

**An Integrated Genomic Approach Identifies HOXC8 as an Upstream Regulator in
Ovarian Endometrioma**

(ゲノム統合解析による卵巣チョコレート嚢胞の上流制御遺伝子としてのHOXC8の同定)

三原 由実子

山口大学大学院 情報解析医学系専攻 産婦人科学分野

令和3年1月

目次

【要旨】	3
【研究の背景と目的】	4
【方法】	5
【結果】	13
【考察】	23
【謝辞】	27
【参考文献】	28

【要旨】

（目的） 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（upstream regulators; URs）を同定する。

（方法） 我々は近年、transcriptome と遺伝子発現制御ネットワークを組み合わせ、細胞機能の URs を同定する解析（SMITE）を開発した。本研究では、①当研究室で明らかにした卵巣チョコレート嚢胞の間質細胞（ovESCs）および正所性の子宮内膜間質細胞（euESCs）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て SMITE を行った。②SMITE で同定された URs が妥当であることを確認するために、Boolean network simulation を行った。URs の異常な発現状態を正常化することで、ovESCs の遺伝子発現プロファイルを euESCs のプロファイルに復元できるかどうかをコンピュータを用いて simulation することで確認した。③同定された URs の機能を調べるため、同遺伝子を過剰発現する euESCs を樹立し、細胞機能と transcriptome の解析を行った。

（結果） SMITE により、12 遺伝子を卵巣チョコレート嚢胞の URs として同定した。Boolean network simulation により、これら 12 遺伝子すべてが URs として妥当であることを確認した。URs の一つである HOXC8 に着目した。HOXC8 を過剰発現させた euESCs（HOXC8-euESCs）では、細胞増殖、遊走、線維化能が有意に亢進した。HOXC8-euESCs の transcriptome では、TGF β シグナル経路の遺伝子の発現が有意に変化しており、また、同経路の活性化マーカーであるリン酸化 SMAD2/SMAD3 の発現が蛋白レベルで増加した。HOXC8 によって亢進した線維化能は、TGF β 受容体 I 型キナーゼの選択的阻害剤（E-616452）により有意に阻害された。HOXC8 が実際に ovESCs で発現が亢進していることを qRT-PCR で確認した。

（結論） ゲノム統合解析により卵巣チョコレート嚢胞の UR として HOXC8 を同定した。細胞増殖、遊走、および線維化を含む卵巣チョコレート嚢胞の特徴的な細胞機能は、HOXC8 及び HOXC8 によって活性化された TGF β シグナル経路により誘導された。

【研究の背景と目的】

子宮内膜症は生殖可能女性の約 10%が発症する、極めて頻度の高い女性特有の疾患である (1)。子宮内膜症病巣での所見の特徴は、細胞増殖、癒着、線維化である。これらの病態は月経困難症や慢性骨盤痛を引き起こし、また不妊症の原因となって女性の生涯における QOL を著しく低下させる。

子宮内膜症の特徴である細胞増殖、癒着、線維化には、TGF β シグナル経路の活性化や局所のエストラジオール産生の増加、エストロゲン受容体の異常発現が関連していることが、子宮内膜症の代表的病態である卵巣チョコレート嚢胞において報告されている (2-10)。また、当研究室ではゲノムワイドな遺伝子解析を行い、卵巣チョコレート嚢胞では数多くの遺伝子が発現異常をきたしていること、これらの遺伝子が種々の細胞機能やシグナル経路経路の異常を引き起こしていることを報告してきた (8)。これらの結果は、卵巣チョコレート嚢胞の病態を理解するためには極めて重要な研究報告であった。その一方で、その病態がどのように引き起こされているのか、即ち、その病態を引き起こす上流制御因子 (Upstream regulator; URs) が存在するののかについては不明なままであった。

これまで、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) (11) や direct reprogramming の研究 (12-14) により、URs が多くの下流遺伝子の発現を制御して細胞の機能に関与していることが示されてきた。また、URs の発現異常は、癌や肉腫を含む、多くの疾患の発症に関与することも報告されている (15-19)。当研究室は最近、子宮筋腫の発症における疾患の URs として、2つの遺伝子 (SATB2 と NRG1) を同定している (15)。そこで我々は、卵巣チョコレート嚢胞の進行においても URs が存在し、URs の発現異常が卵巣チョコレート嚢胞の発症に関与していると考えている。

近年、正常な細胞機能における URs や、疾患発症に関与する URs を特定するのに有用な、SMITE (Significance-based Modules Integrating the Transcriptome and Epigenome) という bioinformatics 手法が当研究室の前川らにより開発された (20)。SMITE 解析は、transcriptome やエピゲノムなどの網羅的データを、interactome と呼ばれる遺伝子間の発現制御や蛋白レベルでの相互作用のデータと組み合わせる解析手法である。

interactome は公的データベースで容易に入手することが可能である。SMITE は、網羅的発現データのみではなく、interactome と組み合わせる解析手法であり、正常細胞での種々の細胞機能や、疾患発症において鍵となる URs を同定することを可能とする。

本研究では、SMITE により卵巣チョコレート嚢胞の URs 候補を同定した。次に、同定された候補遺伝子が URs として妥当であるかについて、Boolean network simulation による検討を行った。本 simulation では、ovESCs の異常な遺伝子発現状態から、URs の発現状態のみを正常な状態に強制的に変化させた。そして、下流の遺伝子発現の変化をコンピュータ simulation により遷移させた。そして、simulation 後の全体の遺伝子発現状態が euESCs と同様の状態に復元されるかについて検討した。即ち、疾患の発現状態から URs 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復元できるかを調べることによって、同定された遺伝子が URs として妥当であるかについて検討した。そして、同定された遺伝子の一つに着目し、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かについて検討した。

【方法】

1. 倫理審査および承認

本研究は、山口大学大学院医学研究科の施設内倫理委員会によって承認を得て行った。サンプル収集前に、患者から書面によるインフォームドコンセントを得て行い、匿名化した。人間の組織の取り扱いを含むすべての実験は、ヘルシンキ宣言の信条に従って実施した。

2. 細胞培養

正所性子宮内膜組織は、子宮平滑筋腫で子宮全摘を行った患者で、かつ子宮内膜症に罹患していない 38~48 歳の 19 人の患者から採取した。子宮内膜に対する子宮筋腫の影響を最小限に抑えるため、粘膜下筋腫症例は除外した。卵巣チョコレート嚢胞は、卵巣チョコ

レート嚢胞を摘出する手術を受けた 33~49 歳の 16 人の患者から採取した (8, 9)。子宮内膜組織および卵巣チョコレート嚢胞組織を、phenol red 非添加の Dulbecco modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen, Paisley, UK) で洗浄し、1mm³未満の小片に断片化し、0.2%コラゲナーゼ (Sigma, St.Louis, MO, USA) で処理した後、70 μm ナイロンメッシュでろ過して間質細胞を分離した。ろ液を 3 回洗浄し、DMEM (Glutamax, 抗菌剤、10% FBS 加) と共に培養プレートへ入れ、37°C で培養した。本研究においては、間質細胞はすべて同様の条件で培養した。正所性子宮内膜および卵巣チョコレート嚢胞から採取した間質細胞は、それぞれ正所性子宮内膜間質細胞 (euESCs) および卵巣子宮内膜症由来間質細胞 (ovESCs) と定義した。

TGFβ シグナル経路を阻害するために、TGFβ 受容体 I 型キナーゼ (ALK5) の選択的阻害剤である E-616452 (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を用いた。細胞を 6 well plate 当たり 1×10^5 細胞の細胞密度で培養し、24 時間の培養の後、E-616452 10 μM を添加してさらに 48 時間培養した。

3. Gene transfection

細胞機能への HOXC8 の影響を検討するために、HOXC8 過剰発現 euESCs (HOXC8-euESCs) を樹立した。HOXC8 のコード配列を In-Fusion HD Cloning kit (TaKaRa, Ohtsu, Japan) により、pMXs レトロウイルス発現ベクター (Cell BIOLABS inc., San Diego, USA) のマルチクローニングサイトに挿入した。Mock コントロールとして、pMXs レトロウイルス発現ベクターを使用した。レトロウイルスを産生するために、Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用し、これらのベクターをパッケージングプラスミドとともに HEK293 細胞にコトランスフェクトした。トランスフェクションの 48 時間後にレトロウイルスの上清を回収した。ウイルスを含む上清を PEG-it Virus Precipitation Solution (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) で濃縮した。euESCs を 6 ウェルプレートに 1×10^5 細胞/well の密度で培養した後、24 時間後に濃縮したウイルスを、8μg/mL の最終濃度のポリブレン (Sigma) を含む培地に添加した。48 時間の

インキュベーション後、HOXC8 過剰発現ベクターおよび Mock ベクターを導入した細胞を、それぞれ HOXC8-euESCs および Mock-euESCs とし、その後の実験に使用した。

4. SMITE 解析

卵巣チョコレート嚢胞の URs 候補を同定するため、SMITE を R (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/SMITE.html>) にて実行した (20)。euESCs と ovESCs の transcriptome は以前の当研究室の研究で取得したデータを用いた (8) (Gene Expression Omnibus Web site, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, GSE47361)。interactome は、REACTOME データベース (<https://reactome.org/download-data>) (22) から functional interactions (FIs) を取得した。

