

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09272

研究課題名(和文) 妊孕性回復を目指した子宮体癌細胞のリプログラミング研究

研究課題名(英文) Reprogramming study of endometrial cancer cells for restoring fertility

研究代表者

矢野倉 恵 (YANOKURA, Megumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：20433732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの臨床的知見から子宮体癌担癌状態では着床が成立しないことが知られている。そこで、子宮体癌由来細胞株よりリプログラミング細胞を作製し、DNAのメチル化および着床能変化を解析することで子宮体癌における着床阻止メカニズムの探索を目的とした。

作製された(Reprogrammed-Cancer cells, RC細胞)は未分化マーカーの発現上昇や、in vitro着床試験による着床能の亢進が認められた。また、DNAメチル化アレイ解析から親株とRC細胞間で4.2% (31,511/747,192) のCpGに有意なメチル化率の差が認められた($p < 0.05$, $| \chi^2 | > 0.25$)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までのところ、子宮体癌細胞を用いたリプログラミングの報告はなく、既存の方法でリプログラミング可能であったことは学術的に意義がある。

また、リプログラミングによって正常子宮内膜細胞において着床に重要な役割を担っている遺伝子の発現が回復したことが明らかになった。子宮体癌細胞において、これらの遺伝子発現を回復させることで癌の性質や着床能に変化が認められれば、妊孕性温存・回復治療に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Clinical observations have confirmed that implantation does not occur in patients with endometrial cancer. The mechanism of acquisition of phenotypes characteristic of cancer cells can be examined by identifying epigenomic changes during reprogramming. Therefore, we first produced reprogrammed cancer (RC) cells from human endometrial cancer cell lines. DNA methylation and changes in gene expression and implantation capacity in these cells were then examined to explore the mechanism of inhibition of implantation in endometrial cancer. Upregulation of undifferentiated markers and decreased cell proliferation were observed in the RC cells. The in vitro implantation test showed significantly increased implantation capacity in RC cells compared with parent cell lines ($p < 0.05$). DNA methylation array analysis showed significant differences in methylation (31,511/747,192, 4.2%) in parent and RC cells ($p < 0.05$, $| \chi^2 | > 0.25$). A calcium signaling pathway was identified by KEGG enrichment analysis.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮体癌 リプログラミング 着床阻害 カルシウムシグナルパスウェイ

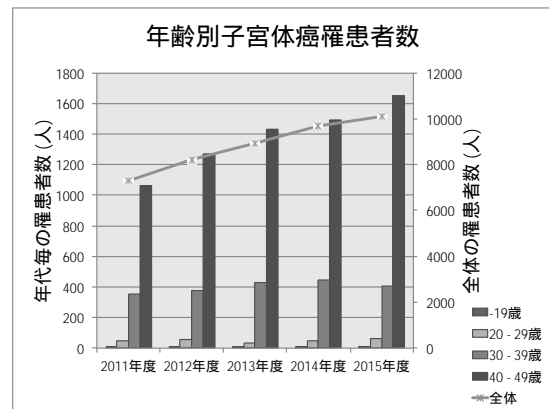
1. 研究開始当初の背景

2006年、分化した体細胞に初期化因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入することで多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPS 細胞) が樹立できることが報告された (Takahashi K, Yamanaka S. Cell; 126 (4), 663-676, 2006)。この iPS 細胞の樹立過程では遺伝子の塩基配列変化を必要としないにもかかわらず、DNA のメチル化に代表されるエピジェネティック修飾が大きく変化していることが明らかとなっている。一方、癌細胞においてもエピジェネティック修飾は重要な役割を担っている。例えば、癌抑制遺伝子のプロモーター領域がメチル化を受けることによって、その遺伝子発現が抑制され発癌を促進することが種々の癌細胞で報告されている。さらに、これまで癌研究分野ではエピジェネティック修飾は塩基配列変化を伴うジェネティック修飾と協調して癌の発生や進展などに関与すると考えられてきたが、近年ではエピジェネティック変異のみによる発癌機構 (エピジェネティック発癌) が示され、ますますエピジェネティック修飾が注目されている。

また、これまでの研究により iPS 細胞からのテラトーマ形成、不完全な体細胞の初期化による腫瘍の出現、癌細胞の脱分化など、iPS 細胞と癌細胞には共通点が多いことも明らかとなっている。そこで、癌細胞にリプログラミング技術を応用し、エピジェネティック修飾を積極的に変化させることで癌細胞特異的なエピゲノムの解明、腫瘍内不均一性のメカニズム解明、新たな治療法の確立といった研究が始まっている。

一方、本邦における子宮体癌の罹患患者数は近年増加傾向にあり、日本産科婦人科学会腫瘍委員会の報告によると 2015 年度には初めて 1 万人を越えた (日本産科婦人科学会雑誌; 69 (3), 1171-1216, 2017)。子宮体癌の標準的治療は子宮および付属器切除であり、患者は良好な予後と引きかえに妊孕性を失う。しかし近年、女性の社会進出による晩婚化が進み、それに伴い妊娠・出産が高齢化しているため、子宮摘出に代わる妊孕性温存療法が強く求められるようになってきている。

