

博士論文

初代子宮内膜症上皮細胞、不死化子宮内膜症上皮細胞の
網羅的遺伝子解析による子宮内膜症の病態解明

中澤（鳥光）明里

目次

目次.....	1
要旨.....	2
序文.....	3
目的.....	16
方法.....	17
結果.....	33
考察.....	65
謝辞.....	75
引用文献.....	76
Supplemental Table.....	88

要旨

これまで子宮内膜症研究の殆どは子宮内膜症間質細胞または子宮内膜症組織より行われており、子宮内膜症上皮細胞の分離培養及び網羅的遺伝子解析の研究の報告はない。本研究では子宮内膜症上皮細胞の分離培養に初めて成功し、初代培養子宮内膜症上皮細胞から不死化細胞の樹立に成功した。また、子宮内膜症上皮細胞の網羅的遺伝子解析を行い、子宮内膜症間質細胞、正所性子宮内膜上皮細胞との比較を行うことで、子宮内膜症の新しい病態解明研究の基盤を構築し得た。

序文

子宮内膜症

子宮内膜症の定義は、子宮内膜に類似した組織が子宮以外の部位に発生する疾患である。組織学的には、子宮内膜様、上皮と間質、そしてそれを取り巻く線維化組織からなる[1]。良性疾患にも関わらず、内膜症組織は増殖、浸潤し、周囲臓器と癒着を形成する。好発部位は卵巣とダグラス窩であるが、その他にも肺や脳、皮膚といった腹腔外にも認められる。子宮内膜症は、慢性痛や月経痛等の疼痛を引き起こし、不妊症の原因になる。また、悪性転化することが報告されている[2][3]。近年では、内膜症を有する女性が妊娠した場合、子宮内膜症が妊娠予後に悪影響を及ぼすという報告もあり[4][5]、生殖年齢期から高齢期まで女性のライフスパン全期間において、QOLを大きく低下させる疾患である[6]。年々、子宮内膜症に罹患する女性は増加傾向にあり、本邦における患者数は約13万人とされ[2]、生殖年齢層女性の6-10%、骨盤痛を認める10代女性の50-60%、不妊症患者の50%に発症していると報告されている[1]。

子宮内膜症の病態生理

このように罹患率の高い疾患であるにも関わらず、子宮内膜症の組織発生についてはこれまで子宮内膜移植説、及び体腔上皮化生説等の仮説が提唱されるも、その発症機序は未だ解明されていない。子宮内膜移植説とは図 1 の通り、月経時に月経血が卵管を介して骨盤内に逆流し、月経血内に含まれる子宮内膜細胞が骨盤内に着床、浸潤、血管新生、線維化することで子宮内膜症病変が形成されるというものである[7] [8]。これに対して、体腔上皮化生説とは、図 2 に示す通り腹膜や卵巣の表層にある中皮細胞が子宮内膜に類似した組織に化生し、これが変異して子宮内膜症に至るという説である[9]。子宮内膜は Müller 管を起源として発生し、Müller 管と中皮細胞はともに胎生期体腔上皮に由来しているため、エストロゲン等の刺激によって中皮細胞が子宮内膜様組織に化生するという仮説が、体腔上皮化生説である。しかしながら、いずれの説も子宮内膜症発症のメカニズムを一元的に説明することは困難であり、子宮内膜症の発症機序においては未だ不明な点が多い。子宮内膜症に対する治療は、現状としてホルモン療法と手術療法がおこなわれているが、いずれも原因を除去する根本治療ではない。また妊娠を希望する女性に対しては、ホルモン治療が行えないことから、妊娠を望む女性でも使用できる治療の開発が求められている。

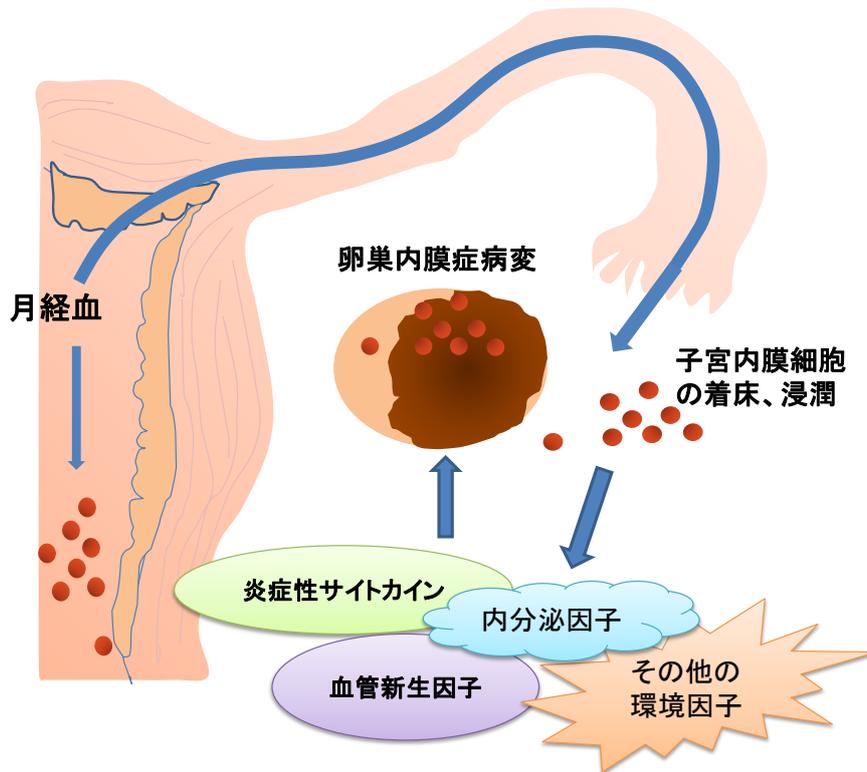


図 1. 子宮内膜症発症機序～逆流説～(Sampson JA. Boston Med Surge J.1927)

月経の最中、子宮内膜細胞を含む月経血は卵管を通り腹腔内に流入する。この逆流血中の子宮内膜細胞が卵巣や腹膜など子宮以外の組織に生着し、発育浸潤することで子宮内膜症病変が形成されるという説が Sampson の逆流説である。しかしながら、月経血が逆流するだけでは子宮内膜症は発症せず、炎症性サイトカイン、血管新生因子、内分泌的環境、その他の環境因子等の要因が関与、影響し、子宮内膜症が発症すると考えられている。

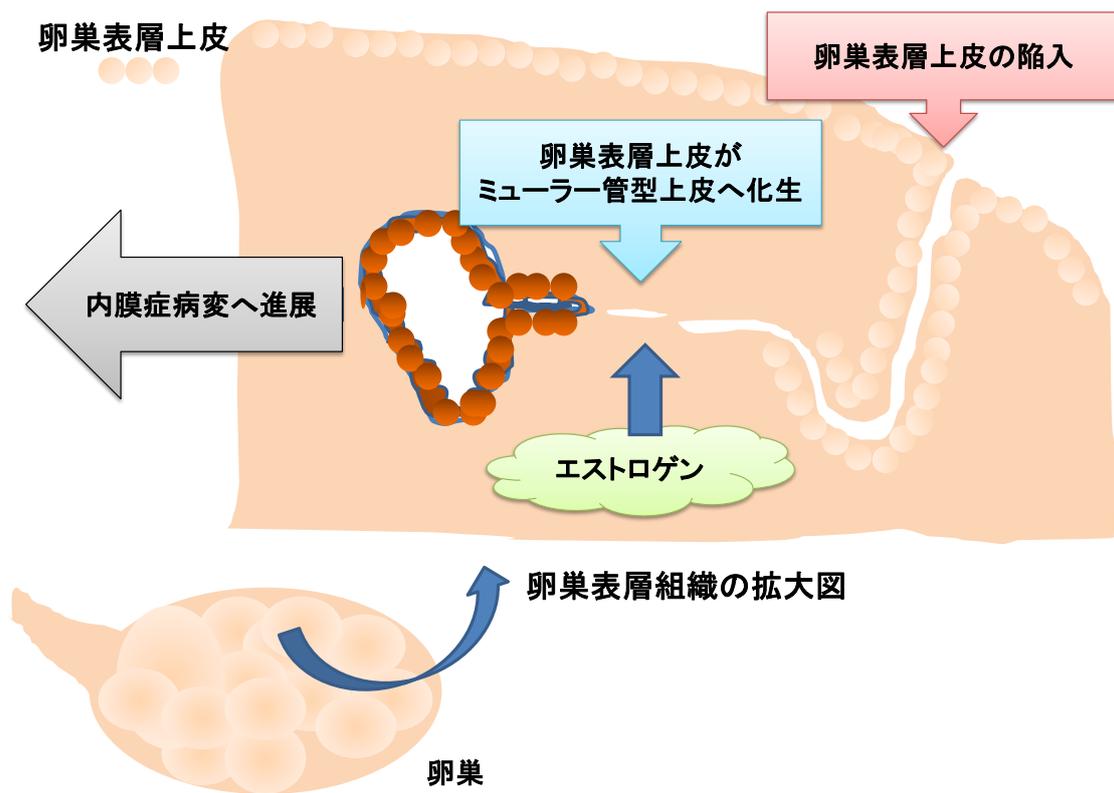


図 2. 子宮内膜症発症機序～化生説～(Lauchlan SC. Obstet Gynecol Surv. 1972)

化生説とは腹膜や卵巣嚢表層にある中皮細胞が子宮内膜に類似した組織に化生しこれが変異して子宮内膜症に至るとい説である。図は卵巣における子宮内膜症病変形成の仮説である。上記の模式図のように卵巣表皮細胞が卵巣実質内へ陥入し、陥入した表層上皮が子宮内膜様上皮に化生し、内膜症病変が形成される。化生説を裏付けるように、陥入した卵巣表層上皮に隣接するように子宮内膜類似細胞の存在が病理組織に確認、報告されている[10]。

これまでの子宮内膜症研究の問題点

当研究グループでは子宮内膜症の病態生理についてこれまで、いくつかの炎症性サイトカインや血管新生因子の発現が子宮内膜組織に高く、内膜症の進展、増悪に関与していることを示してきた[11][12]。これらの検討では、いずれもヒトの手術検体から分離培養された子宮内膜症間質細胞が用いられている。一方で、ホルモンレセプター[13]、血管新生因子[14]、炎症性サイトカイン[15]、ケモカインなどの内膜症の病態において重要な働きをもつ因子が子宮内膜症上皮細胞に高いことが報告されている。しかしながら、これまで子宮内膜症上皮細胞は研究材料として用いられてこなかった。その原因として、子宮内膜症の上皮細胞は単離が困難であり、かつ培養が極めて難しいことが挙げられる。手術検体から得られた組織病理切片でさえも、子宮内膜症上皮細胞は術中操作のために剥奪しやすく、少量の上皮細胞しか残存していない。こうした細胞の研究を行うためには、少量の上皮細胞から分離、初代培養に持ち込む方法についての研究が必要であり、研究に十分な期間、培養に耐えられるだけの子宮内膜症上皮細胞の実験ツールが必要である。子宮内膜症の研究においては、これまで用いられてきた子宮内膜症間質細胞のみの検討では不十分であり、子宮内膜症上皮細胞の単離と研究が必要である。

子宮内膜症と癌

子宮内膜症は良性の疾患でありながら、一定の頻度で悪性化することがこれまで様々な臨床研究により報告されてきた。中でも子宮内膜症性卵巣嚢胞の癌化に関する研究は多数行われ、その 0.5–1.0%が卵巣癌へ移行すると推定されている[16] [17]。本邦で行われた観察研究では Kobayashi らが子宮内膜症卵巣嚢胞 6,398 例の平均観察期間 9 年の追跡調査で 46 例(0.72%)の卵巣癌が発症していることを報告した[18]。これに対して子宮内膜症卵巣嚢胞を有さないコントロール患者 57,165 例からは 7 例(0.012%)の卵巣癌が発症したのみであった[18]。このように子宮内膜症卵巣嚢胞は卵巣癌のリスク因子であることが示唆され、現在では、閉経後でも癌へ転化する可能性がある疾患として取り扱われている。また、高齢者であるほど、並びに嚢胞が大きいほど子宮内膜症性卵巣嚢胞は癌に移行しやすいという報告がある[19] [20] [21]。そのため、我が国では「子宮内膜症取り扱い規約 第 2 部治療・診療編」において、「Endometrial cyst 合併卵巣癌に対するガイドライン」がまとめられており、症例が 40 歳以上で卵巣嚢胞径が 4cm 以上の場合、嚢胞の摘出が推奨されている[22]。

子宮内膜症卵巣嚢胞から発生する卵巣癌の組織型には、類内膜腺癌(35%)、明細胞腺癌(39%)が多いことが報告されている[23,24]。子宮内膜症が発症母地、あるいは前駆病変と推定されるこれら卵巣癌の一群を内膜症関連癌(EAOC;

endometriosis -associated ovarian cancer)と総称し、発癌のメカニズムへの研究が進められているが、癌化のプロセスは未だ不明な点が多い[25]。子宮内膜症性卵巣嚢胞の悪性化には(表 1)のような Sampson and Scott の診断基準があり[26] [27]、子宮内膜症と卵巣癌が共存する症例において、二つの病変の移行部を観察すると多様な程度の異型を示す内膜症上皮が観察されている[28]。異型内膜症が子宮内膜症から卵巣癌への移行病変である可能性が示唆されているが、確定的な証拠は未だ明らかではない。

このように子宮内膜症は良性疾患でありながら、悪性転化する可能性がある。しかしながら癌化のプロセスについては未だ不明な点が多い。子宮内膜症上皮細胞を用いた研究は、子宮内膜症の悪性転化に関する研究においても、有用であると考えられる。

Sampson and Scottの診断基準

腫瘍内に良性の子宮内膜症病変が存在すること
他の組織からの悪性腫瘍の侵潤がないこと
腺上皮の周囲に内膜の間質と類似した組織が存在すること
良性から悪性への移行像が認められること

表 1. Sampson and Scott による子宮内膜症性卵巣嚢胞の悪性化の診断基準

子宮内膜症の網羅的遺伝子解析

これまで内膜症には前述の逆流説及び化生説以外にも様々な仮説が報告され、それを裏付けるための遺伝子研究が進められてきた。その多くは子宮内膜症組織と正所性子宮内膜組織とを比較しその違いから原因遺伝子を模索するという方法が用いられている[29]。また近年では次世代シーケンスを用いた研究が報告されているが[30]、これらの解析はいずれも子宮内膜症の間質細胞、または子宮内膜症組織を用いた研究であり、子宮内膜症上皮細胞を用いた網羅的遺伝子解析は未だ行われていない。一方で、これまで用いられてきた子宮内膜症間質細胞を線維性間質細胞や卵巣間質細胞と鑑別することは難しく、解析に用いられる組織や細胞には子宮内膜症以外の間質細胞が混入している可能性が指摘されている[31]。そのため、子宮内膜症組織や子宮内膜症間質細胞を用いた網羅的遺伝子解析では、混入した子宮内膜症以外の間質細胞の影響を受けている可能性がある」と指摘する報告がある[31]。この点においても、子宮内膜症の本体である子宮内膜症上皮細胞をより高純度に分離培養し、解析の対象とすることが重要である。以上の現状にあたり、私は子宮内膜症上皮細胞の分離培養方法を開発すること、それらの分離培養細胞を用いて網羅的遺伝子解析を行うこと、そして子宮内膜症上皮にフォーカスした内膜症研究の基盤となりうる研究ツールを作成することを、本研究の目的とした。

研究材料としての不死化細胞の樹立

生体内の細胞を実験ツールとして用いるための方法として初代培養細胞の不死化がある[32]。細胞の不死化には E6,E7 などの癌遺伝子が用いられることが多いが、細胞調節因子である CyclinD1、CDK4R24C (CyclinD – dependent kinase 4 活性化型変異)、及び hTERT の遺伝子導入が有効という報告がある[33] [34]。CDK 及び CyclinD1 は細胞分裂の G1 期チェックポイントを制御している蛋白で、Cyclin は CDK に結合し複合体を作ることによって CDK を活性化させ細胞周期を分裂期へと移行させる [35]。細胞分裂は各段階のチェックポイントで種類の異なる CDK 及び Cyclin が作動しているが、その中でも G1 から S 期への移行を誘導する CyclinD1 と CDK4 を過剰発現させることが細胞老化を回避し、細胞の不死化に有用と報告されている[33,36]。また、hTERT とはテロメラーゼを構成する逆転写酵素で、hTERT 遺伝子の導入により、テロメアが延長し細胞は分裂回数の制限を免れる[37] [38]。E6 や E7 等の癌遺伝子を導入し不死化したヒト体細胞株は異なる分化能を持つこと、あるいは染色体不安定性を生じることが問題であった。そこで、これら CDK4、CyclinD1、及び hTERT の 3 遺伝子を導入することでヒト体細胞を癌化せずに不死化することが可能であると報告された[34]。この方法による不死化細胞の樹立は、気管上皮細胞、卵巣表層上皮細胞、角膜内皮細胞等の不死化に広く利用されており、樹立された不死化細胞は様々な研究の基

盤となっている[39] [40] [41]。

2012年 Bono らは CyclinD1、CDK4R24C、hTERT を用いて子宮内膜症上皮細胞の不死化細胞を作成した[42]。しかしながら、同研究においては子宮内膜症上皮細胞の初代培養は行っておらず、手術検体から得た子宮内膜症組織を細かく刻み、培養液中で分離された腺管組織に直接、不死化遺伝子を導入している。また、この不死化細胞は Cytokeratin 陽性であるも、子宮内膜及び子宮内膜症間質細胞に特異的なマーカーである CD10 陽性細胞である。形態学的所見としても繊維芽細胞様の形態を持っていることから、これらの樹立された不死化細胞においては子宮内膜症間質細胞の性質を併せ持つと考えられている。こうした状況において、本研究では子宮内膜症上皮細胞の分離培養を行い、Cytokeratin を含めた上皮マーカーの発現を持ち合わせていることを確認した上で網羅的遺伝子解析を行うこと、また分離培養に成功した初代培養子宮内膜症性上皮細胞を不死化することで内膜症上皮細胞研究の基盤を構築することを目的とした。

RNA シーケンス

RNA シーケンスは転写産物のシーケンス量から遺伝子の発現量を定量化し、同時にその配列から選択的スプライシングの検出や未知転写産物などの発見を行う技術である[43]。例えば、複数のサンプル間で発現の異なる遺伝子群を抽出することでフェノタイプに関連する転写ネットワークが同定できる。これまで、このような遺伝子発現解析はマイクロアレイで行われてきたが、近年ではRNA シーケンスを用いた網羅的遺伝子解析も多く利用されるようになってきた。RNA シーケンスでは遺伝子の配列情報が得られるため、マイクロアレイと比較し、アレル特異的な発現解析やスプライシング、そして融合遺伝子等の検出が可能である[44]。RNA シーケンスで読まれた転写産物の定量化には大きく分けて2つの方法が利用されている。ひとつはCAGE法などで用いられるデジタル遺伝子発現解析法で遺伝子の末端のみをシーケンス及びカウントする手法である。もう一つの定量方法としてPRKM (Reads Per Kilobase of exon per Million mapped-Sequence reads)やFPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped Sequence reads)という読まれたシーケンスのリード数を遺伝子の長さで補正したものがある。この方法は様々な部位のシーケンス情報を統合して遺伝子発現を定量化するため、一部の領域がシーケンスされなくてもほかの部位の転写量からおおよその遺伝子発現量を算定できる[43]。

PAX8

PAX8 とは Mullerian system、甲状腺、腎臓の胚発育及び、これらの臓器の腫瘍形成に関与する転写調節因子である[45]。正常組織では糸球体上皮細胞、子宮頸管/内膜上皮、卵管上皮、精巣上体上皮、甲状腺上皮などが陽性となる。Ozcanらの報告によると、子宮卵巣の上皮細胞にはほぼ 100%陽性となるが、間質細胞では陽性となる細胞は 0%と、上皮マーカーとして利用できるタンパクである[46]。また、同研究では卵巣子宮内膜症組織の検討も行われており、子宮内膜症上皮細胞は 100%陽性であったと報告されている。このように上皮に特異的に発現する性質により、現在では腹腔内腫瘍の原発の検索や卵巣腫瘍の組織型の鑑別に利用されている[47]。

AT-rich interactive domain 1A (ARID1A)

AT-rich interactive domain 1A (ARID1A 別名 BAF250a)はSWI-SNF クロマチンリモデリング複合体の重要な構成因子の一つであり、1番染色体短腕(1p36)に位置する遺伝子 ARID1A にコードされる[48]。SWI-SNF クロマチンリモデリング複合体は遺伝子発現において重要な働きを持ち[49]、組織発育や細胞分化にも関与すると考えられている[50] [51]。近年、婦人科癌を含む様々な癌疾患において ARID1A の遺伝子変異が報告されており、ARID1A は重要な癌抑制遺伝子と考

えられている[52]。2011年 Yamamoto らは免疫染色にて明細胞性腺癌に隣接する子宮内膜症上皮細胞で ARID1A 発現消失群と発現保持群との間に明瞭なフロント形成があることを報告し、明細胞腺癌に隣接する非異型または異型子宮内膜症にも ARID1A の変異を確認した[53]。これらの報告はこのような卵巢癌群が子宮内膜症から連続性をもって卵巢癌へ進展することを示唆するものである。

CD 10

CD10 抗原は Neprilysin と呼ばれる分子量 100kDa の II 型膜タンパクで、生物学的活性のあるさまざまなペプチドを不活化させる、膜結合型中性エンドペプチターゼである。発見当初は common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA)として同定され、分化前のリンパ球前駆細胞に発現し、腫瘍特異的であると考えられてきた[54]。しかしその後の研究より、CD10 抗原が様々な正常及び腫瘍細胞の表面に発現することが示され、2002年 Sumathi らにより子宮内膜症間質細胞にも高頻度に発現することが報告された[55,56]。それ以来、腹腔内腫瘍における子宮内膜症性卵巢嚢胞の鑑別にも有用なマーカーとされている[57]。

目的

本研究において、

1. 子宮内膜症上皮細胞の初代分離培養に取り組み、培養方法を樹立すること。
2. 初代培養子宮内膜症上皮細胞の網羅的遺伝子解析を行うこと。
3. 初代培養された子宮内膜症上皮細胞の不活化細胞を樹立すること。

以上 3 点より、子宮内膜症上皮細胞にフォーカスした内膜症研究の基盤を構築することを目的とした。

方法

ヒト内膜症性卵巢嚢胞上皮細胞の初期培養

東京大学医学部附属病院女性診療科・産科／女性外科において、子宮内膜症性卵巢嚢胞の診断で腹腔鏡下卵巢嚢胞摘出術または腹腔鏡下付属器切除術を施行した患者の検体を用いた。手術前3ヶ月以内に性ステロイドホルモンや GnRH アゴニストを投与されている患者は検体採取から除外した。全ての手術検体は無菌下で回収し、子宮内膜症の診断は術後の病理学的診断により、評価を行った。東京大学医学部附属病院倫理委員会(審査承認番号：0324-(5))、及びヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会(審査承認番号：G10035 号)の承認を得て、患者へは十分なインフォームドコンセントを行った。摘出された卵巢嚢胞の内側をセルスクレーパー(IWAKI)で軽くなぞり、細胞を DMEM/F-12(1:1) (Invitrogen, Carlsbad, California)10ml で満たした容器に回収した。具体的には下記の方法で初期培養を行った。