FIs は遺伝子間の発現制御作用だけでなく、蛋白レベルでの相互作用のデータも含んでいる。FIs データの記述形式は「Gene1-Gene2, Annotation」である。例えば、「AR-AVP, expression regulates」は、AR が AVP の mRNA 発現を調節することを意味し、「A2M-PROC, Protein-protein relationship」は A2M がタンパク質レベルで PROC と相互作用することを意味している。また、「ADM-CALCRL, complex」は、ADM と CALCRL が共にタンパク質複合体を形成することを意味する。本研究では、「Annotation」が遺伝子発現制御 (4,004 遺伝子と 13,004 制御関係) の部分のみを抽出して interactome として解析に用いた。

SMITE において、はじめに、euESCs (n=3) と ovESCs (n=3) 間での遺伝子発現量の違いを、各遺伝子のスコアとして計算した (図 1A)。この遺伝子スコアは、両群間の p 値と発現量の倍数変化 (fold change) に基づいて算出される。また、遺伝子スコアは、ovESCs での発現が euESCs での発現よりも高いと正、低いと負となるように算出される。そのため、遺伝子スコアが 0 であれば両群間での発現量の差は無く、遺伝子スコアが正で高い場合は ovESCs で euESCs と比較して発現が高く、負で低い場合は ovESCs で euESCs と比較して発現が低いことを意味する。そして、得られた遺伝子スコアを interactome の各遺伝子に代入した (図 1A)。次に、遺伝子間の遺伝子発現制御関係の強さを求めるため、制御関係を有する、つまり制御関係で結ばれた 2 つの遺伝子の遺伝子スコアの絶対値を和して制

御関係のスコアとした。この計算により、interactome 中の全制御関係 (13,004 制御関係) の制御スコアを算出した。次に、スピングラスアルゴリズムにより、強い制御関係が密集した遺伝子群と、その中心となる遺伝子を同定した (図 1B)。同定された遺伝子群の中心となっている遺伝子を URs 候補として抽出した (23)。

5. Boolean network simulation

SMITE で抽出された遺伝子が、子宮内膜症病態に関わる URs として妥当であるかについて検討するため、Boolean network モデルを使用した遺伝子発現遷移 simulation 解析を施行した。本解析では SMITE 解析で使用した 4,004 遺伝子とそれら遺伝子間の 13,004 制御関係で構成される遺伝子発現制御ネットワーク (即ち interactome) を用いた。ovESCs における 4,004 遺伝子の異常な発現状態を開始状態とし、SMITE で同定された URs 候補遺伝子の発現を正常化することにより、euESCs に近づけることができるかを検討した。euESCs での発現状態に近づけることができれば、その URs 候補遺伝子は子宮内膜症病態の URs として妥当であると考えられる。Boolean network simulation では、遺伝子はノードと呼称し、遺伝子間の制御関係はエッジと呼称する。発現の制御関係には方向性があるため、エッジは有向性である。例えば、遺伝子 A (controlling gene) が遺伝子 B (controlled gene) の発現を制御している場合、エッジは A から B への方向性を有する。全てのノードは、有向エッジにより、単一もしくは複数のノードと接続している。

Boolean network simulation は、バイナリデータ (0 か 1 の何れかをとるという意味) に基づいて行われるため、ノードの状態は 0 または 1 のいずれかの状態を取る。つまり、これは遺伝子発現が On または Off の状態に相当する。一つの上位ノード (controlling gene) が一つの下位ノード (controlled gene) の発現を制御している場合、上位ノードの発現が 1 (on) になれば、下位ノードの発現も 1 (on) となり、逆に上位ノードの発現が 0 (off) になれば、下位ノードの発現も 0 (off) になる。一方、複数の上位ノードが一つの下位ノードを調節する場合、調節には 3 つの可能性がある。1 つ目は、上位ノードのうち 1 つでも 1 となれば、下位ノードも 1 となる場合であり、これは複数の controlling

gene のうちの一つでも活性化すれば controlled gene も活性化される場合に相当する。2 つ目は、下位ノードが 1 となるためには、複数ある上位ノードの全てが 1 となる必要がある場合である。これは、controlled gene の活性化には、全ての controlling gene の活性化が必要である場合に相当する。3 つ目は、上述した 2 つの制御が混合したタイプである。つまり、下位ノードを 1 にするためには、複数の上位ノードのうちのいくつかは 1 となる必要がある場合である。これは、controlled gene の活性化には、controlling gene 活性化のいくつかを組み合わせて活性化する必要がある場合に相当する。本研究で使用する interactome データには、遺伝子発現制御の方向性は含まれている。しかし、複数の上位遺伝子で制御される下位遺伝子について、上記 3 つのどのタイプの制御を受けているかについてのデータは含まれていない。そのため、Boolean network モデルを構築する際には、上記 3 タイプ全ての制御の可能性を考慮する必要がある。

Controlled gene、即ちノードは 4,004 存在し、それら間の制御であるエッジは 13,004 存在する。そのため、上述の 3 つの可能性全てを考慮して Boolean network を作成する場合、この 13,004 エッジ全てが単一もしくは組み合わせで作用している可能性を考慮する必要がある。その結果、構築される Boolean network の可能性は $2^{13,004}$ 通りとなる。言い換えれば、URs の発現を変化させる Boolean network simulation を行う場合、 $2^{13,004}$ 通りの Boolean network それぞれで simulation を行う必要がある。しかし、コンピュータリソースの制限の問題により、考慮される $2^{13,004}$ 全てで行うことは不可能である。そのため、これらのうち 10,000 通りのネットワークを無作為に抽出し、URs の発現を変化させる simulation を実行した。尚、10,000 通りの解析で問題ないかを検討するため、1,000、2,000、3,000、4,000 通りと、1,000 通り毎に 10,000 通りまでのネットワークで解析を行ったところ、5,000 通りを超えてからは、simulation の結果に変化は見られなかった。そのため、10,000 通りの解析は simulation 結果を解釈するのに十分であると判断した。

euESCs および ovESCs の遺伝子発現レベルは、R Bool Net パッケージの「binarize Time Series」関数を使用して、バイナリデータ (1 または 0) に変換した (24)。次に、遺伝子のバイナリ発現状態を、Boolean network モデルのそれぞれのノード (即ち遺伝子) に代

入した。各ノードの 1 (on) は遺伝子が発現している状態を意味し、0 (off) は発現していない状態を意味する。時間 t におけるネットワークでのノードの状態を g とすると、時間 $t+1$ におけるネットワークでのノードの状態 $g+1$ は、時間 t での上位ノードの状態とノード間の有向エッジによって決定される。例えば、上位ノードから下位ノードへ有向エッジが存在する場合を考える。時間 t での上位ノードが 1、下位ノードが 0 である場合、時間 $t+1$ では下位ノードは 1 に変化する。このように、時間 t を更に進め、 $t+2$ 、 $t+3$ とネットワーク全体を遷移させていき、ノードの値が変化しなくなる状態まで simulation する。このノードの値が変化しなくなった状態を収束と呼ぶ。

本 simulation では、ovESCs の遺伝子の発現状態を初期状態とし、この状態から URs 候補の発現を 1 つずつ、あるいは組み合わせで正常化させ、全遺伝子の発現状態を収束に至るまで遷移させた。例えば、URs 候補の 1 つを例にとると、その UR の発現状態が ovESCs で 0 の場合、euESCs と同じ 1 に変えて (つまり正常化させて)、ネットワークを収束に至るまで遷移させた。複数の URs 候補 (n) が存在する場合は、URs 候補の 1 から n 個までの全ての組み合わせで発現を正常化させて simulation を行った。

ovESCs の発現状態を初期状態として simulation した結果得られた発現状態 (q) と、euESCs の遺伝子発現状態 (p) を比較し、URs の発現を正常化させることによって q が p に近づけることができたかについて検討した。 q と p の類似性については、 q と p の各ノードの発現状態 (0 または 1) の差を 2 乗して合算するユークリッド距離によって評価した (図 2B および C)。ユークリッド距離が小さいことは、ovESCs の発現状態を euESCs の発現状態に近づけることができたことを意味する。即ち、URs 候補が ovESCs の発現状態を正常化するのに重要であることを示しており、URs として妥当であることを意味する。

6. 定量的 RT-PCR

組織・細胞から Isogen (Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan) を用いて total RNA の抽出を行った。Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて RT 反応 (25) を行い、Real-time qPCR を施行して mRNA 発現量を定量

した (21)。Real-time qPCRはLightCycler (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) を使用した。

7. Western blotting

当研究室で実績のある (15) Western blotting による蛋白定量を行った。細胞から蛋白質を抽出し、SDS-PAGEを行い、メンブレンに転写した。その後、以下の抗体で抗原抗体反応を行った。HOXC8 抗体 (Research Resource Identifier [RRID]: AB_1925078; cat. #ab86236, Abcam, Cambridge, UK) (26)、SMAD2/3 抗体 (RRID: AB_10698742; cat. #3102, Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan) (27)、リン酸化 SMAD2/3 (RRID: AB_2631089; cat. #8828, Cell Signaling Technology) (28)、 β -tubulin 抗体 (RRID: AB_477577; cat. #T4026, Sigma-Aldrich Japan K.K.) (29)。Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent と hyperfilm-ECL (GE health care UK Ltd. Buckinghamshire, UK) を用いてバンドの検出を行った。

