

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09812

研究課題名(和文) 腫瘍由来のエリスロポエチンが子宮筋腫を巨大に増大させる機序の解明と臨床的応用

研究課題名(英文) Exploring the novel mechanisms of the massive growth of uterine leiomyoma by Erythropoietin

研究代表者

佐藤 美紀子 (SATO, Mikiko)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：70326049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究で、EPOを高発現している子宮筋腫は腫瘍内の血管成熟が亢進し大きく増大することを報告した。本研究ではEPO発現が既知の筋腫ドライバー遺伝子変化であるMED12変異とHMGA1/2発現亢進とは違う要因で生じることを示したが、具体的な機序に関しては解明し得なかった。また、EPO高発現筋腫ではEPO代替受容体であるEPHB4遺伝子発現が亢進していることからEPO-EPHB4系が子宮筋腫の増大に関与している可能性が示唆された。本研究をさらに発展させることは、分子遺伝学的に多様な子宮筋腫の発生と進展機序を解明し腫瘍増大の予測マーカーや新たな薬物治療ターゲットの開発へつなぐと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮筋腫は罹患頻度の高い良性腫瘍で、時に巨大に増大し生活の質や妊娠・出産に多大な影響を与える。我々は先行研究で一部の子宮筋腫細胞がEPOを分泌し腫瘍の増大を促進する可能性を報告し、新規の筋腫増大機序を提案した。本研究はどのような分子遺伝学的背景の筋腫がEPOを発現し、どのような機序で筋腫の増大を促進するのかを検証した。その結果、EPOの発現機序は既知の筋腫のドライバー遺伝子異常で直接的には説明できないことが明らかになった。さらなる検証が必要である。また、EPO高発現筋腫ではEPOの代替受容体である血管成熟因子EPHB4が強発現しており、EPOの腫瘍増大作用に関与している新たな可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported that uterine leiomyomas expressing high levels of EPO are greatly enlarged due to enhanced vascular maturation in the tumor. This study showed that EPO expression is caused by different factors than the known myoma driver gene alterations, MED12 mutation, and HMGA1/2 upregulation. Still, we could not elucidate the specific mechanism. In addition, EPHB4 gene expression, an alternative receptor for EPO, is upregulated in EPO-high myomas, suggesting that the EPO-EPHB4 system may be involved in the expansion of uterine leiomyomas. We expect further study to elucidate the molecular mechanisms underlying the development and progression of diverse uterine fibroids and lead to the development of predictive markers for tumor growth and new drug treatment targets.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮筋腫 エリスロポエチン 腫瘍内分泌学

## 1. 研究開始当初の背景

巨大な子宮筋腫に赤血球増多症が合併する(Myomatous erythrocytosis syndrome: MES)は、1953年に Thomsonらによって初めて報告され(Thomson AP et al Lancet 1953;262:759-60)、その後 MES は子宮筋腫細胞自身が赤芽球の増殖・分化因子である Erythropoietin (EPO)を分泌することによって発症することが示されている(Pollio F et al. Hum Pathol 2005;36:120-7)。先行研究で我々は赤血球増多症を呈さなくても EPO を分泌している筋腫がある程度存在するのではないかと考え、100例超の子宮筋腫症例を解析し、臨床上 MES を呈していない筋腫でも 20%程度で EPO mRNA・蛋白を高発現することを見出した。さらに EPO mRNA 発現と子宮筋腫径とは正の相関関係があり、また、EPO 高発現の子宮筋腫では腫瘍内血管の成熟が更新していることから、血管増生を介して腫瘍の増大に寄与している可能性を示した(Asano R, Asai-Sato M et al. Am J Obstet Gynecol. 2015)。続いて Mediator Complex Subunit 12 (MED12) 遺伝子変異を有する筋腫(MED12 変異型筋腫)では EPO 発現量が少なく、EPO の高発現は MED12 野生型筋腫に特有の現象であることを見出した(Asano R, Asai-Sato M. et. al., Fertil Steril. 2019;111:178-185)。

また、諸家の研究により子宮平滑筋細胞腫瘍化の背景には多様な遺伝子異常が存在することが解明されている。最も高頻度に認められる異常は Mediator complex subunit 12 (MED12)遺伝子変異で、筋腫の半数以上を占める。次に 25%程度で見られるのは 12 番染色体短腕と 6 番染色体長腕を含む Chromothripsis であり、High mobility group AT-hook (HMGA)1、2 遺伝子の過剰発現を伴う。さらに 15%程度の症例では 7 番染色体長腕の欠失が認められ、共通する遺伝子異常として Cut-like homeobox-1 (CUX)のハプロ不全が同定されている。このように近年では MED12、HMGA1/2 と CUX-1 が相互排他的に大半の筋腫のドライバー遺伝子になっていると理解されている (Mehine M. et al, PNAS 2016;113:1315-20)。

## 2. 研究の目的

子宮筋腫は腫瘍変性もなく cell viability を保ちながら腹腔内を占拠するほど巨大化することがあり、その機序解明が各症例に対する適切な治療方針立案や新規の治療法確立のために重要である。我々は現在までに EPO が一部の筋腫で高発現し血管増生に関与している可能性を示していることから、その展開として子宮筋腫における EPO の発現機序を解明する目的で既知である筋腫のドライバー遺伝子異常と EPO 発現との関連を解析し、また EPO の筋腫に対する作用を解明するために EPO 発現と血管新生・血管成熟因子発現の相関について解析を行なう。

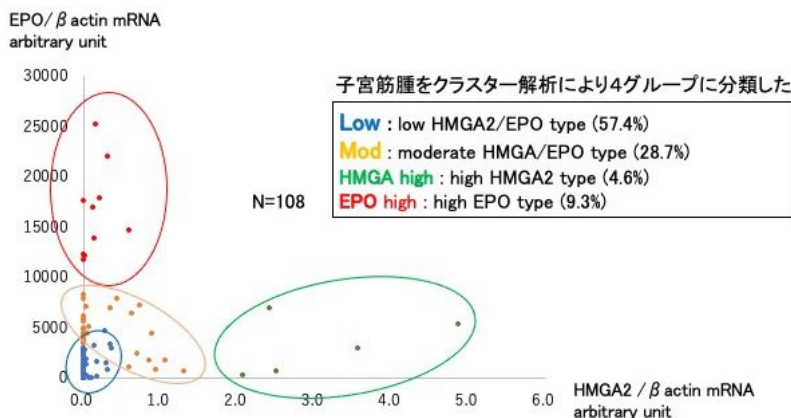
## 3. 研究の方法

- (1) 本研究は学内倫理委員会の認可を得て施行されており、全ての症例より文書による同意を得て行われた。
- (2) 子宮筋腫の原因として最も頻度が高い遺伝子異常である MED12 の変異をサンガーシーケンス法で解析し、子宮筋腫による EPO mRNA 発現との関連を解析した。
- (3) CUX-1 遺伝子の欠失を確認するため、子宮筋腫組織から抽出した DNA 検体を用いて、digital PCR 法で CUX-1 遺伝子定量を行なった。
- (4) 子宮筋腫細胞において EPO が発現する機序を解明する目的で子宮筋腫組織の EPO、HMGA1/2、Vascular endothelial growth factor (VEGF)、Angiopoietin1/2 (ANG1/2)、EphrinB2 およびそれぞれの受容体(EPOR、VEGFR、Tie-2、EPHB4)の mRNA 発現量を Real-Time PCR 法で定量した。

## 4. 研究成果

- (1) 子宮筋腫の EPO mRNA 発現を制御する分子遺伝学的背景に関する検証

子宮筋腫検体 108 例について、EPO mRNA と HMGA2 mRNA 発現量を定量したところ、EPO と HMGA2 の発現亢進は相互排他的であり、STATA ver.17 を用いてクラスター解析すると図1に示すように EPO と HMGA2 の発現量によって4つのサブグループに分類できた。両者の発現様式によって Low 群(EPO、HMGA2 共に低発現)、Moderate 群(EPO、HMGA2 共に中等度発現)、EPO high 群(EPO 高発現かつ HMGA2 低発現)、HMGA2-high 群(HMGA2 高発現かつ EPO 低発現)と命名した。MED12 変異型筋腫は 108 例中 52 例(48.1%)あったが、その 78.8%が Low 群に分類されて HMGA2 high 群、EPO high 群は各々 1 例(1.9%)ずつしか存在しなかった。MED12 野生型筋腫での分布は Low 群 37.5%、HMGA2 high 群 7.1%、EPO high 群 16.0%であった。MED12



変異型筋腫の大半がEPO、HMGA2共に低発現であったことから、子宮筋腫におけるEPO mRNA発現亢進はMED12変異およびHMGA2発現亢進と相互排他的であると考えられた。HMGA1でも同様の結果が得られた。

EPO発現とHMGA1/2発現、MED12変異が相互排他的であったことから、CUX-1遺伝子のハプロ不全がEPO高発現に関与している可能性を考え、digital-PCR法を用いてCUX-1 DNA定量を行なった。しかし、CUX-1 DNA量とEPO発現との間に相関を見出すことはできなかった。EPOの発現は既知の分子遺伝学的異常により直接制御されたものではないと考えられる。

(2) 子宮筋腫におけるEPOの血管増生因子調節の検証

さらに子宮筋腫169検体で、正常子宮筋層と比較してEPO高発現検体をEPO(+)、低発現検体をEPO(-)として、各種血管増生因子mRNAの発現量の関連について検証を行なった。VEGF、VEGFR、ANG1/2、Tie-2、Ephrin B2とEPOの発現量に差異は認められなかったが、EPHB4の発現はEPO(+群)で有意な上昇を認めた(Scandalized EPHB4/actin mRNA値 EPO(-) -0.16 vs EPO(+) 0.331,  $p=0.0025$ , by t-test)。

EPOは造血作用以外にも腫瘍細胞増殖を含む多様な作用を呈するが、悪性腫瘍細胞では赤芽球で同定されている既知のEPO受容体発現が少なく、代替受容体の存在が想定されている。2015年にPradeepらは乳癌や卵巣癌細胞においてEPOがEPHB4のリガンドとしてSTAT3を介して作用することを報告している(Pradeep S. et al. Cancer Cell. 2015;28:610-22)。このことから、EPO高発現筋腫においてEPHB4が強発現していた事実はこれらの分子が子宮筋腫の増大に関与している可能性が示唆される。

(3) まとめ

我々はこれまでにEPOを高発現している子宮筋腫は腫瘍径が大きく、腫瘍内の血管成熟が亢進していることを報告している。本研究では子宮筋腫でのEPO発現の機序について、既知の筋腫ドライバー遺伝子変化に着目して検討し、EPO発現がMED12変異とHMGA1/2発現亢進以外の要因によって生じることを示したが、具体的な機序に関しては解明し得なかった。既知の分子遺伝学的異常が間接的にEPOを制御している可能性について検討が必要である。また、EPO高発現筋腫では特異的にEPO代替受容体であるEPHB4遺伝子発現が亢進していることからEPO-EPHB4系が子宮筋腫の増大に関与している可能性が示唆された。本研究をさらに発展させることは、分子遺伝学的に多様な子宮筋腫の発生と進展機序を解明し、腫瘍増大の予測マーカーや新たな薬物治療ターゲットの開発へつながることが期待される。

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 1件）

1. 発表者名 浅野涼子, 佐藤美紀子, 水島大一, 宮城悦子
2. 発表標題 子宮筋腫によるエリスロポエチン発現とMED12変異の関連
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅野涼子, 佐藤美紀子, 水島大一, 永井康一, 宮城悦子
2. 発表標題 子宮平滑筋種のMED12遺伝子変異と血管新生因子の関連
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aya Taniguchi, Mikiko Sato, Ryoko Asano, Estuko Miyagi, Kei Kawana
2. 発表標題 New classification of uterine myoma by expression of HMGA2 and Erythropoietin and the molecular characteristics of each subtype
3. 学会等名 73th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology (国際学会)
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	浅野 涼子  (ASANO Ryoko)  (70806471)	横浜市立大学・医学研究科・客員研究員   (22701)	

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	宮城 洋平  (MIYAGI Yohei)  (00254194)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・臨床研究所・所長    (82713)	
研究分担者	羽尾 裕之  (HAO Hiroyuki)  (40393243)	日本大学・医学部・教授    (32665)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川名 敬  (KAWANA Kei)  (60311627)		
研究協力者	小松 篤史  (KOMATSU Atsushi)		
研究協力者	片山 佳代子  (KATAYAMA Kayoko)		

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