さらに、これまでの臨床学的知見から子宮体癌担癌状態では着床が成立しないことが知られているが、子宮内膜における着床の分子生物学的メカニズムは解明されておらず、子宮体癌経験者の妊娠成立には未だ高いハードルがある。そこで、申請者は子宮体癌細胞にリプログラミング技術を応用し、子宮体癌における内膜着床阻止メカニズムを解明することが、新たな妊孕性温存療法の確立につながるのではないかと考えた。



2. 研究の目的

正常子宮内膜は、月経周期に伴って増殖と剥脱を繰り返す組織である。月経周期前半にはエストロゲンの作用によって腺上皮が増殖し、排卵後にはプロゲステロンの作用によって増殖を停止するとともに、分泌性変化を呈する。その後妊娠が成立すれば、腺上皮は間質とともに脱落膜へと変化するが、妊娠が成立しないときにはプロゲステロンの減少とともに子宮内膜の剥脱が起き、月経に至る。月経周期の反復は、内膜特異的かつ周期的な遺伝子発現変化を反映していると考えられ、可逆性のあるエピジェネティック修飾による制御が強く示唆されるが、現在までに子宮内膜の増殖や脱落膜化におけるエピジェネティック修飾に関する研究はほとんど行われていない。

また、これまでの申請者らの研究から、子宮体癌の発癌にはエピジェネティック変化が重要な役割を担っていることも示されており (Yanokura M, et al. Oncol. Rep.; 17(1), 41-48, 2007、Yanokura M, et al. Anticancer Res.; 26(2A), 851-856, 2006)、リプログラミングによる影響を大きく受けることが推測される。

そこで申請者は、子宮体癌細胞をリプログラミングすることで正常子宮内膜様細胞へと変化させ、子宮体癌における着床阻止メカニズムの解明および着床機能を回復させることを目的とし研究を行うこととした。本研究は、リプログラミングによる癌細胞の死滅や既存薬剤の感受性増強を目指すものではなく、癌細胞を正常様細胞に変化させ、着床機能を回復させるという全く新しい妊孕性温存療法の確立を目指している。

3. 研究の方法

(1) 子宮体癌 (Reprogrammed-Cancer Cells) RC 細胞の作製

子宮体癌細胞株に Oct3/4、Sox-2、Klf4、c-Myc の 4 因子をエピソーマルベクターを用いて導入し RC 細胞を作製する。エピソーマルベクターは導入する遺伝子が宿主細胞のゲノムに組み込まれない非ウイルス性のベクターであり、安全性が高い。

(2)RC 細胞の性質解析

作製した RC 細胞を用いて、NANOG、TRA-1-60、SSEA4 といった幹細胞マーカーの発現をリアルタイム PCR にて解析する。また、親株と比べ細胞増殖能、細胞遊走・浸潤能、ヌードマウスに対する腫瘍形成能がどのように変化しているか、それぞれコロニーフォーメーションアッセイ、マトリゲルを用いたインベーションアッセイ、マウス皮下移植実験を行い解析する。

(3)RC 細胞の着床実験

ヒト絨毛癌細胞株 (JAR) とヒト子宮体癌細胞株を、それぞれ胚と子宮内膜に見立てた *in vitro* 着床実験を行う。子宮体癌細胞株は、エストロゲンレセプター・プロゲステロンレセプター共に発現陽性、または共に発現陰性の各細胞株とその RC 細胞を用いて検討する。

(4)RC 細胞の着床因子の同定

親株と作製した RC 細胞の DNA メチル化をビーズアレイを用いて解析し、親株と RC 細胞間で有意にメチル化率に差が見られた CpG サイト (Differential methylated Positions; DMPs) を同定する。DMPs のうち、遺伝子発現調節に重要な役割を担っていると考えられている TSS<1500, CpG island, shore, shelf に位置する DMPs を抽出する。さらにそれらの遺伝子のパスウェイ解析を行い、着床に重要な役割を担うパスウェイおよび遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1)子宮体癌 RC 細胞の作製および性質解析

山中 4 因子のトランスフェクション後、約 4 週間で Ishikawa および HOOUA 細胞ではリプログラミングされた RC 細胞のコロニーが出現した。細胞境界が不明瞭でややドーム状に増殖するコロニーは、親株とは形態学的に大きく異なっていた。

また、使用した 8 種の子宮体癌細胞株のうち RC 細胞の作製に成功したのは 2 株だけであったことから、親株が有しているジェネティックな変異やリプログラミングプロトコルの最適化が RC 細胞の作製効率に影響している可能性が考えられた。

(2)RC 細胞の性質解析

親株と RC 細胞の SSEA4, TRA-1-60 染色およびアルカリフォスファターゼ染色を行った結果、親株ではほとんど染色されなかったが、RC 細胞のコロニーはほぼ全てが染色された (図 1)。また、リプログラミング前後での内因性 OCT4, KLF4, c-MYC 遺伝子の発現変化を解析したところ、RC 細胞ではこれらの遺伝子の発現が上昇していることが確認された。

