮内膜症発症を抑制あるいは促進する転写因子の候補を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症は、子宮内膜様の組織が子宮外に発育し、重篤な骨盤痛、不妊症、骨盤内癒着を引き起こす病気で、生殖年齢女性全体の約10%にみられる。現在、子宮内膜症の治療としては手術療法や薬物療法が存在するが、手術療法による卵巣機能の障害や薬物療法による排卵抑制など、現在の治療方法は妊娠を望む患者にとっては必ずしも有効な治療とはいえない。そこで、妊娠希望者にも使用できる新たな治療戦略の開発が急務となっている。今回同定された、子宮内膜症発症を抑制あるいは促進する転写因子の発現を子宮内膜症間質細胞内でコントロールすることで、最終的に排卵抑制に依らない、画期的な子宮内膜症の治療薬開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：In normal endometrial stromal cells, the gata2 gene regulates a group of genes involved in decidualization, and it is known that the expression of the gata2 gene is decreased in endometriotic stromal cells. Since impairment of the stem cell differentiation mechanism may contribute to the pathogenesis of endometriosis, we narrowed down the candidates of transcription factors that may be involved in the progression of endometriosis based on the gene expression changes during the differentiation of human iPS cells into endometrial stromal cells. By knocking down the gata2 gene in endometrial stromal cells, we identified candidate transcription factors that suppress or promote the development of endometriosis in response to gata2.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮内膜 子宮内膜症 転写因子 iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、子宮内膜様の組織が子宮外に発育し(図1)重篤な骨盤痛、不妊症、そして骨盤内癒着を引き起こす病気で、生殖年齢女性全体の約10%にみられる。現在、子宮内膜症の治療としては手術療法や薬物療法が存在するが、手術療法による卵巣機能の障害や薬物療法による排卵抑制など、現在の治療方法は妊娠を望む患者にとっては必ずしも有効な治療とはいえない。そこで、妊娠希望者にも使用できる新たな治療戦略の開発が急務となっている。

一方、近年の分子生物学の発展により、古典的なセントラルドグマで説明のつかない遺伝子発現の調節機構が次々と発見されている。これには、DNAメチル化やヒストンタンパク質修飾と言ったエピジェネティックな遺伝子発現調節や、わずか20塩基ほどのsmall RNAによるmicro RNA発現調節機構が挙げられる。子宮内膜症の病態にもこうしたエピジェネティックな異常が大きな役割を果たしていることが、近年の報告で次々と明らかになってきている。子宮内膜症で認められる異常は、大きく分けて(1)子宮内膜症上皮細胞における、癌原遺伝子変異 (ARID1A, PIK3CA, KRAS, PPP2R1A) そして(2)子宮内膜症間質細胞における、ホルモン受容体やその他の転写因子の発現異常 (ESR1, PGR, HOXA11 発現低下、ESR2, SF1 発現上昇) がこれまで報告されている(図2)。このうち、特に間質細胞内でのエピジェネティックな異常による

ホルモン受容体やその他の転写因子の発現異常が、異常な上皮細胞の維持・増殖に大きな役割を果たしていると我々は推測している。つまり、この間質細胞のエピジェネティックな異常を標的として治療することで、異常な上皮細胞を排除し、最終的に子宮内膜症を治療することが可能と考えている。このエピジェネティックな異常を標的として創薬を試みることで、排卵抑制に依らない、新たな子宮内膜症治療薬を開発することが可能である、というのが我々の仮説である。

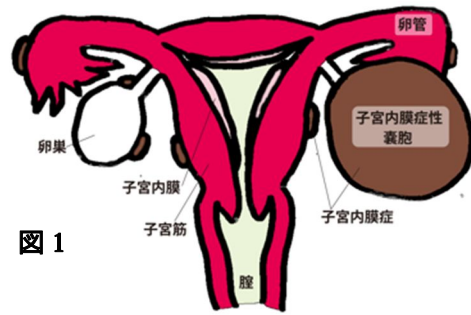
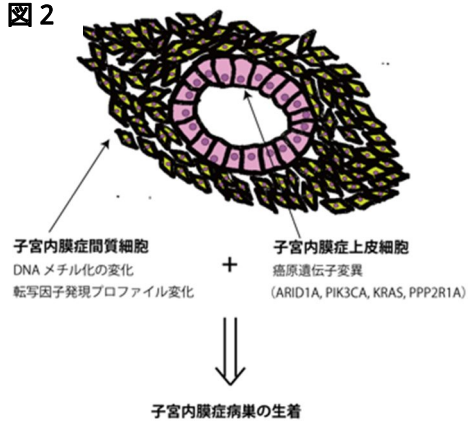