内膜症性卵巢嚢胞上皮細胞(endometriotic epithelial cells : EmoEC)を含む

DMEM/F-12(Invitrogen, Carlsbad, California)を 40 μ m ナイロンセルストレイナー (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA)のフィルターにかけ、セルストレイナーにトラップされた子宮内膜症上皮細胞を 10 ml の PBS(リン酸緩衝生理

食塩水)で 10 cm ディッシュ上にバックウォッシュした。EmoEC を含む PBS にトリプシン EDTA 1 ml を加え、37°C で 2-3 分インキュベートし、これを再び 70 μm のナイロンセルストレーナー(Becton Dickinson and Co)に通した。セルストレーナーを通り抜けた細胞を 15 ml 遠沈管に回収し 1500 回転/分で 4 分間遠心した。遠心後、上清を捨て、最終濃度 10% FBS (仔ウシ血清, Bio West, Nuaille, France) 及び、10mM 2-Mercaptoethanol (2ME) (Life Technologies, California, USA)とした DMEM/F-12 に再懸濁し、IWAKI collagen plate (Iwaki, Asahi technology Co, Tokyo, Japan)上にまいた上で、CO₂ 濃度 5%、37°C の環境下で培養を行った。培養液には、抗生剤(ペニシリン 100 U/ml、ストレプトマイシン 0.1 mg/ml、アンフォテリシン B 0.25 mg/ml)を加えて培養した。

子宮内膜症間質細胞の分離及び培養

子宮内膜症間質細胞(endometriotic stromal cells : EmoSC)は以前に当研究室で報告している方法を用いた[12]。卵巣子宮内膜症組織はカミソリを用いて十分に細切した後、collagenase (0.25%, WAKO, Osaka, Japan) 、 deoxyribonuclease I recombinant (250 IU/ml, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)及びトリプシン EDTA を含んだ DMEM/F12 溶液に入れ、37°C で 1 時間攪拌した。攪拌した溶液を、100 μm のセルストレーナー(Becton Dickinson and Co)で 2 回濾過し、

その後、70 μm のセルストレーナー(Becton Dickinson and Co)でさらに1回濾過した。濾過液を1500回転/分で4分間遠心分離して得られたペレットが EmoSC である。EmoSC は、PBS(リン酸緩衝生理食塩水) で2回洗浄した後、10% FBS(仔ウシ血清, Bio West, Nuaille, France) 及び抗生剤(ペニシリン 100 U/ml、ストレプトマイシン 0.1 mg/ml、アンフォテリシン B 0.25 mg/ml) を含んだ DMEM/F12 に懸濁し、100 mm ディッシュ(Iwaki, Asahi technology Co, Tokyo, Japan)下にまき、5% CO_2 、37°C の条件で加湿培養した。1~3日後、0.25%トリプシン EDTA 処理を行い、細胞の継代を行った。細胞は6プレートに 2×10^5 個/mlとして初回継代を行った。

正所性子宮内膜上皮細胞及び、正所性子宮内膜間質細胞の分離培養

正所性子宮内膜間質細胞(endometrial stromal cells : ESC)は以前に当研究室で報告した方法を用いた[58] [59]。子宮内膜をメスを用いて十分に細切した後、collagen (0.25%)及び deoxyribonuclease recombinant (250 IU/ml, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を含んだ DMEM/F12 溶液に入れ、37°C で1時間攪拌した。攪拌した溶液を100 μm のセルストレーナーで2回濾過した後、40 μm のセルストレーナーでさらに1回濾過を加えた。濾過液を1500回転/分、5分間遠心分離して得られた細胞塊が ESC である。このセルストレーナーにトラッ

プされた細胞を PBS でバックウォッシュし、PBS に含まれる細胞を 15ml 遠沈管に回収し 1500 回転/分で 4 分間遠心した。遠心後、回収された細胞塊を用いて、MACS 磁気細胞分離(Miltenyi Biotec , Cologne, Germany)を行った。上清を捨て、500 μ l の MACS running buffer (pH7.2 BPS , 0.5% BSA, 2mM EDTA)で再懸濁した細胞に CD326 (EpCAM)MicroBeads を 10 μ l 加え、4 $^{\circ}$ C、20 分間インキュベートし、細胞表面の抗原にビーズを十分反応させた後、カラムを通した。続けて MACS running buffer 500 μ l で 3 回カラムを洗い、さらに 1 ml の running buffer をカラムにのせ、磁気台からカラムを外し、ビーズと反応した細胞を回収した。この細胞を 1.5 ml のエッペンに回収し、1500 回転/分、4 分間遠心分離し回収された細胞が子宮内膜上皮細胞(endometrial epithelial cells : EEC)である。EEC を 10 mM 2ME 10% FBS で再懸濁し 6 穴の collagen plate (Iwaki, Asahi technology Co, Tokyo, Japan)にて 5 % CO₂、37 $^{\circ}$ C の条件で加湿培養した。

セルストレーナーで濾過された側の ESC は PBS で 2 回洗浄した後、10% FBS 及び抗生剤を含んだ 10 mM 2ME 入りの DMEM/F12 に再懸濁し、100 mm ディッシュにまいた上で、5 % CO₂、37 $^{\circ}$ C の条件で加湿培養した。1~3 日後、0.25 % トリプシン EDTA 処理を行い、細胞の継代を行った。細胞は 6 穴プレートに 2 \times 10⁵ 個/ml で初回継代を行った。

遺伝子導入

Gateway system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて、レンチウイルスベクタープラスミドの作成を行った。米国 Addgene Plasmid より購入したプラスミド (pBabe-cylinD1+CDK4R24C (addgene, # 11129)、pBABE-hTERT+53D (addgene, # 11128)より、hTERT、human cyclin dependent kinase 4 (CDKR24C)及び human CylinD1 を表 2 のプライマーを用いて PCR でサブクローニングし、eric campeau らが作成したレンチウイルスベクター pLent-CMV-Blas DEST (706-1) (addgene, #17451)に gateway technology を用いて導入した[60]。最終的に図 3 のようなレンチウイルスベクター(pLent- CMV- Blast CDK4 DEST、pLent- CMV- Blast CyclinD1 DEST、pLent- CMV- Blast hTERT DEST) を作成した。作成したウイルスベクターは全て導入部位の塩基配列をシーケンスにて確認し、目的通りに遺伝子が組み込まれていることを確認した。これらのウイルスベクターを 293 細胞に導入し、レンチウイルスを作成した。全てのウイルスは Hela 細胞を用いて titration を確認した。組み替えウイルスを含む培養液を polybrene 4 μ g/ml 存在下で初代培養子宮内膜症性上皮細胞に感染させ、blasticidine - S 1 μ g/ml を用いて薬剤耐性細胞を選択した。

プライマー	塩基配列
<i>hTERT</i> forward primer	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCA TGCCGCGCGCTCCCCGCT
<i>hTERT</i> reverse primer	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAGTC CAGGATGGTCTTAAG
<i>CyclinD1</i> forward primer	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCA TGGAACACCAGCTCCTGTG
<i>CyclinD1</i> reverse primer	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAGAT GTCCACGTCCCGCA
<i>CDK4</i> forward primer	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCA TGGCTACCTCTCGATATAG
<i>CDK4</i> reverse primer	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCACTCC GGATTACCTTCATC

表 2. レンチウイルス作成時、サブクローニングに使用した各プライマーの塩基配列

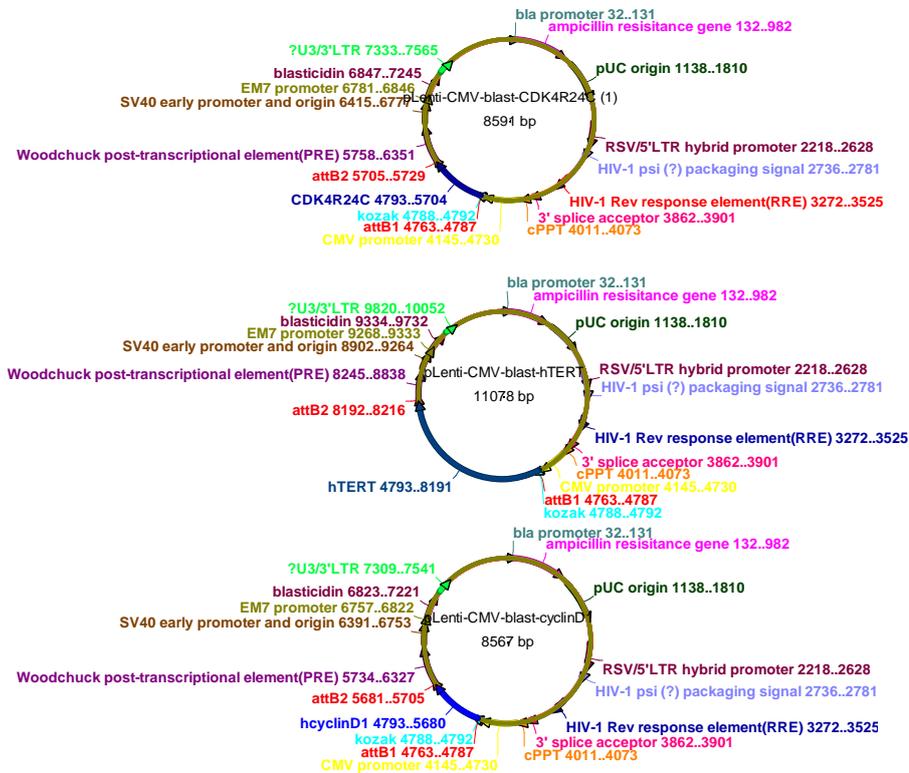


図 3. 作成したレンチウイルスベクター

Addgene plasmid より得たプラスミドから 3 遺伝子(CDK4, CyclinD1, hTERT)をサブクローニングし、Eric Campeau らが作成したレンチウイルスベクターに導入し、上記レンチウイルスベクターを作成した。作成したウイルスベクターは全て導入部位の塩基配列をシーケンスにて確認し、遺伝子導入が目的通りに導入されていることを確認した。

RNA の抽出

各種作成したセルライン、また手術検体から得たプライマリーの EmoEC, EmoSC, EEC, ESC の RNA 抽出は Nucleospin RNA (MACHEREY-NAGAL GmbH & Co.KG, Duren, Germany) を用いて、プロトコールに従って行った。全ての RNA は DNA の混入を避けるために、DNAse 処理を行った。抽出された RNA を RT-PCR kit (TOYOBO,Osaka,Japan)を用いてプロトコールに従い cDNA に逆転写した。

PCR

PCR は SYBER Green Master (Roche Diagnostics) を用いて行った。データ解析は LightCycler 480 (Roche Diagnostics) を用いて行った。*CDK4*、*CyclinD1* 及び *hTERT* の遺伝子発現は *GAPDH* mRNA を internal standard として標準化し、表 2 の通りのプライマーを用いた。*PSTIN*、*LAMA4*、*PAX8*、*KRT* も同様に、表 2 の通りのプライマーを用いて行った。PCR 条件は、以下の通りである。*CDK4*、*CyclinD1*、*hTERT* は 95°C10 秒、62°C10 秒、72°C 12 秒を 40 サイクル行った。*PSTIN*、*LAMA4*、*PAX8*、*KRT* の 4 つの遺伝子は 98°C10 秒、60°C10 秒、68°C30 秒 35 サイクル行った。*GAPDH* は 95°C10 秒、64°C10 秒、72°C18 秒を 30 サイクル行った。全ての PCR は melting curve を確認し、標準化は全ての遺伝子の signal

threshold サイクル数から、*GAPDH* の signal threshold サイクル数を引いて行った。
 また、それぞれの遺伝子発現が集積され始める PCR サイクル数を CT 値として、
 internal standard として *GAPDH* の CT 値を引いたものを dCT 値とした。

遺伝子名	5'末端	3'末端
<i>CDK4</i>	TTTGCAGAGATGTTTCGTCG	AGGCAGAGATTTCGCTTGTGT
<i>CyclinD1</i>	AACTACCTGGACCGCTTCCT	GTGTTCAATGAAATCGTGCG
<i>hTERT</i>	AGAACGTTCCGCAGAGAAAA	GCAGTACGTGTTCTGGGGTT
<i>PSTIN</i>	CTCATAGTCGTATCAGGGGTCG	ACACAGTCGTTTTCTGTCCAC
<i>LAMA4</i>	TGATGCCGTACTGTAAGCTC	CCCGACAGGGTGTGAAAGAA
<i>PAX8</i>	AAGTGCAGCAACCATTCAACC	CTGCTCTGTGAGTCAATGCTTA
<i>KRT7</i>	TCAAGGATGCTCGTGCCAAG	ACTGCCACCAGTGGAATTCAT

表 3. 各プライマーの塩基配列

ウェスタンブロッティング

遺伝子導入を行い不死化した細胞を冷却下で PBS で洗浄し、proteinase inhibitor cocktail (Roche Diagnostics)を含む lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 1 mM EDTA)を用いて蛋白を抽出した。蛋白(10 μ g) を 10 % SDS-PAGE にて電気泳動し、polyvinyl difluoride membrane に転写させた。抗 CDK4 抗体(1:1000, Cell Signaling, Danvers, USA) 抗 CyclinD1 抗体(1:1000, Santa Cruz Biotechnonology, Inc, Snata Cruz, California) 及び、抗 hTERT 抗体(1:1000,

Merch Millipore, Billerica, MA, USA)を1次抗体として用い、4°C overnight 反応させた。CDK4 及び hTERT の二次抗体として、anti-rabbit 抗体(1:10000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, Pennsylvania)、CyclinD1 の二次抗体として、horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse 抗体(1:10000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc)を用い、4°C overnight 反応させた。Western blotting detection reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) を用いて 信号を検出した。

免疫細胞染色

初代培養細胞、または遺伝子導入により不死化した細胞を IWAKI chamber slide II (Iwaki, Asahi technology Co, Tokyo, Japan) に 1×10^5 個/ml で撒き、Aceton-Methanol (1:1)を用いて -20°C で 20 分間冷却固定し、PBS で洗淨したのち、免疫染色を行った。Protein Block Serum-Free (Dako, California, USA)で室温にて 30 分間ブロッキングを行った後に、1次抗体として、抗 Cytokeratin (AE1/AE3) 抗体(Dako, Callifornia, USA)、抗 PAX8 抗体(proteintech, Illinois, USA)、抗 ARID1A 抗体(SIGMA Life Science, Missouri, USA)、抗 CD10 抗体(Dako, California, USA)を用いて 4°C overnight でインキュベートした。PBS で洗淨した後、2次抗体として anti-Rabbit IgG Secondary antibody Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 568、

anti-Mouse IgG Secondary antibody Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher, Illinois, USA)を用いて蛍光免疫細胞染色を行った。核染色は 4',6-diamino-2- phenylindole (DAPI)染色を行った。

免疫組織染色

東京大学医学部附属病院倫理委員会(審査承認番号：0324-(5))の承認を得て、文書に手同を得た患者の組織切片を用いた。内膜症組織検体は東京大学医学部附属病院産婦人科において、腹腔鏡下卵巣嚢胞摘出術または腹腔鏡下付属器切除術を施行した患者の検体で、手術前3ヶ月以内に性ステロイドホルモンを使用した患者は除外した。子宮内膜組織検体は、子宮頸癌の診断で子宮全摘術を受け、病理学的に正常な子宮内膜組織を用いた。組織検体は10%アルデヒドで固定した後パラフィン包埋され、4 μ mの切片に薄切りされ、organosilane コートスライド上に張り付けられた。スライドをキシレンで脱パラフィン処理した後、イムノセーバーで抗原不活化を行った。自然冷却した後、0.3%過酸化水素含有メタノール液にて内在性ペルオキシダーゼ活性を抑制した。さらに、非特異的染色ブロッキング試薬(Dako, California, USA)にてブロッキングを行った。切片は、抗 PAX8 抗体(proteintech, Illinois, USA)を用いて1時間室温で静置し、一次抗体反応を行った。PBS で洗浄後、EnVisionKit (Dako, California, USA)により二次抗

体として sheep anti-rabbit ペルオキシダーゼ標識抗体でプローブし、
Diaminobenzidine を用いて染色した。スライドは Mayer-Hematoxylin 液(Wako
Chemical, Osaka, Japan)にて核染色した後に包埋した。

網羅的遺伝子解析

それぞれ初期培養した EmoEC, EmoSC, EEC, ESC 及び作成した不死化子宮内
膜症性卵巣嚢胞上皮細胞を用いて、RNA シークエンスにて網羅的解析を行った。
各種細胞は 10 mM 2ME 10%FBS で 5 % CO₂、37°C という同じ条件下で培養し
Nucleospin RNA (MACHEREY-NAGAL GmbH & Co.KG, Duren, Germany)を用い
て RNA を回収した。全ての RNA は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies,
California, USA)で品質を確認した上で、Mondorian SP+ Complete Library Systems
(NuGEN, California, USA)を用いてライブラリーを作成し、HiSeq 2500 (illumina
California, USA) を用いて RNA シークエンスを行った。RNA シークエンス結果
の解析は ExAtlas (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/exatlas/>)を用いて行った[61]。ExAtlas
にて解析した結果は、FDR 0.05 未満、または Fold Increase 2 以上を有意な差があ
るものとした。

初代培養子宮内膜症上皮細胞の網羅的遺伝子解析から得られた結果の比較

RNA シーケンスより得た初代子宮内膜症上皮細胞の網羅的遺伝子解析の結果を ExAtlas を用いて初代培養子宮内膜症間質細胞、及び正所性子宮内膜上皮細胞と比較した。また、初代培養子宮内膜症間質細胞と正所性子宮内膜間質細胞との比較も同様に ExAtlas を用いて行った(図 4)。比較対象とした細胞と組織の模式図を図 4 に示す。

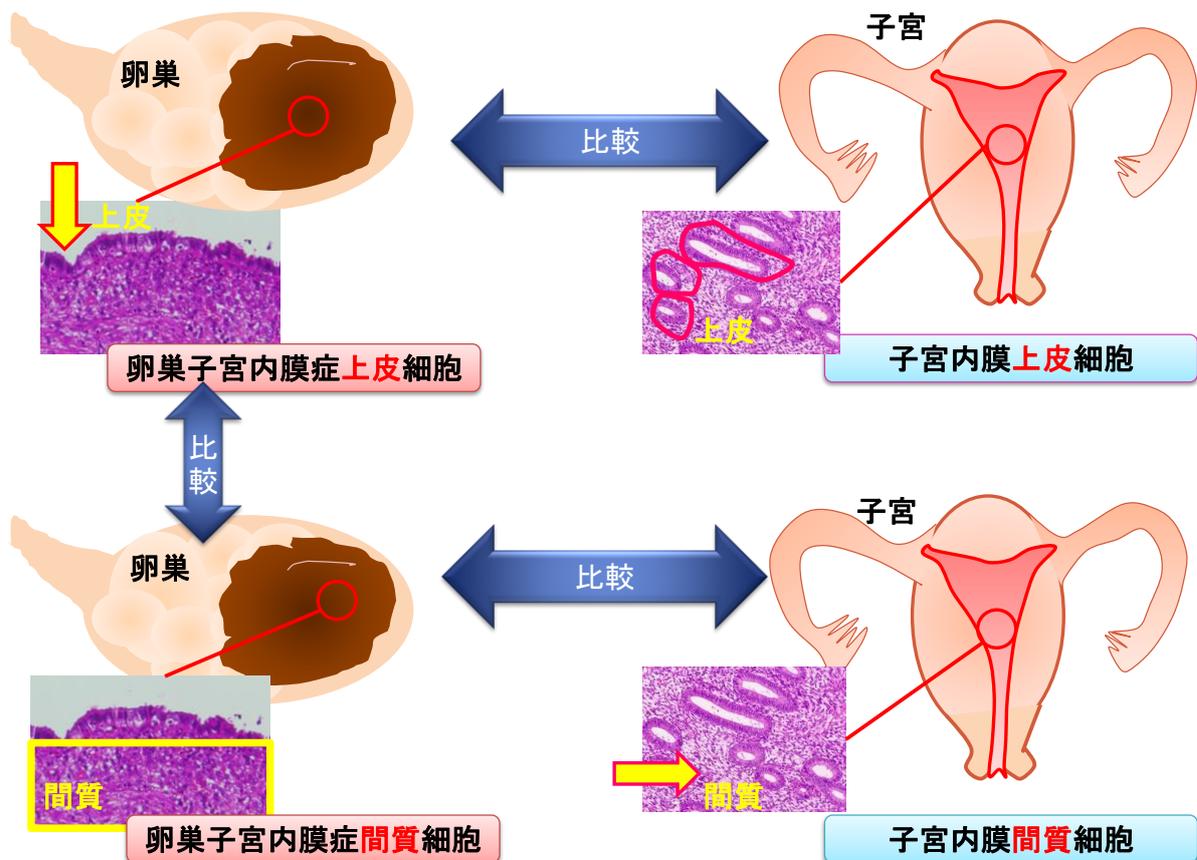


図 4. 網羅的遺伝子解析結果の比較

初代培養子宮内膜症上皮細胞の網羅的遺伝子解析の結果は ExAtlas を用いて初代培養子宮内膜症間質細胞、及び正所性子宮内膜上皮細胞と比較した。また、初代培養子宮内膜症間質細胞と正所性子宮内膜間質細胞との比較も同様に ExAtlas を用いて行った。

本研究での網羅的遺伝子解析結果と既存のデータセットの比較

Yamazaki らの子宮内膜症間質細胞の網羅的遺伝子解析の結果(子宮内膜症間質細胞 3 検体及び正所性子宮内膜間質細胞 6 検体)は Web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) の accession No. GSE47361 よりデータセットを得て[30]、Exatlas にて解析し、FDR 0.05 未満、Fold Increase 2 以上を有意な差があるものとした。

統計学的手法

実験結果の統計処理にあたって、2 群間の遺伝子発現を比較する際には Student'T 検定を用いた。正規分布を示さない 2 群間の値の比較には non-parametric 検定を行った。網羅的遺伝子解析の結果においては、FDR 0.05 未満、Fold Increase 2 以上で統計学的に有意な差があるものとした。

不死化子宮内膜症上皮細胞の網羅的遺伝子解析から得られた結果の比較

初代培養子宮内膜症上皮細胞より不死化細胞を4株樹立した。樹立した不死化子宮内膜症上皮細胞のトランスクリプトームが初代子宮内膜症上皮細胞のトランスクリプトームと類似するかについてRNAシーケンスを用いて検討することとした。それら4株の不死化子宮内膜症上皮細胞の網羅的遺伝子解析をRNAシーケンスを用いて行い、初代培養子宮内膜症上皮細胞の網羅的遺伝子解析結果と比較した(図5)。網羅的遺伝子解析を行った不死化細胞株は、F3、H1、K細胞株が7継代目、I細胞株が12継代目の細胞を用いた。