8. 細胞増殖アッセイ

当研究室で実績のある (30) 細胞増殖アッセイを行った。HOXC8-euESC および Mock-euESC を、6 ウェル培養プレートに 1.0×10^5 細胞/ウェルの密度で培養した後、24、48、72、および 96 時間後にトリプシン処理し、Vi-CELL XR (Beckman Coulter, Tokyo, Japan) で細胞数をカウントした。

9. 細胞遊走アッセイ

細胞遊走アッセイは、BioCoat Matrigel Invasion Chamber (cat. No. 354480; Corning Life Sciences Inc. Tewksbury, MA, USA) を使用して、これまでに報告されたプロトコルに従って行った (31)。細胞 (HOXC8-euESCs および Mock-euESCs) をトリプシン処理し、無血清培地中の 4.0×10^5 個の細胞を上部インサートチャンバー内に入れ、下部チャンバーには、10%FBS を含む 750 μ L の培地を入れた。20 時間のインキュベーション後、上部チャ

ンバー膜の上面の細胞を完全に除去した。メンブレンを固定し、Diff-Quick (cat. no. 24606 500; Sysmex, Kobe, Japan) で膜の下面の細胞を染色した。膜の下面の細胞は、4つの領域に分け、それぞれについて視野をランダムに選択して 200 倍の倍率で細胞数をカウントした。

10. 創傷治癒アッセイ

細胞 (HOXC8-euESCs および Mock-euESCs) は、100%コンフルエントに達するまで 6 ウェルプレートで培養し、1000 μ L の滅菌ピペットチップを使用して、各ウェルの中央に線状のスクラッチを入れた。36 時間後、同視野でスクラッチを観察し、創傷部の面積を測定し、スクラッチ直後の面積と比較して創傷治癒の程度を算出した (31)。

11. コラーゲンゲル収縮アッセイ

当科で施行実績のあるコラーゲンゲル収縮アッセイ (32) で、コラーゲンゲル収縮能を検討した。I 型コラーゲンを含む溶液と 2.0×10^5 個の細胞を混和し、5%BSA でコーティングした 96well plate に 100 μ L ずつ入れた。37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした後、50 μ L の DMEM 培地を各 well に添加し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。コラーゲンゲルの収縮性は [(ウェル面積 - ゲル表面積) / ウェル面積] により収縮面積を計算することによって評価した。

12. transcriptome 解析

HOXC8-euESCs および Mock-euESCs の transcriptome を、当研究室が過去に行った方法と同じ手法により調べた (8)。細胞からの total RNA 抽出は RNeasy ミニキット (QIAGEN) を使用して行い、マイクロアレイは GeneChip Human Genome 1.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) を使用した。

13. バイオインフォマティクス

GO (gene ontology) および KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway

解析には DAVID Bioinformatics Resources v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) を用いた。発現異常を認めた遺伝子群を同解析に投入した。p<0.05 (KEGG pathway) および adjusted p (Benjamini) <0.01 (GO) を有意判定のカットオフとした。

14. 統計学的処理

mRNA 発現レベル、細胞増殖アッセイ、細胞遊走アッセイにおける細胞及び創傷治癒アッセイやコラーゲンゲル収縮アッセイにおける面積の比較は、R バージョン 3.6.0 を使用し、unpaired *t*-test で解析した。P<0.05 を有意差ありとした。

15. 解析プラットフォーム

本研究では Intel (R) Xeon (R) CPU E5-2667 v4、3.20GHz (x4 CPUs, 8 cores/CPU)、504GB RAM、CentOS (release 6.10) を使用した。

【結果】

1. SMITE 解析による URs の抽出

卵巣チョコレート嚢胞の病態に関与する URs 候補遺伝子を SMITE により抽出した (図 1A および B)。SMITE では 34 個の URs 候補が抽出された (34)。これら 34 個の URs 候補のうち、euESCs と ovESCs 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 URs 候補として同定した (表 1)。

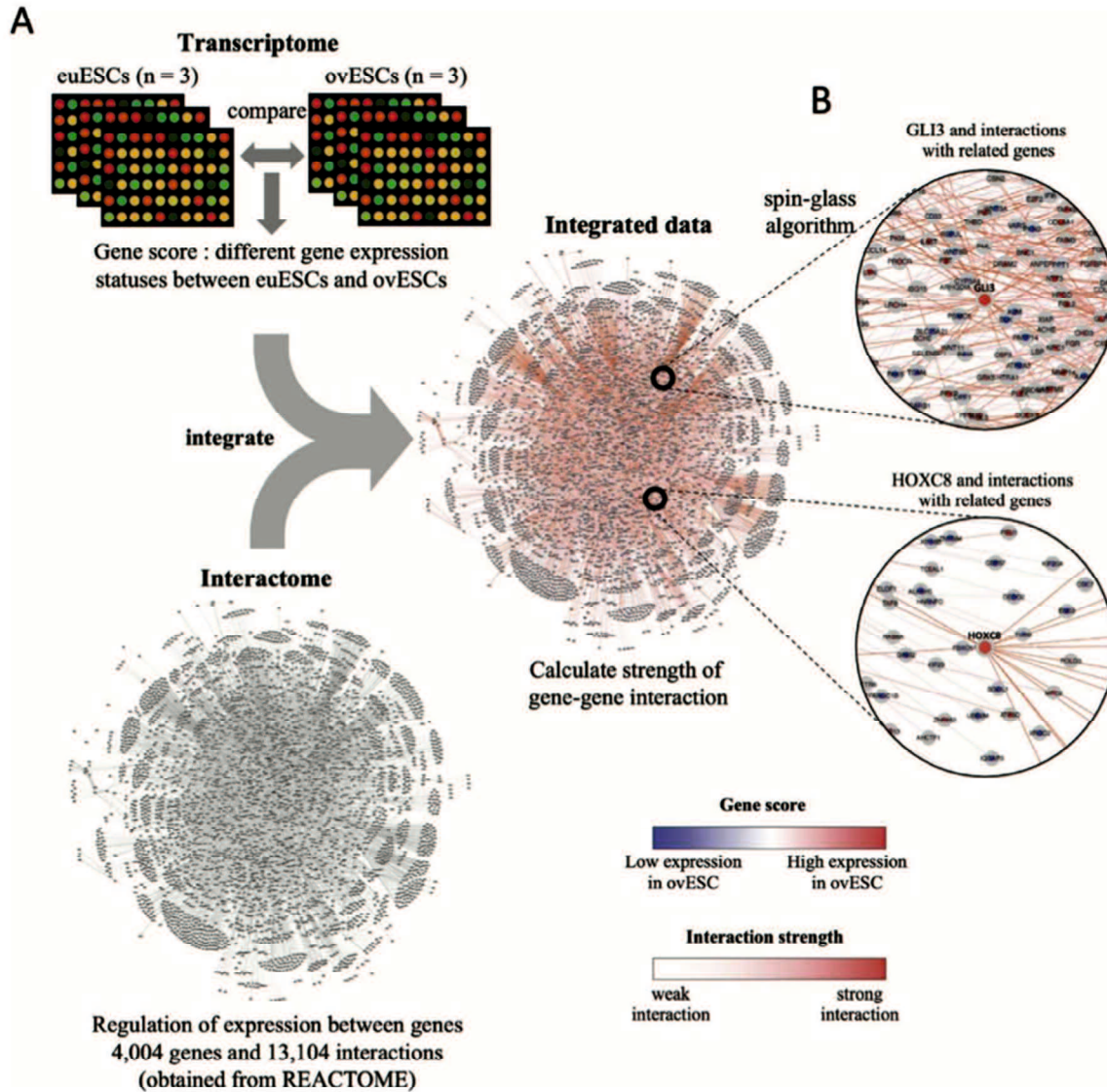


図 1. SMITE 解析 (A) transcriptome と interactome の統合。各遺伝子のスコア (gene score) は、SMITE により euESCs と ovESCs の間の発現状態の P 値と fold change により算出される。遺伝子間の制御関係の強さ (interaction strength) は、発現制御が結ぶ両端の 2 つの遺伝子のスコアの絶対値を合計して算出される。(B) スピングラスアルゴリズムによる URs の同定。SMITE 解析で抽出された UR 候補の 2 つの遺伝子を示している。遺伝子は dot で示し、制御関係は dot を繋ぐ line として示している。遺伝子 (dot) と制御関係 (line) の色の濃さは、それぞれ遺伝子スコアと制御関係の強さを示している。

表 1. SMITE 解析で同定された卵巣チョコレート嚢胞の URs 候補

	Mean expression level (log2)		P value (Student <i>t</i> -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.