図1

図2



### 2. 研究の目的

子宮内膜症間質細胞は多能性幹細胞マーカー (SOX2, NANOG, OCT4) を高発現しており、正常間質細胞よりも未熟な細胞、つまり幹細胞に近い細胞といえることができる。つまり、幹細胞の分化メカニズムになんらかの障害が起きていると考えられる。本研究は、ヒト正常子宮内膜間質細胞と子宮内膜症間質細胞の遺伝子発現プロファイルを次世代シーケンサーを用いて網羅的に比較し、その中からヒトiPS細胞が分化する際に発現が変化する転写因子に注目して、それらの転写因子の機能解析とゲノムレベルでの結合領域同定・ヒストン修飾解析を行うことを目的とする。

我々は、米国Northwestern大学との共同研究により、子宮内膜幹細胞分化のメカニズムを子宮内膜発生段階から再現し理解するため、多能性幹細胞を子宮内膜細胞へと誘導する研究を行った。その結果、ヒトiPS細胞を子宮内膜間質様の細胞へと分化させることに成功した (Miyazaki, et al. Stem Cell Reports, 2018)。ヒトiPS細胞から分化した細胞(D14)は、子宮内膜間質細胞で高発現する転写因子であるHOXA11とプロゲステロン受容体(PGR)を発現していた(図2)。また、D14をプロゲステロンで処理すると(D22IVD)、対照群(D22VC)と比較し、転写因子FOXO1の発現が上昇し、培地中へのIGFBP1タンパク分泌が上昇していた(図3)。これは、子宮内膜間質細胞のプロゲステロン依存性分化(脱落膜化)に認められる変化である。子宮は、中間中胚葉、体腔上皮を経てミューラー管から分化して形成されるが、この研究ではこの過程を忠実に再現している。RNA-seqから得られた遺伝子発現データから

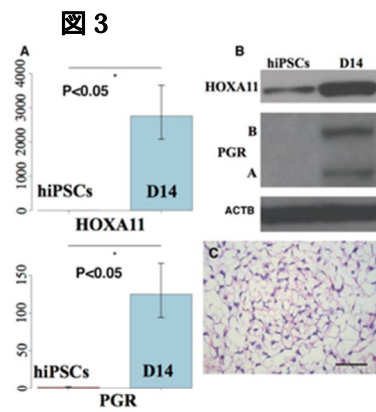


図4

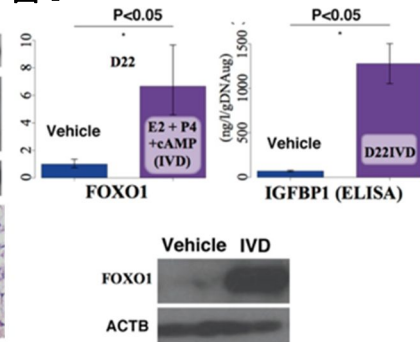
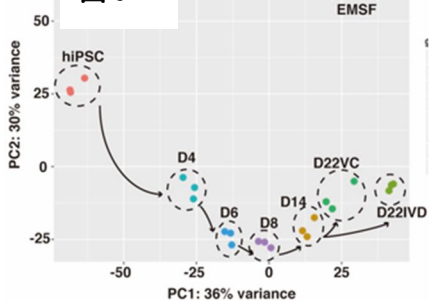


図5



この研究ではこの過程を忠実に再現している。RNA-seqから得られた遺伝子発現データから

Principal Component Analysis を行って各分化段階の transcriptome を比較すると、転写因子を初めとした遺伝子発現が劇的に変化していた(図4)。我々は、RNA-seq のデータよりいくつかの転写因子をピックアップし、定量 RT-PCR を行う事で、D8 (ミューラー管様細胞) および子宮内膜症間質細胞と比較し、正常内膜間質細胞および D14 (内膜間質様細胞) で共通に高発現あるいは低発現する転写因子をいくつか同定した。この中には内膜間質の脱落膜化に必要な転写因子である PGR, CREB, FOSL1 を含む(未発表データ)。子宮内膜間質の分化と子宮内膜症の病態において重要な枠割りを果たすと想定されるこれらの転写因子群に注目して、その結合やヒストン修飾などのエピゲノム情報を調べるとというのが、本研究の独自の視点である。