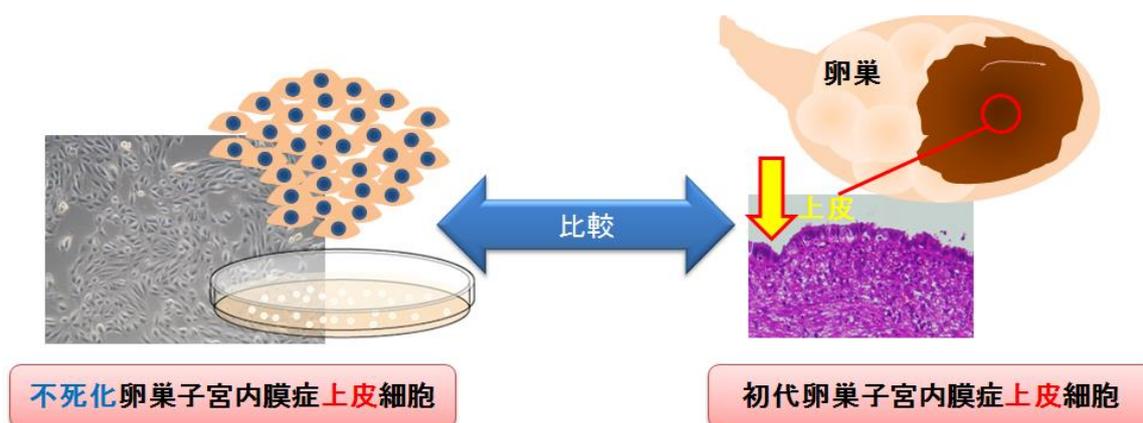


図5. 初代培養子宮内膜症上皮細胞と不死化子宮内膜症上皮細胞の比較

RNAシーケンスより得られた初代培養、及び不死化子宮内膜症上皮細胞の網羅的遺伝子解析の結果をExAtlasを用いて比較した。

結果

子宮内膜症上皮細胞及び正所性子宮内膜上皮細胞における PAX8 の発現

東京大学医学部附属病院において子宮付属器切除術または卵巣嚢胞摘出術にて摘出された子宮内膜症性卵巣嚢胞の免疫組織染色を行い PAX8 の発現について検討した。PAX8 は子宮内膜症上皮細胞のみに陽性で、間質細胞には発現が見られなかった(図 6, A, B)。また同じく東京大学医学部附属病院において子宮全摘術より得られた正所性子宮内膜の免疫染色を行い、正所性子宮内膜の上皮細胞にも PAX8 の発現を認めた。子宮内膜症同様に、PAX8 は子宮内膜の上皮細胞のみに陽性で、間質細胞には発現を認めなかった(図 6, C)。以上より子宮内膜症においても、PAX8 は特異的な上皮細胞マーカーとなり得ると考えられ、本研究の初代分離培養子宮内膜症上皮細胞の性質を確認する際に用いる方針とした。

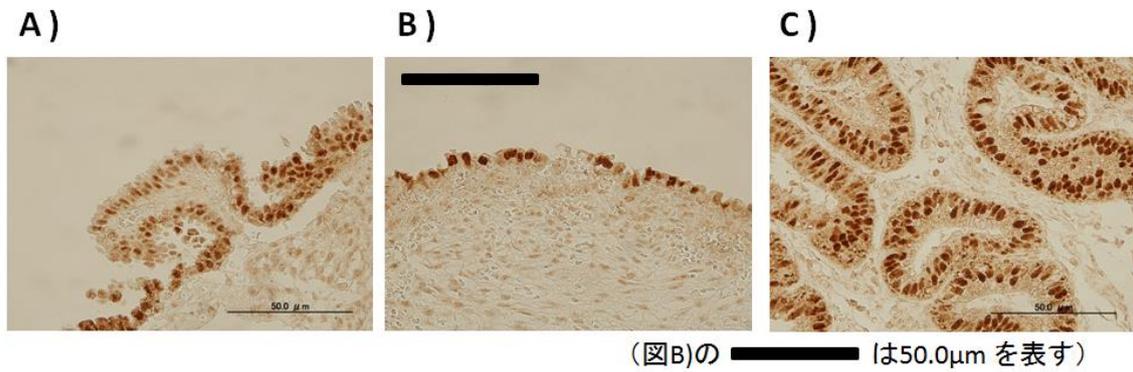


図 6. 子宮内膜症性卵巢嚢胞及び正所性子宮内膜の PAX8 免疫組織染色

東京大学医学部附属病院において子宮付属器切除術、子宮内膜症性卵巢嚢胞摘出術、または子宮摘出術を施行した患者の病理標本を用いて行われた免疫組織染色。A)B)子宮内膜症性卵巢嚢胞及び C)正所性子宮内膜いずれの組織においても、上皮細胞に強く PAX8 の発現を確認し、間質細胞には殆ど発現を認めなかった。

子宮内膜症上皮細胞の初代分離培養

東京大学医学部附属病院における付属器切除術または卵巢嚢胞摘出術にて摘出された内膜症性卵巢嚢胞より子宮内膜症上皮細胞の初代分離培養をし得た。初代培養子宮内膜症上皮細胞は培養開始より 1~2 日で collagen plate に接着し、培養開始 2~3 日後には増殖を認めた。初代培養子宮内膜症性上皮細胞は上皮細胞様の形態を保持していた(図 7)。

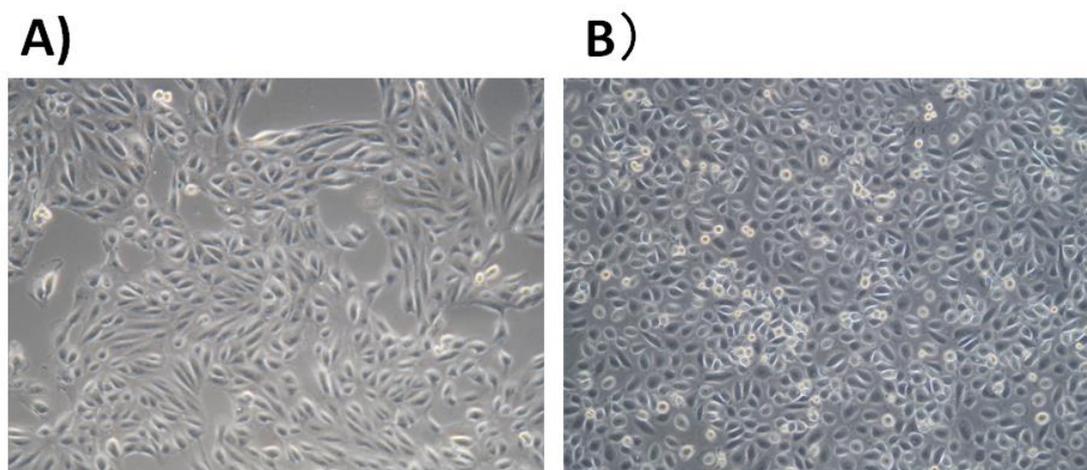


図 7. 初代分離培養子宮内膜症上皮細胞

手術検体から得られた子宮内膜症性卵巢嚢胞を用いて、子宮内膜症上皮細胞を分離培養した。手術検体は東京大学医学部附属病院にて腹腔鏡手術を施行した異なる 2 人の女性から得た(A)並びに B)。初代培養細胞は collagen plate 上に接着し、上皮細胞様の形態を維持していた。

初代子宮内膜症上皮細胞の免疫細胞染色

初代培養子宮内膜症上皮細胞の性質を確認するために、蛍光免疫細胞染色を行った。初代培養子宮内膜症上皮細胞は上皮マーカーである Cytokeratin、PAX8 が陽性であり、また間質細胞のマーカーである CD10 は陰性であった。ARID1A は陽性であった(図 8)。

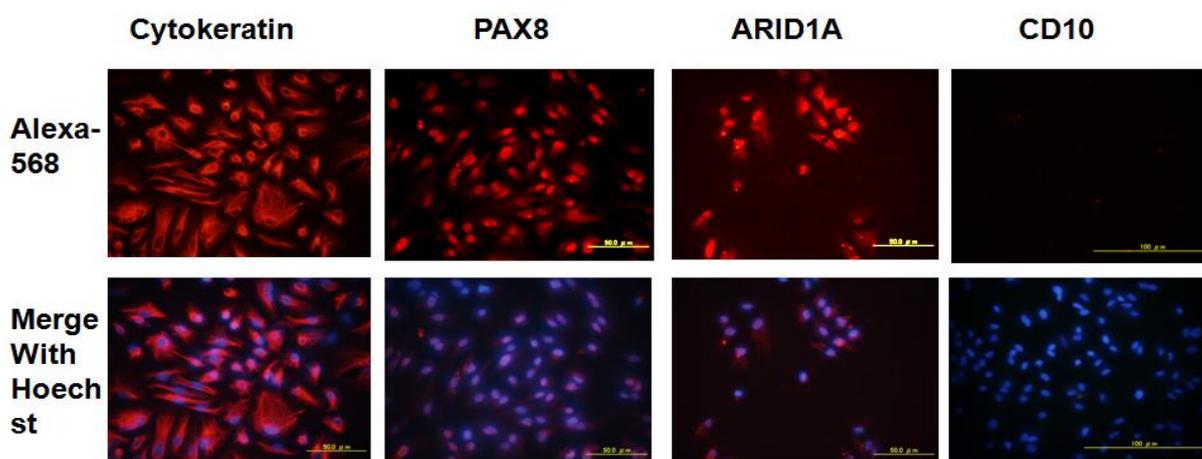


図 8. 初代子宮内膜症性上皮細胞の蛍光免疫細胞染色

初代培養子宮内膜症上皮細胞をの免疫染色を行い、上皮マーカーである Cytokeratin 及び PAX8 が陽性であることを確認した。また子宮内膜症性間質細胞に特異的なマーカーである CD10 の発現は陰性であった。ARID1A の発現は陽性であった。

RNA シーケンス Principal component analysis (PCA) 解析

初代分離培養した子宮内膜症上皮細胞(EmoEC) 6 検体の網羅的遺伝子解析を RNA シーケンスを用いて行った。同じく、子宮内膜症間質細胞(EmoSC) 4 検体、正所性子宮内膜症上皮細胞(EEC) 4 検体の網羅的遺伝子解析を、RNA シーケンスを用いて行った。EmoEC、EmoSC 及び EEC 3 種類の細胞群の RNA シーケンスによるデータセットでは、其々の細胞群が PCA 解析上、明確に異なるプロファイルを持つことが分かった(図 9)。PCA 解析でクラスターを形成した細胞群間で有意差を持って発現していた遺伝子を 262 遺伝子認めた(図 10)。

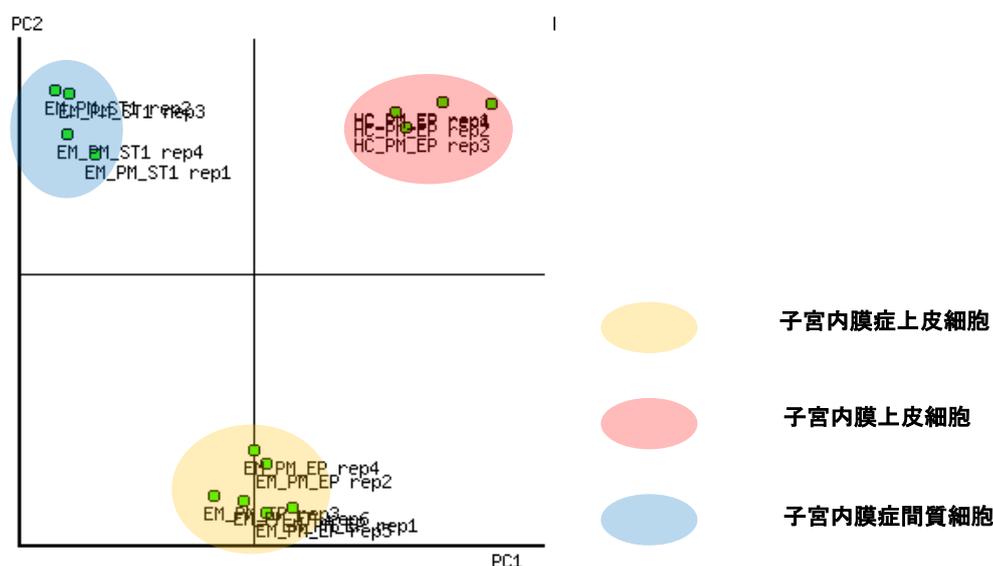


図 9. 子宮内膜症上皮細胞、子宮内膜間質細胞、子宮内膜正所性上皮細胞 3 群間の PCA 解析

PCA 解析によると子宮内膜症上皮細胞、子宮内膜症間質細胞及び正所性子宮内膜上皮細胞の 3 群は異なる遺伝子プロファイルを持つことが分かった。子宮内膜症上皮細胞と他の 2 細胞は主に PC2 に属する遺伝子群で分離されることが分かった。

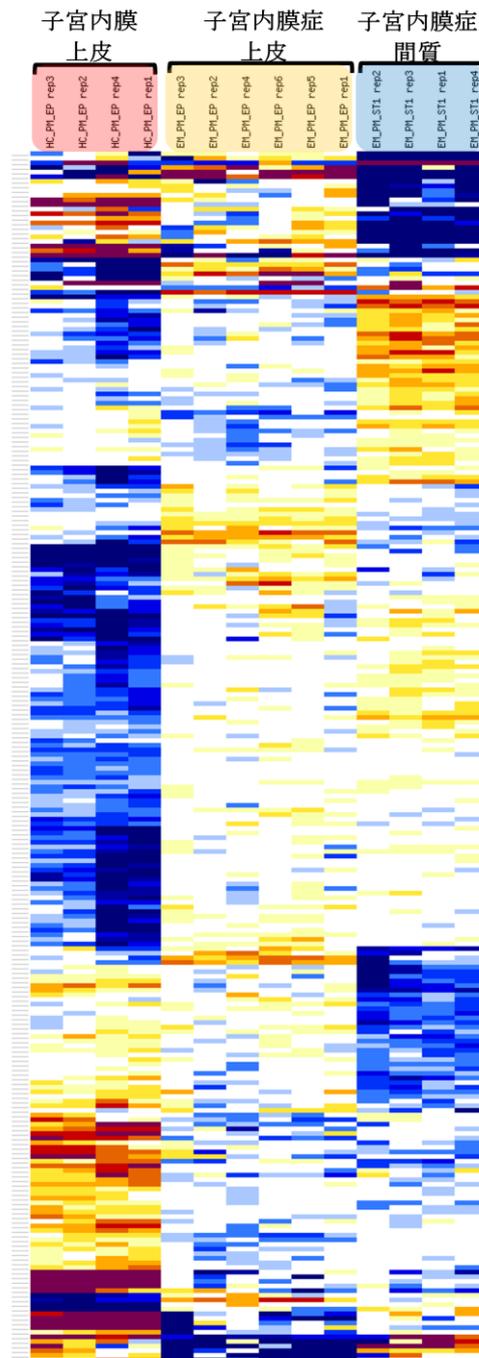


図 10. 子宮内膜症上皮細胞、子宮内膜上皮細胞、子宮内膜症間質細胞 3 群間に有意差を持って発現していた 262 遺伝子の Heat map

PCA 解析でクラスターを形成した細胞群間で有意差を持って発現していた遺伝子を 262 遺伝子認めた。(FDR < 0.05、Fold change > 2)

子宮内膜症上皮細胞と子宮内膜症間質細胞の間での遺伝子変化

PCA 解析の結果より子宮内膜症上皮細胞、子宮内膜症間質細胞及び正所性子宮内膜上皮細胞の 3 群は異なる遺伝子プロファイルを持つことが分かった。また、3 種類の細胞群間で有意差をもって発現している遺伝子を 262 遺伝子認めた

(図 10)。PCA 解析で子宮内膜症上皮細胞、子宮内膜症間質細胞及び正所性子宮内膜上皮細胞の 3 細胞群はそれぞれクラスターを形成し、同様の遺伝子発現パターンを有していた。そこでまず子宮内膜上皮細胞と子宮内膜症間質細胞における遺伝子発現パターンの差異について検討した。子宮内膜症上皮細胞は間質細胞と比べ、42 遺伝子が有意に高発現であり、30 遺伝子が有意に低発現であった(図 11)。高発現遺伝子には KRT7、CDH1 (E-cadherin)、PAX8 など上皮細胞マーカーが確認された。また間質細胞では、ACTA2、MYH10、MYH11 など、間質系の細胞に特異的な遺伝子の高発現が確認され、上皮細胞、間質細胞それぞれに特徴的なパターンを示していた。その他、これまでの報告にもあるように、IL-18 が子宮内膜症上皮で高発現であった[62]。また、あらたに子宮内膜症上皮細胞に高発現であった遺伝子として、ALDH1A2、ALDH1A3、REC8 などが確認された。また、VEGF-A は子宮内膜症間質細胞に高発現であった。

Ontology 解析によると表 4 のように integrin-mediated signaling pathway, cell migration などの遺伝子群が子宮内膜症上皮細胞に高発現であった。また、

structural constituent of muscle, actin cytoskeleton, cell adhesion などが低発現遺伝子群であった。本研究で分離培養した子宮内膜症上皮細胞は、子宮内膜間質細胞とは異なることが明確となった。

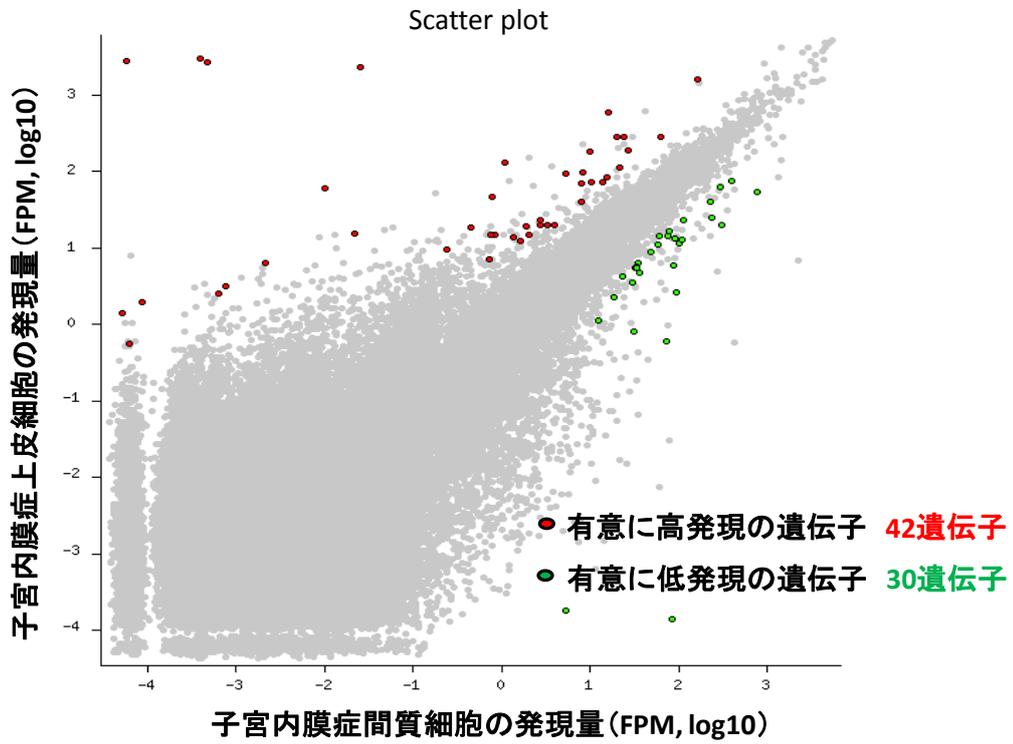


図 11. 子宮内膜症上皮細胞と子宮内膜症間質細胞における遺伝子発現の比較

子宮内膜上皮細胞と子宮内膜症間質細胞における遺伝子発現パターンの際について検討した。子宮内膜症上皮細胞は間質細胞と比べ、42 遺伝子が有意に高発現であり、30 遺伝子が有意に低発現であった。

Title	z-value	FDR	fold_enrich	N genes	genes
高発現					
GO:0007229, integrin-mediated signaling pathway	7.4133	0	20.1573	3	ITGB4,LAMA5,TYROBP
GO:0030324, lung development	7.3609	0	19.8989	3	IL18,ALDH1A2,LAMA5
GO:0005604, basement membrane	7.3609	0	19.8989	3	ITGB4,LAMA5,MATN2
GO:0016477, cell migration	5.6104	0	12.3184	3	PODXL,WWC1,LAMA5
GO:0031012, extracellular matrix	4.7386	0	9.2941	3	POSTN,LAMA5,MATN2
GO:0030198, extracellular matrix organization	3.4959	0.0005	5.835	3	POSTN,ITGB4,LAMA5
GO:0005794, Golgi apparatus	3.0218	0.0025	3.4584	5	POSTN,KRT7,PDE4DIP,WWC1,CDH1
GO:0005813, centrosome	2.8175	0.0048	4.3599	3	CCDC64,PDE4DIP,PLK2
GO:0004674, protein serine/threonine kinase activity	2.7563	0.0058	4.2407	3	BMP2K,PLK2,MYO3A
GO:0007155, cell adhesion	2.306	0.0211	3.4339	3	PODXL,POSTN,ITGB4
GO:0048471, perinuclear region of cytoplasm	2.1572	0.031	3.1937	3	ALDH1A2,WWC1,CDH1
低発現					
GO:0008307, structural constituent of muscle	11.674	0	47.2304	3	SORBS2,MYH11,PDLIM3
GO:0015629, actin cytoskeleton	5.3434	0	11.3156	3	SORBS2,PDLIM3,ACTA2
GO:0007155, cell adhesion	4.3303	0	6.4088	4	SORBS2,MYH10,EDIL3,COL6A1
GO:0007411, axon guidance	3.8774	0.0001	6.7682	3	MYH10,MYH11,COL6A1
GO:0042803, protein homodimerization activity	3.5724	0.0004	4.8768	4	IMPA2,VEGFA,CDH13,ASNS
GO:0045944, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	2.0267	0.0427	2.9762	3	VEGFA,CDH13,RORA

表 4. 子宮内膜症上皮細胞で子宮内膜症間質細胞と比較して高発現であった遺伝子の ontology 解析結果

子宮内膜症上皮細胞と正所性子宮内膜上皮細胞の比較

子宮内膜症上皮細胞は子宮内膜上皮細胞と比べ 100 遺伝子が高発現であり、48 遺伝子が低発現であった(表 5, 6)。有意差をもって高発現である遺伝子としては、POSTN、FN1、NRP2 などの EMT 関連遺伝子の高発現が見られた(図 12)。また、これらの高発現遺伝子の ontology 解析、KEGG pathway 解析を行ったところ、Adhesion、cell migration に関連する遺伝子群の高発現が確認された(表 5)。また、子宮内膜症上皮細胞に低発現であった遺伝子群に対して ontology 解析をおこなったところ、子宮内膜上皮細胞では、着床に重要とされる MMP7 [63] や、ケモカイン CCL20、CXCL16 などが高発現であった(表 6)。

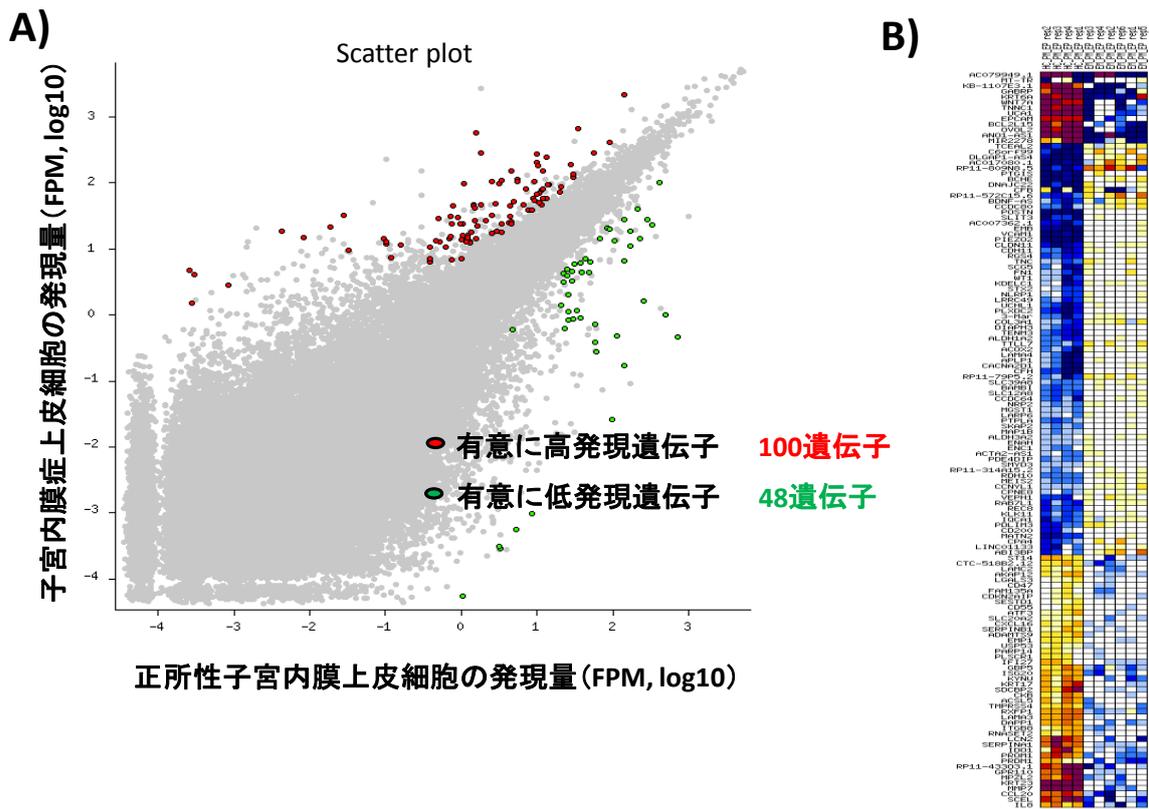


図 12. 子宮内膜症上皮細胞と子宮内膜上皮細胞における遺伝子発現の比較

子宮内膜症上皮細胞は子宮内膜上皮細胞と比べ、100 遺伝子が高発現であり、48 遺伝子が低発現であった。A) Scatter plot B)Heat map

Title	z-value	FDR	fold_enrichment	N genes	genes
Ontology analysis					
GO:0005614, interstitial matrix	10.5045	0	38.5362	3	ABI3BP,TNC,CCDC80
GO:0005604, basement membrane	10.4149	0	17.2919	7	FN1,APLP1,TNC,CCDC80,THBS2,MATN2,LAMA4
GO:0008201, heparin binding	10.0211	0	12.9413	9	FN1,POSTN,CFH,NRP2,APLP1,ABI3BP,FGF7,CCDC80,THBS2
GO:0031012, extracellular matrix	7.7176	0	9.2302	8	FN1,LOXL1,POSTN,ABI3BP,COL3A1,TNC,MATN2,LAMA4
GO:0010811, positive regulation of cell-substrate adhesion	7.1025	0	18.6465	3	ABI3BP,EDIL3,CCDC80
GO:0030198, extracellular matrix organization	6.5499	0	6.5193	9	FN1,LOXL1,POSTN,APLP1,ABI3BP,COL3A1,TNC,CCDC80,LAMA4
GO:0007155, cell adhesion	6.3999	0	5.1154	12	FN1,CDH11,EMB,POSTN,KIAA1462,NRP2,APLP1,EDIL3,TNC,THBS2,VCAM1,LAMA4
GO:0009611, response to wounding	5.1584	0	10.7045	3	FN1,TNC,FGF7
GO:0007507, heart development	4.9059	0	6.5987	5	NRP2,WT1,COL3A1,VCAM1,PDLIM3
GO:0005911, cell-cell junction	4.6482	0	7.203	4	KIAA1462,ADD3,STX2,HEG1
GO:0005201, extracellular matrix structural constituent	4.5606	0	8.7582	3	FN1,COL3A1,LAMA4
GO:0055114, oxidation-reduction process	4.3542	0	6.5316	4	ALDH3A2,MGST1,LOXL1,CYP1B1
GO:0001501, skeletal system development	4.0955	0	5.9746	4	CDH11,POSTN,COL3A1,PKDCC
GO:0005178, integrin binding	3.7534	0.0002	6.4949	3	COL3A1,EDIL3,VCAM1
GO:0006805, xenobiotic metabolic process	3.7308	0.0002	5.243	4	MGST1,CYP1B1,GSTA4,PTGIS
GO:0009887, organ morphogenesis	3.6969	0.0002	6.3521	3	STX2,APLP1,SLIT3
GO:0007411, axon guidance	3.3967	0.0007	3.6015	6	BDNF,NRP2,ENAH,SLIT3,COL3A1,MATN2
GO:0008360, regulation of cell shape	3.2988	0.001	5.4023	3	BAMBI,FN1,SH3KBP1
GO:0005615, extracellular space	3.1784	0.0015	2.4645	11	BCHE,FN1,LOXL1,ENOX1,CFH,SLIT3,ABI3BP,COL3A1,TNC,VCAM1,PTGIS
GO:0016477, cell migration	2.9188	0.0035	4.5876	3	BAMBI,FN1,SH3KBP1
GO:0003779, actin binding	2.6455	0.0082	3.0391	5	DIAPH3,MYLK,ADD3,ENAH,ENC1
GO:0045202, synapse	2.5637	0.0104	3.9057	3	ENAH,SH3KBP1,MAP1B
GO:0005506, iron ion binding	2.4376	0.0148	3.6818	3	AOX1,CYP1B1,PTGIS
GO:0030424, axon	2.4376	0.0148	3.6818	3	TENM3,UCHL1,NRP2
GO:0005789, endoplasmic reticulum membrane	2.4276	0.0152	2.2635	8	PTPLA,RDH10,ALDH3A2,MGST1,CYP1B1,UCHL1,EIF5A2,PTGIS
GO:0005509, calcium ion binding	2.4095	0.016	2.2503	8	CDH11,C1S,SLIT3,HEG1,EDIL3,THBS2,MATN2,S GCE
GO:0005516, calmodulin binding	2.3205	0.0203	3.4822	3	RGS4,MYLK,ADD3
GO:0005788, endoplasmic reticulum lumen	2.2711	0.0231	3.4003	3	BCHE,KDELC1,COL3A1
GO:0008285, negative regulation of cell proliferation	2.2445	0.0248	2.5968	5	SKAP2,RARRES1,WT1,SLIT3,DFNA5
GO:0016491, oxidoreductase activity	2.1996	0.0278	3.2843	3	BDH2,ENOX1,AOX1
GO:0007399, nervous system development	2.1106	0.0348	2.7234	4	BDNF,APLP1,TTLL7,ENC1
KEGG pathway					
KEGG_ECM_RECEPTOR_INTERACTION	4.4452	0	5.6991	5	COL3A1,TNC,LAMA4,THBS2,FN1
KEGG_TRYPTOPHAN_METABOLISM	4.0248	0.0001	7.1809	3	AOX1,ALDH3A2,CYP1B1
KEGG_FATTY_ACID_METABOLISM	3.8965	0.0001	6.8389	3	ECI2,ALDH3A2,ACAA2
KEGG_VALINE_LEUCINE_AND_ISOLEUCINE_DEGRADATION	3.7762	0.0002	6.528	3	ACAA2,AOX1,ALDH3A2
KEGG_FOCAL_ADHESION	2.7369	0.0062	2.8581	6	COL3A1,TNC,MYLK,LAMA4,THBS2,FN1
KEGG_COMPLEMENT_AND_COAGULATION_CASCADES	2.7094	0.0067	4.1628	3	C1S,CFB,CFH
KEGG_METABOLISM_OF_XENOBIOTICS_BY_CYTOCHROME_P450	2.6778	0.0074	4.1033	3	GSTA4,MGST1,CYP1B1
KEGG_DRUG_METABOLISM_CYTOCHROME_P450	2.6163	0.0089	3.9894	3	GSTA4,AOX1,MGST1
KEGG_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	2.2887	0.0221	3.4195	3	LAMA4,SKP2,FN1

表 5. 子宮内膜上皮細胞と比較して子宮内膜症上皮細胞に高発現であった遺伝子の GO 解析と Pathway 解析

Title	z-value	FDR	fold_enrich	N_genes	genes
GO:0030198, extracellular matrix organization	6.3605	0	8.5089	6	MMP7,ITGB8,LAMA3,LGALS3,FBLN1,RXFP1
GO:0031012, extracellular matrix	5.3783	0	9.0354	4	LGALS3,PLSCR1,ADAMTS9,FBLN1
GO:0005578, proteinaceous extracellular matrix	4.692	0	7.2895	4	MMP7,LGALS3,ADAMTS9,FBLN1
GO:0005615, extracellular space	4.5663	0	3.9477	9	MMP7,ADAMTS9,FBLN1,CCL20,SERP INB1,PROM1,RNASET2,LCN2,CXCL16
GO:0016324, apical plasma membrane	4.4404	0	6.7063	4	EPCAM,CD55,MUC1,PROM1
GO:0010628, positive regulation of gene expression	4.3776	0	8.2006	3	PRDM1,PLSCR1,LCN2
GO:0006811, ion transport	3.8819	0.0001	6.8174	3	GABRP,SLC20A2,LCN2
GO:0009986, cell surface	3.3145	0.0009	4.4643	4	EPCAM,CD55,MUC1,PROM1
GO:0005576, extracellular region	3.164	0.0016	2.4055	11	MMP7,LAMA3,CD55,MUC1,ADAMTS9,FBLN1,CCL20,ST14,RNASET2,LCN2,CXCL16
GO:0006508, proteolysis	2.2685	0.0233	2.9018	4	MMP7,ADAMTS9,CPM,ST14
GO:0030154, cell differentiation	1.9779	0.0479	2.9318	3	LGALS3,RXFP1,KRT6A
GO:0005887, integral to plasma membrane	1.9739	0.0484	2.1433	6	PLSCR1,CD55,MUC1,SLC20A2,PROM1,ST14

表 6. 子宮内膜上皮細胞と比較して子宮内膜症上皮細胞に低発現であった遺伝子の GO 解析と Pathway 解析

qPCR による差異のある遺伝子群の検討

RNA シークエンス解析結果より得たデータセットから、子宮内膜症間質細胞または正所性子宮内膜上皮細胞と比較して子宮内膜症上皮細胞に有意な差をもって発現していた遺伝子に対して qPCR にて発現の差異を確認した。RNA シークエンスの結果と同様に、KRT7 及び PAX8 は子宮内膜症間質細胞と比較し、子宮内膜症上皮細胞に有意に高く発現していた (図 13, A, B (PAX8 については non parametric 検定にて有意差あり))。POSTN に関しては子宮内膜症上皮細胞に有意に高く発現していた(図 13, C)。LAMA4 は正所性子宮内膜上皮細胞と比較し、子宮内膜症上皮細胞に有意に高く発現していた(図 13, D)。

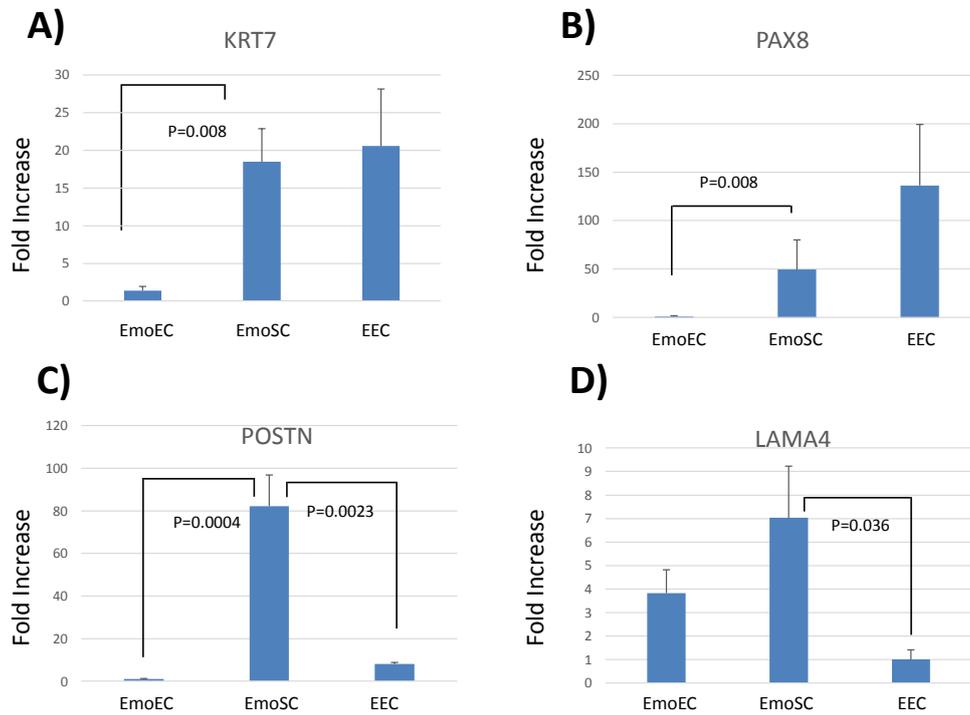


図 13. qPCR による遺伝子発現の確認

KRT7、PAX8 は子宮内膜症間質細胞と比較して有意に高く子宮内膜症上皮細胞に発現していた(A)及び B) ; B)においては non parametric 検定において有意差あり)。POSTN は子宮内膜症間質細胞及び正所性子宮内膜上皮細胞と比較して子宮内膜症上皮細胞に有意に高く発現していた(C)。LAMA4 は正所性子宮内膜上皮細胞と比較し、子宮内膜症上皮細胞に有意に高く発現していた(D)。

子宮内膜症間質細胞と正所性子宮内膜間質細胞の検討比較

子宮内膜症間質細胞と正所性子宮内膜間質細胞の比較検討を行ったところ、子宮内膜症間質細胞は子宮内膜間質細胞と比較し、1226 遺伝子が高発現であり、220 遺伝子が低発現であった(図 14、Supplemental table.1)。Yamagata ら[30]の報告のデータセットを ExAtlas で再解析したところ 477 遺伝子が子宮内膜症間質細胞に高発現であり、347 遺伝子が低発現であった(Supplemental table.3,4)。本研究のデータと高発現の遺伝子群を比較したところ、57 遺伝子が一致した。これらの高発現であった 57 遺伝子の ontology 解析を行ったところ、T cell activation gene, response to hypoxia, cell adhesion などに関連する遺伝子群を含むことが分かった(表 7)。一方、低発現遺伝子の一致は認めなかった。

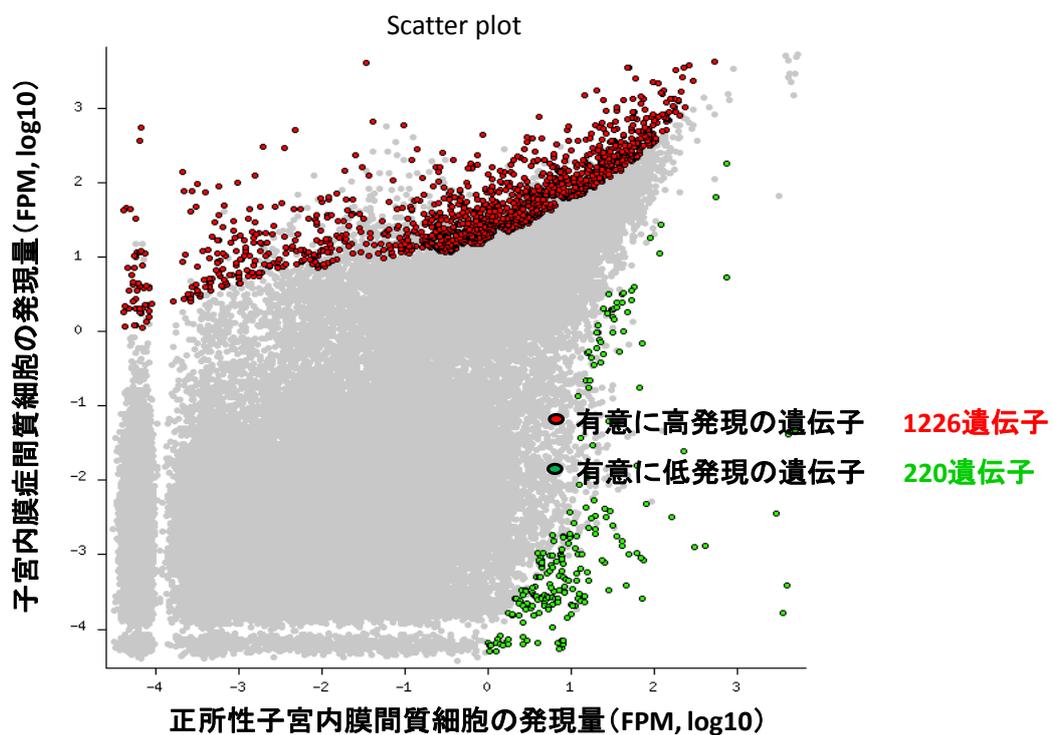


図 14. 子宮内膜症間質細胞と正所性子宮内膜間質細胞との比較

子宮内膜症間質細胞と正所性子宮内膜間質細胞の比較検討を行ったところ、子宮内膜症間質細胞は子宮内膜間質細胞と比べ、1226 遺伝子が高発現であり、220 遺伝子が低発現であった。

Title	z-value	FDR	fold enrich	N genes	genes
GO:0042110, T cell activation	7.7097	0	21.6579	3	SMAD3,DPP4,IL6
GO:0006805, xenobiotic metabolic process	6.7073	0	10.8044	5	GCLM,MGST1,NNMT,CYP1B1,PTGIS
GO:0045216, cell-cell junction organization	6.2554	0	14.8898	3	CDH11,SMAD3,HEG1
GO:0051015, actin filament binding	5.4967	0	11.9118	3	EZR,LIMA1,MYH10
GO:0001701, in utero embryonic development	5.2945	0	7.3872	5	RDH10,ZFPM2,SMAD3,MYH10,HEG1
GO:0001666, response to hypoxia	5.099	0	8.3046	4	PLOD2,SMAD3,DPP4,BDNF
GO:0008360, regulation of cell shape	4.6093	0	8.9061	3	EZR,MYH10,IL6
GO:0015629, actin cytoskeleton	4.3977	0	6.6177	4	EZR,PDLIM5,LIMA1,PDLIM3
GO:0003779, actin binding	4.0479	0.0001	5.0102	5	EZR,PDLIM5,MYH10,EPB41,ENC1
GO:0008201, heparin binding	3.9904	0.0001	7.1115	3	CFH,NRP2,CCDC80
GO:0005506, iron ion binding	3.5853	0.0003	6.0697	3	PLOD2,CYP1B1,PTGIS
GO:0030198, extracellular matrix organization	3.4871	0.0005	4.7767	4	PLOD2,EFEMP1,CCDC80,LAMA4
GO:0008083, growth factor activity	3.4482	0.0006	5.7406	3	EFEMP1,BDNF,IL6
GO:0042493, response to drug	3.4188	0.0006	4.6542	4	GCLM,MGST1,NNMT,IL6
GO:0005789, endoplasmic reticulum membrane	3.386	0.0007	3.2651	7	RDH10,MGST1,SGK1,PLOD2,CYP1B1,EPHX1,PTGIS
GO:0009897, external side of plasma membrane	3.2406	0.0012	5.2649	3	HEG1,IL6,IL6ST
GO:0007601, visual perception	3.1147	0.0018	4.9893	3	RDH10,EFEMP1,CYP1B1
GO:0007155, cell adhesion	3.0415	0.0024	3.5138	5	CDH11,DPP4,NRP2,MYH10,LAMA4
GO:0007411, axon guidance	3.0052	0.0027	3.9582	4	EZR,BDNF,NRP2,MYH10
GO:0044281, small molecule metabolic process	2.7653	0.0057	2.2608	10	GCLM,MGST1,NNMT,SLC25A4,MOCOS,GLS,PLA2G16,CYP1B1,PYGL,PTGIS
GO:0005856, cytoskeleton	2.7648	0.0057	3.5893	4	EZR,EPB41,ACTG2,ENC1
GO:0005198, structural molecule activity	2.7345	0.0062	4.2166	3	KRT18,CLDN11,EPB41
GO:0042803, protein homodimerization activity	2.331	0.0198	2.6738	5	MGST1,SMAD3,DPP4,PYGL,IL6ST
GO:0005783, endoplasmic reticulum	2.0873	0.0369	2.4248	5	MGST1,AQP11,PLOD2,PLA2G16,PTGIS
GO:0005615, extracellular space	2.0535	0.04	2.2162	6	EFEMP1,CFH,SRGN,IL6,IL6ST,PTGIS
GO:0048471, perinuclear region of cytoplasm	2.0274	0.0426	2.6144	4	TSTD1,KRT18,PLA2G16,BDNF

表 7. 本研究において、子宮内膜症間質細胞で高発現していた遺伝子と、Yamagata ら[30]の検討で高発現していた遺伝子で共通していた遺伝子群の ontology 解析

子宮内膜症上皮細胞の老化

分離培養した初代子宮内膜症上皮細胞は 1~2 日で collagen plate 上に接着するも、細胞増殖のスピードは遅く、細胞は徐々に巨大、扁平化した。分離培養された子宮内膜症上皮細胞の多くは 1 週間余りで増殖を停止し、図 15 に示すように老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ活性を呈した。これらの結果より子宮内膜症上皮細胞は培養により早期に増殖力が低下し、研究材料として用いるには困難であることが考えられた。今後子宮内膜症上皮細胞を用いた研究を進めていくにあたり、遺伝子導入の技術を用いて不死化子宮内膜症上皮細胞を作成する方針とした。

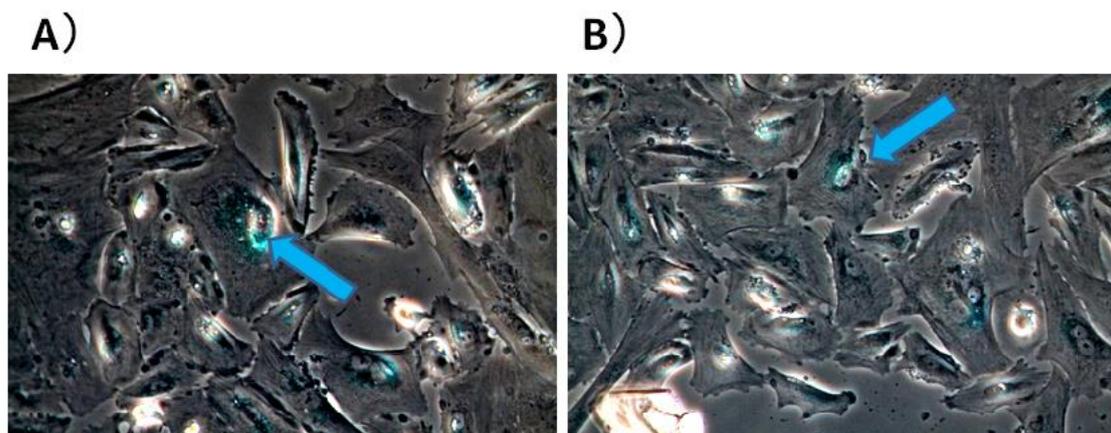


図 15. 初代培養子宮内膜症上皮細胞の Senescence associated β gal 染色

手術検体は東京大学医学部附属病院にて腹腔鏡手術を施行した異なる 2 人の女性の子宮内膜症性卵巣嚢胞を用いて、子宮内膜症上皮細胞を分離培養した(A)並びに B))。初代培養された子宮内膜症性卵巣上皮細胞は徐々に巨大、扁平化し、老化関連酸性 β ガラクトシダーゼ活性を呈した。矢印で示された細胞は核周辺が青く染色され、細胞の老化が認められた。初代培養子宮内膜症上皮細胞の多くはこれらの細胞と同じく、継代可能なまでに増殖せず老化に至った。