2. Boolean network simulation

卵巣チョコレート嚢胞が複数の URs の異常な発現によって引き起こされていると仮定すると、これら URs の発現状態が正常化されれば、卵巣チョコレート嚢胞における異常な遺伝子発現状態が、正常な正所性子宮内膜の発現状態に戻ると考えることができる。そこで、URs 候補が卵巣チョコレート嚢胞の URs として妥当であるかについて検討するため、Boolean network を用いた simulation を行った。本解析では、卵巣チョコレート嚢胞 (ovESCs) の異常な遺伝子発現状態を開始点として、URs の遺伝子発現状態を強制的に正常化させて、全体の遺伝子発現状態を収束に至るまで遷移させ、全体の発現状態が正所性子宮内膜 (euESCs) の発現状態に復元できるかを検討した。

SMITE により URs 候補として 12 遺伝子を同定したため、URs の過剰発現変化の組み合わせは 4,095 通り存在する (図 2A 参照)。また、前述のランダムに作成した 10,000 の Boolean network (方法論を参照) を用いるため、合計で 4,095 万の simulation を実行した (図 2B)。simulation で収束に至った発現状態 (q) について、euESCs の発現状態 (p) と類似しているかについて、ユークリッド距離で評価した (方法論を参照)。4,095 万のユークリッド距

離のヒストグラムを図 2B に示す。ユークリッド距離が小さいほど、 q と p の遺伝子発現状態が類似していると考えられる。そこで、まず 4,095 万の q のユークリッド距離のうち、上位 0.01% に含まれる 4,095 の simulation 結果を選出した (図 2C)。それらの simulation で使用した URs 候補の頻度を累積評価した。その結果、12 の URs 候補全てが上位 0.01% の simulation 結果に含まれていることがわかった (図 2D)。つまり、SMITE 解析で抽出された 12 個の遺伝子すべてが URs として妥当であることが確認された。特に、9 つの URs (NR3C2、BLI3、MAPK8、HOXA10A、HOXC8、CEBPD、HOXA9、ETS2、および PRDM1) は、他の UR よりも頻度が高く、より重要な URs であると考えられた (図 2D)。

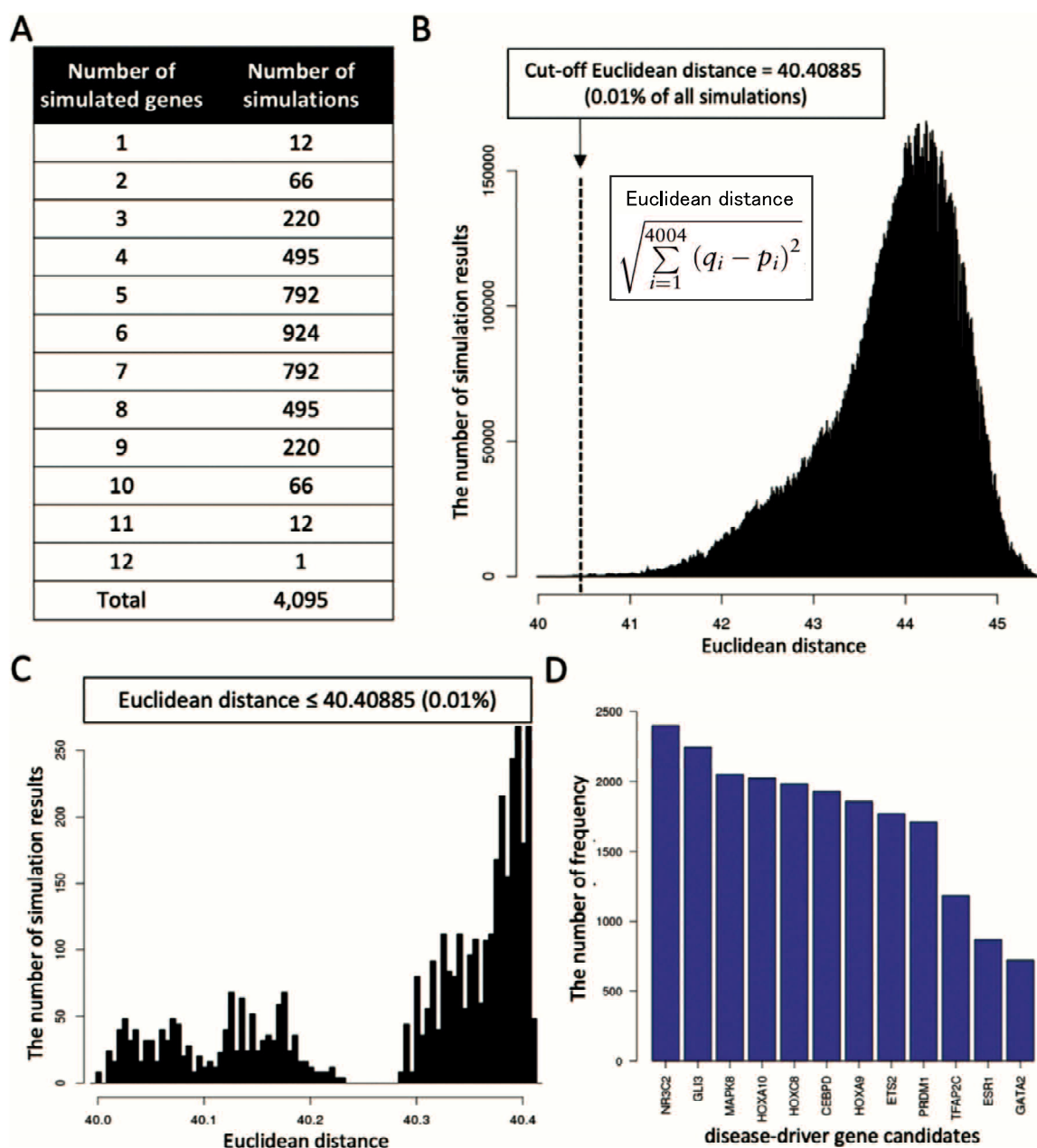


図 2. Boolean network simulation (A) 発現変化させた遺伝子数 (左の列)。UR 候補は 12 遺伝子あるため、simulation の数は変化させた遺伝子数により異なる (右の列)。(B) simulation 結果のユークリッド距離のヒストグラム。simulation は、4,095 通り/ネットワークを 10,000 ネットワークで行ったため、4,095 万の結果がプロットされている。ユークリッド距離がより短い上位 4,095 個 (0.01%) の simulation 結果を選択した。横軸はユークリッド距離であり、縦軸は該当するユークリッド距離を呈した simulation 結果の頻度である。(C) 選出された上位 4,095 結果のユークリッド距離のヒストグラム。(D) 上位 4,095 結果での UR 候補遺伝子の頻度のヒストグラム。

3. 卵巣チョコレート嚢胞では HOXC8 発現は上昇している

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 (35)。主に胚発生に関連することが報告されている (36)。近年、HOXC8 は、癌や肉腫の細胞増殖を活性化することにより、腫瘍形成や転移に関与していることが報告されている (37-43)。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 (44、45)。そこで我々は、HOXC8 が卵巣チョコレート嚢胞の URs 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があると考えた。

卵巣チョコレート嚢胞において HOXC8 発現が上昇しているかについて、euESCs および ovESCs での定量的 RT-PCR、および Western blotting によって検討した。HOXC8 の mRNA の発現とタンパク質の発現レベルが euESCs と比較して ovESCs で有意に高いことを確認した (図 3)。

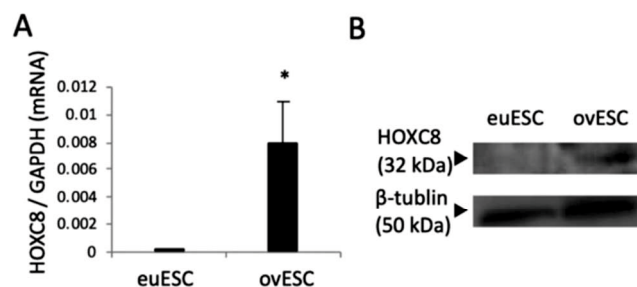


図 3. euESCs および ovESCs における HOXC8 mRNA およびタンパク質の発現 (A) 定量的 RT-PCR 法で mRNA レベルを検討した。内部コントロール遺伝子として GAPDH を用いて補正した。値は mean ± SEM (n=5) で示す。*p<0.05。(B) Western blotting によって蛋白質レベルを検討した。内部コントロールとして β-tubulin を用いた。

4. HOXC8 過剰発現 euESCs における増殖、遊走、および線維化能の検討

HOXC8 が euESCs の増殖および遊走能を増加させるか検討するために、HOXC8 過剰発現子宮内膜間質細胞 (HOXC8-euESCs) を作成した。同細胞における HOXC8 の過剰発現は、Western blotting によって確認した (図 4A)。細胞増殖アッセイにおいて、HOXC8-euESCs の細胞数は、48、72、および 96 時間で Mock-euESCs よりも有意に多かった (図 4B)。細胞遊走アッセイにおいて、HOXC8-euESCs では Mock-euESCs と比較して有意に遊走細胞数が多かった (図 4C)。創傷治癒アッセイにおいて、HOXC8-euESCs では Mock-euESCs と比較して有意に創傷部面積の減少率が高かった (図 4D)。コラーゲンゲル収縮アッセイにおいて、HOXC8-euESCs では Mock-euESCs と比較してコラーゲンゲル収縮率が有意に高かった (図 4E)。