### 3. 研究の方法

- (1) ヒト正常子宮内膜間質細胞と子宮内膜症間質細胞を分離し、それぞれについて RNA-seq を行って transcriptome を比較し、両者間で有意に発現量の異なる遺伝子 (Differentially expressed genes, DEG) を同定する。
- (2) ヒト iPS 細胞から子宮内膜間質細胞を分化させる時に生じる遺伝子プロファイルの変化と上記 DEG を比較し、共通の DEG を同定する。
- (3) 共通の DEG のうち、子宮内膜症間質細胞で高発現する転写因子をノックダウンし、ESR1 や PGR といったホルモン受容体の発現、およびホルモン刺激に対する反応の変化を観察する。

具体的には、以下のような方法で行った。

- (1) ヒト正常子宮内膜間質細胞と子宮内膜症間質細胞を分離し、それぞれについて RNA-seq を行って transcriptome を比較し、両者間で有意に発現量の異なる遺伝子 (Differentially expressed genes, DEG) を同定する。

ヒト正常内膜および子宮内膜症組織から、それぞれ正常子宮内膜間質細胞と子宮内膜症間質細胞を分離する。

それぞれの細胞より RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成する。

で作成した cDNA ライブラリーをシーケンシングする。

シーケンシングデータをもとに各遺伝子の発現量を特定する。

正常子宮内膜間質細胞と子宮内膜症間質細胞の間で有意に発現量が異なる遺伝子 (DEG) を特定する。

- (2) ヒト iPS 細胞から子宮内膜間質細胞を分化させる時に生じる遺伝子プロファイルの変化と上記 DEG を比較し、共通の DEG を同定する。

ヒト iPS 細胞は、中間中胚葉様細胞、体腔上皮様細胞、ミューラー管様細胞を経て子宮内膜間質細胞へと誘導されるが、各分化段階の遺伝子発現プロファイルは、RNA-seq データとして EMBL-EBI ([www.ebi.ac.uk/arrayexpress](http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress)) の ArrayExpress データベースに登録されている (E-MTAB-7292)。

このうち、ミューラー管様細胞と子宮内膜間質様細胞の間で DEG を同定する。

で求めた DEG を(1)の で求めた DEG と比較し、共通の DEG を抽出する。

- (3) 共通の DEG のうち、子宮内膜症間質細胞で高発現する転写因子をノックダウンし、ESR1 や PGR といったホルモン受容体の発現、およびホルモン刺激に対する反応の変化を観察する。

### 4. 研究成果

- (1) ヒト正常子宮内膜間質細胞と子宮内膜症間質細胞を分離し、それぞれ 3 検体ずつについて RNA-seq を行って transcriptome を比較し、両者間で有意に発現量の異なる遺伝子 (Differentially expressed genes, DEG) を同定した。

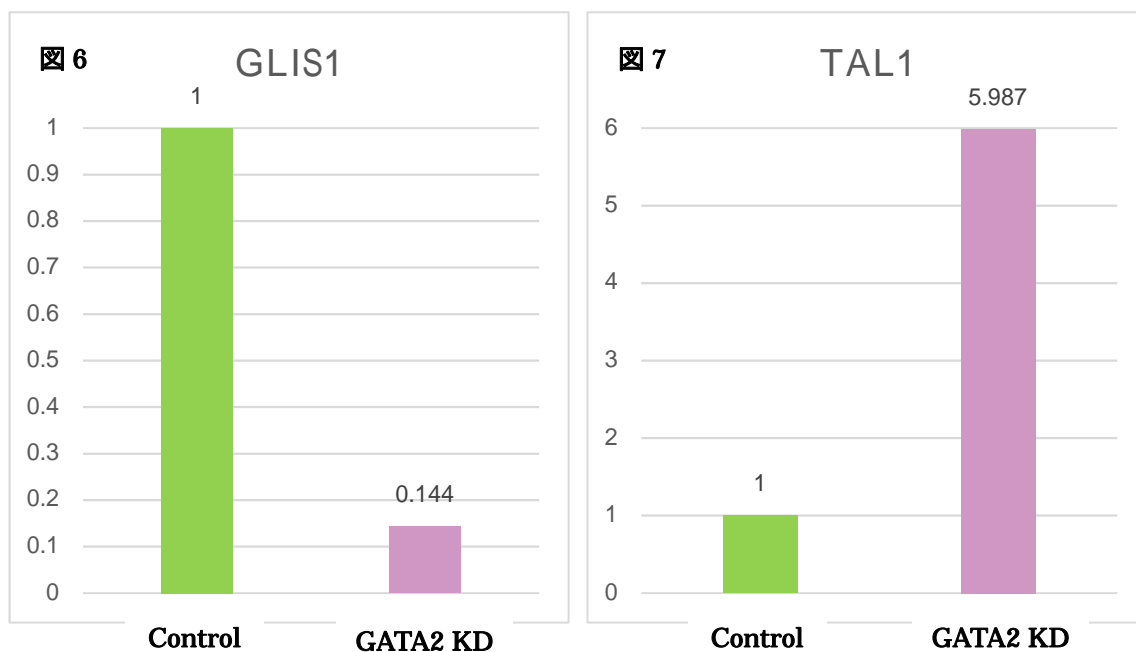
- (2) ヒト iPS 細胞から子宮内膜間質細胞を分化させる時に生じる遺伝子プロファイルの変化 (Miyazaki K, Stem Cell Reports. 2018) と上記 DEG を比較し、共通の DEG を同定した。

- (3) これらの DEG から、正常子宮内膜間質細胞にて高発現する転写因子群を OSIS-suppressor TFs、子宮内膜症間質細胞にて高発現する転写因子群を OSIS-genic TFs と定義する。ヒト正常子宮内膜間質細胞と子宮内膜症間質細胞の間でこれら転写因子群の発現量が有意に異なることを qPCR にて再確認した。

(4) 正常子宮内膜間質細胞においては、gata2 遺伝子が脱落膜化に関与する遺伝子群を制御しており、子宮内膜症間質細胞においては gata2 遺伝子がメチル化され発現が低下していることが知られている (Dyson MT, PLoS Genet. 2014)。正常子宮内膜間質細胞にて gata2 遺伝子をノックダウンしたところ、先述の OSIS-suppressor TFs の発現が低下し、OSIS-genic TFs の発現が上昇した。gata2 遺伝子によって、これら OSIS-suppressor TFs および OSIS-genic TFs の発現が調節されている可能性が考えられた。

OSIS-suppressor TFs の一例として、GLIS1 を挙げる。GLIS1 は TCF/  $\beta$ -catenin の転写活性を促進し、乳癌においては細胞遊走及び浸潤を促進することが知られているが、正常子宮内膜間質細胞にも多く発現している (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000174332-GLIS1/tissue/endometrium>)。GLIS1 と子宮内膜症の進展の関連性は未だ報告されていないが、子宮内膜間質細胞にて gata2 遺伝子をノックダウンしたところ、GLIS1 の発現が著明に低下した

ことから(図6)同遺伝子が gata2 遺伝子によって制御され、子宮内膜症進展を抑制する因子である可能性が示唆される。一方、OSIS-genic TFs の一例として、TAL1 を挙げる。TAL1 は T 細胞急性リンパ性白血病における癌原転写因子の 1 つで、正常子宮内膜間質細胞にはほとんど発現していない(<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000162367-TAL1/tissue/endometrium>)。TAL1 と子宮内膜症の進展の関連性もまた報告されていないが、子宮内膜間質細胞にて gata2 遺伝子をノックダウンしたところ、TAL1 の発現が著明に上昇したことから(図7)同遺伝子が gata2 遺伝子によって制御され、子宮内膜症進展を促進する因子である可能性が示唆される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Miki Fumie, Maruyama Tetsuo, Miyazaki Kaoru, Takao Tomoka, Yoshimasa Yushi, Katakura Satomi, Hihara Hanako, Uchida Sayaka, Masuda Hiroataka, Uchida Hiroshi, Nagai Toshihiro, Shibata Shinsuke, Tanaka Mamoru	4. 巻 100
2. 論文標題 The orientation of a decellularized uterine scaffold determines the tissue topology and architecture of the regenerated uterus in rats†	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 1215 ~ 1227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz004	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 Bulun Serdar E, Yilmaz Bahar D, Sison Christia, Miyazaki Kaoru, Bernardi Lia, Liu Shimeng, Kohlmeier Amanda, Yin Ping, Milad Magdy, Wei JianJun	4. 巻 40
2. 論文標題 Endometriosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine Reviews	6. 最初と最後の頁 1048 ~ 1079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/er.2018-00242	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kaoru Miyazaki, Yuichi Furukawa, Tetsuo Maruyama, Serdar Bulun
2. 発表標題 Role of WNT/CTNNB1 pathway in differentiation of human induced pluripotent stem cells to endometrial stromal fibroblasts
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎薫、丸山哲夫、Serdar Bulun
2. 発表標題 WNT/CTNNB1経路を利用したヒトiPS細胞の子宮内膜間質細胞への分化方法の開発
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎薫、雪本めぐみ、竹本崇史、宇都博文、吉田宏之、杉山武
2. 発表標題 卵管間膜に発生した靱帯内妊娠の一例
3. 学会等名 第59回日本産科婦人科内視鏡学会学術講演会
4. 発表年 2019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