不死化ヒト子宮内膜症上皮細胞株の樹立

前述したレンチウイルスベクター(pLent- CMV- Blast CDK4 DEST、pLent- CMV- Blast CyclinD1 DEST、pLent- CMV- Blast hTERT DEST)を用いて、初代培養子宮内膜症性上皮細胞に CDK4R24C, CyclinD1, hTERT を導入し、不死化ヒト子宮内膜症上皮細胞を 4 株作成した。不死化細胞株 4 株はいずれも、初期培養細胞同様に、上皮細胞様の形態を維持していた(図 16)。

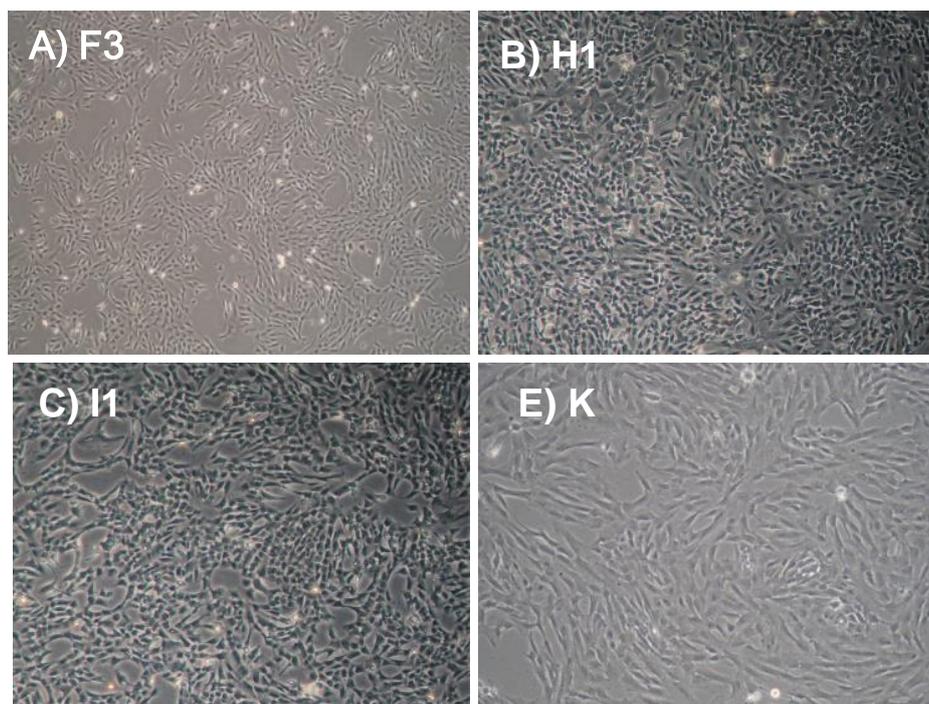


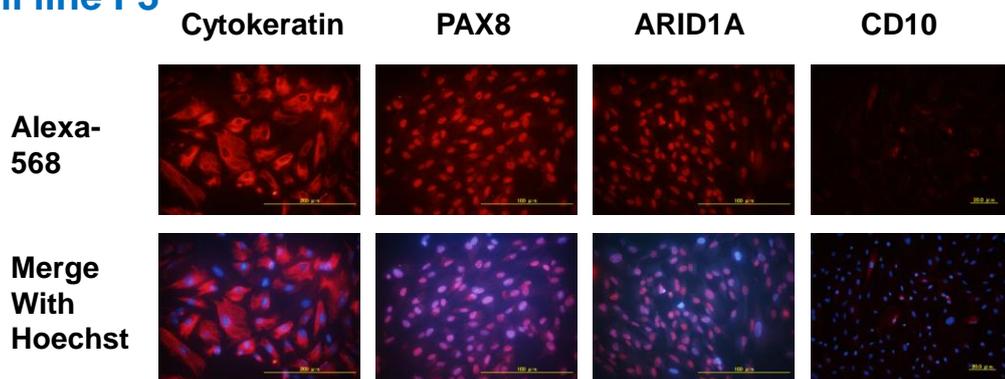
図 16. 不死化ヒト子宮内膜症上皮細胞

初期培養された子宮内膜症上皮細胞に CDK4, CyclinD1, 及び hTERT を遺伝子導入し、不死化細胞を 4 ライン樹立した。いずれの細胞も初期培養同様に上様の形態を保持していた。

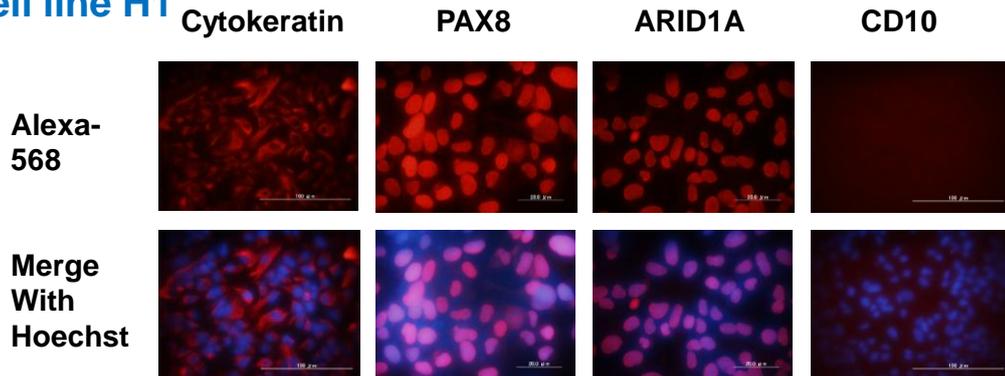
不死化ヒト子宮内膜症上皮細胞の細胞免疫染色

作成した不死化ヒト子宮内膜症上皮細胞を用いて、免疫細胞染色を行った。不死化ヒト子宮内膜症上皮細胞は、4株全てが蛍光免疫染色にて上皮マーカーである Cytokeratin、PAX8 陽性であった(図 17)。全ての細胞株で、子宮内膜症間質細胞のマーカーである CD10 は陰性であった。また、免疫細胞染色にて4株全ての細胞に ARID1A の発現を認めた。

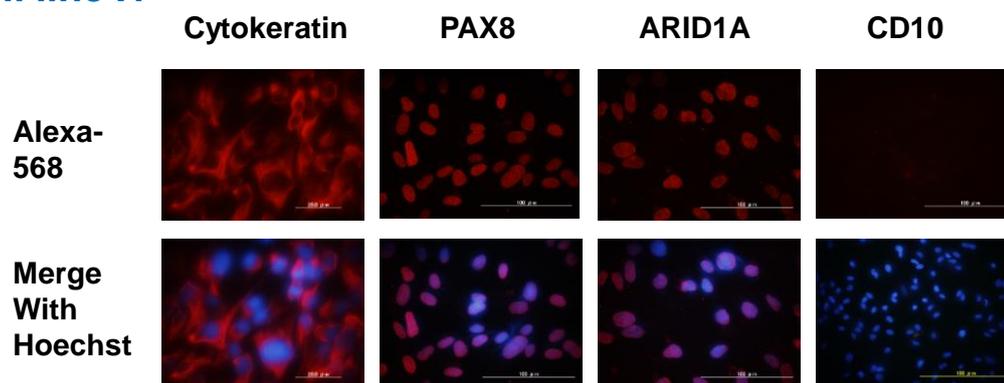
Cell line F3



Cell line H1



Cell line I1



Cell line K

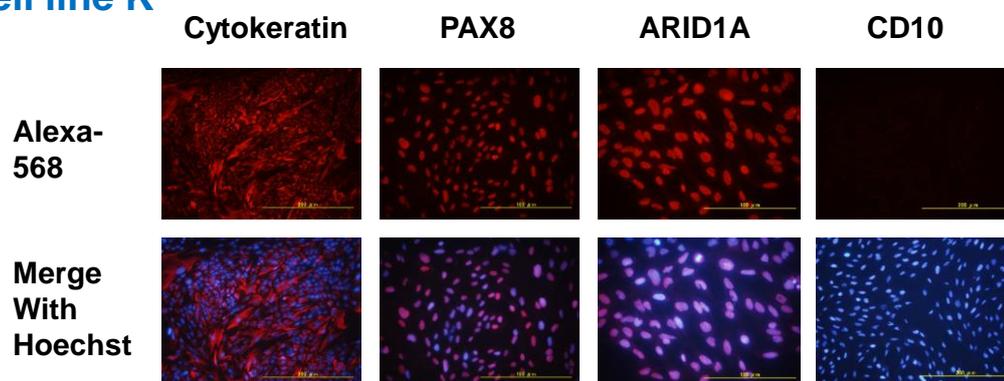


図 17. 不死化ヒト子宮内膜症上皮細胞 蛍光免疫細胞染色

樹立した不死化細胞 4 株全てにおいて、上皮マーカーである Cytokeratin、PAX8 が陽性であった。また子宮内膜症間質細胞のマーカーである CD10 は陰性であり、ARID1A の発現は保たれていた。

導入遺伝子の確認

作成した不死化ヒト子宮内膜症上皮細胞において導入遺伝子が発現していることを PCR、ウェスタンブロッティングで確認した。qPCR 及びウェスタンブロッティングにて CDK4, CyclinD1, hTERT の高発現を認めた(図 18)。私の作成したレンチウイルスベクターにより、各遺伝子の高発現が確認された。

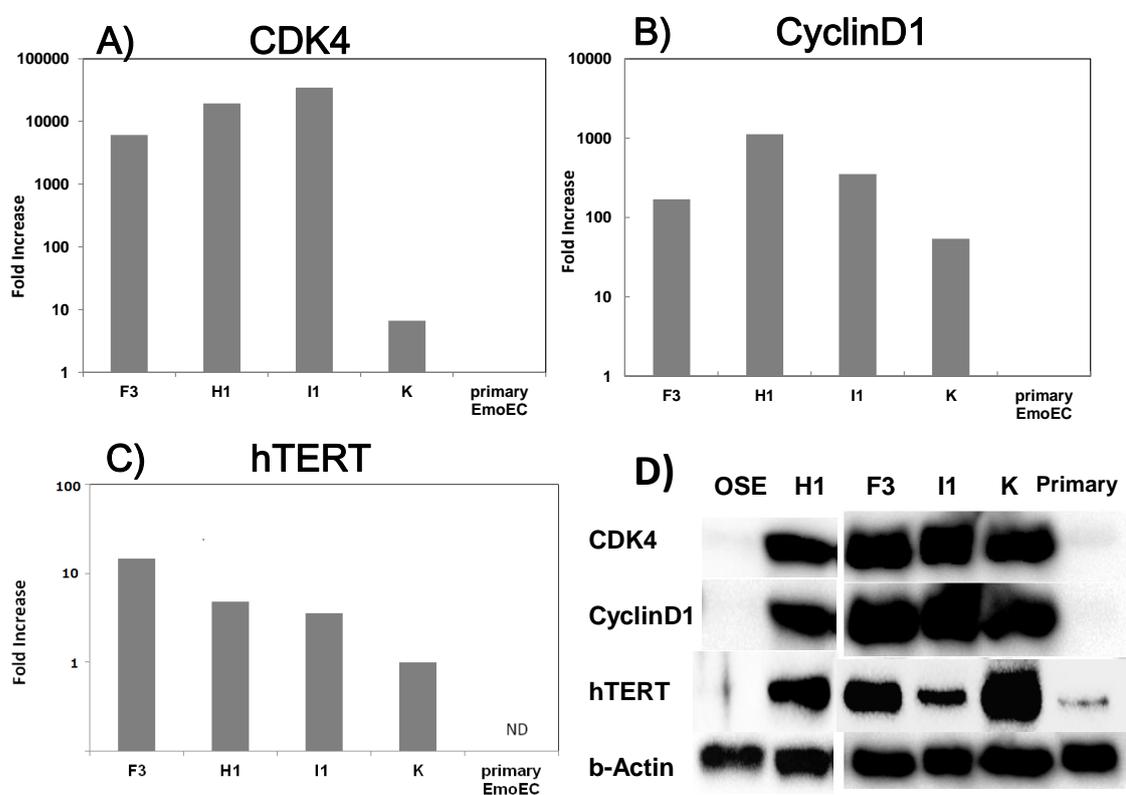


図 18. qPCR 及びウェスタンブロッティングによる導入遺伝子の発現確認

全ての不死化細胞において、qPCR を用いて、CDK4 mRNA(A)、CyclinD1 mRNA(B)、hTERT mRNA(C)の強発現が確認された。また、ウェスタンブロッティングにて、全ての作成した不死化細胞に CDK4, CyclinD1 の発現を確認した。primary：初代培養子宮内膜症性上皮細胞、OSE：初代培養卵巣表層上皮細胞と比較し、不死化細胞は導入遺伝子を明らかに高く発現していた。

増殖曲線

CDK4R24C, CyclinD1, hTERT の 3 遺伝子を導入した不死化ヒト子宮内膜症上皮細胞は、増殖スピードを低下させることなく増殖し、4 株全てが 100 日以上長期培養することが可能であった(図 19)。全ての不死化細胞が 100~130 日間に亘り細胞増殖を停止せず、セネッセンスに至ることはなかった。これにより、私の作成したレンチウイルスベクターで導入した分子が細胞において実際に機能し、不死化したことが確認された。

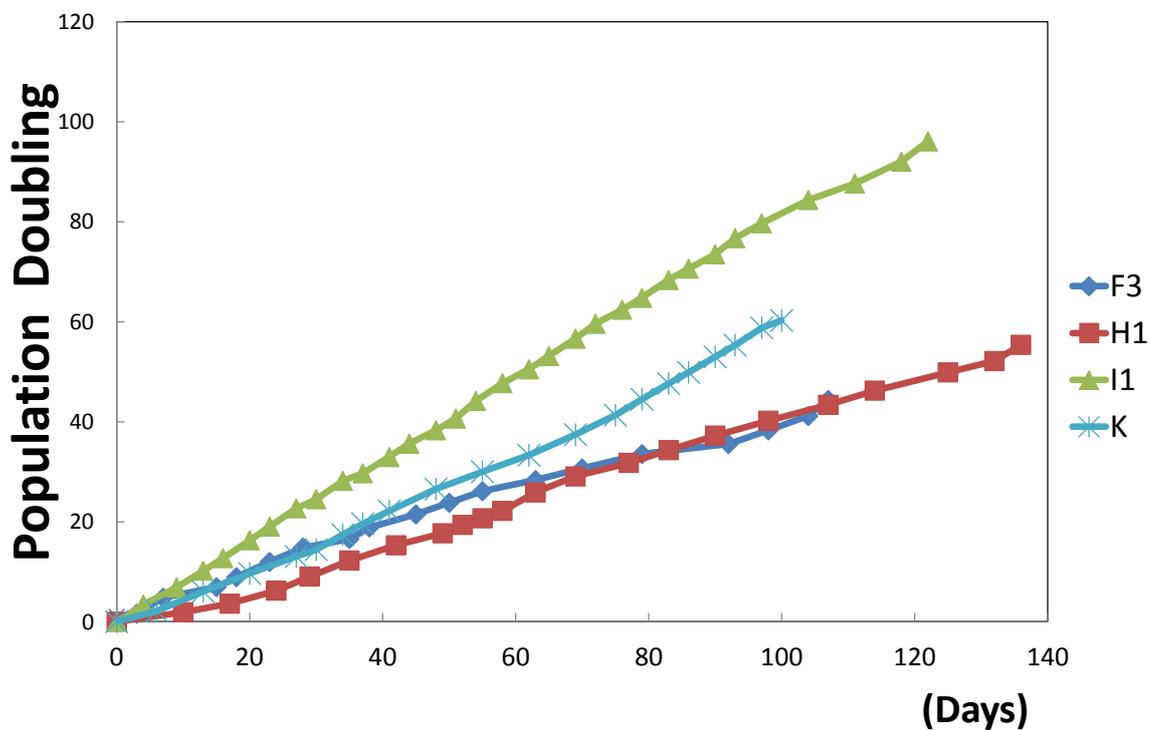


図 19. 不死化細胞 4 株の増殖曲線

DCK4R24C, CyclinD1, hTERT の 3 遺伝子を導入した不死化子宮内膜症上皮細胞 4 株全てが 100 日以上長期培養することが可能であった。いずれの細胞も 100~130 日間に亘り増殖スピードを落とすことなく増殖し続けた。

長期培養後の不死化ヒト子宮内膜症上皮細胞の検討

30 継代以上長期に培養した不死化子宮内膜症上皮細胞において、免疫細胞染色にて上皮マーカー発現の有無を検討した。樹立した不死化子宮内膜症上皮細胞 4 株は 30 継代以上長期培養した後も、Müller 管システムの系列の上皮マーカーである PAX8 の発現を認めた(図 20)。

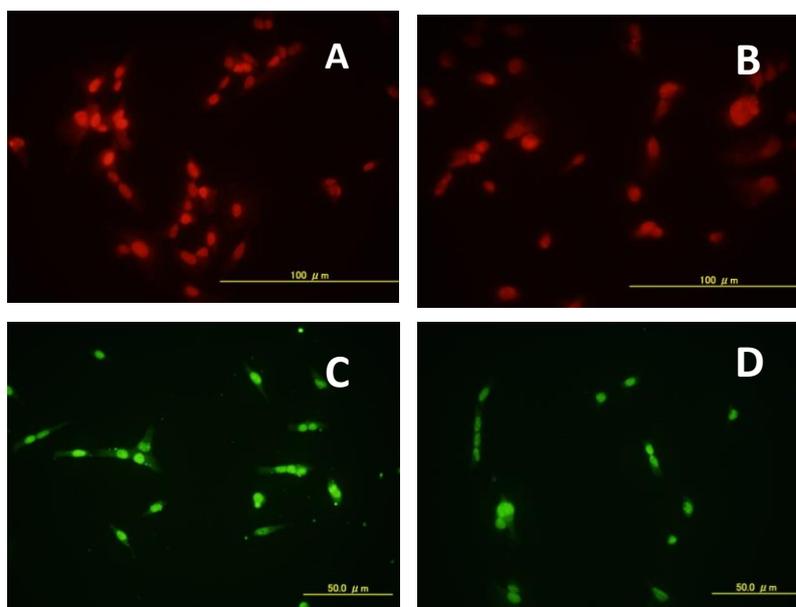


図 20. 長期培養不死化細胞株の PAX8 発現

長期培養した不死化子宮内膜症上皮細胞株は 30 継代を重ねた後も免疫染色にて上皮マーカーである PAX8 の発現を認めた。A)I1, B)H1,C)F3, D) K 細胞の PAX8 免疫染色において、A)B)は Alexa486 に、D)C)は Alexa 568 に染色陽性であり、PAX8 の発現が保たれていることを示した。

不死化子宮内膜症上皮細胞と初代培養子宮内膜症上皮細胞の遺伝子発現比較

樹立した不死化子宮内膜症上皮細胞 4 株の網羅的遺伝子解析を RNA シーケンスを用いて行った。RNA シーケンスより得られた不死化子宮内膜症上皮細胞の遺伝子プロファイルを初代培養子宮内膜症上皮細胞から得られた RNA シーケンスのデータセットと比較検討した。すると、有意に高発現だったのはわずか 18 遺伝子、低発現であったのは 32 遺伝子であった(図 21)。不死化子宮内膜症上皮細胞に高発現であった遺伝子群は ontology 解析、KEGG pathway 解析により CDK4、CyclinD1 (CCND1)などの導入不死化遺伝子とそれに関連する CDKN1A などの cell cycle 関連の遺伝子であった(表 8)。

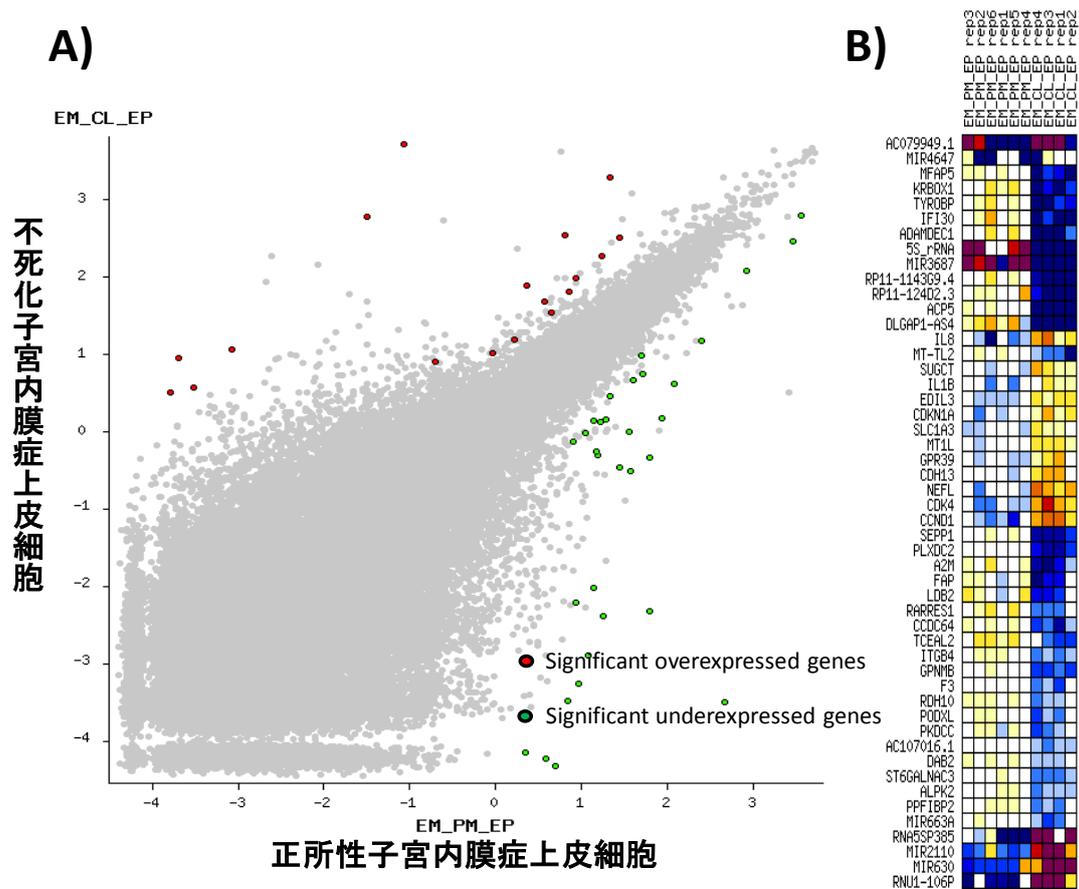


図 21. 不死化子宮内膜症上皮細胞と初代培養子宮内膜症上皮細胞の遺伝子発現の比較

不死化子宮内膜症上皮細胞と初代培養子宮内膜症上皮細胞のRNA シークエンスより得られた遺伝子プロファイルを比較すると、有意に高発現だったのは 18 遺伝子、低発現であったのは 32 遺伝子であった。

