

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09254

研究課題名（和文）子宮内膜癌におけるPPP2R1A遺伝子変異の意義の検討

研究課題名（英文）Investigation of the significance of PPP2R1A mutation in endometrial carcinoma

研究代表者

布施谷 千穂（FUSEYA, Chiho）

信州大学・医学部附属病院・助教（診療）

研究者番号：50447736

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：PPP2R1Aを含むPP2A複合体と同様の標的因子をリン酸化して活性化し、PP2Aと拮抗的に作用するPIM1の発現について子宮内膜癌で検討すると、予後不良の漿液性癌（USC）で特に高発現し、PIM1高発現例の全生存期間が有意に短縮していた。In vitroではPIM1発現抑制（PIM1-siRNA）によりUSC細胞の生存率が低下し、遊走能や浸潤能も低下した。さらにPIM1 inhibitor（SGI-1776）添加により、USC細胞の増殖能、遊走能、浸潤能の抑制が観察された。またマウス皮下に移植したUSC細胞株ARK1の異種移植片腫瘍は、SGI-1776投与により有意に腫瘍増大が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果はPPP2R1Aを含むPP2A複合体、および、それと拮抗的に作用するPIM1が子宮内膜癌の予後不良組織型である漿液性癌（SC）の悪性度上昇や予後に関連することを示した最初の報告であり、SCに対する新規治療につながる可能性がある意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：PPP2R1A is a component of the PP2A complex, which dephosphorylates and represses oncogenes. PIM1 is an opposite factor of PP2A that phosphorylates target factors. We investigated the expression of PIM1 in endometrial carcinoma and found that PIM1 was strong in serous carcinoma (USC), with a significantly shorter overall survival in cases with high PIM1 expression. Suppression of PIM1 expression (PIM1-siRNA) reduced USC cell viability, migration, and invasion in vitro. Inhibition of PIM1 by PIM1 inhibitor (SGI-1776) also reduced cellular functions of USC cell lines. Oral administration with SGI-1776 significantly inhibited tumor growth in USC cell line ARK1 xenograft tumors transplanted subcutaneously in mice.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：PIM1 PPP2R1A PP2A 子宮内膜癌 子宮内膜漿液性癌 リン酸化脱リン酸化

1. 研究開始当初の背景

わが国では子宮内膜癌 (EMC) の罹患数・死亡数とも急速に増加しているが、有効な分子標的薬が少なく、薬物療法の選択肢が限定されている。EMC は比較的予後良好とされるが、約 2 割を占める漿液性癌 (SC) や癌肉腫 (CS) は、抗がん剤抵抗性で悪性度が高く、特に予後不良であり、これらに対する有効な治療法の開発は極めて重要な課題である。

PPP2R1A は PP2A (protein phosphatase 2A) 3 量複合体の機能調節 subunit をコードする遺伝子である。MYC などのがん遺伝子や増殖因子受容体、サイトカイン受容体、それらに連なるシグナル経路 (PI3K 経路、MAPK 経路、JAK-STAT 経路など) はリン酸化によって活性化されるが、PP2A はこれらを脱リン酸化することにより陰性に制御する。PPP2R1A 変異では PP2A 機能低下によりこれらの経路の活性化から癌化を引き起こすと考えられる [1]。我々の米国での共同研究者 (Shih IM and Wang TL) らは、PPP2R1A 変異が EMC で比較的高頻度に認められるが、悪性度の高い SC では 19.2% であり、類内膜癌 (6.7%) に比較して高頻度であることを報告した [2]。他の研究グループや The Cancer Genome Atlas (TCGA) の統合的ゲノム解析も同様の結果を報告している [3,4]、さらに TCGA は、より悪性度の高い CS で PPP2R1A 変異が 28% と高頻度であることも報告している [5]。

Haesen らは PPP2R1A 野生型 (WT) EMC 細胞株 HEC1A に PPP2R1A 変異を導入すると造腫瘍能が増強することを報告しており [1]、これらの研究結果は、PPP2R1A 変異が EMC の悪性度上昇や抗がん剤耐性に関与することを示唆しており、治療標的として有望と考えられる。

