

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22674

研究課題名(和文)新規子宮内膜症モデルと線維化セルリネッジによるドライバー変異発生機序の探索

研究課題名(英文)A new animal model and cell lineages to investigate cancer-driver mutations in endometriosis

研究代表者

岩瀬 明(Iwase, Akira)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20362246

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)：子宮内膜症間質細胞におけるTCF21発現は、内膜症の発症・進展に伴い増加することが臨床検体を用いた解析により示された。免疫染色およびインビトロの解析ではTCF21依存性のペリオスチン産生および SMA発現促進経路が存在することが示された。免疫蛍光法では、TCF21、TGF $\beta$ 、IL-4、IL-13が共局在しており、インビトロの系においてIL-4添加がTGF $\beta$ 誘導性かつTCF21依存性のペリオスチン産生および SMA発現を促進することが示された。以上より、子宮内膜症の局所線維化において、TCF21陽性間質細胞が局所炎症にも修飾を受け関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症は、疼痛、不妊症、がん発生源となる重要な疾患である。局所炎症と線維化が重要な病態のひとつであるが、その分子メカニズムについては詳細が明らかではなかった。今回の研究で、TCF21陽性間質細胞が局所の線維化に関与すること、TCF21発現抑制により実験的には線維化が抑制されることが示され、TCF21が子宮内膜症の新たな治療ターゲットとなる可能性があるといえる。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemistry (IHC) revealed that the expression of TCF21 is increased according to the development of endometriosis. IHC and in vitro analyses demonstrated that the TCF21-dependent pathway to induce periostin production and SMA expression is involved in the local fibrosis of endometriosis. We also found that the IL-4, -13 and TGF $\beta$  are co-localized with TCF21 and that IL-4 upregulates the TGF $\beta$ -induced and TCF21-dependent production of periostin and SMA. Taken together, TCF21-positive stromal cells play significant role in local fibrosis in endometriosis under local inflammatory response. Our results suggest that TCF21 can be a new therapeutic target for endometriosis.

研究分野：生殖医学

キーワード：子宮内膜症 TCF21 線維化

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症病変が腹腔内に逆流した月経血中の子宮内膜に由来する月経血逆流説について、従来の研究手法では明らかにできない以下の問題点を見出した。1) 月経血の腹腔内への逆流は、ほぼすべての女性にみられるのに対し、子宮内膜症を発症するのは生殖年齢女性の 10%であるのはなぜか、2) 正常子宮内膜と異なる子宮内膜症細胞の性質(癌関連遺伝子変異含む)はいつ、どのように獲得されるのか、である。子宮内膜症の研究は、正常の子宮内膜と子宮内膜症病変を比較検討することで、子宮内膜症の特徴や内膜症細胞の形質を明らかにしてきたが、子宮内膜から内膜症への継時的な変化についての考察やその過程を明らかにできる実験手法の開発については重きを置かれていなかった。また子宮内膜症の線維化は局所での炎症で促進されるが、他の炎症性疾患と比較し線維化がより顕著であるという特徴があり、ここにも子宮内膜症細胞の特殊性があることに気づいた。

子宮内膜症性卵巣嚢胞においては 0.7-0.8% が癌化することは広く知られていたが、その機序についても詳細は不明であった。近年、比較的にまれな深部内膜症病変においても、高頻度に ARID1A や KRAS といった子宮内膜症性卵巣嚢胞の癌化と共通した cancer driver mutation が生じていることが報告された(N Engl J Med 2017;376:1835-48)。子宮内膜症病変は腹膜表在性病変 - 子宮内膜症性卵巣嚢胞 - 深部内膜症の順で重症化し線維化が進行する。以上より、線維化を主とした内膜症細胞の形質が、cancer driver mutation にも関与すると考え、ヒトの子宮内膜症では正常子宮内膜細胞から線維化を惹起するセルリネッジが派生・逆流し、腹膜に生着した後、局所の炎症により線維化が促進され、子宮内膜症が進行するとともに cancer driver mutation が生じるとする仮説に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、子宮内膜症の本態を病変局所の炎症と線維化、細胞レベルでは異所性に生着した子宮内膜細胞の筋線維芽細胞への変化であると位置づけ、線維化を起こす分子機序としての Transcription factor 21 (TCF21)陽性セルリネッジが子宮内膜症を生じ、子宮内膜症細胞の形質のみならず cancer driver mutation 獲得にも寄与するという仮説について、臨床検体を用いた解析、臨床検体由来細胞株を用いたインビトロの解析、新しい子宮内膜症モデルマウスを用いた解析を行うことを目的とした。TCF21 は発生の過程で間葉系細胞を中心に強く発現する転写因子であり、特に心臓においては、心外膜から TCF21 陽性セルリネッジが、EMT (上皮間葉転換)を経て心臓を形成する線維芽細胞へ分化し、コラーゲン等の細胞外マトリックス(ECM)を産生することが示されている。さらに心筋障害が発生すると、TCF21 陽性線維芽細胞は筋線維芽細胞へと分化し、過剰な ECM を産生し心筋の収縮能を阻害する。この TCF21 陽性セルリネッジの心臓における役割は、線維化・瘢痕化と組織障害という点で子宮内膜症の進展過程に類似するものである。

また TCF21 に関する実験の進捗とその結果に伴い Meflin にも着目した。Meflin は膵がんの cancer-associated fibroblast (CAF) で発現し、その発現低下が CAF の性質変化(筋線維芽細胞様変化)とがん促進に関与することが報告されている。Meflin についても線維化とがん化双方に関与することを示唆しており、TCF21 同様の検討を予備的に行った。

## 3. 研究の方法

まず臨床検体(各種子宮内膜症組織:腹膜表在性病変、卵巣子宮内膜症性嚢胞、深部内膜症)において TCF21 発現を免疫組織染色にて検討した。局所炎症、線維化との関連性の評価については、IL-4, 13,  $\alpha$ SMA などとの多重染色(免疫蛍光法)を行った。臨床検体由来の細胞株(正常子宮内膜由来の間質細胞と子宮内膜症間質細胞)を用い、インビトロでも関連分子の発現解析を行った(TCF-21,  $\alpha$ SMA 発現解析(筋線維芽細胞への変化)、コラーゲン・フィブロネクチン・ペリオスチンなどの ECM 産生(組織線維化惹起)等)細胞の表現型については、増殖能(MTS, BrdU アッセイ)、インベーションアッセイ、マイグレーションアッセイを実施し、比較検討した。正常子宮内膜由来間質細胞には TCF21 発現ベクターを導入し、TCF21 陽性の子宮内膜症間質細胞については siRNA で TCF21 発現を抑制し同様の実験を行い、TCF21 依存性の細胞形質変化について詳細に検討する。

正常子宮内膜および子宮内膜症病変からレーザーマイクロダイセクションにて上皮細胞を分取し DNA を採取し、網羅的解析に供するための検体評価を行った。

子宮内膜症モデルマウスについては、ドナー子宮を細切、腹腔内に散布し、異所性内膜を生着させるモデルを用いた。子宮内膜症(異所性子宮内膜)の評価を病理学的に行い、TCF21 発現を誘導した際の変化を検証するため、in vivo 遺伝子導入用ベクター(TCF21)を腹腔内投与した後の、異所性内膜組織における TCF-21 発現、異所性内膜組織の定量的評価を実施した。

## 4. 研究成果

免疫組織染色では、子宮内膜症を有しない正常子宮内膜において TCF21 発現をみとめなかったが、

子宮内膜症を有する正常子宮内膜においては弱い発現をみとめた。子宮内膜症においては、深部内膜症 > 卵巣子宮内膜症性嚢胞 > 腹膜表在性病変の順で、間質細胞に TCF21 発現をみとめた。半定量的評価において深部内膜症—卵巣子宮内膜症性嚢胞間、腹膜表在性病変—正常子宮内膜間に有意差をみとめた。卵巣子宮内膜症性嚢胞および深部内膜症ならびに正常子宮内膜から間質細胞を分離培養し、RT-PCR、ウェスタンブロッティングで発現を比較したところ、深部内膜症、卵巣子宮内膜症性嚢胞で正常子宮内膜と比較し有意に発現が増強していることを確認した。同様の実験手法で細胞外マトリクス的一种であるペリオスチン発現・局在を評価したところ、TCF21 発現と同様の傾向をみとめた。

上記実験より、子宮内膜症進展における TCF21 とペリオスチンのパラレルな関与を推測するに至った。転写因子 TCF21 により誘導されるペリオスチン産生、すなわち局所の線維化の背景を評価するため IL-4,13,TGF- $\beta$ 1 発現・局在を評価した。卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞、深部内膜症間質細胞、正常子宮内膜間質細胞における mRNA 発現レベルについては、IL-4,13,TGF- $\beta$ 1 すべてにおいて、TCF-21, ペリオスチンと同様の傾向であった。免疫蛍光法による多重染色では、TCF21, ペリオスチン, IL-4,13,TGF- $\beta$ 1 は共局在を示した。

正常子宮内膜間質細胞に TCF21 発現ベクターを導入、卵巣子宮内膜症性嚢胞間質細胞では、siRNA で TCF21 発現を抑制し、ペリオスチン発現の変化を検討した。前者では、TCF21 発現に伴いペリオスチン発現が誘導され、後者では TCF-21 発現抑制によりペリオスチンも抑制された。 $\alpha$ SMA 発現についてもペリオスチン産生と同様の結果であった。この系に IL-4 を添加したところ、ペリオスチン発現はさらに増強した。以上より、子宮内膜症発症・進展機序に、TCF21 依存性のペリオスチン産生（線維化）とその共誘導因子である IL-4（局所炎症）の関与が明らかになった。本実験系における細胞の表現型変化として、細胞増殖、浸潤能を評価したが、TCF21 ノックダウン、強発現いずれの系においても変化はみられなかった。

TCF21 依存性変化が正常子宮内膜細胞の異所性生着後に生じていると仮説をたて実験を行うため、マウス子宮内膜症モデルを作製した。このモデルでは正常子宮内膜、異所性子宮内膜とも TCF21 発現は陰性であった。インビボ導入用の TCF21 発現ベクターを作製し、異所性生着後の子宮内膜細胞への導入を試みたが、TCF21 発現誘導にはいたらなかった。また腹腔内への IL-4 添加においてもペリオスチン発現誘導はみられなかった。本実験系が確立できなかったため、TCF21 発現が、子宮内膜症発症・進展のどの過程で誘導されるかについては、結論を得ることができなかった。

さらにヒト検体を用い、TCF21 依存性線維化の進行と内膜症上皮細胞における遺伝子変異を評価するため、まず卵巣子宮内膜症病変からレーザーマイクロダイセクションにて、上皮細胞 DNA 採取をこころみた。卵巣子宮内膜症から発生したと思われる卵巣癌の合併有無で、変異頻度を比較する予定であったが、質・量的に十分なサンプルを採取することができなかった。

メフリンについては、子宮内膜症間質細胞に発現しているが、発現強度は細胞により異なっていた。子宮内膜症間質細胞への TGF- $\beta$ 1 添加では、すべて  $\alpha$ SMA が増加したが、Meflin 陽性細胞では TGF- $\beta$ 1 依存性の  $\alpha$ SMA 誘導が弱いという結果であった。上記 TCF21 発現抑制系(siRNA 使用)において、TCF21 抑制により Meflin 発現は増加した。

上記結果を総合すると、正常子宮内膜間質細胞は子宮内膜症発症への進展過程で、もしくはそれに先立ち TCF21 陽性となり、TCF21 存在下ではペリオスチン産生、 $\alpha$ SMA 発現を指標とする細胞の筋線維芽細胞変化、局所の線維化を惹起している。Meflin 発現はこの系を抑制しているが、TCF21 発現により Meflin 発現が抑制され、線維化の進展に間接的に寄与している可能性がある。TCF21 依存性の線維化には、IL-4 も促進的に関与しており局所炎症が線維化をさらに促進することが示された。局所線維化とがん化について直接的な関連性を示すデータについては今回の検討で得ることはできなかったが、すい臓がんががん抑制性 CAF として報告されている Meflin 陽性 CAF が手掛かりとなる可能性が示された。

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 0件）

1. 著者名 Umida Ganieva, Tomoko Nakamura, Satoko Osuka, Bayasula, Natsuki Nakanishi, Yukiyo Kasahara, Nobuyoshi Takasaki, Ayako Muraoka, Shotaro Hayashi, Takashi Nagai, Tomohiko Murase, Maki Goto, Akira Iwase, Fumitaka Kikkawa	4. 巻 190
2. 論文標題 Involvement of Transcription Factor 21 in the Pathogenesis of Fibrosis in Endometriosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Pathol	6. 最初と最後の頁 145-157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2019.09.008	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ガニエヴァ ウミダ、中村智子ほか
2. 発表標題 子宮腺筋症と子宮内膜症における正所性子宮内膜の違い
3. 学会等名 第41回日本エンドメトリオーシス学会
4. 発表年 2020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
研究分担者	平川 隆史  (Hirakawa Takashi)  (80375534)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授   (12301)	
研究分担者	中村 智子  (Nakamura Tomoko)  (40732681)	名古屋大学・医学部附属病院・講師   (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	ガニエバ ウミダ  (Ganiyeva Umida)		

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