Title	z-value	FDR	fold_enrich	N_genes	genes
Ontology解析					
GO:0000307, cyclin-dependent protein kinase activity	35.6217	0	424.4297	3	CCND1,CDK4,CDKN1A
GO:0031100, organ regeneration	15.405	0	80.8437	3	CCND1,CDK4,CDKN1A
GO:0032403, protein complex binding	8.5827	0	26.3212	3	CCND1,CDK4,CDKN1A
GO:0000082, G1/S transition of mitotic cell cycle	7.8561	0	22.3384	3	CCND1,CDK4,CDKN1A
GO:0042493, response to drug	7.7149	0	16.5833	4	CCND1,CDK4,SLC1A3,CDKN1A
GO:0008285, negative regulation of cell cycle	6.4834	0	12.2028	4	IL8,CDKN1A,IL1B,CDH13
GO:0000278, mitotic cell cycle	4.5969	0	8.7737	3	CCND1,CDK4,CDKN1A
GO:0005615, extracellular space	2.6343	0.0084	3.9482	3	IL8,IL1B,CDH13
GO:0005654, nucleoplasm	2.3361	0.0195	3.4263	3	CCND1,CDK4,CDKN1A
GO:0007165, signal transduction	2.2748	0.0229	3.3256	3	IL8,CDK4,IL1B
GO:0005829, cytosol	1.9829	0.0474	2.2262	5	NEFL,CCND1,CDK4,CDKN1A,IL1B
Pathway解析					
KEGG_BLADDER_CANCER	14.4109	0	53.5714	4	CDKN1A,IL8,CCND1,CDK4
KEGG_GLIOMA	8.5232	0	25.9615	3	CDKN1A,CCND1,CDK4
KEGG_P53_SIGNALING_PATHWAY	8.2539	0	24.4565	3	CDKN1A,CCND1,CDK4
KEGG_MELANOMA	8.1277	0	23.7676	3	CDKN1A,CCND1,CDK4
KEGG_CHRONIC_MYELOID_LEUKEMIA	8.0066	0	23.1164	3	CDKN1A,CCND1,CDK4
KEGG_CELL_CYCLE	5.8586	0	13.1836	3	CDKN1A,CCND1,CDK4
KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER	4.5622	0	6.8598	4	CDKN1A,IL8,CCND1,CDK4

表 8. 初代培養子宮内膜症上皮細胞と比較し不死化子宮内膜症上皮細胞に高発現にみられた遺伝子発現の比較 **Ontology** 解析

各細胞群の遺伝子プロファイル

不死化子宮内膜症上皮細胞 4 株を含めて、初代培養子宮内膜症上皮細胞及び間質細胞、初代培養正所性子宮内膜上皮細胞及び間質細胞の合計 5 種類の細胞群において、PCA 解析を行った(図 22, 23)。PC1、PC2 での検討では、子宮内膜症上皮細胞と正所性子宮内膜上皮細胞とは他種の細胞群と比較し遺伝子発現パターンが類似していた。PC3 まで含めて検討すると、子宮内膜症上皮細胞と正所性子宮内膜上皮細胞は異なる遺伝子プロファイルを持っていた(図 21-A)。一方、子宮内膜症間質細胞と正所性子宮内膜間質細胞は明らかに異なる遺伝子プロファイルを有していた(図 22-B)。

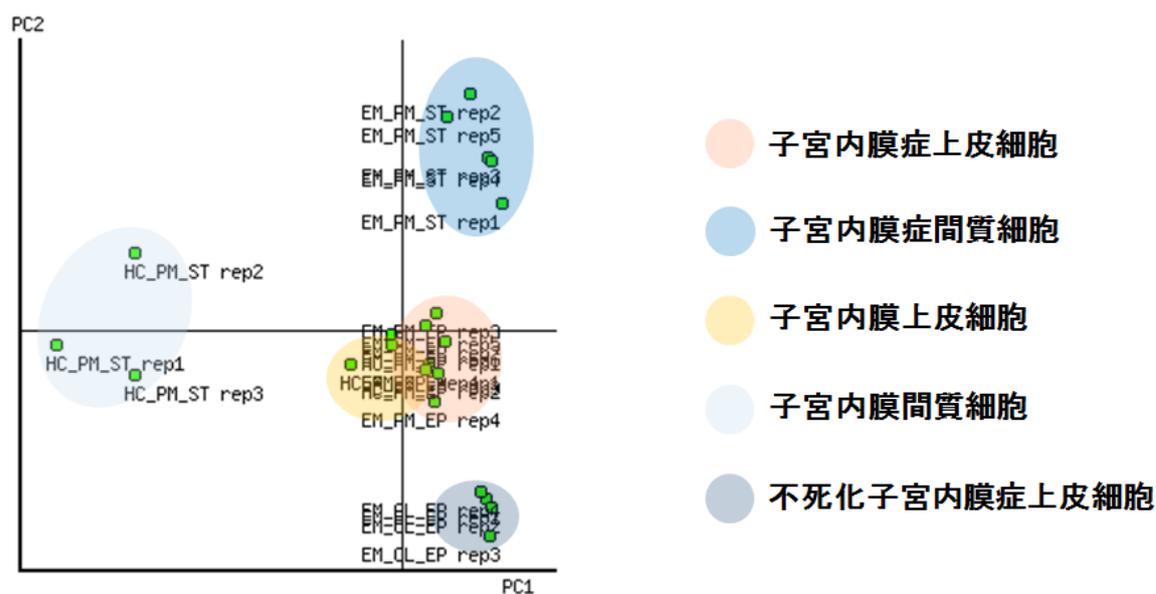
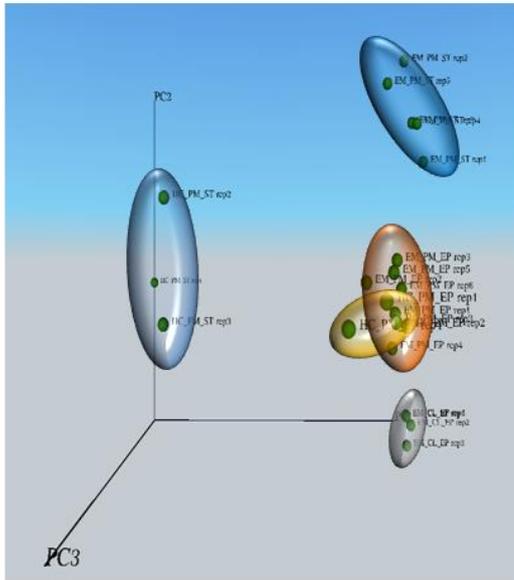


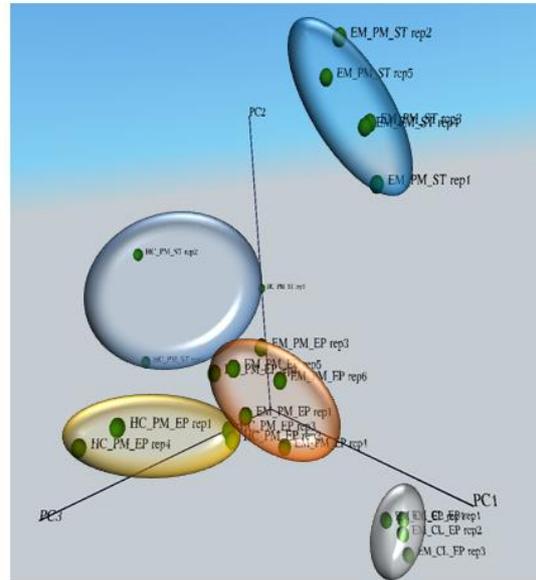
図 22. 各細胞群の遺伝子プロファイル

不死化子宮内膜症上皮細胞を含めた、各細胞群の遺伝子プロファイルの PCA 解析。子宮内膜症上皮細胞と正所性子宮内膜上皮細胞は PC1、PC2 において比較的類似した遺伝子プロファイルを持っていた。

A)



B)



- 子宮内膜症上皮細胞
- 子宮内膜症間質細胞
- 子宮内膜上皮細胞
- 子宮内膜間質細胞
- 不死化子宮内膜症上皮細胞

図 23. 各細胞群の PCA 解析

RNA シークエンスにて解析した5種全ての細胞群をPCA解析で検討すると、PC1、PC2 での検討では、子宮内膜症上皮細胞と正所性子宮内膜上皮細胞とは他種の細胞群と比較し遺伝子発現パターンが類似していた(A)。しかしながら、PC3 まで含めて検討すると、子宮内膜症上皮細胞と正所性子宮内膜上皮細胞は異なる遺伝子プロファイルを持っていた(B)。

考察

私は初めて子宮内膜症上皮細胞の分離培養方法の開発とその網羅的遺伝子解析を行った。また、子宮内膜症上皮細胞及び間質細胞、子宮内膜上皮細胞及び間質細胞に対してのRNAシーケンスを用いた遺伝子プロファイリングも初めての試みである。本研究により、子宮内膜症上皮細胞は子宮内膜症間質細胞および子宮内膜上皮細胞と、異なる遺伝子プロファイルを持つことが確認された。また、子宮内膜症間質細胞はPCA解析上、子宮内膜間質細胞とも異なる遺伝子プロファイルを持つ細胞であることが明らかになった。さらに、私は、CyclinD1、CDK4R24C、hTERTを導入し、不死化子宮内膜症上皮細胞を樹立した。網羅的遺伝子解析の結果より、初代培養子宮内膜症上皮細胞に比較し、不死化細胞株に有意に高発現であった遺伝子群の殆どは導入遺伝子によるものであり、導入遺伝子以外のトランスクリプトームの差は少ないため、子宮内膜症上皮に関連する研究に十分応用できるものと考えられた。

子宮内膜症研究の殆どはこれまで子宮内膜症間質細胞で行われてきた。しかしながら、子宮内膜症上皮細胞の存在が子宮内膜症の定義でもあり、病態の増悪、悪性化においても子宮内膜症上皮細胞の研究は必須である。今回、これまで分離培養が難しいとされてきた子宮内膜症上皮細胞の分離培養を試み、免疫染色法にて細胞の純度が高いことを解析前に確認した。

まず、子宮内膜症上皮細胞、子宮内膜症間質細胞、子宮内膜上皮細胞に対する遺伝子プロファイルを作成し、子宮内膜症間質細胞や正所性子宮内膜上皮細胞と比較することで、子宮内膜症上皮細胞の性質を検討した。RNA シーケンスの結果に対し、PCA 解析を行ったところ、それぞれの細胞群は PCA 解析上、明確に異なるプロファイルを持っていることが示された。続いて、子宮内膜症上皮細胞と子宮内膜症間質細胞における遺伝子発現パターンの差異について検討した。子宮内膜症上皮細胞は間質細胞と比較し、42 遺伝子が有意に高発現であり、30 遺伝子が有意に低発現であった。子宮内膜症間質細胞と比較し上皮細胞に高発現であった遺伝子群の Ontology 解析をしたところ、高発現遺伝子には basement membrane や Golgi apparatus など上皮細胞の性質を表す GO term が濃縮され、一方上皮細胞に低発現である遺伝子群としては、actin cytoskeleton など間質細胞に特徴的な GO term が濃縮された。具体的には子宮内膜症上皮細胞には、KRT7、CDH1(E-cadherin)、PAX8 などの上皮細胞マーカーの発現が確認され、子宮内膜症間質細胞に、ACTA2、MYH10、MYH11 などの間質系の分子の発現が高いことが明らかとなり、解析に用いたそれぞれの細胞集団の妥当性が保証されたと考える。私の分離培養した子宮内膜症上皮細胞は、子宮内膜間質細胞とは異なることが確認された。

次に、子宮内膜症上皮細胞と子宮内膜上皮細胞の比較検討を行った。移植説

は、逆流した月経血内の子宮内膜細胞が生着することで発症するとする仮説である。その仮説に基づき、子宮内膜症上皮細胞と子宮内膜上皮細胞の発現遺伝子の差異につき検討するために網羅的遺伝子解析を行った。子宮内膜症上皮細胞は子宮内膜上皮細胞と比べ、100 遺伝子が高発現であり、48 遺伝子が低発現であった。有意差のある遺伝子群として、子宮内膜症上皮細胞には POSTN、FN1 などの EMT 関連遺伝子の高発現がみられた。EMT とは上皮細胞が細胞極性や周囲細胞との接着機能を失い、遊走、侵潤能を得ることで間葉系様の細胞へと変化するプロセスである[64]。これまで、子宮内膜症組織に EMT 関連分子の発現が高いという報告があり、本研究においても子宮内膜症上皮細胞に高発現であった遺伝子群の内 EMT に関連する遺伝子が多数認められ、これまでの報告 [65] [66] [67] と整合性が見られる。

POSTN は子宮内膜症間質細胞の浸潤、遊走を促すことが報告されているが [68]、本研究にて子宮内膜症間質細胞と比較し、子宮内膜症上皮細胞に有意に高発現であることが示された。また、子宮内膜上皮細胞と比較しても、子宮内膜症上皮細胞に有意に高発現であり、POSTN は子宮内膜症の病態に関与している可能性が考えられる。今回、子宮内膜症上皮細胞に高発現であった TNC(tenascin C)も、子宮内膜と比較して子宮内膜症に高発現であることが報告されている [69]。その他、新たに SLIT3、MATN2 などの新規の子宮内膜症上皮に高発現遺伝子が

同定された。SLIT3 は、子宮内膜症腹膜病変に発現し、エストラジオールによって発現が上昇し、血管新生に働くこと[70] や子宮内膜症性卵巣嚢胞の術後再発マーカーとしての可能性[71]が報告されている。今後、これらの分子につき機能解析を行うとともに、術後再発マーカーや治療ターゲットとしての可能性につき検討を行う予定である。

今回私は子宮内膜症間質細胞は正所性子宮内膜間質細胞と比べ、1226 遺伝子が高発現であり、220 遺伝子が低発現であることも示した。(Supplemental table.1,2)。さらに、Yamagata らの報告のデータセットを ExAtlas で再解析したところ、477 遺伝子が子宮内膜症間質細胞に高発現であり、347 遺伝子が低発現であった。本研究のデータと高発現の遺伝子群を比較したところ、炎症性サイトカイン IL-6 などを含む 57 遺伝子が一致した(Supplemental table.3, 4)。これらの 57 遺伝子の ontology 解析を行ったところ、T cell activation gene, response to hypoxia, cell adhesion などに関連する遺伝子群を含むことが分かった。これらの高発現遺伝子の中の BDNF は、血漿中の子宮内膜症のマーカーになることも報告されている[72]。一方、低発現遺伝子には一致が見られなかった。

これまでの子宮内膜症組織を用いた網羅的遺伝子解析において、子宮内膜症には子宮内膜組織と比較し、細胞接着に関連する遺伝子、HOX 遺伝子群等が高発現であるとの報告が見られる[73]。また、子宮内膜症間質細胞と子宮内膜間質

細胞の比較を行った Yamagata らの報告によると、DNA methylation のクラスター解析ではいずれも子宮内膜症間質細胞と正所性子宮内膜間質細胞の間に分離が認められたが transcriptome 解析では 2 つの細胞間に優位な分離が見られなかった[30]。本研究の検討では、子宮内膜症間質細胞と子宮内膜間質細胞は、transcriptome において明らかに異なるクラスターを形成した。現在、さらに網羅的 DNA メチル化解析を行っており、子宮内膜症と子宮内膜を構成する細胞における DNA メチル化での差異を検討することで、さらに子宮内膜症の発症メカニズムに迫る必要性があると考えている。

次に、私は上皮にフォーカスした子宮内膜症研究の基盤として、分離培養した子宮内膜症上皮細胞に Cyclin1, CDK4R24C, hTERT を導入することで不死化細胞を樹立した。これらの遺伝子は、HPV16E6E7 や SV40 T antigen と異なり、transform を起こさず、ゲノムの安定性を保ったまま不死化させることができるため、正常細胞の不死化に最適であると考えられる[39] [42] [73]。今回の検討においても、この 3 遺伝子の導入により、100 日以上培養が可能であり、不死化していることが確認された。また、これらの不死化細胞は、100 日以上の培養においても PAX8 の発現を維持しており、少なくとも一部の mullerian system 系統の上皮細胞としての性格を維持していると考えられた。また、網羅的遺伝子解析においては、不死化子宮内膜症上皮細胞 4 ラインと初代培養子宮内膜症上皮細

胞の遺伝子比較を行ったところ、有意に高発現であったのはわずか 18 遺伝子、低発現であったのはわずか 32 遺伝子であった。高発現であった遺伝子群は ontology 解析、KEGG pathway 解析により CDK4、CyclinD1(CCND1)などの導入不死化遺伝子とそれに関連する CDKN1A などの cell cycle 関連の遺伝子が高発現であり、導入遺伝子による影響と考えられる。低発現遺伝子に関しては、ontology 解析によると cell adhesion などに関連する遺伝子であった。発現に有意差のある遺伝子群が少ないことから、これらの不死化子宮内膜症上皮細胞は子宮内膜症上皮細胞の研究として十分応用可能と考えられる。

以前に、Bono らも不死化子宮内膜症上皮細胞を樹立しているが、子宮内膜症上皮細胞の分離培養をしておらず、腺管組織を pick up し、直接不死化遺伝子を導入するものであった[42]。この不死化細胞には子宮内膜症間質細胞に発現の高い CD10 の発現を認めている。Bono らは腺管細胞に直接遺伝子を導入する際、上皮細胞に間質細胞が僅かに混入し、不死化の過程で増殖能の高い間質細胞が上皮細胞より有利に増殖してしまった可能性があると考えしている[42]。一方、本研究では子宮内膜症上皮細胞の初代培養に成功し、これらの分離培養細胞に不死化遺伝子を導入した。初代培養した子宮内膜症上皮細胞においては、不死化遺伝子を導入する前に上皮マーカーである Cytokeratin、PAX8 の発現を確認しているため、間質細胞の混入はないと考える。実際に本研究で樹立した不死化

細胞はいずれも CD10 は陰性である。私の知る限り、初代分離培養した子宮内膜症上皮細胞から不死化細胞を樹立した報告はない。本研究で樹立した不死化細胞は、30 継代を越えて培養しても、PAX8 の発現を認めており、長期培養にも耐え、上皮細胞の性質を保持していると考えられる。

ARID1A は SWI-SNF クロマチンリモデリング複合体の重要な構成因子である BAF250a をコードしている。近年、卵巣明細胞癌と卵巣類内膜癌では癌抑制遺伝子である ARID1A が高頻度に変異していることが報告された[74]。また、異型子宮内膜症でも ARID1A の変異と BAF250a の消失がみられることから、これらは子宮内膜症が癌化する際の初期の事象である可能性がある[74]。本研究で樹立した不死化子宮内膜症上皮細胞は 4 株全ての細胞において、ARID1A の発現が維持されていることを示した。また、本研究と同様の 3 遺伝子を導入した過去の研究では、不死化細胞では表現型の変異はみられないことが報告されている[42]。これらの性質より、樹立した不死化子宮内膜症上皮細胞は子宮内膜症の悪性転化における研究において、有用なツールとなると考えられる。具体的には、子宮内膜症の癌化において候補となる癌遺伝子、または ARID1A 等の癌抑制遺伝子を、樹立した不死化子宮内膜症上皮細胞に遺伝子操作し、悪性転化のプロセスについて模索することが可能であると考ええる。

本研究では初代分離培養子宮内膜症性上皮細胞を用いて網羅的遺伝子解析を

行い、さらに初代培養子宮内膜上皮細胞を用いて今後の研究のツールとなる不死化細胞を 4 株樹立した。網羅的遺伝子解析で得られたデータセットを基に、不死化子宮内膜症上皮細胞を用いた *in vitro* の研究を行い、さらに免疫組織染色などの *in vivo* の研究を行うことで、これまでにない子宮内膜症の研究の基盤を構築し得た。今後の展望としては、図 23 に示す様に、子宮内膜症を発症母地とする卵巣癌の網羅的遺伝子解析のデータセットと、本研究で得られた網羅的遺伝子解析のデータセットを比較し、差異のある遺伝子を同定すること。そしてそれら遺伝子群について不死化子宮内膜症上皮細胞を用いて検討することができると予想される。さらに、不死化内膜症性上皮細胞を用いた子宮内膜症モデルの作成や癌化モデルの作成も可能と考える。

子宮内膜症研究の基盤の構築

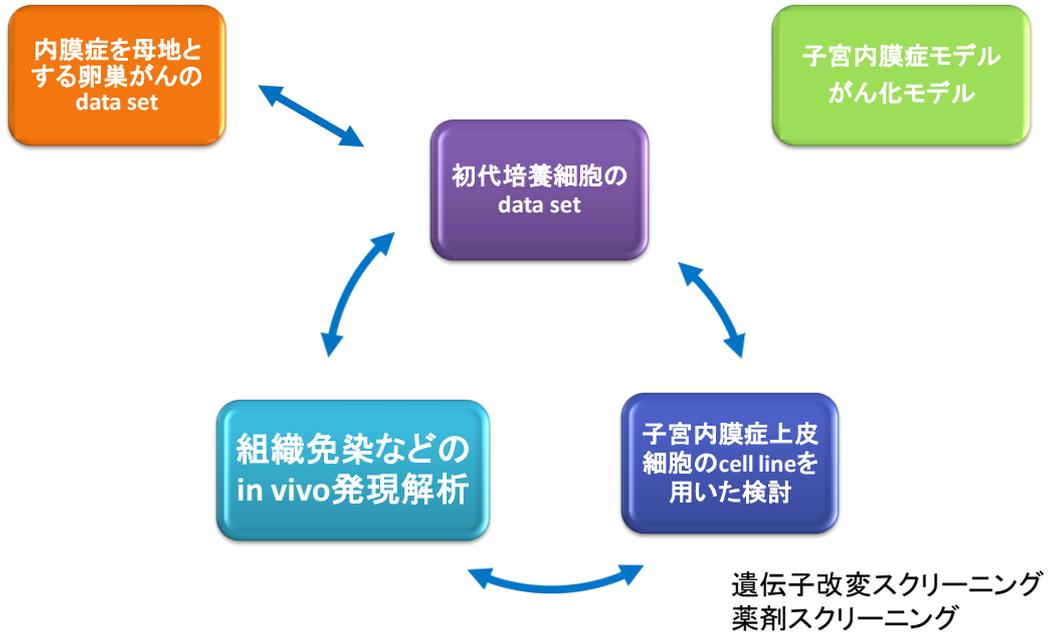


図 23. 子宮内膜症研究基盤の構築

本研究から得られた子宮内膜症研究の基盤と今後の可能性と展望。

おわりに

本研究では初代子宮内膜症上皮細胞の分離培養方法を樹立した。これらの分離培養細胞の網羅的遺伝子解析を行うことで、子宮内膜症上皮細胞のデータセットを作成し得た。またこれらの初代分離培養子宮内膜症上皮細胞を用いて不死化細胞株を4株樹立した。樹立した不死化細胞はRNAシーケンスによる発現遺伝子の比較検討にて、初代培養子宮内膜症上皮細胞と発現遺伝子の差が少なく、子宮内膜症研究の材料として十分耐え得ると考えられた。今後はこれらの子宮内膜症上皮細胞のデータセットを用いてさらなる発現遺伝子の解析を行う予定である。また、DNAメチレーション解析に関する研究はすでに開始しており、これらのデータとの比較検討を行うことでさらなる子宮内膜症の病態生理の解明に取り組む予定である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり御指導、御鞭撻を頂きました、東京大学医学部附属病院女性診療科・産科／女性外科、藤井知行教授、大須賀穰教授、慶應義塾大学システム医学教室、洪実教授、小田真由美先生、研究をサポートして下さいました福田晋也先生、鍊石和明先生をはじめとする同研究グループの先生方に心より感謝致します。また、本研究においては、研究の立案から実験手技まで様々な面において御指導頂きました平田哲也先生に深く感謝の意を表します。

参考文献

1. Giudice LC (2010) Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 362: 2389-2398.
2. Taketani Y (2001) [History and current understanding of endometriosis]. *Nihon Rinsho* 59 Suppl 1: 3-7.
3. Vercellini P, Parazzini F, Bolis G, Carinelli S, Dindelli M, et al. (1993) Endometriosis and ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 169: 181-182.
4. Takemura Y, Osuga Y, Fujimoto A, Oi N, Tsutsumi R, et al. (2013) Increased risk of placenta previa is associated with endometriosis and tubal factor infertility in assisted reproductive technology pregnancy. *Gynecol Endocrinol* 29: 113-115.
5. Leone Roberti Maggiore U, Ferrero S, Mangili G, Bergamini A, Inversetti A, et al. (2016) A systematic review on endometriosis during pregnancy: diagnosis, misdiagnosis, complications and outcomes. *Hum Reprod Update* 22: 70-103.
6. Vannuccini S, Clifton VL, Fraser IS, Taylor HS, Critchley H, et al. (2016) Infertility and reproductive disorders: impact of hormonal and inflammatory mechanisms on pregnancy outcome. *Hum Reprod*

Update 22: 104-115.