一方、PIM1 は JAK-STAT 経路で活性化され、PP2A とは逆にリン酸化によりがん遺伝子活性化に作用し、標的遺伝子も PP2A と重なることから PP2A とは拮抗する作用を有する因子であり (図 1) 乳癌など多くの癌で高発現が報告されている [6]。これらの因子について、SC での機能を検討することは、新規治療法につながる可能性があり、意義が大きい。

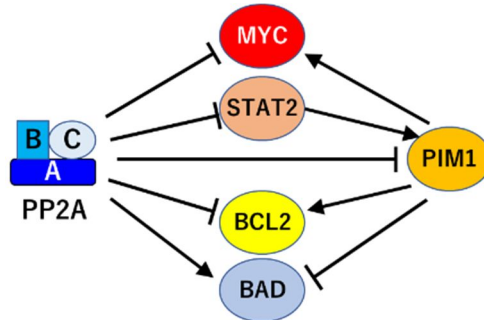


図 1 : PP2A の脱リン酸化と PIM1 のリン酸化により、両者はこれらの因子に対し、互いに拮抗する作用を示す。

2. 研究の目的

SC 細胞における PPP2R1A 変異および PP2A に拮抗する PIM1 の、細胞機能 (増殖能、浸潤能、造腫瘍能、抗がん剤耐性など) への影響、その分子機構を解明することを目的とする。最終的にはこれらの因子を標的とした SC の新規治療法開発を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 子宮内膜腺上皮特異的に Ppp2r1a 変異タンパク発現を誘導するマウスモデルの検討
我々の共同研究者の Shih らは、子宮内膜腺上皮や卵管上皮の腺細胞特異的に発現する Pax8 の promoter 配列に連動した Tet-On Cre システムと floxed-STOP cassette 下流に 1 塩基置換の変異 Ppp2r1a 遺伝子 (Ppp2r1a-mut) を組み込むことで doxycycline (DOX) 投与で子宮内膜特異的に Ppp2r1a-mut を発現する遺伝子改変マウスを作成した。このマウスに DOX を投与し、子宮内膜の表現型の変化を観察した。また、子宮内膜腺上皮細胞のみを分離し、mRNA の sequencing によって Ppp2r1a-mut が発現しているか確認した。
- (2) PIM1 の EMC における発現の検討
信州大学で子宮全摘術された EMC 133 例、うち類内膜癌 (EC) 103 例、SC 30 例の組織切片を PIM1 抗体で免疫染色を行い、核染色の染色強度を H-score = [1 × (% 弱染色核) + 2 × (% 中等度染色核) + 3 × (% 強染色核)] で示した。H-score と予後との相関を検討した。また、TCGA での遺伝子発現データから PIM1 mRNA 発現と予後の関係を検討した。またリン酸化 MYC の H-score との相関性も観察した。
- (3) SC 細胞株を用いた検討
SC 細胞株 ARK1, ARK2, SPAC-1L, SPEC2 を用いた。siRNA 法で PIM1 発現を抑制し、細胞生存能・増殖能を WST-1 assay で検討した。また遊走能は trans-well migration assay、浸潤能を matrigel invasion assay で検討を行った。また、PIM1 inhibitor である SGI-1776 を培養液に添加し、同様に細胞機能を検討した。
- (4) ノードマウス皮下異種移植腫瘍での検討
ノードマウス腰背部皮下に SC 細胞株 ARK1 を接種し、異種移植片腫瘍を形成させた。SGI-1776 75mg/kg 週 5 回経口投与 (SGI-1776 群) と溶媒のみ経口投与の Control 群で投与開始から 3 週間後 (D-22) まで腫瘍径を測定し D-22 に腫瘍を摘出し重さや病理像などを検討した。また、マウスの健康状態は体重変化と、肝臓・腎臓の臓器障害の有無を病理学的に検討した。

4. 研究成果

- (1) マウスモデルの確認

同様の Pax8 に連動した Tet-On および Cre-loxP システムを用いることで、子宮内膜腺上皮特異的に遺伝子ノックアウト (KO) を誘導することに成功している [7]。DOX 経口投与により、Ppp2r1a-KO を誘導したが、何の病変も誘導されなかった。さらに子宮内膜腺上皮のみを分離して RNA 抽出を行い、Ppp2r1a mRNA の sequencing をしたが、Ppp2r1a-mut 配列は確認できなかった。Cre の発現は確認できており、floxed-STOP cassette 切り出しによる、Ppp2r1a-mut 発現が上手く機能していないと思われた。よって、以後の実験にこのマウスは用いていない。

(2) PIM1 高発現と予後

EMC においては、PIM1 は EC よりも SC に強く発現する傾向を認めた (図 1 A, B)。H-score 140 (EMC 全体での 90 パーセンタイル、SC のみの 75 パーセンタイルに相当) で高発現 (PIM1-high) と低発現 (PIM1-low) に分類したところ、PIM1-high は EMC 全体、SC のみのいずれにおいても生存期間の有意な短縮が認められた (図 1 C, D)。多変量解析においても PIM1 高発現は病期、期と並び、独立した予後不良因子であった。さらに、TCGA の mRNA 発現解析を用いた EMC の検討では、PIM1 高発現は低発現例に比較して、有意に予後不良であった。PP2A と PIM1 の共通の標的因子として MYC が注目されているが (図 1)、PIM1 とリン酸化 MYC (pMYC) の H-score は高い相関性を示し (spearman's rank correlation coefficient, $\rho = 0.638$, $P < 0.001$) また高発現部位も腫瘍の辺縁部位で特に発現が強いなど、よく一致していた。

(3) PIM1 抑制と細胞機能変化

siRNA 法により SC 細胞株での PIM1 発現を抑制した。図 3 に代表例として ARK1 細胞での結果を示す。PIM1 発現抑制により pMYC 発現も減弱が観察される。PIM1 抑制により細胞増殖は有意に抑制され、遊走細胞数、浸潤細胞数も有意に減少した。

次に PIM1 inhibitor SGI-1776 添加では、siRNA 同様に pMYC 発現は減弱する。SGI-1776 添加 72 時間後に、すべての SC 細胞株で生存細胞が減少したが、特に ARK1、ARK2、SPEC2 では濃度依存的であり、IC50 値は 1~5 μ M の間であった。また ARK1 細胞において、生存細胞数減少が起きない添加 24 時間後の段階で遊走細胞数、浸潤細胞数も濃度依存的に有意な減少を認めた。

(4) PIM1 阻害剤のヌードマウス異種移植腫瘍への効果

ARK1 細胞をヌードマウス皮下に接種して形成された異種移植腫瘍の検討では、D-22 での Control 群の腫瘍重量の平均が 187mg であったのに対し、SGI-1776 投与群では、18mg ($p < 0.01$) であり、有意に腫瘍増大が抑制された。また病理像では形成された腫瘍は SC の像を呈し、Control 群と比較し、SGI-1776 投与群では、腫瘍間質が多く、生存がん細胞がまばらに存在していた。両群で体重増加に変化はなく、肝臓や腎臓の病理像にも差は止められず、SGI-1776 の明らかな有害事象は認められなかった。

以上のことから、PPP2R1A が構成要素である PP2A、そして PP2A と拮抗する作用をもつ PIM1 は SC の進行・悪性度上昇に重要な役割を持ち、PIM1 inhibitor は新規治療薬候補となりうると考えられる。今後、さらなる検討が必要であると考えられる。

なお、これらの研究成果は現在投稿中である。

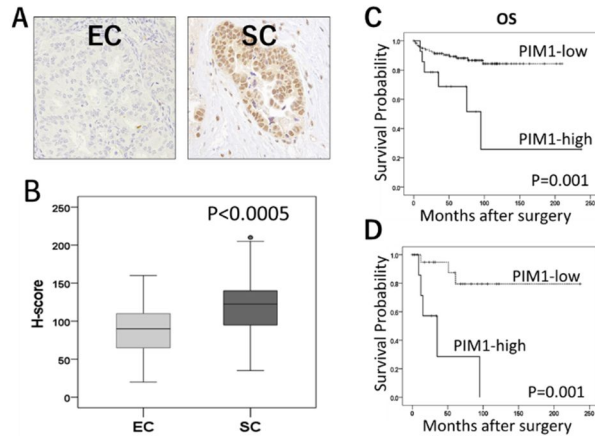


図 2 : PIM1免疫染色結果。A, B : ECに比較し、SCで有意に発現が強い。C, D : EMC全体(C)およびSCのみ(D)では、PIM1高発現症例で全生存期間の有意な短縮を認める。

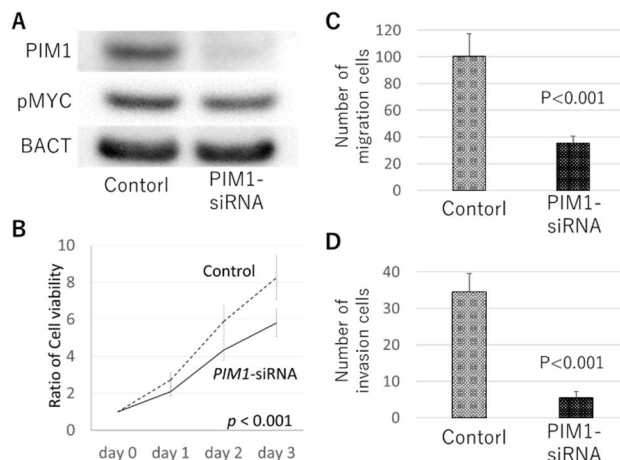


図 3 : SC細胞株ARK1におけるPIM1抑制の効果 A : siRNAによるPIM1発現抑制により、リン酸化MYC発現も減弱している。B : PIM1抑制により細胞増殖が有意に抑制される。C, D : PIM1発現抑制により遊走細胞数 (C)、および浸潤細胞数(D)は有意に減少する。

<参考文献>

- [1] Haesen D, et al. Recurrent PPP2R1A Mutations in Uterine Cancer Act through a Dominant-Negative Mechanism to Promote Malignant Cell Growth. *Cancer Res.* 2016; 76: 5719-5731.
- [2] Shih IM, et al. Somatic mutations of PPP2R1A in ovarian and uterine carcinomas. *Am J Pathol.* 2011; 178: 1442-7.
- [3] McConechy MK, et al. Subtype-specific mutation of PPP2R1A in endometrial and ovarian carcinomas. *J Pathol.* 2011; 223: 567-73.
- [4] Kandoth C, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature.* 2013; 497: 67-73.
- [5] Cherniack AD, et al. Integrated Molecular Characterization of Uterine Carcinosarcoma. *Cancer Cell.* 2017; 31: 411-423.
- [6] Brasó-Maristany F, Filosto S, Catchpole S, et al. PIM1 kinase regulates cell death, tumor growth and chemotherapy response in triple-negative breast cancer. *Nat Med* 2016; 22: 1303-13.
- [7] Suryo Rahmanto Y, Shen W, Shi X, Chen X, Yu Y, Yu ZC, **Miyamoto T**, et al. Inactivation of Arid1a in the endometrium is associated with endometrioid tumorigenesis through transcriptional reprogramming. *Nat Commun.* 2020; 11: 2717.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内穂高 宮本強 小野元紀 山田諭 井田耕一 et al.
2. 発表標題 PIM1高発現は子宮内膜癌患者の予後不良を予測する因子になり得る
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 竹内 穂高、宮本 強、浅香 亮一、小野 元紀、井田 耕一、田中 泰裕、品川 真奈花、塩沢 丹里
2. 発表標題 PIM1 is a potential therapeutic target for serous carcinoma of the endometrium
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内 穂高、宮本 強、浅香 亮一、品川 真奈花、小野 元紀、田中 泰裕、井田 耕一、塩沢 丹里
2. 発表標題 PIM1阻害剤は子宮内膜漿液性癌細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第73回 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井田 耕一 (IDA Koichi) (10773442)	信州大学・医学部附属病院・助教(診療) (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	宮本 強 (MIYAMOTO Tsutomu) (70418721)	信州大学・学術研究院医学系・准教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関