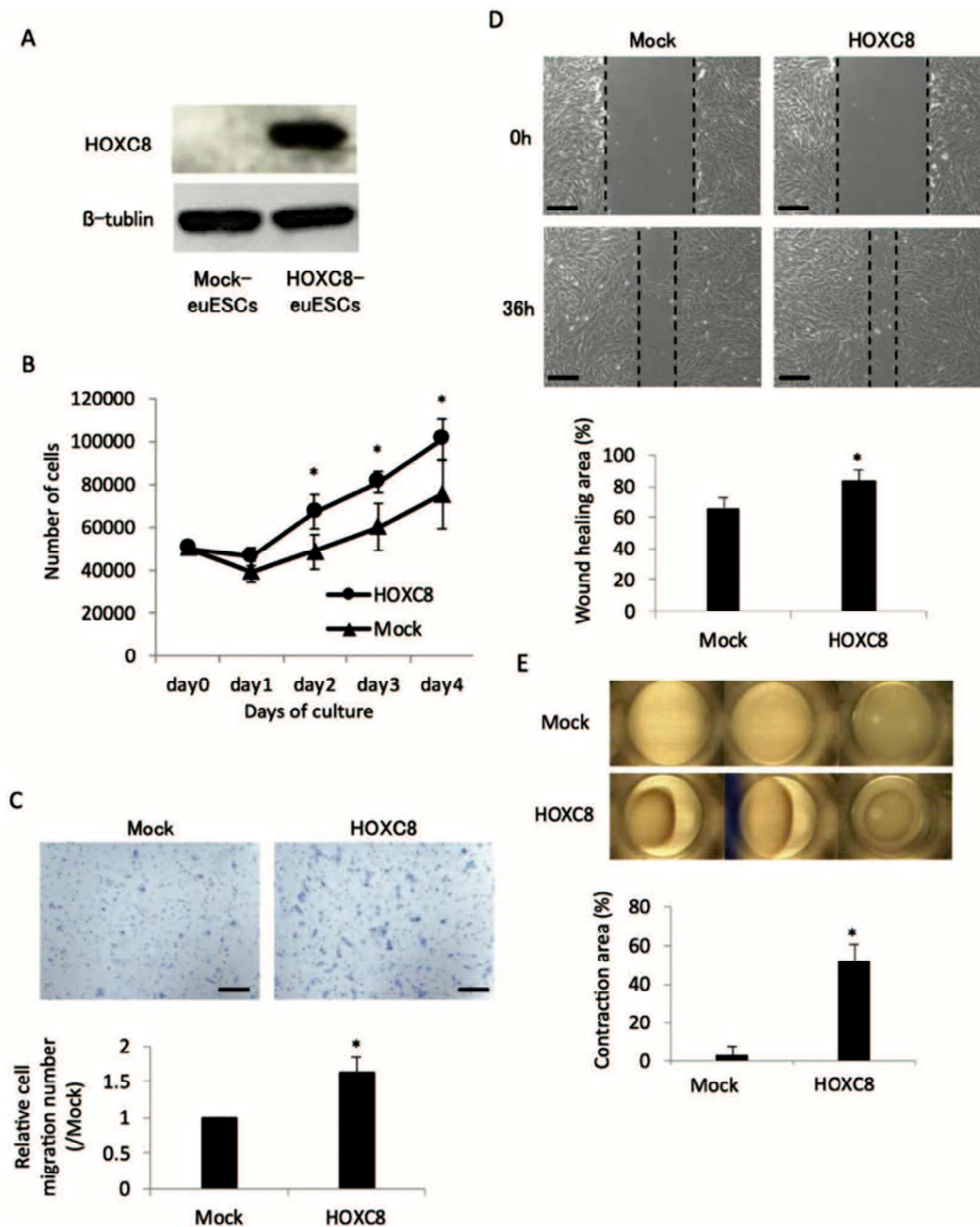


図 4. HOXC8 過剰発現による細胞増殖、遊走、および線維化能 (A) Mock-euESCs および HOXC8-euESCs における HOXC8 の Western blotting によるタンパク量の検討。内部コントロールとして β -tubulin を用いた。(B) Mock-euESCs および HOXC8-euESCs における細胞増殖能の検討。細胞数は、24 時間、48 時間、72 時間、および 96 時間でカウントした。(C) Mock-euESCs および HOXC8-euESCs における細胞遊走能の検討。5 つのランダム化されたフィールドで遊走した細胞数をカウントした。倍率 $\times 200$ (D) Mock-euESCs および HOXC8-euESCs における創傷治癒能の検討。(下)細胞が移動・増殖した面積をスクラッチした元面積で除して評価した。(E) Mock-euESCs および HOXC8-euESCs におけるコラーゲンゲル収縮能の検討。(下) コラーゲンゲルの培養開始から 24 時間後に撮影し、収縮面積を以下のように計算してコラーゲンゲルの収縮率を評価した：(ウェル面積-ゲル表面積) / ウェル面積。A-E 全ての実験は $n=3$ で行い、 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ で示している。* $p < 0.05$ 。

5. HOXC8-ESCs の transcriptome

HOXC8 を過剰発現させた euESCs (HOXC8-euESCs) について 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 が同定された変化した (表 2)。我々はこれまでに、euESCs と ovESCs の transcriptome 解析により、euESCs と比較して ovESCs では 795 遺伝子 (増加 414 遺伝子、低下 381 遺伝子) が異常をきたしていることを明らかにしており、これら遺伝子の GO 解析で 56 の GO を同定している (48)。そこで HOXC8-euESCs で同定された 47 の GO term と ovESCs で同定された 56 の GO terms を比較したところ、卵巣チョコレート嚢胞で特徴的な細胞増殖 (PDGFA、IGF1R、FGF2、SOX9、TGFB2、TGFB1、NTRK2、LAMC2 など)、細胞遊走 (CXCL16、NTF3、FERMT1、AJAP1、SIRPA、HES1 など)、細胞接着 (CDH2、CCL2、POSTN、NRP2、ADAM12 など)、および細胞外マトリックス (COL18A1、COL6A2、FBN1、CXXM など) など、12 の term が共通していることがわかった (表 2; common と表示)。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。

一方、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 (表 3)。GO 解析と同様に、ovESCs で異常発現の 795 遺伝子で同定された 26 の pathway と比較したところ、TGF β シグナル経路を含む 6 の pathway が共通していた (表 3; common と表示)。

表 2. HOXC8-euESCs で発現上昇した 279 遺伝子と発現低下した 303 遺伝子の Gene Ontology 解析

Category	GO ID	Term	Gene count	adjusted P value (Benjamini)	Common with ovESCs ^a
Biophysical process					
	GO:0007067	mitotic nuclear division	30	4.33×10^{-6}	—
	GO:0051301	cell division	35	1.10×10^{-5}	—
	GO:0007059	chromosome segregation	14	1.73×10^{-4}	—
	GO:0030335	positive regulation of cell migration	22	2.98×10^{-4}	common
	GO:0008284	positive regulation of cell proliferation	37	4.30×10^{-4}	common
	GO:0007062	sister chromatid cohesion	16	4.91×10^{-4}	—
	GO:0014068	positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling	12	0.002276617	—
	GO:0051310	metaphase plate congression	6	0.007217149	—
	GO:0071456	cellular response to hypoxia	13	0.013072782	—
	GO:0007018	microtubule-based movement	12	0.013557795	—
	GO:0060045	positive regulation of cardiac muscle cell proliferation	7	0.014802165	—
	GO:0007155	cell adhesion	32	0.016467442	common
	GO:0050919	negative chemotaxis	8	0.017006301	—
	GO:0043406	positive regulation of MAP kinase activity	10	0.018593136	—
	GO:0016477	cell migration	17	0.0213243	—
	GO:0072012	glomerulus vasculature development	4	0.022634927	—
	GO:0007080	mitotic metaphase plate congression	8	0.022845576	—
	GO:0051726	regulation of cell cycle	14	0.024567858	—
	GO:0042060	wound healing	11	0.031204718	—
	GO:0048008	platelet-derived growth factor receptor signaling pathway	7	0.033103842	—
	GO:0007165	signal transduction	60	0.033648476	common
	GO:0001666	response to hypoxia	16	0.049599077	common
	GO:0097150	neuronal stem cell population maintenance	6	0.049753402	—
Molecular function					
	GO:0019901	protein kinase binding	30	0.005346641	—
	GO:0005515	protein binding	320	0.009702511	—
	GO:0003777	microtubule motor activity	12	0.012967557	—
	GO:0008201	heparin binding	16	0.020951386	common
	GO:0008574	ATP-dependent microtubule motor activity, plus-end-directed	6	0.023035246	—
	GO:0017124	SH3 domain binding	13	0.039947329	—
Cellular component					
	GO:0005615	extracellular space	81	3.42E-06	common
	GO:0005578	proteinaceous extracellular matrix	26	1.76×10^{-4}	common
	GO:0005576	extracellular region	84	2.56×10^{-4}	common
	GO:0000775	chromosome, centromeric region	11	8.03×10^{-4}	—
	GO:0009986	cell surface	37	0.001042007	common
	GO:0005871	kinesin complex	10	0.001990744	—
	GO:0030496	midbody	15	0.002447352	—
	GO:0005819	spindle	14	0.004415395	—
	GO:0005887	integral component of plasma membrane	68	0.011618187	common
	GO:0031012	extracellular matrix	22	0.013675544	common
	GO:0000922	spindle pole	12	0.018751872	—
	GO:0016324	apical plasma membrane	21	0.023118257	—
	GO:0000776	kinetochore	10	0.024964969	—
	GO:0030018	Z disc	12	0.028548059	—
	GO:0005829	cytosol	131	0.03530129	—
	GO:0000777	condensed chromosome kinetochore	10	0.035970183	—
	GO:0032591	dendritic spine membrane	4	0.047318441	—
	GO:0000786	nucleosome	10	0.048460796	—

^aovESCs indicates endometriotic stromal cells obtained from ovarian endometrioma.