7. Sampson JA (1927) Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol* 3: 93-110.143.
8. JA. S (1940) The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis *Am J Obstet Gynecol* 40: 549-557.
9. Lauchlan SC (1972) The secondary Mullerian system. *Obstet Gynecol Surv* 27: 133-146.
10. 生駒直子 (2012) 子宮内膜症の発生に関する病理組織学的・免疫組織学的検討. *近畿大医誌 (Med J Kinki Univ)* 37.
11. Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Yoshino O, Ito M, et al. (2008) Interleukin (IL)-17A stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell proliferation of endometriotic stromal cells. *Endocrinology* 149: 1260-1267.
12. Hirata T, Osuga Y, Takamura M, Kodama A, Hirota Y, et al. (2010) Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL 20 secreted from IL-1 beta-, TNF-alpha-, and IL-17A-stimulated endometriotic stromal cells. *Endocrinology* 151: 5468-5476.

13. Cavallini A, Resta L, Caringella AM, Dinaro E, Lippolis C, et al. (2011)
Involvement of estrogen receptor-related receptors in human ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 96: 102-106.
14. Takehara M, Ueda M, Yamashita Y, Terai Y, Hung YC, et al. (2004)
Vascular endothelial growth factor A and C gene expression in endometriosis. *Hum Pathol* 35: 1369-1375.
15. Ulukus M, Ulukus EC, Tavmergen Goker EN, Tavmergen E, Zheng W, et al. (2009) Expression of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis. *Fertil Steril* 91: 687-693.
16. Sayasneh A, Tsivos D, Crawford R (2011) Endometriosis and ovarian cancer: a systematic review. *ISRN Obstet Gynecol* 2011: 140310.
17. Munksgaard PS, Blaakaer J (2011) The association between endometriosis and gynecological cancers and breast cancer: a review of epidemiological data. *Gynecol Oncol* 123: 157-163.
18. Kobayashi H (2012) [Malignant transformation of endometriosis]. *Nihon Rinsho* 70 Suppl 4: 493-497.
19. Kobayashi H (2009) Ovarian cancer in endometriosis: epidemiology, natural history, and clinical diagnosis. *Int J Clin Oncol* 14: 378-382.

20. Kobayashi H, Kajihara H, Yamada Y, Tanase Y, Kanayama S, et al. (2011)
Risk of carcinoma in women with ovarian endometrioma. *Front Biosci (Elite Ed)* 3: 529-539.
21. 小林浩 (2005) 卵巣チョコレート嚢胞と癌化. *日産婦誌* 57: N351.
22. 日本産婦人科学会 (2005) 子宮内膜症取り扱い規約 第2部治療編・診療編.
23. Kobayashi H, Sumimoto K, Moniwa N, Imai M, Takakura K, et al. (2007)
Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. *Int J Gynecol Cancer* 17: 37-43.
24. Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, et al. (2012)
Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *The Lancet Oncology* 13: 385-394.
25. Mandai M, Yamaguchi K, Matsumura N, Baba T, Konishi I (2009)
Ovarian cancer in endometriosis: molecular biology, pathology, and clinical management. *Int J Clin Oncol* 14: 383-391.
26. Scott RB (1953) Malignant changes in endometriosis. *Obstet Gynecol* 2: 283-289.

27. JA S (1925) Endometrial carcinoma of the ovary, arising in endometrial tissue in that organ. *Arch Surg* 10: 1-72.
28. Czernobilsky B, Morris WJ (1979) A histologic study of ovarian endometriosis with emphasis on hyperplastic and atypical changes. *Obstet Gynecol* 53: 318-323.
29. Eyster KM, Klinkova O, Kennedy V, Hansen KA (2007) Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. *Fertil Steril* 88: 1505-1533.
30. Yamagata Y, Nishino K, Takaki E, Sato S, Maekawa R, et al. (2014) Genome-wide DNA methylation profiling in cultured eutopic and ectopic endometrial stromal cells. *PLoS One* 9: e83612.
31. Sanchez AM, Vigano P, Somigliana E, Cioffi R, Panina-Bordignon P, et al. (2015) The endometriotic tissue lining the internal surface of endometrioma: hormonal, genetic, epigenetic status, and gene expression profile. *Reprod Sci* 22: 391-401.
32. Masters JR (2002) HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* 2: 315-319.
33. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, et al. (1998)

- Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396: 84-88.
34. Kiyono T (2007) Molecular mechanisms of cellular senescence and immortalization of human cells. *Expert Opin Ther Targets* 11: 1623-1637.
35. al BAe (2010) *Essential cell biology*.
36. Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, Iida S, Tahara H, et al. (2006) Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol* 8: 1291-1297.
37. Yang J, Chang E, Cherry AM, Bangs CD, Oei Y, et al. (1999) Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J Biol Chem* 274: 26141-26148.
38. Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, et al. (1999) Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 21: 111-114.
39. Sasaki R, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Tashiro H, et al. (2009) Oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells

- with defined cellular oncogenes. *Carcinogenesis* 30: 423-431.
40. Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, Makino H, Hatou S, et al. (2012) Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PLoS One* 7: e29677.
41. Hashimoto N, Kiyono T, Wada MR, Shimizu S, Yasumoto S, et al. (2006) Immortalization of human myogenic progenitor cell clone retaining multipotentiality. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 1383-1388.
42. Bono Y, Kyo S, Takakura M, Maida Y, Mizumoto Y, et al. (2012) Creation of immortalised epithelial cells from ovarian endometrioma. *Br J Cancer* 106: 1205-1213.
43. 二階同愛 (2014) 次世代シーケンス解析スタンダード.
44. 鈴木穰、菅野純夫 (2012) 次世代シーケンサー目的別アドバンスメソッド.
45. Tacha D, Zhou D, Cheng L (2011) Expression of PAX8 in normal and neoplastic tissues: a comprehensive immunohistochemical study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 19: 293-299.
46. Ozcan A, Liles N, Coffey D, Shen SS, Truong LD (2011) PAX2 and PAX8 expression in primary and metastatic mullerian epithelial tumors: a

- comprehensive comparison. *Am J Surg Pathol* 35: 1837-1847.
47. Bowen NJ, Logani S, Dickerson EB, Kapa LB, Akhtar M, et al. (2007) Emerging roles for PAX8 in ovarian cancer and endosalpingeal development. *Gynecol Oncol* 104: 331-337.
48. Reisman D, Glaros S, Thompson EA (2009) The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* 28: 1653-1668.
49. Van Rechem C, Boulay G, Leprince D (2009) HIC1 interacts with a specific subunit of SWI/SNF complexes, ARID1A/BAF250A. *Biochem Biophys Res Commun* 385: 586-590.
50. Gao X, Tate P, Hu P, Tjian R, Skarnes WC, et al. (2008) ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF chromatin remodeling component BAF250a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6656-6661.
51. Ho L, Crabtree GR (2010) Chromatin remodelling during development. *Nature* 463: 474-484.
52. Mao TL, Shih Ie M (2013) The roles of ARID1A in gynecologic cancer. *J Gynecol Oncol* 24: 376-381.
53. Yamamoto S, Tsuda H, Takano M, Tamai S, Matsubara O (2012) Loss of

ARID1A protein expression occurs as an early event in ovarian clear-cell carcinoma development and frequently coexists with PIK3CA mutations. *Mod Pathol* 25: 615-624.

54. McIntosh GG, Lodge AJ, Watson P, Hall AG, Wood K, et al. (1999) NCL-CD10-270: a new monoclonal antibody recognizing CD10 in paraffin-embedded tissue. *Am J Pathol* 154: 77-82.

55. Sumathi VP, McCluggage WG (2002) CD10 is useful in demonstrating endometrial stroma at ectopic sites and in confirming a diagnosis of endometriosis. *J Clin Pathol* 55: 391-392.

56. Onda T, Ban S, Shimizu M (2003) CD10 is useful in demonstrating endometrial stroma at ectopic sites and in confirming a diagnosis of endometriosis. *J Clin Pathol* 56: 79.

57. Capobianco G, Wenger JM, Marras V, Cosmi E, Ambrosini G, et al. (2013) Immunohistochemical evaluation of epithelial antigen Ber-Ep4 and CD10: new markers for endometriosis? *Eur J Gynaecol Oncol* 34: 254-256.

58. Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, Yano T, Yoshino O, et al. (2001) Demonstration of angiogenin in human endometrium and its

- enhanced expression in endometrial tissues in the secretory phase and the decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5609-5614.
59. Harada M, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Morimoto C, et al. (2005) Mechanical stretch stimulates interleukin-8 production in endometrial stromal cells: possible implications in endometrium-related events. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 1144-1148.
60. Campeau E, Ruhl VE, Rodier F, Smith CL, Rahmberg BL, et al. (2009) A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One* 4: e6529.
61. Sharov AA, Schlessinger D, Ko MS (2015) ExAtlas: An interactive online tool for meta-analysis of gene expression data. *J Bioinform Comput Biol*: 1550019.
62. Oku H, Tsuji Y, Kashiwamura SI, Adachi S, Kubota A, et al. (2004) Role of IL-18 in pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod* 19: 709-714.
63. Zhang X, Nothnick WB (2005) The role and regulation of the uterine matrix metalloproteinase system in menstruating and non-menstruating species. *Front Biosci* 10: 353-366.
64. Shang Y, Cai X, Fan D (2013) Roles of epithelial-mesenchymal transition

- in cancer drug resistance. *Curr Cancer Drug Targets* 13: 915-929.
65. Proestling K, Birner P, Gamperl S, Nirtl N, Marton E, et al. (2015) Enhanced epithelial to mesenchymal transition (EMT) and upregulated MYC in ectopic lesions contribute independently to endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 13: 75.
66. Bartley J, Julicher A, Hotz B, Mechsner S, Hotz H (2014) Epithelial to mesenchymal transition (EMT) seems to be regulated differently in endometriosis and the endometrium. *Arch Gynecol Obstet* 289: 871-881.
67. Matsuzaki S, Darcha C (2012) Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 27: 712-721.
68. Xu X, Zheng Q, Zhang Z, Zhang X, Liu R, et al. (2015) Periostin Enhances Migration, Invasion, and Adhesion of Human Endometrial Stromal Cells Through Integrin-Linked Kinase 1/Akt Signaling Pathway. *Reprod Sci* 22: 1098-1106.
69. Tan O, Ornek T, Seval Y, Sati L, Arici A (2008) Tenascin is highly

- expressed in endometriosis and its expression is upregulated by estrogen. *Fertil Steril* 89: 1082-1089.
70. Greaves E, Collins F, Esnal-Zufiaurre A, Giakoumelou S, Horne AW, et al. (2014) Estrogen receptor (ER) agonists differentially regulate neuroangiogenesis in peritoneal endometriosis via the repellent factor SLIT3. *Endocrinology* 155: 4015-4026.
71. Shen F, Liu X, Geng JG, Guo SW (2009) Increased immunoreactivity to SLIT/ROBO1 in ovarian endometriomas: a likely constituent biomarker for recurrence. *Am J Pathol* 175: 479-488.
72. Wessels JM, Kay VR, Leyland NA, Agarwal SK, Foster WG (2015) Assessing brain-derived neurotrophic factor as a novel clinical marker of endometriosis. *Fertil Steril*.
73. Ramirez RD, Sheridan S, Girard L, Sato M, Kim Y, et al. (2004) Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer Res* 64: 9027-9034.
74. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, et al. (2010) ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med* 363: 1532-1543.

Supplemental table.1

子宮内膜間質細胞に比較し、子宮内膜症間質細胞で高発現の遺伝子上位 100 遺伝子リスト

ProbeID	Fold change	z-value	p	FDR	Gene symbol	Gene name
AC105399.2	104.761	11.9596	0	0		
CTA-276O3.4	74.456	11.089	0	0		
FN1	72.661	11.0189	0	0	FN1	fibronectin 1
RPS20P10	87.257	10.6328	0	0	RPS20P10	ribosomal protein S20 pseudogene 10
RPS15A	527.473	10.145	0	0	RPS15A	ribosomal protein S15a
RPS2	136.176	9.9434	0	0	RPS2	ribosomal protein S2
ACTA2	2025.35	9.7044	0	0	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
SPARC	42.034	9.6109	0	0	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
LOX	120.976	9.567	0	0	LOX	lysyl oxidase
EEF1A1	883.283	9.3346	0	0	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
ACTB	35.481	8.9078	0	0	ACTB	actin, beta
MYH9	30.179	8.8036	0	0	MYH9	myosin, heavy chain 9, non-muscle
COL1A1	29.943	8.7414	0	0	COL1A1	collagen, type I, alpha 1
HEG1	39.838	8.5491	0	0	HEG1	heart development protein with EGF-like domains 1
SRGN	618.301	8.5269	0	0	SRGN	serglycin
THY1	27.435	8.4926	0	0	THY1	Thy-1 cell surface antigen
IGFBP3	103.467	8.4607	0	0	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
GAPDH	684.069	8.3687	0	0	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
EIF3M	72.377	8.2947	0	0	EIF3M	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M
COL1A2	24.643	8.2753	0	0	COL1A2	collagen, type I, alpha 2
CNN2	288.005	8.2656	0	0	CNN2	calponin 2
TPM1	23.747	8.1111	0	0	TPM1	tropomyosin 1 (alpha)
LDHB	24.316	8.0351	0	0	LDHB	lactate dehydrogenase B
RPL11	21.657	7.9432	0	0	RPL11	ribosomal protein L11
ACTA2-AS1	191.249	7.8511	0	0	ACTA2-AS1	ACTA2 antisense RNA 1
RPL6P27	271.644	7.834	0	0	RPL6P27	ribosomal protein L6 pseudogene 27
CD63	20.578	7.8186	0	0	CD63	CD63 molecule
SERPINE2	118.741	7.8059	0	0	SERPINE2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2
RPL4	20.109	7.6989	0	0	RPL4	ribosomal protein L4
PGM3	557.314	7.5057	0	0	PGM3	phosphoglucomutase 3
CD200	705.342	7.4598	0	0	CD200	CD200 molecule

COL3A1	17.947	7.446	0	0	COL3A1	collagen, type III, alpha 1
SGCE	52.119	7.4333	0	0	SGCE	sarcoglycan, epsilon
AC004453.8	17.705	7.3355	0	0		
THBS1	16.951	7.3015	0	0	THBS1	thrombospondin 1
VIM	18.189	7.2982	0	0	VIM	vimentin
SAMM50	39.537	7.2808	0	0	SAMM50	SAMM50 sorting and assembly machinery component
KPNB1	15.856	7.1883	0	0	KPNB1	karyopherin (importin) beta 1
RPS15AP38	62.661	7.1794	0	0	RPS15AP38	ribosomal protein S15a pseudogene 38
MORF4L2	15.948	7.1759	0	0	MORF4L2	mortality factor 4 like 2
ACTN1	15.918	7.1434	0	0	ACTN1	actinin, alpha 1
TPRN	1489.704	7.1232	0	0	TPRN	taperin
CTTN	26.074	7.0834	0	0	CTTN	cortactin
TPI1	15.29	7.04	0	0	TPI1	triosephosphate isomerase 1
TPT1	15.791	7.0272	0	0	TPT1	tumor protein, translationally-controlled 1
HIF1AP1	1000000	6.9573	0	0	HIF1AP1	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) pseudogene 1
RP11-318C24.1	83233.853	6.9427	0	0		
AC004941.5	14.625	6.8994	0	0		
PGK1	16.497	6.8403	0	0	PGK1	phosphoglycerate kinase 1
HIF1A	14.444	6.7972	0	0	HIF1A	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
PDLIM3	161.473	6.7499	0	0	PDLIM3	PDZ and LIM domain 3
ENAH	19.467	6.7219	0	0	ENAH	enabled homolog (Drosophila)
KIF5B	63.402	6.7213	0	0	KIF5B	kinesin family member 5B
ANXA5	13.668	6.7209	0	0	ANXA5	annexin A5
AC140076.1	101.93	6.7159	0	0		
ACTG2	407.005	6.6967	0	0	ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric
ACTG1	13.323	6.6502	0	0	ACTG1	actin, gamma 1
KDEL2	13.375	6.6362	0	0	KDEL2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2
RPS7	21.727	6.5878	0	0	RPS7	ribosomal protein S7
HDLBP	12.987	6.5852	0	0	HDLBP	high density lipoprotein binding protein
ITGB1	12.764	6.5802	0	0	ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
RP11-478C6.4	1000000	6.5097	0	0		
EEF2	12.612	6.5034	0	0	EEF2	eukaryotic translation elongation factor 2

TPM2	52.918	6.4699	0	0	TPM2	tropomyosin 2 (beta)
RAP1B	79.726	6.456	0	0	RAP1B	RAP1B, member of RAS oncogene family
CNN3	27.208	6.4063	0	0	CNN3	calponin 3, acidic
EIF3H	13.161	6.3833	0	0	EIF3H	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H
ASNS	74.851	6.3805	0	0	ASNS	asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)
COL6A1	13.932	6.3724	0	0	COL6A1	collagen, type VI, alpha 1
RPL10A	14.488	6.3283	0	0	RPL10A	ribosomal protein L10a
RPL4P5	172.822	6.3154	0	0	RPL4P5	ribosomal protein L4 pseudogene 5
SHFM1	11.956	6.3021	0	0	SHFM1	split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1
SELT	69.663	6.2971	0	0	SELT	selenoprotein T
GNAI2P1	11.836	6.2667	0	0	GNAI2P1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2 pseudogene 1
MRPL51	11.806	6.2626	0	0	MRPL51	mitochondrial ribosomal protein L51
DEGS1	164.059	6.2283	0	0	DEGS1	delta(4)-desaturase, sphingolipid 1
GARS	26.996	6.2114	0	0	GARS	glycyl-tRNA synthetase
IL1R1	71.203	6.2028	0	0	IL1R1	interleukin 1 receptor, type I
TGFBI	30.402	6.2026	0	0	TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
CANX	33.136	6.1926	0	0	CANX	calnexin
RP11-466H18.1	10.794	6.1407	0	0		
SERPINH1	11.122	6.1387	0	0	SERPINH1	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)
AC079742.4	413.619	6.0999	0	0		
PDIA3	14.747	6.0976	0	0	PDIA3	protein disulfide isomerase family A, member 3
AC007362.1	872.77	6.0942	0	0		
CCDC80	76.595	6.0883	0	0	CCDC80	coiled-coil domain containing 80
PTP4A2P2	452.689	6.0416	0	0	PTP4A2P2	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2 pseudogene 2
SYNPO	213.895	6.0343	0	0	SYNPO	synaptopodin
G3BP2	10.673	6.032	0	0	G3BP2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2
PLOD2	10.275	6.0192	0	0	PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
IL6ST	58.224	6.007	0	0	IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
UCHL1	529.298	5.9652	0	0	UCHL1	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)
RPS25	10.16	5.9404	0	0	RPS25	ribosomal protein S25
RPL14P1	207.683	5.9218	0	0	RPL14P1	ribosomal protein L14 pseudogene 1
CTD-2545M3.2	103681.196	5.8961	0	0		
YBX1	18.634	5.8928	0	0	YBX1	Y box binding protein 1
ITGB1P1	241.324	5.8733	0	0	ITGB1P1	integrin beta 1 pseudogene 1

RP11-570P14.1	13.561	5.8381	0	0		
GBP1	175.267	5.8355	0	0	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible
IL6STP1	508.862	5.8301	0	0	IL6STP1	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor) pseudogene 1

Supplemental table.2

子宮内膜症間質細胞に比較し、子宮内膜間質細胞で高発現の遺伝子上位 100 遺伝子リスト

ProbeID	Fold change	z-value	p	FDR	Gene symbol	Gene name
MT-TR	97073.35	17.0138	0	0		
MT-TS2	108918.1	12.6007	0	0		
MT-TL2	1000000	10.7411	0	0		
MT-TH	1000000	7.1354	0	0		
MMP3	138.644	6.5994	0	0	MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
MT-RNR2	812456.3	6.4004	0	0		
RP11-304L19.12	100.346	6.1213	0	0		
GPX3	379.402	5.4836	0	0	GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)
RP11-241F15.9	274599.7	5.2614	0	0		
CTD-2522B17.8	73231.85	5.2463	0	0.0001		
AL049542.1	87700.08	5.2127	0	0.0001		
Y_RNA	234530.9	5.1141	0	0.0001		
MIR148B	305351.5	4.9619	0	0.0002	MIR148B	microRNA 148b
RNU2-61P	115637.8	4.8583	0	0.0003		
AC114755.2	19502.94	4.8144	0	0.0003		
ROCK1P1	40.841	4.8113	0	0.0003	ROCK1P1	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 pseudogene 1
HYDIN	25.96	4.7976	0	0.0003	HYDIN	HYDIN, axonemal central pair apparatus protein
CTD-2328D6.1	10.361	4.7556	0	0.0004		
IGHVII-43-1	57822.92	4.7418	0	0.0004	IGHVII-43-1	immunoglobulin heavy variable (II)-43-1 (pseudogene)
SNRPGP1	12947.92	4.7222	0	0.0005	SNRPGP1	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G pseudogene 1
CRIP1P2	579.029	4.6562	0	0.0006	CRIP1P2	cysteine-rich protein 1 (intestinal) pseudogene 2
RNA5SP133	8976.355	4.6506	0	0.0006	RNA5SP133	RNA, 5S ribosomal pseudogene 133
TAF13P2	86297.86	4.6214	0	0.0007	TAF13P2	TAF13 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 18kDa pseudogene 2
SNORA71	50640.74	4.6036	0	0.0007		
KDM6B	446.375	4.4461	0	0.0013	KDM6B	lysine (K)-specific demethylase 6B