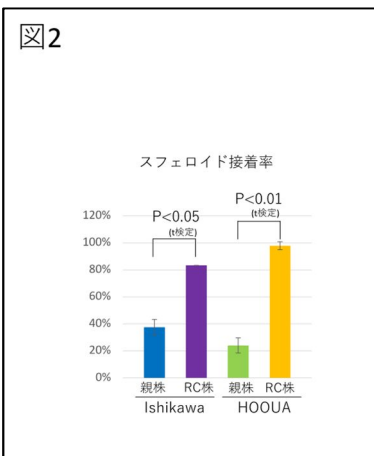
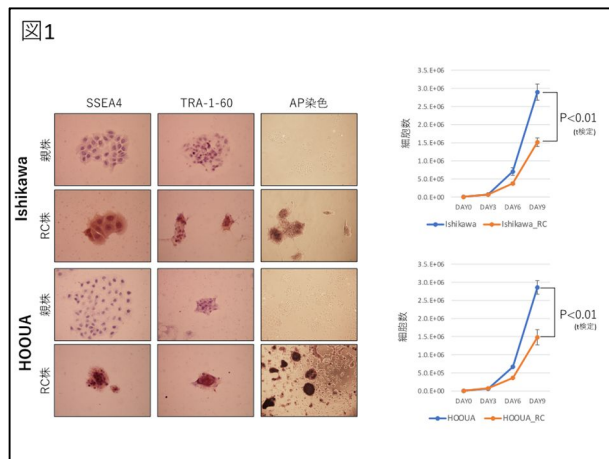
また、いずれの細胞株においても RC 細胞の方で有意な細胞増殖能の低下を認められた ($p<0.01$, 図 1)。しかし、RC 細胞ではマトリゲル等のコート剤無しには未分化性の維持が不可能であったため、細胞増殖能・浸潤能の解析は行えなかった。さらに、コロナ禍の影響で動物実験が制限されたため、マウスへの皮下移植実験は現在進行中で結果が得られていない。

今回作製した RC 細胞は、既存の iPS 細胞の特徴を有していることから、リプログラミングは概ね成功したと考えられる。また、これまでに子宮体癌由来細胞株からのリプログラミング細胞作製の報告はなく、学術的にも意義があると考えられる。

(3) RC 細胞の着床実験

JAR 細胞スフェロイドを胚に見立てた *in vitro* 着床実験を行ったところ、いずれの細胞株においても RC 細胞の方でスフェロイドの接着率の上昇を認められた (Ishikawa; $p<0.05$, HOOUA; $p<0.01$, 図 2)。さらに、RC 細胞ではヒト子宮内膜細胞において着床に重要な役割を担っていると報告されている COX-2 や LIF の発現が上昇していることが確認された。

研究予定では、エストロゲンレセプターおよびプロゲステロンレセプター発現の有無で着床能変化に差が見られるか検討予定であったが、RC 細胞が 2 株しか作製できなかった



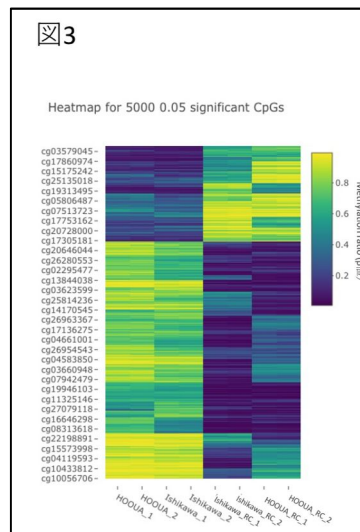
ため解析できなかった。

(4) RC 細胞の着床因子の同定

DNA メチル化アレイ解析により得られたデータから、コントロールプローブデータの除去、QC チェックおよびノーマライズを行った。747,192cite のデータを用いて DMP 解析(親株 vs RC 細胞, $P < 0.05$, $| \beta | > 0.25$)を行ったところ、31,511cite が DMPs として同定された。同定された DMPs の 2/3 以上が RC 細胞で有意に低メチル化であった(図 3)。

また、遺伝子発現調節領域解析および KEGG エンリッチメント解析によりカルシウムシグナルパスウェイに含まれる CREB, COX-2, HOXA10 が同定された。

今後は RC 細胞を用いた候補遺伝子ノックダウンによる着床能変化の解析や、臨床検体における候補遺伝子の発現解析を通して子宮体癌における着床阻止メカニズムの解明につなげたい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢野倉恵, 阪埜浩司, 的場優介, 小林祐介, 富永英一郎, 田中守, 青木大輔
2. 発表標題 リプログラミングされた子宮体癌由来培養細胞を用いた内膜着床阻止メカニズムの探索
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢野倉恵, 阪埜浩司, 的場優介, 小林祐介, 富永英一郎, 田中守, 青木大輔
2. 発表標題 ヒト子宮体癌由来培養細胞を用いたReprogrammed-Cancer cellの作成
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------