表 3. HOXC8-euESCs で発現上昇した 279 遺伝子と発現低下した 303 遺伝子の KEGG pathway 解析

ID	Term	Gene count	P-value	Common with ovESCs ^d
hsa04068	FoxO signaling pathway	15	2.41×10^{-4}	—
hsa04110	Cell cycle	14	3.88×10^{-4}	—
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	20	4.43×10^{-4}	—
hsa05200	Pathways in cancer	26	0.002724277	common
hsa04114	Oocyte meiosis	11	0.004829147	—
hsa04914	Progesterone-mediated oocyte maturation	9	0.011116387	—
hsa05323	Rheumatoid arthritis	9	0.011868459	common
hsa04014	Ras signaling pathway	16	0.013173776	common
hsa05202	Transcriptional misregulation in cancer	13	0.015054845	—
hsa04010	MAPK signaling pathway	17	0.017342093	—
hsa04710	Circadian rhythm	5	0.022265802	—
hsa04350	TGF-beta signaling pathway	8	0.0278016	common
hsa05142	Chagas disease (American trypanosomiasis)	9	0.029564075	—
hsa04022	cGMP-PKG signaling pathway	12	0.03178309	common
hsa04610	Complement and coagulation cascades	7	0.033692294	common
hsa04380	Osteoclast differentiation	10	0.040815604	—
hsa05322	Systemic lupus erythematosus	10	0.046061943	—

^dovESCs indicates endometriotic stromal cells obtained from ovarian endometrioma.

6. TGFβ シグナル経路

TGFβ シグナル経路の異常は、子宮内膜間質細胞の細胞増殖、接着、浸潤活性を促進することが報告されている (32、50、51)。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-euESCs 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、Mock-euESCs と比較して HOXC8-euESCs において高く (図 5A)、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となった。また、HOXC8 によるコラーゲンゲル収縮能の増加、即ち線維化能の亢進 (図 4E) 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 (図 5B および 5C)。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。

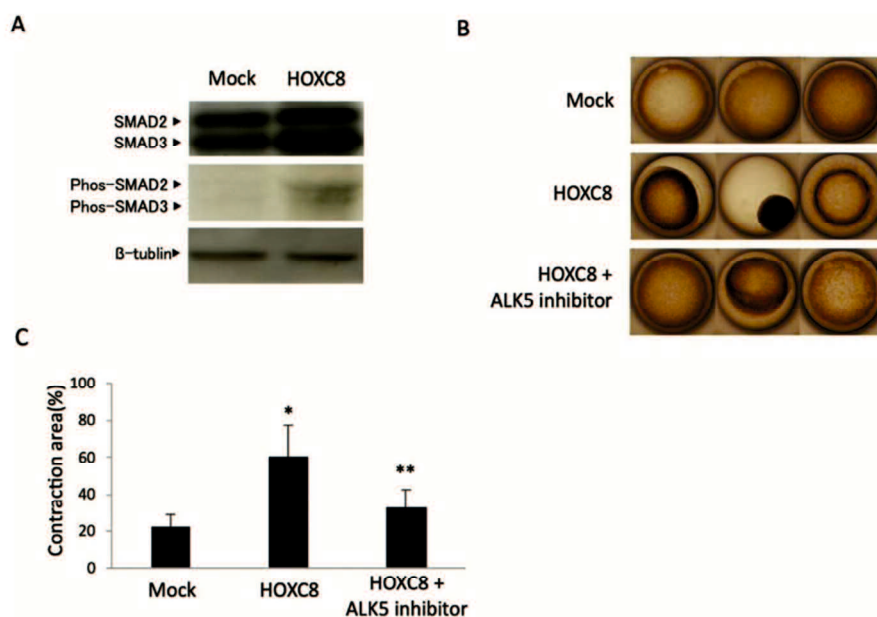


図 5. HOXC8 の過剰発現による TGFβ シグナル経路の活性化 (A) Mock-euESCs および HOXC8-euESCs における SMAD2/3 およびリン酸化 SMAD2/3 の Western blotting によるタンパク量の検討。内部コントロールとして β-tubulin を用いた。(B) TGFβ 受容体 I 型キナーゼの選択的阻害剤による HOXC8-euESCs のコラーゲンゲル収縮への影響の検討。(C) 収縮面積を図 4E と同様に計算した。Mock; Mock-euESCs, HOXC8; HOXC8-euESCs, ALK5 inhibitor; TGFβ 受容体 I 型キナーゼ選択的阻害剤 E-616452。* p<0.05 vs. Mock; ** p<0.05 vs. HOXC8。

【考察】

本研究は卵巣チョコレート嚢胞の病態における上流制御遺伝子 (UR) を同定した、世界で初めての報告である。これまで、卵巣チョコレート嚢胞と正所性子宮内膜の間で発現の異なる遺伝子を同定し、Gene ontology 解析や pathway 解析を行って、卵巣チョコレート嚢胞において異常に活性化された細胞機能やシグナル経路を特定した報告は、我々の報告を含めて複数存在する (2-9)。それらの研究は、卵巣チョコレート嚢胞で生じている病態を理解するには非常に有用であった。しかし、卵巣チョコレート嚢胞で生じている病態が何の因子によって引き起こされているのかを明らかにすることはできなかった。本研究では、SMITE を用いて卵巣チョコレート嚢胞で生じている病態で中心的な役割を果たす遺伝子の同定を行った。SMITE は、正常な細胞機能や疾病の病態において中心的な役割を果たす遺伝子を同定するバイオインフォマティクス手法であり、その開発には当研究室も参

画している (20)。

近年、疾患発症において鍵となる URs の同定を試みる研究が、特に癌の分野で進められている (16-19、52)。癌においては遺伝子変異が発症の鍵となると考えられており、URs としての遺伝子変異の発見が試みられている (16-19、52)。一方、卵巣チョコレート嚢胞では、遺伝子変異は悪性転化には関与するが、卵巣チョコレート嚢胞自体の発症や進展への関与は少ない (53)。そこで本研究で卵巣チョコレート嚢胞の URs を同定するに当たっては、遺伝子変異ではなく遺伝子発現に着目した。即ち、卵巣チョコレート嚢胞で異常に発現して下流の遺伝子発現に影響を与え、URs として疾患発症・進展において機能している遺伝子を同定することを目的とした。

卵巣チョコレート嚢胞における URs を同定するため、SMITE による解析を行った。SMITE では、網羅的遺伝子発現データと遺伝子制御ネットワークデータという 2 種類のビッグデータを統合する。遺伝子発現制御ネットワークデータなどのネットワークデータは interactome と呼ばれる。このようなネットワークデータは、これまでの数多の研究によって蓄積されてきた遺伝子間の相互作用やタンパク質間の相互作用を集積した知的財産であり、REACTOME、BioGRID、HPRD、MINT、STRING、MPIDB などの公的データベースに登録されている (22、54)。これらのネットワークデータ、即ち interactome は、無償で入手することができる。そして、transcriptome などの網羅的データと統合して解析に用いることが可能である。本研究では、REACTOME から入手した遺伝子調節ネットワークデータと、当研究室が有する網羅的発現データを統合し、卵巣チョコレート嚢胞の URs を同定した。本研究で用いた研究手法は、種々の研究、特に遺伝子変異よりも遺伝子発現が重要な良性疾患の研究において、広く応用することができる。

これまで、卵巣チョコレート嚢胞を除く種々の疾患において、発症に重要な URs が同定されてきた (16-19、52)。これらの研究では、URs 候補遺伝子が実際に細胞機能に影響するかを検討するために、候補遺伝子の発現を過剰発現もしくはノックダウンした細胞株を樹立して検討する必要があった。候補遺伝子が多い場合は、細胞株の樹立には多大な労力を要する。本研究では、数理モデルを用いたコンピュータ simulation を施行することによ

り、この労力を大幅に軽減した。SMITEにより URs として同定した 12 遺伝子が URs として妥当であるかを検討するため、Boolean network simulation を行った。この simulation では、12 遺伝子の異常な発現状態を正常化することで、卵巣チョコレート嚢胞の異常な遺伝子発現プロファイルを正常な子宮内膜の遺伝子発現プロファイルへシフトできるかを確認した。その結果、SMITE で同定した 12 遺伝子が URs として妥当であることを証明した。コンピュータsimulation を用いることにより、候補遺伝子を絞り込んだり、候補遺伝子の妥当性を検討するための労力を大幅に軽減することが可能である。近年のコンピュータsimulation 技術の発達は著しい。本手法は、多大な労力を余儀なくされてきた種々の疾患における URs 研究において、極めて有用な手法となると考えられる。

HOXC8 は軟骨の分化など、胚の発生や形態形成に重要な役割を果たすことが知られている (55)。一方、HOXC8 が発生段階だけでなく、線維芽細胞、骨格/平滑筋細胞、脂肪細胞などの成体の間葉系細胞などで発現していることが近年報告されている (35、36)。そしてそれらの細胞において HOXC8 は細胞増殖や接着、遊走に関与する遺伝子の発現を調節し、細胞の正常な機能の調節因子として機能していることが報告されている (35、36)。本研究において、卵巣チョコレート嚢胞の病態で中心的な役割を果たす URs として HOXC8 が同定された。更に、HOXC8 が細胞の増殖と遊走に関連する遺伝子を含む、多くの下流遺伝子の発現を制御し、細胞の増殖と遊走を実際に亢進させることが明らかとなった。また本研究において、HOXC8 はコラーゲンゲルの収縮能を亢進させた。コラーゲンゲルは細胞外基質に相当する。子宮内膜症間質細胞の細胞外基質収縮能の亢進は、卵巣チョコレート嚢胞の癒着形成に関与していることが報告されている (22)。本研究のHOXC8により細胞外基質収縮能が亢進した結果は、HOXC8 が子宮内膜症の特徴である癒着形成に関与することを示唆している (32)。実際に、transcriptome 解析では HOXC8 の過剰発現により細胞外基質との接着や細胞外基質形成に関連する遺伝子の発現が増加していた。これらの結果から、HOXC8 が細胞外基質産生と基質への接着を亢進させ、卵巣チョコレート嚢胞の主たる特徴である癒着や線維化を誘導していると考えられる。

これまでに、TGF β -SMAD 経路は子宮内膜症で活性化され (51)、子宮内膜細胞の増殖、遊

走、接着、浸潤に関与していることが報告されてきた (56-58)。さらに、TGF β の過剰発現は、ERK/MAPK シグナル経路を介して内膜症細胞の遊走や浸潤に関与していることが報告されている (50)。しかし、これまで、これらの経路がどのように活性化されるのかというメカニズムは不明であった。本研究により、HOXC8 が TGF β -SMAD シグナル経路を活性化していることが明らかとなった。HOXC8 が TGF β シグナル経路を活性化することにより乳癌細胞の増殖と遊走に関与していることが報告されている (37)。本研究結果及びこれまでの知見を鑑みると、細胞増殖、癒着、線維化 (2-9) などの卵巣チョコレート嚢胞の特徴は HOXC8 によって引き起こされていると考えられる。本研究は、HOXC8 が子宮内膜症の発症に重要な因子であることを初めて明らかにした。今後、HOXC8 は子宮内膜症の分子標的治療において有用な標的となる可能性がある。

化学物質などの我々の周囲に存在する環境要因が子宮内膜症の発症に関与していることがこれまでに報告されている (59-62)。化学物質は DNA のメチル化状態や遺伝子発現を変化させる。実際に、ビスフェノール A、塩化ビニル、およびトリクロサンは、動物 (63、64) およびヒト (65) で HOXC8 の発現を増加させる。さらに、マウスでの網羅的 DNA メチル化研究では、ビスフェノール A が HOXC8 遺伝子の DNA メチル化異常を引き起こすことが報告されている (66)。ビスフェノール A、塩化ビニル、トリクロサンは、現在も市販製品に広く使用されている。当研究室は最近、我が国での通常の社会生活において、我々人類が種々の化学物質に暴露されていることを報告した (67)。また我々は、実際に卵巣チョコレート嚢胞において、HOXC8 遺伝子の下流領域に DNA メチル化異常を呈する領域が存在することを見出している。(data not shown)。まだ、この DNA メチル化異常が卵巣チョコレート嚢胞での HOXC8 の発現異常に関与しているかについては不明である。しかし、環境要因を含む何らかの原因によって引き起こされた DNA メチル化異常が HOXC8 の発現上昇を引き起こし、卵巣チョコレート嚢胞の発症・進展に関与している可能性がある。

当研究室はこれまでに、子宮内膜症では、エストラジオール合成関連遺伝子 (StAR、NR5A1、STRA6、HSD17B2) の異常発現によってエストロゲンの局所産生が亢進していることを報告した (8)。本研究においては、HOXC8 を過剰発現させてもエストラジオール合成

関連遺伝子の発現は変化しなかった。この結果より、エストロゲンの局所産生亢進には HOXC8 は関与しておらず、別の要因によって引き起こされていることが考えられる。当研究室は、エストロゲンの局所産生亢進はエストラジオール合成関連遺伝子の DNA メチル化異常によって引き起こされていることを明らかにした (3, 8)。前述のように、我々は、子宮内膜症における HOXC8 の発現異常は、DNA メチル化によって引き起こされていると考えている。これらのことから、DNA メチル化は、URs (HOXC8 など) の発現異常を介して多数の下流遺伝子の発現を変化させる一方、エストロゲン局所産生亢進については URs を介さず直接的に複数のエストラジオール合成関連遺伝子の発現異常が引き起こされているものと考えられる。HOXC8 だけでは子宮内膜症の特徴全てを再現することはできない。複数の URs の異常な DNA メチル化や発現異常が子宮内膜症の発症に複合的に関与していると考えられる。

本研究では、SMITE および Boolean network simulation という手法によって卵巣チョコレート嚢胞の URs を同定した。URs の 1 つである HOXC8 は、多くの下流遺伝子の発現に関与しており、その一つとして TGF β シグナル経路を活性化させて卵巣チョコレート嚢胞の細胞増殖や遊走、線維化に関与していることが明らかとなった。一方、HOXC8 のみでは卵巣チョコレート嚢胞の特徴的所見の全てを再現できないことから、卵巣チョコレート嚢胞の病態には複数の URs の発現異常が複合的に作用している可能性がある。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 URs を同定することが可能となり、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、更に重要となる可能性がある。

【謝辞】

本研究は文部科学省の科学研究費 (19K09803、18K09262、20K18191、20K18168、18K09230、20K09645、19K22688、および20H03825)、山口大学病院のトランスレーショナルリサーチ助成金 2017、Takeda Science Foundation 2019 によって資金提供されて

いる。本論文は The Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2020, Vol. 105, No. 12, page1-16 に掲載された An Integrated Genomic Approach Identifies HOXC8 as an Upstream Regulator in Ovarian Endometrioma の和訳であり、学位論文として投稿することを許可されている。

【参考文献】

1. Rogers PA, D'Hooghe TM, Fazleabas A, et al. Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop. *Reprod Sci.* 2009;16(4):335-346.
2. Barjaste N, Shahhoseini M, Afsharian P, Sharifi-Zarchi A, Masoudi-Nejad A. Genome-wide DNA methylation profiling in ectopic and eutopic of endometrial tissues. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(8):1743-1752.
3. Bulun SE, Monsivais D, Kakinuma T, et al. Molecular biology of endometriosis: from aromatase to genomic abnormalities. *Semin Reprod Med.* 2015;33(3):220-224.
4. Dyson MT, Roqueiro D, Monsivais D, et al. Genome-wide DNA methylation analysis predicts an epigenetic switch for GATA factor expression in endometriosis. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004158.
5. Yotova I, Hsu E, Do C, et al. Epigenetic alterations affecting transcription factors and signaling pathways in stromal cells of endometriosis. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170859.
6. Naqvi H, Ilagan Y, Krikun G, Taylor HS. Altered genome-wide methylation in endometriosis. *Reprod Sci.* 2014;21(10):1237-1243.
7. Khan MA, Sengupta J, Mittal S, Ghosh D. Genome-wide expressions in autologous eutopic and ectopic endometrium of fertile women with endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012;10:84.
8. Yamagata Y, Nishino K, Takaki E, et al. Genome-wide DNA methylation profiling in cultured eutopic and ectopic endometrial stromal cells. *PLoS One.* 2014;9(1):e83612.
9. Yamagata Y, Takaki E, Shinagawa M, et al. Retinoic acid has the potential to suppress endometriosis development. *J Ovarian Res.* 2015;8:49.
10. Maekawa R, Mihara Y, Sato S, et al. Aberrant DNA methylation suppresses expression of estrogen receptor 1 (ESR1) in ovarian endometrioma. *J Ovarian Res.* 2019;12(1):14.
11. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-676.
12. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010;463(7284):1035-1041.
13. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell.* 2010;142(3):375-386.
14. Szabo E, Rampalli S, Risueño RM, et al. Direct conversion of human fibroblasts to

- multilineage blood progenitors. *Nature*. 2010;468(7323):521-526.
15. 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.
 16. Althubaiti S, Karwath A, Dallol A, et al. Ontology-based prediction of cancer driver genes. *Sci Rep*. 2019;9(1):17405.
 17. Liu SH, Shen PC, Chen CY, et al. DriverDBv3: a multi-omics database for cancer driver gene research. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D863-D870.
 18. Ma M, Wang C, Glicksberg BS, Schadt EE, Li SD, Chen R. Identify cancer driver genes through shared mendelian disease pathogenic variants and cancer somatic mutations. *Pac Symp Biocomput*. 2017;22:473-484.
 19. Song J, Peng W, Wang F, Wang J. Identifying driver genes involving gene dysregulated expression, tissue-specific expression and gene-gene network. *BMC Med Genomics*. 2019;12(Suppl 7):168.
 20. 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.
 21. Maekawa R, Mihara Y, Sato S, et al. Supplemental Table 1— Primer pairs used in the amplification of coding sequence of HOXC8 and quantitative real-time RT-PCR. *Dryad Digital Repository* 2019. Deposited May 25 2020. Doi: 10.5061/dryad. s4mw6m94g.
 22. Fabregat A, Jupe S, Matthews L, et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1): D649-D655.
 23. Reichardt J, Bornholdt S. Statistical mechanics of community detection. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2006;74(1 Pt 2):016110.
 24. Müssel C, Hopfensitz M, Kestler HA. BoolNet—an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics*. 2010;26(10):1378-1380.
 25. Maekawa R, Sato S, Yamagata Y, et al. Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. *PLoS One*. 2013;8(6):e66632.
 26. RRID:AB_1925078, https://antibodyregistry.org/search.php?q=AB_1925078.
 27. RRID:AB_10698742, https://antibodyregistry.org/search.php?q=AB_10698742.
 28. RRID:AB_2631089, https://antibodyregistry.org/search.php?q=AB_2631089.
 29. RRID: AB_477577, https://antibodyregistry.org/search?q=AB_477577.
 30. Nishimoto Y, Murakami A, Sato S, et al. Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes tumor growth via epithelial mesenchymal transition in uterine cervical squamous cell carcinomas. *Reprod Med Biol*. 2018;17(2):173-181.
 31. Kajimura T, Sato S, Murakami A, et al. Overexpression of carbonyl reductase 1 inhibits malignant behaviors and epithelial mesenchymal transition by suppressing TGF- β signaling in uterine leiomyosarcoma cells. *Oncol Lett*. 2019;18(2):1503-1512.
 32. Yuge A, Nasu K, Matsumoto H, Nishida M, Narahara H. Collagen gel contractility is

- enhanced in human endometriotic stromal cells: a possible mechanism underlying the pathogenesis of endometriosis-associated fibrosis. *Hum Reprod.* 2007;22(4):938-944.
33. Huang DW, Sherman BT, Tan Q, et al. DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W169-W175.
 34. Maekawa R, Mihara Y, Sato S, et al. Supplemental Table 2— Upstream regulatory genes identified by SMITE analysis. *Dryad Digital Repository* 2019. Deposited May 25 2020. Doi: 10.5061/dryad.s4mw6m94g
 35. Lei H, Wang H, Juan AH, Ruddle FH. The identification of Hoxc8 target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(7):2420-2424.
 36. Lei H, Juan AH, Kim MS, Ruddle FH. Identification of a Hoxc8- regulated transcriptional network in mouse embryo fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(27):10305-10309.
 37. Gong C, Zou J, Zhang M, et al. Upregulation of MGP by HOXC8 promotes the proliferation, migration, and EMT processes of triple-negative breast cancer. *Mol Carcinog.* 2019;58(10):1863-1875.
 38. Li Y, Chao F, Huang B, Liu D, Kim J, Huang S. HOXC8 promotes breast tumorigenesis by transcriptionally facilitating cadherin-11 expression. *Oncotarget.* 2014;5(9):2596-2607.
 39. Xu P, Zhang X, Ni W, et al. Upregulated HOXC8 expression is associated with poor prognosis and oxaliplatin resistance in hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci.* 2015;60(11):3351-3363.
 40. de Barros E Lima Bueno R, Ramão A, Pinheiro DG, et al. HOX genes: potential candidates for the progression of laryngeal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2016;37(11):15087-15096.
 41. Cheng L, Wei X, Zhao K, et al. The predictive potential and oncogenic effects of HOXC8 expression on osteosarcoma. *Tumour Biol.* 2016;37(11):14961-14967.
 42. Lu S, Liu R, Su M, et al. Overexpression of HOXC8 is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Reprod Sci.* 2016;23(7):944-954.
 43. Shah M, Cardenas R, Wang B, et al. HOXC8 regulates self-renewal, differentiation and transformation of breast cancer stem cells. *Mol Cancer.* 2017;16(1):38.
 44. Chui MH, Wang TL, Shih IM. Endometriosis: benign, malignant, or something in between? *Oncotarget.* 2017;8(45):78263-78264.
 45. Samani EN, Mamillapalli R, Li F, et al. Micrometastasis of endometriosis to distant organs in a murine model. *Oncotarget.* 2019;10(23):2282-2291.
 46. Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol.* 1994;124(4):401-404.
 47. Maekawa R, Mihara Y, Sato S, et al. Supplemental Table 3—279 upregulated and 303 downregulated genes in HOXC8-euESCs compared to Mock-euESCs. *Dryad Digital Repository* 2019. Deposited May 25 2020. Doi: 10.5061/dryad.s4mw6m94g.
 48. Maekawa R, Mihara Y, Sato S, et al. Supplemental Table 4— 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
49. Maekawa R, Mihara Y, Sato S, et al. Supplemental Table 5— KEGG pathway analysis in differentially expressed 795 genes (upregulated 414 and downregulated 381 genes) in ovESCs compared to euESCs. *Dryad Digital Repository* 2019. Deposited May 25 2020. Doi: 10.5061/dryad.s4mw6m94g
 50. Liu Z, Yi L, Du M, Gong G, Zhu Y. Overexpression of TGF- β enhances the migration and invasive ability of ectopic endometrial cells via ERK/MAPK signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2019;17(6):4457-4464.
 51. Shi LB, Zhou F, Zhu HY, et al. Transforming growth factor beta1 from endometriomas promotes fibrosis in surrounding ovarian tissues via Smad2/3 signaling. *Biol Reprod*. 2017;97(6):873-882.
 52. Darbyshire M, du Toit Z, Rogers MF, Gaunt TR, Campbell C. Estimating the frequency of single point driver mutations across common solid tumours. *Sci Rep*. 2019;9(1):13452.
 53. Bulun SE, Wan Y, Matei D. Epithelial mutations in endometriosis: link to ovarian cancer. *Endocrinology*. 2019;160(3):626-638.
 54. Calderón-González KG, Hernández-Monge J, Herrera- Aguirre ME, Luna-Arias JP. Bioinformatics tools for proteomics data interpretation. *Adv Exp Med Biol*. 2016;919: 281-341.
 55. Le Mouellic H, Lallemand Y, Brûlet P. Homeosis in the mouse induced by a null mutation in the Hox-3.1 gene. *Cell*. 1992;69(2):251-264.
 56. Sikora J, Smycz-Kubańska M, Mielczarek-Palacz A, Bednarek I, Kondera-Anasz Z. The involvement of multifunctional TGF- β and related cytokines in pathogenesis of endometriosis. *Immunol Lett*. 2018;201:31-37.
 57. Tani H, Sato Y, Ueda M, et al. Role of versican in the pathogenesis of peritoneal endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(11):4349-4356.
 58. Miyazaki Y, Horie A, Tani H, et al. Versican V1 in human endometrial epithelial cells promotes BeWo spheroid adhesion in vitro. *Reproduction*. 2019;157(1):53-64.
 59. Louis GM, Weiner JM, Whitcomb BW, et al. Environmental PCB exposure and risk of endometriosis. *Hum Reprod*. 2005;20(1):279-285.
 60. Porpora MG, Medda E, Abballe A, et al. Endometriosis and organochlorinated environmental pollutants: a case-control study on Italian women of reproductive age. *Environ Health Perspect*. 2009;117(7):1070-1075.
 61. Bruner-Tran KL, Ding T, Osteen KG. Dioxin and endometrial progesterone resistance. *Semin Reprod Med*. 2010;28(1):59-68.
 62. Parazzini F, Cipriani S, Bravi F, et al. A metaanalysis on alcohol consumption and risk of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;209(2):106 e101-110.
 63. Eun JW, Ryu SY, Noh JH, et al. Discriminating the molecular basis of hepatotoxicity

- using the large-scale characteristic molecular signatures of toxicants by expression profiling analysis. *Toxicology*. 2008;249(2-3):176-183.
64. Du G, Yu M, Wang L, et al. Transcriptome and DNA methylome dynamics during triclosan-induced cardiomyocyte differentiation toxicity. *Stem Cells Int*. 2018;2018:8608327.
 65. Calhoun KC, Padilla-Banks E, Jefferson WN, et al. Bisphenol A exposure alters developmental gene expression in the fetal rhesus macaque uterus. *PLoS One*. 2014; 9(1):e85894.
 66. Weinhouse C, Sartor MA, Faulk C, et al. Epigenome-wide DNA methylation analysis implicates neuronal and inflammatory signaling pathways in adult murine hepatic tumorigenesis following perinatal exposure to bisphenol A. *Environ Mol Mutagen*. 2016;57(6):435-446.
 67. Maekawa R, Ito R, Iwasaki Y, et al. Evidence of exposure to chemicals and heavy metals during pregnancy in Japanese women. *Reprod Med Biol*. 2017;16(4):337-348.