RNU2-22P	48528.85	4.361	0	0.0018		
SCN3A	27396.81	4.304	0	0.0022	SCN3A	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit
GHRHR	63182.97	4.2594	0	0.0026	GHRHR	growth hormone releasing hormone receptor
RP11-343K8.3	53333.49	4.242	0	0.0028		
RNU6-388P	110433.3	4.2222	0	0.0029		
PRSS3	16653.29	4.2139	0	0.003	PRSS3	protease, serine, 3
RPL31P47	30450.89	4.1729	0	0.0035	RPL31P47	ribosomal protein L31 pseudogene 47
LINC00362	127732.1	4.1694	0	0.0035	LINC00362	long intergenic non-protein coding RNA 362
AC005176.3	106291.9	4.1632	0	0.0036		
OSBPL10-AS1	126882	4.1517	0	0.0037	OSBPL10-AS1	OSBPL10 antisense RNA 1
NLRC5	16.185	4.1123	0	0.0042	NLRC5	NLR family, CARD domain containing 5
MAPKBP1	22.055	4.1005	0	0.0044	MAPKBP1	mitogen-activated protein kinase binding protein 1
RP11-1281K21.3	134617	4.0915	0	0.0045		
MLLT10P2	26363.31	4.0785	0	0.0047		
LINC00969	14.997	4.0584	0	0.0051	LINC00969	long intergenic non-protein coding RNA 969
TIMM8BP1	10452.01	4.0494	1E-04	0.0052	TIMM8BP1	translocase of inner mitochondrial membrane 8B pseudogene 1
ABHD6	63533.09	4.0478	1E-04	0.0053	ABHD6	abhydrolase domain containing 6
GZMK	53678.45	4.037	1E-04	0.0054	GZMK	granzyme K (granzyme 3; tryptase II)
HMG1P7	45352.37	4.0148	1E-04	0.0058	HMG1P7	high mobility group nucleosome binding domain 1 pseudogene 7
RP11-646J21.4	104833.5	4.0048	1E-04	0.006		
RN7SKP42	604.923	3.9893	1E-04	0.0063		
MRPL57P7	29908.87	3.9859	1E-04	0.0064	MRPL57P7	mitochondrial ribosomal protein L57 pseudogene 7
RGS12	19.472	3.9736	1E-04	0.0066	RGS12	regulator of G-protein signaling 12
MLLT10P1	3863.67	3.9726	1E-04	0.0067	MLLT10P1	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10 pseudogene 1
FAM182B	5688.529	3.9709	1E-04	0.0067	FAM182B	family with sequence similarity 182, member B
BTNL9	35645.11	3.9658	1E-04	0.0068	BTNL9	butyrophilin-like 9
SHD	8495.716	3.9645	1E-04	0.0068	SHD	Src homology 2 domain containing transforming protein D
RP3-348I23.3	48428.39	3.9564	1E-04	0.007		

RP3-399L15.3	63226.63	3.9479	1E-04	0.0072	RP3-399L15.3	uncharacterized LOC101927768
RN7SL762P	19462.56	3.8993	1E-04	0.0084		
FANCG	34.222	3.8906	1E-04	0.0086	FANCG	Fanconi anemia, complementation group G
LINC01208	19943.44	3.8891	1E-04	0.0086	LINC01208	long intergenic non-protein coding RNA 1208
KSR1	19.93	3.876	1E-04	0.0089	KSR1	kinase suppressor of ras 1
PIK3R1	14.415	3.8723	1E-04	0.009	PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
LYNX1	6884.937	3.8641	1E-04	0.0092	LYNX1	Ly6/neurotoxin 1
RNU6-484P	57836.23	3.8625	1E-04	0.0092		
CTC-340A15.2	25480.03	3.8608	1E-04	0.0092		
WDR52	16.47	3.8556	1E-04	0.0094	WDR52	WD repeat domain 52
RP11-10D7.2	20854.51	3.8536	1E-04	0.0095		
PRKCH	16.331	3.8415	1E-04	0.0098	PRKCH	protein kinase C, eta
GRIN2A	17926.69	3.8411	1E-04	0.0098	GRIN2A	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A
RN7SL757P	26157.73	3.8402	1E-04	0.0098		
CARNS1	13034.67	3.8371	1E-04	0.0098	CARNS1	carosine synthase 1
snR65	52747.27	3.8051	1E-04	0.0108		
RP11-448G4.4	58357.95	3.79	2E-04	0.0113		
ST8SIA1	31.017	3.7826	2E-04	0.0115	ST8SIA1	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1
RN7SL155P	29546.09	3.7712	2E-04	0.0119		
EPS8L3	21622.21	3.7701	2E-04	0.0119	EPS8L3	EPS8-like 3
AGAP3	12.9	3.7539	2E-04	0.0124	AGAP3	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 3
RN7SKP248	15609.9	3.7486	2E-04	0.0126		
ARHGEF1	16.136	3.7404	2E-04	0.0129	ARHGEF1	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1
LINC00877	26601.13	3.7301	2E-04	0.0133	LINC00877	long intergenic non-protein coding RNA 877
YWHAEP4	8066.776	3.7184	2E-04	0.0139		
CCDC57	12.788	3.7067	2E-04	0.0143	CCDC57	coiled-coil domain containing 57
MAN2C1	15.495	3.705	2E-04	0.0144	MAN2C1	mannosidase, alpha, class 2C, member 1
RN7SL547P	24417.43	3.7035	2E-04	0.0144		
SAG	26019.56	3.691	2E-04	0.015	SAG	S-antigen; retina and pineal gland (arrestin)
STAB2	28595.65	3.6888	2E-04	0.015	STAB2	stabilin 2
CTC-507E2.2	5957.993	3.6799	2E-04	0.0154		

SNHG1	8.756	3.6789	2E-04	0.0155	SNHG1	small nucleolar RNA host gene 1 (non-protein coding)
RP11-113K21.3	22454.33	3.6761	2E-04	0.0156		
ATP5J2P6	8997.047	3.6718	2E-04	0.0157	ATP5J2P6	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F2 pseudogene 6
RNU2-43P	26607.25	3.664	2E-04	0.0162		
RN7SL436P	13870.75	3.6623	2E-04	0.0162		
ARPP21	1399.91	3.6621	3E-04	0.0162	ARPP21	cAMP-regulated phosphoprotein, 21kDa
CCDC144NL	27688.54	3.6577	3E-04	0.0164	CCDC144NL	coiled-coil domain containing 144 family, N-terminal like
ANO9	27.542	3.6528	3E-04	0.0166	ANO9	anoctamin 9
AC098784.1	3477.763	3.6291	3E-04	0.0177		
KLHDC4	15.115	3.6211	3E-04	0.0181	KLHDC4	kelch domain containing 4
GNAO1	90.615	3.6205	3E-04	0.0181	GNAO1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide O
RP11-495P10.4	23356.08	3.6194	3E-04	0.0181		
GRM7	74.131	3.6176	3E-04	0.0182	GRM7	glutamate receptor, metabotropic 7
MYO15B	15.226	3.6056	3E-04	0.0188	MYO15B	myosin XVB pseudogene
ST8SIA5	41667.75	3.6053	3E-04	0.0188	ST8SIA5	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 5
RP11-445P19.2	11447.22	3.5959	3E-04	0.0192		

Supplemental table.3

GSE47361(yamagata et al.)を再解析し、子宮内膜症間質に高発現であった遺伝子リスト上位 100 遺伝子

ProbeID	Fold change	z-value	p	FDR	Gene symbol	Gene name
8150253	50.513	26.6351	0	0	STAR	steroidogenic acute regulatory protein
7903358	41.314	23.9324	0	0	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
8066925	76.542	21.6027	0	0	PTGIS	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase
8151369	17.89	19.2027	0	0	SBSPON	somatomedin B and thrombospondin, type 1 domain containing
8144880	14.894	18.3416	0	0	SH2D4A	SH2 domain containing 4A
8168622	17.191	18.0187	0	0	KLHL4	kelch-like family member 4
8122176	15.241	16.952	0	0	TCF21	transcription factor 21
8081657	35.884	16.9301	0	0	CD200	CD200 molecule
8059350	12.207	15.9518	0	0	AP1S3	adaptor-related protein complex 1, sigma 3 subunit
7936050	10.483	15.8127	0	0	CYP17A1	cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1
8160431	10.375	14.972	0	0	MIR31HG	MIR31 host gene (non-protein coding)
7962212	14.818	14.5053	0	0	PKP2	plakophilin 2
7904025	8.876	14.3931	0	0	WNT2B	wingless-type MMTV integration site family, member 2B
8094028	9.337	14.1518	0	0	AFAP1-AS1	AFAP1 antisense RNA 1///actin filament associated protein 1
8005134	7.757	13.6474	0	0	ADORA2B	adenosine A2b receptor
8104022	14.444	13.6435	0	0	PDLIM3	PDZ and LIM domain 3
8113790	9.236	13.4605	0	0	42066	membrane-associated ring finger (C3HC4) 3, E3 ubiquitin protein ligase
8108912	7.442	13.4586	0	0	SH3RF2	SH3 domain containing ring finger 2
8057797	7.393	12.8237	0	0	SDPR	serum deprivation response
8144656	7.171	12.6496	0	0	C8orf49	chromosome 8 open reading frame 49
7912520	9.38	12.4888	0	0	NPPB	natriuretic peptide B
8147837	5.583	12.4139	0	0	ZFPM2	zinc finger protein, FOG family member 2

7947230	6.276	11.8324	0	0	BDNF	brain-derived neurotrophic factor
7921916	22.636	11.7256	0	0	RGS5	regulator of G-protein signaling 5
7961540	12.924	11.6699	0	0	RERG	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor
8144786	5.939	11.5594	0	0	SLC7A2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2
7947199	5.893	11.5021	0	0	LGR4	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4
8040430	6.142	11.4985	0	0	VSNL1	visinin-like 1
8060997	6.095	11.4504	0	0	SPTLC3	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 3
8114249	6.034	11.4227	0	0	CXCL14	chemokine (C-X-C motif) ligand 14
8020495	5.595	11.3316	0	0	CABLES1	Cdk5 and Abl enzyme substrate 1
7940530	5.63	11.2442	0	0	MYRF	myelin regulatory factor
8122222	5.028	10.9674	0	0	PDE7B	phosphodiesterase 7B
8156199	11.238	10.9484	0	0	DAPK1	death-associated protein kinase 1
8144643	5.463	10.8724	0	0	GATA4	GATA binding protein 4
8098611	9.139	10.8281	0	0	TLR3	toll-like receptor 3
8090193	3.296	10.7893	0	0	HEG1	heart development protein with EGF-like domains 1
8064808	4.554	10.7876	0	0	SLC23A2	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2
8020455	4.681	10.5918	0	0	GATA6	GATA binding protein 6
8140358	6.874	10.5729	0	0	CCL26	chemokine (C-C motif) ligand 26
7925929	5.305	10.5708	0	0	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3
8030563	6.283	10.5447	0	0		
7927280	9.024	10.5282	0	0	NPY4R	neuropeptide Y receptor Y4
8072229	4.871	10.296	0	0	NEFH	neurofilament, heavy polypeptide
8051583	4.313	10.1845	0	0	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
8041582	4.375	10.1478	0	0	PKDCC	protein kinase domain containing, cytoplasmic
8147516	4.592	10.1367	0	0	MATN2	matrilin 2

8063458	8.138	10.0243	0	0	DOK5	docking protein 5
7955797	4.495	9.9943	0	0	AMHR2	anti-Mullerian hormone receptor, type II
7940775	4.878	9.9697	0	0	RARRES3	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3
8092095	8.574	9.7346	0	0	TNIK	TRAF2 and NCK interacting kinase
8049435	3.475	9.7166	0	0	SH3BP4	SH3-domain binding protein 4
8099721	8.531	9.7116	0	0	SEL1L3	sel-1 suppressor of lin-12-like 3 (C. elegans)
8175234	5.351	9.5561	0	0	GPC3	glypican 3
8066939	2.752	9.3511	0	0	B4GALT5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5
7917779	5.489	9.1548	0	0	GCLM	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
8090214	6.352	9.1086	0	0	SLC12A8	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 8
7908161	3.863	9.0453	0	0	C1orf21	chromosome 1 open reading frame 21
8097867	8.006	8.9582	0	0	KIAA0922	KIAA0922
8122860	5.797	8.8274	0	0	MYCT1	myc target 1
8089785	5.42	8.8267	0	0	POPDC2	popeye domain containing 2
8065071	3.895	8.735	0	0	FLRT3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3
8117243	4.55	8.6362	0	0	LRRC16A	leucine rich repeat containing 16A
8007493	4.004	8.6292	0	0	ARL4D	ADP-ribosylation factor-like 4D
8138602	3.374	8.5685	0	0	DFNA5	deafness, autosomal dominant 5
7914557	3.806	8.5497	0	0	SYNC	syncollin, intermediate filament protein
8161865	8.614	8.5372	0	0	PRUNE2	prune homolog 2 (Drosophila)
7944769	3.723	8.5152	0	0	GRAMD1B	GRAM domain containing 1B
8136200	10.342	8.4055	0	0	CPA4	carboxypeptidase A4
8161884	10.361	8.392	0	0	PRUNE2	prune homolog 2 (Drosophila)
8154725	6.314	8.2965	0	0	KRT18	keratin 18
7936494	5.286	8.2918	0	0	GFRA1	GDNF family receptor alpha 1

7955887	3.68	8.2545	0	0	HOXC5	homeobox C5
8149877	5.92	8.2164	0	0	PNMA2	paraneoplastic Ma antigen 2
8035304	11.822	8.1745	0	0	BST2	bone marrow stromal cell antigen 2
7969574	6.285	8.0273	0	0	MIR622	microRNA 622//keratin 18
8101992	5.125	8.0101	0	0	SLC39A8	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8
8077376	3.276	7.9942	0	0	ITPR1	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1
8089145	22.233	7.9916	0	0	ABI3BP	ABI family, member 3 (NESH) binding protein
7908488	8.108	7.9746	0	0	CFHR1	complement factor H-related 1
7959102	3.441	7.9741	0	0	HSPB8	heat shock 22kDa protein 8
8001784	3.662	7.96	0	0	CDH8	cadherin 8, type 2
8148059	7.521	7.9191	0	0	DEPTOR	DEP domain containing MTOR-interacting protein
7901951	3.903	7.8471	0	0	PGM1	phosphoglucomutase 1
8052355	15.485	7.8434	0	0	EFEMP1	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
7955873	3.321	7.8411	0	0	HOXC6	homeobox C6//homeobox C5//homeobox C4
8096440	3.987	7.8238	0	0	GRID2	glutamate receptor, ionotropic, delta 2
8163109	4.039	7.7093	0	0	FRRS1L	ferric-chelate reductase 1-like
7961399	6.148	7.6193	0	0	GSG1	germ cell associated 1
7976451	3.304	7.5704	0	0	PPP4R4	protein phosphatase 4, regulatory subunit 4
7996819	4.356	7.5397	0	0	CDH3	cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)
8105302	16.881	7.5363	0	0	FST	follicle-stimulating hormone receptor 1
8094228	3.675	7.534	0	0	BST1	bone marrow stromal cell antigen 1
7968883	6.778	7.5106	0	0	LACC1	laccase (multicopper oxidoreductase) domain containing 1
7955637	4.634	7.4978	0	0	KRT18	keratin 18
8084630	4.538	7.4308	0	0	LOC344887	NmrA-like family domain containing 1 pseudogene
8131614	2.722	7.3512	0	0	AHR	aryl hydrocarbon receptor
7910387	2.951	7.3135	0	0	RHOU	ras homolog family member U

8109490	4.918	7.3105	0	0	SGCD	sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)
8117034	3.033	7.2608	0	0	GMPR	guanosine monophosphate reductase

Supplemental table.4

GSE47361(yamagata et al.)を再解析し、子宮内膜間質に高発現であった遺伝子リスト上位
100 遺伝子

ProbeID	Fold change	z-value	p	FDR	Gene symbol	Gene name
8088180	16.051	19.7782	0	0	WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A
7951259	55.233	18.8746	0	0	MMP10	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)
7990309	13.363	17.8355	0	0	STRA6	stimulated by retinoic acid 6
8121257	27.315	16.9576	0	0	PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain
8104570	11.495	16.6232	0	0	FAM105A	family with sequence similarity 105, member A
8138765	10.177	15.1216	0	0	HOXA11	homeobox A11
7925320	5.479	15.0007	0	0	NID1	nidogen 1
8102792	6.586	14.175	0	0	PCDH18	protocadherin 18
8138749	8.73	13.9811	0	0	HOXA9	homeobox A9
8001387	5.99	13.4415	0	0	SALL1	sal-like 1 (Drosophila)
7951284	82.3	13.3941	0	0	MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
8081001	19.297	13.0221	0	0	ROBO2	roundabout, axon guidance receptor, homolog 2 (Drosophila)
8046906	5.32	12.3945	0	0	GULP1	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1
8083494	9.198	12.1608	0	0		
8108688	6.289	11.7302	0	0	PCDHB3	protocadherin beta 3
7966690	4.567	11.5435	0	0	TBX3	T-box 3
8023598	5.89	11.4609	0	0	RNF152	ring finger protein 152
8108693	5.396	11.3507	0	0	PCDHB4	protocadherin beta 4
8077323	5.995	11.3454	0	0	CNTN4	contactin 4
7902127	18.621	11.1991	0	0	SGIP1	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1
7976560	5.653	11.1774	0	0	BDKRB2	bradykinin receptor B2
8107594	6.38	10.6645	0	0	SNCAIP	synuclein, alpha interacting protein
7995681	2.73	10.577	0	0	MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
7905220	4.639	10.4329	0	0		
7949588	4.407	10.3538	0	0	CD248	CD248 molecule, endosialin
8065412	46.196	10.2732	0	0	CST1	cystatin SN
7924071	6.958	10.1869	0	0	KCNH1	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 1

8091600	5.394	10.0964	0	0	PLCH1	phospholipase C, eta 1
8046536	17.486	10.0075	0	0	HOXD10	homeobox D10
8134869	2.762	9.8067	0	0	PCOLCE	procollagen C-endopeptidase enhancer
8063536	12.729	9.6619	0	0	TFAP2C	transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)
7972750	3.713	9.6573	0	0	COL4A1	collagen, type IV, alpha 1
7951271	37.334	9.6555	0	0	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)
8071758	11.97	9.6525	0	0	MMP11	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)
8127563	2.353	9.4109	0	0	COL12A1	collagen, type XII, alpha 1
8163618	8.511	9.4088	0	0	TNFSF15	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15
8090469	4.179	9.1826	0	0	GATA2	GATA binding protein 2
7915682	4.109	9.1232	0	0	ZSWIM5	zinc finger, SWIM-type containing 5
8142981	5.69	9.0805	0	0	PODXL	podocalyxin-like
8138741	5.286	9.0352	0	0	HOXA6	homeobox A6
7933842	8.464	9.0139	0	0	TMEM26	transmembrane protein 26
8108720	4.433	8.9552	0	0	PCDHB9	protocadherin beta 9
8103399	3.512	8.8902	0	0	PDGFC	platelet derived growth factor C
8046815	3.865	8.7181	0	0	ZNF804A	zinc finger protein 804A
8152297	5.494	8.5294	0	0	ANGPT1	angiopoietin 1
7928705	3.056	8.4527	0	0	TSPAN14	tetraspanin 14
7947512	3.567	8.3121	0	0	PAMR1	peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1
7918457	4.943	8.3008	0	0	KCNA3	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3
7978285	3.62	8.2964	0	0	ADCY4	adenylate cyclase 4
8015806	3.741	8.2835	0	0	ETV4	ets variant 4
8106761	3.364	8.283	0	0		
8108697	3.163	8.1995	0	0	PCDHB5	protocadherin beta 5
8109383	5.275	8.1409	0	0	GRIA1	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1
8105229	4.124	8.0758	0	0	PELO	pelota homolog (Drosophila)//integrin, alpha 1
8108744	4.854	8.0467	0	0	PCDHB14	protocadherin beta 14
8016094	3.37	7.972	0	0	GJC1	gap junction protein, gamma 1, 45kDa
7902104	3.178	7.9704	0	0	PDE4B	phosphodiesterase 4B, cAMP-specific
8058063	5.677	7.9335	0	0	RFTN2	raftlin family member 2
7925257	3.381	7.9182	0	0	LYST	lysosomal trafficking regulator
8090433	3.733	7.8733	0	0	MGLL	monoglyceride lipase

8020141	4.381	7.856	0	0	APCDD1	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1
7992293	3.022	7.7966	0	0	TMEM204	transmembrane protein 204
7957338	3.288	7.7926	0	0	SYT1	synaptotagmin I
7935613	8.151	7.7665	0	0	HPSE2	heparanase 2
7956522	3.156	7.7491	0	0	KIF5A	kinesin family member 5A
7970033	3.069	7.7438	0	0	COL4A2	collagen, type IV, alpha 2
7934553	2.858	7.6968	0	0	ZNF503-AS2	ZNF503 antisense RNA 2///zinc finger protein 503
8116780	5.465	7.6444	0	0	DSP	desmoplakin
8143397	3.295	7.6139	0	0	DENND2A	DENN/MADD domain containing 2A
8000480	3.332	7.5801	0	0		
8151686	3.515	7.563	0	0	MMP16	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)
8046530	3.191	7.4909	0	0	HOXD11	homeobox D11
8108683	4.997	7.4694	0	0	PCDHB2	protocadherin beta 2
7966122	3.65	7.3897	0	0	TMEM119	transmembrane protein 119
8098344	3.202	7.3408	0	0		
8015268	12.996	7.3354	0	0	KRT34	keratin 34
7899615	3.727	7.3311	0	0	SERINC2	serine incorporator 2
8059470	3.524	7.274	0	0	IRS1	insulin receptor substrate 1
7896709	5.116	7.2674	0	0		
7927389	2.685	7.2446	0	0		
8049187	4.331	7.2197	0	0	EFHD1	EF-hand domain family, member D1
8154233	3.122	7.2192	0	0	CD274	CD274 molecule
8138745	3.391	7.2165	0	0	HOXA7	homeobox A7
8151684	4.271	7.1922	0	0		
7922328	3.381	7.1376	0	0	MIR199A2	microRNA 199a-2
7972239	9.074	7.0938	0	0	SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6
8123936	2.901	7.0778	0	0		
8021470	2.638	7.0693	0	0	PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
8026490	26.278	7.0619	0	0	UCA1	urothelial cancer associated 1 (non-protein coding)
8148580	2.815	7.0502	0	0	C8orf31	chromosome 8 open reading frame 31
7993889	2.745	7.0171	0	0	C16orf52	chromosome 16 open reading frame 52
8102950	2.793	6.9867	0	0	INPP4B	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa
7946245	5.034	6.9859	0	0	DCHS1	dachsous 1 (Drosophila)
8046695	3.643	6.9446	0	0	CERKL	ceramide kinase-like///integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)

8084206	2.724	6.9377	0	0		
7971565	3.514	6.8683	0	0	LPAR6	lysophosphatidic acid receptor 6
8168589	2.951	6.8557	0	0	ZNF711	zinc finger protein 711
7929012	2.587	6.8327	0	0	STAMBPL1	STAM binding protein-like 1
7947496	3.214	6.8007	0	0	SLC1A2	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
8115099	3.141	6.7994	0	0	PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide