

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791165
 研究課題名（和文） 子宮体癌における統合的ゲノム解析ならびにマイクロ RNA 解析による分子機構の解明
 研究課題名（英文） Integrative genomic analysis and screening of microRNA expression status in endometrial cancer.
 研究代表者
 平沢 晃（HIRASAWA AKIRA）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：90296658

研究成果の概要（和文）：

近年、ゲノム情報発現系における新たな調節・制御分子としてマイクロ RNA(miRNA)が注目されている。miRNA は蛋白質に翻訳されない non-codingRNA であり翻訳阻害あるいは RNA 干渉により標的分子を阻害することから、発生・分化のみならずがん遺伝子やがん抑制遺伝子と同様にがんの発生・分化における分子機序に深く関与すると考えられている。本研究では最終的に個性診断および新規個別化治療法の確立を念頭におき、miRNA の機能的スクリーニングにメチル化解析と発現解析を組み合わせて絞込みを行い、新規がん抑制遺伝子型 miRNA の同定を行った。

研究成果の概要（英文）：

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs and negative regulators for their gene targets. Although the tumor suppressive functions of several miRNAs have been demonstrated, the dysregulation of miRNAs and their molecular mechanisms in endometrial cancer still remain unclear. To identify tumor suppressive miRNAs (TS-miRs) silenced by DNA hypermethylation during endometrial carcinogenesis, we performed functional screening for TS-miRs in endometrial cancer cell lines. We further analyzed DNA hypermethylation of CpG-islands around mature miRNAs, resulting in identification of some miRNAs as the candidate TS-miRs silencing by CpG island hypermethylation. Our data suggest that these TS-miRs might play an important role in endometrial carcinogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮体癌、ゲノム異常、メチル化、マイクロ RNA

1. 研究開始当初の背景

近年、子宮体癌は増加の一途をたどり、婦

人科悪性腫瘍において罹患率・死亡率共に最も高くなることが容易に予想されている。し

かしながらその病態については不明な点も多く、治療の個別化にはほど遠い現状であり、本疾患の発がん機構の解明とこれらに基づいたがんの予防と至適治療法の確立は急務の課題である。さらにごく近年、ゲノム情報発現系における新たな調節・制御分子としてマイクロRNA(miRNA)が注目されている。

miRNAは蛋白質に翻訳されないnon-codingRNAであり、翻訳阻害あるいはRNA干渉により標的分子を阻害することから、発生・分化のみならずがん遺伝子やがん抑制遺伝子と同様にがんの発生・分化における分子機序に深く関与すると考えられているが、子宮体癌発生におけるmiRNAの関与についての報告は皆無に等しい。

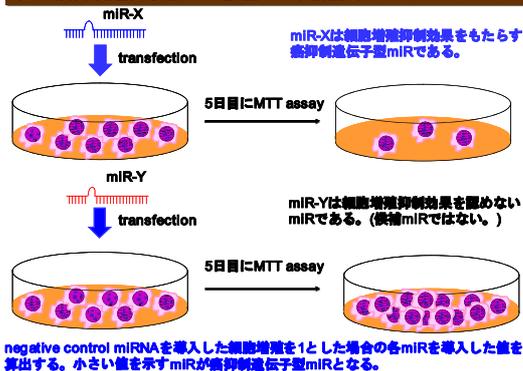
2. 研究の目的

本研究では子宮体癌の発がん・進展におけるmiRNAの関与の解明を目的とした。特に、独自に開発したmiRNAの機能的スクリーニングとメチル化解析と発現解析を組み合わせ、絞込みを行い、新規がん抑制遺伝子型miRNAの同定を柱として、最終的に個性診断および新規個別化治療法の確立を念頭に置いた。

3. 研究の方法

(1) はじめに数種類の子宮体癌細胞株に対して、327種類のmiRNA配列を持つdsRNAライブラリー(ambion社)の遺伝子導入による*in vitro*の細胞増殖能解析を行う。子宮体癌細胞株にmiRNAを1種類ずつ導入し細胞増殖抑制効果をMTT assayを行って検討し、細胞増殖抑制効果を著明に認めるmiRNAを選出した(図A)。

図A 癌抑制遺伝子型miRNAを選出する機能的スクリーニング法



(2) 次に選出されたmiRNAについて、UCSC等の公的ゲノムデータベースによる検索(bioinformatics)によりmiRNAが座位する近傍にCpG islandの有無の検討、がんでの報告を認めないmiRNAであるか否かを検索した。

(3) このような絞り込みにより候補に残った

各miRNAについては同細胞株と臨床検体を用いて、プロモーター領域のCpG islandのメチル化を検討するためにcombined bisulfite restriction analysis(COBRA)やbisulfite sequenceを行い詳細な解析を行った。さらに脱メチル化剤投与による発現回復を行い、メチル化異常による発現制御の関与を検討した。これら結果により正常子宮内膜で高発現し、がん細胞株と子宮体癌臨床検体において低発現でありDNAメチル化異常により発現制御されるがん抑制型miRNAの同定を行った。

(4) このように同定されたmiRNAの標的分子の探索にはウェスタンブロット法を用いてタンパクの同定を行い、また同定された分子は細胞増殖能にどのように関与しているか機能解析を進めた。また臨床病理学的因子と該当するmiRNAや標的分子との関連性を検討し臨床的な意義を見出すこととした。

4. 研究成果

(1) Pre-miR™ miRNA Precursor Library - Human V2 (Ambion社)による増殖抑制効果を指標としたがん抑制遺伝子型miRNAの機能的スクリーニングを細胞株HEC-1AとHEC-1Bに対して施行した結果、114種類のmiRNAが選出された。

(2) 次に選出されたmiRNAについて、UCSC等の公的ゲノムデータベースによる検索(bioinformatics)により65種類のmiRNAが近傍にCpG islandの有していた。さらにはがんでの報告を認めないmiRNAは33種類であった。

(3) この33種類のmiRNAに対してメチル化解析と発現解析をまず16種類の細胞株にて検討した結果、5種類のmiRNAが高頻度(60%以上のメチル化率)メチル化を認めた。その5種類のmiRNAに関しては発現解析と脱メチル化処理剤による発現回復解析を細胞株と臨床検体を用いて施行した。その結果miR-EC20(labo.name)が子宮体癌においてDNAメチル化異常により発現抑制される新規がん抑制遺伝子型miRNAであることを同定した。

(4) miR-EC20の標的分子の同定をウェスタンブロット法にて行った。現在までに複数の標的分子を同定した。その中には転写因子や細胞周期に関わる分子が含まれていた。また子宮体癌臨床検体においてはmiR-EC20のメチル化率は89.3%であり発現低下との一致率も85.1%と効率であった。これは手術進行期分類によるstageに依存しないことから子宮体癌の発がん・進展機序に関わるmiRNAであることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Analysis of candidate target genes for mononucleotide repeat mutation in microsatellite instability high(MSI-H) endometrial cancer. Kawaguchi M, Banno K, Yanokura M, Kobayashi Y, Ogawa S, Kisu I, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D. *Int J Oncol* 2009 35 977-982 査読有

Epigenetic DNA hypermethylation: Clinical applications in endometrial cancer. Muraki Y, Banno K, Yanokura M, Kobayashi Y, Kawaguchi M, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D. *Oncol Rep* 2009 22 967-972 査読有

Endometrial cancer as HNPCC associated tumor. Banno K, Kobayashi Y, Yanokura M, Kishimi A, Ogawa S, Kisu I, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D. *J Fam Tumor* 2009 9 64-68 査読有

Analysis of a correlation between the BRAF V600E mutation and abnormal DNA mismatch repair in patients with sporadic endometrial cancer. Kawaguchi M, Yanokura M, Banno K, Kobayashi Y, Kuwabara Y, Kobayashi M, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D. *Int J Oncol* 2009 34 1541-1547 査読有

Endometrial cancer as a familial tumor: Pathology and molecular carcinogenesis. (Review) Banno K, Yanokura M, Kobayashi Y, Kawaguchi M, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D. *Current Genomics* 2009 10 127-132 査読有

Cross sectional analysis of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in Japanese patients suspected to have hereditary breast/ovarian cancer. Sugano K, Nakamura S, Ando J, Takayama S, Kamata H, Sekiguchi I, Ubukata M, Kodama T, Arai M, Kasumi F, Hirai Y, Ikeda T, Jinno H, Kitajima M, Aoki D, Hirasawa A, Takeda Y, Yazaki K, Fukutomi T, Kinoshita T, Tsunematsu R, Yoshida T, Izumi M, Umezawa S, Yagata H, Komatsu H, Arimori N, Matoba N, Gondo N, Yokoyama S, Miki Y. *Cancer Sci* 2008 99 1967-1976 査読有

Can ABCF2 protein expression predict the prognosis of uterine cancer? Nishimura S, Tsuda H, Miyagi Y, Hirasawa A, Suzuki A, Kataoka F, Nomura H, Chiyoda T, Banno K, Fujii T, Susumu N, Aoki D. *Br J Cancer* 2008 99 1651-1655 査読有

[学会発表](計14件)

Hirasawa A, Akahane T, Tsuruta T, Kobayashi Y, Nomura H, Banno K, Saito K, Zama T, Tanigawara Y, Susumu N, Aoki D. Analysis of UGT1A1 *6, *27, *28 and *60 polymorphism and serum bilirubin levels for individualized cancer therapy using irinotecan. The 4th Asian Conference on Pharmacoepidemiology 2009.10.23-25 (Tainan, Taiwan)

Hirasawa A, Akahane T, Tsuruta T, Kobayashi Y, Nomura H, Banno K, Tsuda H, Saito K, Zama T, Tanigawara Y, Susumu N, Aoki D. Effects of UGT1A1 polymorphism on irinotecan-induced drug reaction and serum bilirubin levels. The 59th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics 2009.10.20-24 (Hawaii, USA)

Susumu N, Hirasawa A, Kobayashi Y, Tsuruta T, Ichikawa Y, Yamagami W, Nomura H, Kataoka F, Suzuki A, Banno K, Tsuda H, Aoki D. Pitfalls in fertility preserving high-dose medroxyprogesterone acetate (MPA) therapy for young patients with endometrial cancer - A retrospective study of 23 patients who subsequently underwent hysterectomy - 16th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology (Belgrade, Serbia) 2009.10.11-14

Hirasawa A, Akahane T, Tsuruta T, Nomura H, Banno K, Tsuda H, Saito K, Zama T, Tanigawara Y, Susumu N, Aoki D. Pharmacogenomic effects of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 on irinotecan-induced drug reaction and serum bilirubin levels. 2009 European Human Genetics Conference 2009.5.23-26 (Vienna, Austria)

平沢 晃、松村聡子、鶴田智彦、赤羽智子、野村弘之、青木大輔、谷川原祐介、杉田哲佳、

緒方是嗣、花房信博 ファーマコゲノミクスの臨床応用を目指した新規遺伝子多型診断システムの確立 第30回日本臨床薬理学会年会(シンポジウム) 2009.12.3-5(横浜)

子宮体癌細胞株の機能的スクリーニングを用いたエピゲノム異常により発現抑制されるがん抑制遺伝子型 microRNA の探索 鶴田智彦、小崎健一、平沢 晃、阪埜浩司、進 伸幸、井本逸勢、青木大輔、稲澤譲治 第68回日本がん学会総会 2009.10.1-3(横浜)

平沢 晃、赤羽智子、鶴田智彦、小林佑介、阪埜浩司、進 伸幸、谷川原祐介、青木大輔 UGT1A1遺伝子多型と血清ビリルビン値およびイリノテカンの有害事象に関するゲノム薬理学的検討 日本人類遺伝学会第54回大会 2009.9.24-26(東京)

子宮体癌におけるマイクロRNAの発現プロファイリング

平沢 晃、齋藤康一郎、赤羽智子、伊藤葉子、梶田紀明、中條聖子、進 伸幸、青木大輔、座間 猛 第46回日本婦人科腫瘍学会学術集会 2009.7.10-11(新潟)

FISH 法の子宮体癌への臨床応用-がん診断と治療効果判定- 進 伸幸、平沢 晃、阪埜浩司、青木大輔 第50回日本臨床細胞学会総会 2009.6.26-28(東京)(ワークショップ)

アレイ CGH による子宮体癌関連遺伝子および薬剤感受性遺伝子の探索

鶴田智彦、平沢 晃、赤羽智子、山上 亘、阪埜浩司、井本逸勢、稲澤譲治、進 伸幸、青木大輔 第50回日本臨床細胞学会総会 2009.6.26-28(東京)(ワークショップ)

BRCA1/2 陽性例における卵巣がんサーベイランスおよび予防的卵巣摘出術に関する検討 平沢 晃、菅野康吉、鶴田智彦、小林佑介、阪埜浩司、進 伸幸、矢崎久妙子、武田祐子、青木大輔 第15回日本家族性腫瘍学会学術集会(シンポジウム) 2009.6.12-13(東京)

UGT1A1遺伝子多型とイリノテカンの有害事象およびグルクロン酸抱合能に関するゲノム薬理学的検討 平沢 晃、赤羽智子、野村弘行、阪埜浩司、津田浩史、齋藤康一郎、座間 猛、後田奈緒美、谷川原祐介、進 伸幸、青木大輔、吉村泰典 第61回日本産科婦人科学会学術講演会 2009.4.3-5(京都)

Hirasawa A, Akahane T, Yamagami W, Nomura H, Banno K, Tsuda H, Naganishi H, Okubo K, Saito K, Zama T, Tanigawara Y, Susumu N, Aoki D. Analysis of UGT1A1 polymorphism and serum bilirubin levels for individualized cancer therapy using irinotecan. 67th Annual meeting of the Japanese cancer association 2008.10.28-30 (Nagoya Japan)

Hirasawa A, Tsuruta T, Nomura H, Kataoka F, Tominaga E, Banno K, Suzuki A, Tsuda H, Naganishi H, Saito K, Zama T, Tanigawara Y, Susumu N, Aoki D Association of Genetic Variants of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 Gene with Serum Bilirubin Level in the Japanese 2008 International Conference on Pharmacogenomics 2008.4.9-12 (Busan, Korea)

[図書](計6件)

平沢 晃、青木大輔 ゲノム薬理学の最近の進展と UGT1A1 遺伝子多型について 産婦人科の実際、金原出版 58(12) 2005-2011 2009

牧田和也、平沢 晃、高松 潔、青木大輔 骨粗鬆症と女性のQOL向上策 週1回のビスフォスフォネート製剤の投与 産婦人科治療、永井出版 99(5) 509-511 2009

平沢 晃、鶴田智彦、進 伸幸、青木大輔 小児疾患の遺伝子診断・治療の進歩 遺伝子診断がもたらす治療の進歩 イリノテカン 小児科、金原出版 50(7) 1227-1232 2009

平沢 晃、久慈直昭 HRT のリスクとベネフィットの見直し The Mainichi Medical Journal、毎日新聞社 2009 104-105

進 伸幸、片岡史夫、平沢 晃、阪埜浩司、青木大輔 子宮内膜病変診断法としての2色FISH法の治療への応用 -若年子宮体癌に対する妊孕性温存両方治療終了時期判定- 組織細胞化学、中西印刷 2008 177-186 2008

進 伸幸、市川義一、末盛友浩、平沢 晃、阪埜浩司、青木大輔 進行・再発子宮体癌に対するホルモン療法の現状 婦人科がん標準化学療法の実践 内分泌療法、金原出版 74-79 2008

〔産業財産権〕
出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等
<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/obgyn/04research/00index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平沢 晃（HIRASAWA AKIRA）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：90296658

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし