

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591866

研究課題名（和文） エピジェネティックに制御される遺伝子を標的とした子宮体癌に対する RNA 医薬

研究課題名（英文） endometrial cancer therapy using epigenetically regulated small RNA

研究代表者

阪埜 浩司 (BANNO KOUJI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70265875

研究成果の概要（和文）：子宮体癌において、CHFR 遺伝子はエピジェネティックに制御されていることが明らかとなった。さらに、CHFR のメチル化とタキサン製剤の感受性には関連が認められた。

また、miRNA もエピジェネティックに制御されており、子宮体癌においては miR-34b が重要と考えられた。miR-34b の導入により、パクリタキセルの感受性を特異的に増強することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：It is revealed that CHFR gene is epigenetically regulated in endometrial cancer. CHFR gene methylation is correlated with response to Taxane. Micro RNA is also regulated by DNA methylation in endometrial cancer. miR-34b is important for the oncogenesis of endometrial cancer. It is revealed that miR-34 enhances response to Taxane specifically.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：婦人科腫瘍学・子宮体癌・CHFR・miR-34b・タキサン製剤

## 1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は欧米では婦人科癌の中で非常に発生頻度の高い癌である。本邦においても、その罹患数は約 15 年間に倍増したと推定され、本疾患による死亡率も増加している。今後も患者数は増加すると予測されているが、その発癌機構は今なお不明な点が多い。

近年、様々な臓器の発癌機構に、DNA 塩基

配列異常によらない選択的な遺伝子機能異常、いわゆるエピジェネティックな変化が深く関与していることが注目されている。特に癌と特定ゲノム領域の異常高メチル化との関連が注目されている。また、最近の研究において、細胞周期チェックポイントや DNA 修復に関与する遺伝子のエピジェネティックな発現制御が特定の抗癌剤の感受性に大き

な影響を与えることが明らかとなってきた。siRNA (small interfering RNA) を用いた遺伝子発現抑制により、抗癌剤感受性を増強する治療も検討されている。

small RNA を素材とする核酸医薬には siRNA だけでなく、miRNA (micro RNA) も注目されている。大部分の miRNA が、癌組織において正常組織に比して発現が低下していることから、癌抑制遺伝子として miRNA が機能しており、さらに、一部の miRNA は通常の遺伝子同様エピジェネティックな制御を受けていると推測されている。さらに癌の発生組織や分化度により miRNA の発現パターンが大きく変化していることが報告され、多くの癌治療への応用が期待されている。

## 2. 研究の目的

### (1) siRNA を用いたアテロコラーゲン DDS (Drug Delivery System) による子宮体癌への RNA 医療

in vitro および in vivo において siRNA を用いた RNA 干渉法により CHFR の発現を特異的にノックダウンし、子宮体癌細胞のタキサン製剤に対する抗腫瘍効果を確認する。CHFR siRNA のアテロコラーゲン DDS による、子宮体癌に対する RNA 創薬、特にタキサン製剤に対する抗腫瘍効果の増強と、患者の予後改善を目指した新規 RNA 治療を子宮体癌細胞株およびヌードマウス皮下移植モデルおよび分子イメージング手法を用いて検討する。

### (2) 子宮体癌でエピジェネティック制御を受けている miRNA の網羅的解析と癌抑制型 miRNA の検出

miRNA アレイを用いて、子宮体癌細胞株を 5-Aza-CdR などの脱メチル化剤で処理することにより発現が 2 倍以上上昇する、エピジェネティックな発現制御を受けている miRNA を網羅的に解析する。その発現をプロファイリングすることにより、子宮体癌の発癌に寄与

する癌抑制型 miRNA や抗癌剤感受性に影響する miRNA を同定するとともに、miRNA の導入による子宮体癌に対する新たな核酸医薬の可能性を追求する。さらに、子宮体癌および正常子宮内膜を用いて miRNA の発現パターンが臨床症例においても一致することを確認する。

## 3. 研究の方法

### (1) 子宮体癌における CHFR 遺伝子のエピジェネティックな発現低下と抗癌剤感受性

6 種のヒト子宮体癌由来細胞株および同意の得られた微量の子宮体癌組織検体を用いて、CHFR 遺伝子の MSP 法による異常メチル化解析およびタキサン製剤を含む計 6 種の抗癌剤に対する in vitro 薬剤感受性試験 (CD-DST 法) を実施する。CHFR 遺伝子の異常メチル化の状態と感受性試験の結果、および臨床的奏功および予後との関連性を解析する。

### (2) siRNA を用いたアテロコラーゲン DDS による子宮体癌に対する RNA 創薬の in vitro、in vivo での基礎的検討

CHFR 遺伝子が異常メチル化により不活化され、タキサン製剤に高い感受性を示すヒト子宮体癌由来培養細胞株を用いて、脱メチル化剤の添加前後における CHFR の発現回復とタキサン製剤感受性の変化を CD-DST 法で解析する。一方、CHFR 遺伝子にメチル化を認めず、タキサン製剤に対し抵抗性を示すヒト子宮体癌由来培養細胞株に対し、CHFR 遺伝子の siRNA を導入し、発現を特異的にノックダウンする。siRNA 導入による HEC-1B 細胞のタキサン製剤などの各種抗癌剤に対する感受性の変化を解析する。

さらに、HEC-1B 細胞をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍を形成させる。この腫瘍に対し CHFR siRNA を導入させる。抗癌剤であるタキサン製剤を腹腔内に投与した条件下で経時的に腫瘍体積を測定することにより、

CHFR を特異的にノックダウンした際のタキサン製剤の抗腫瘍効果の増強を in vivo においても確認する。腫瘍組織の増殖能およびアポトーシス誘導能への影響は、Ki67 染色および TUNEL 法により評価する。

### (3) 子宮体癌細胞でエピジェネティックな制御を受けている miRNA の網羅的解析と癌抑制型 miRNA の検出

4 種のヒト子宮体癌由来細胞株を用いて、脱メチル化剤処理前後における miRNA 発現の変化を miRNA アレイを用いて網羅的に解析を行い、子宮体癌の発癌に重要な癌抑制機能を有する miRNA の候補を選別する。候補となる癌抑制型 miRNA の脱メチル化剤添加による発現の回復を Taq-man PCR 法で確認した後、臨床検体を用いて子宮体癌において候補となる癌抑制型 miRNA が正常子宮内膜に比して発現が抑制されていることを確認する。

### (4) 子宮体癌細胞に対する癌抑制型 miRNA の遺伝子導入と抗腫瘍効果の検討

子宮体癌由来培養細胞株に対して、候補である癌抑制型 miRNA を遺伝子導入し、癌細胞に対する効果を検討する。さらにデータベースによる in silico 解析により、候補である癌抑制型 miRNA が制御する分子を解析し、関連するシグナル伝達経路を明らかとし、癌抑制機構を明らかとする。

### (5) 子宮体癌の抗癌剤感受性に寄与する miRNA の同定と創薬への応用

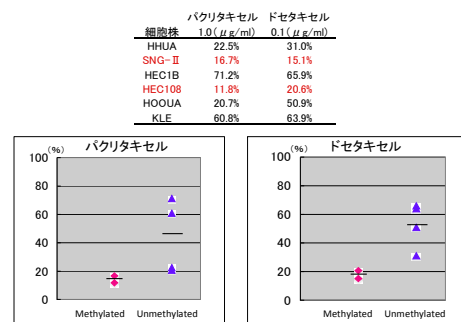
子宮体癌由来細胞株の抗癌剤感受性のデータより、子宮体癌治療の key drug とされるタキサン製剤やドキソルビシンの感受性と相関する miRNA を検出する。特に、エピジェネティックな miRNA の発現低下と抗癌剤抵抗性との関連に注目し解析する。子宮体癌細胞株に候補 miRNA を導入し、その際の抗癌剤感受性の変化を解析する。さらに、ヌードマウスを用いて in vivo における miRNA と抗癌

剤の併用による抗腫瘍効果の増強を確認する。

## 4. 研究成果

(1) 6 種のヒト子宮体癌由来細胞株のうち 2 株 (SNG-II、HEC-108) で CHFR 遺伝子の異常メチル化を認めた。CHFR 遺伝子に異常メチル化を認めた細胞株は、他の細胞株に比しタキサン製剤の感受性が高いことが明らかとなった (図 1)。

図 1. 子宮体癌培養細胞株におけるタキサン製剤感受性



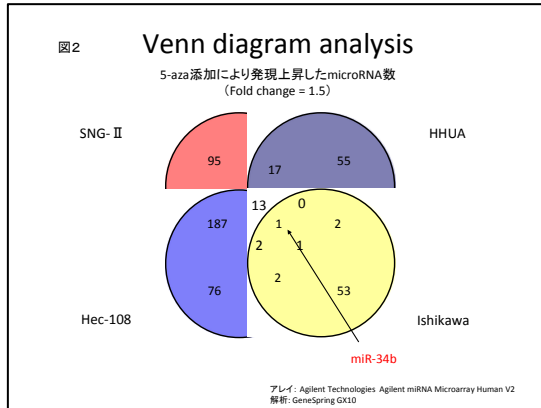
(2) CHFR 遺伝子に異常メチル化を認め、タキサン製剤に対し高感受性を示す 2 株に脱メチル化剤を添加したところ、タキサン製剤への感受性が大きく低下した。

また、CHFR 遺伝子に異常メチル化を認めずタキサン製剤に低感受性を示す HEC-1B において、CHFR siRNA 導入後にタキサン製剤に対する感受性が増強した。ドキソルビシン、アドリアマイシンを用いて同様の実験を行ったが、このような変化はタキサン製剤だけで認められた。

さらに、HEC-1B 細胞をヌードマウス皮下に移植し、①CHFR siRNA を導入群、②タキサン製剤導入群、③CHFR siRNA+タキサン製剤導入群の 3 群に分け、腫瘍径を経時的に測定した結果、薬剤投与後 12 日目にて CHFR siRNA+タキサン製剤群は、タキサン製剤単独群に比し、有意に腫瘍の増殖を抑制した (p=0.016)。

(3) 821 種のヒト miRNA のうち、5-aza 添加

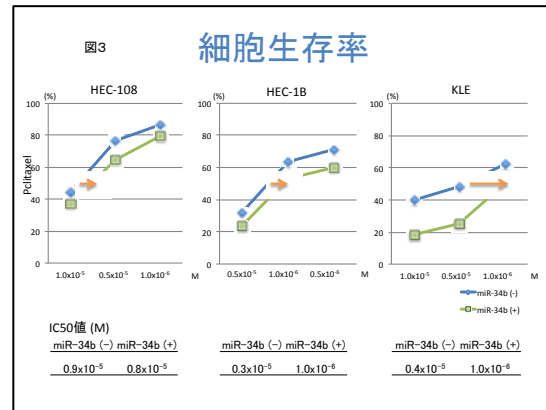
により4種すべての体癌細胞株で発現が上昇したのは miR-34b のみであった (図2)。miR-34b は CpG アイランド内に位置し、p53 により制御されている癌抑制型 miRNA であった。



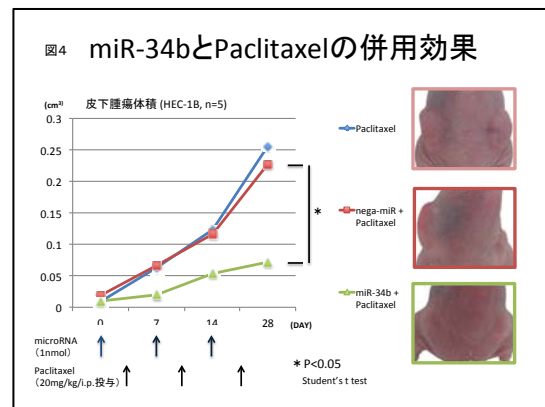
さらに、同意の得られた臨床検体を用いた解析の結果、体癌検体での miR-34b の発現は、正常子宮内膜検体に比し有意に低下していることが明らかとなった ( $p < 0.01$ )。

(4) 子宮体癌細胞株 (HEC-108) に miR-34b を導入したところ、導入前に比しコロニー形成能および遊走能は有意に低下し ( $p < 0.05$ )、G1 arrest の細胞割合が増加した。in silico 解析により miR-34b の標的遺伝子は MYC や MET であることが明らかとなった。miR-34b 導入によりこれらの標的遺伝子の発現も減少した。

(5) ヒト子宮体癌由来細胞株 (HEC-108、HEC-1B、KLE) に対し、段階的に希釈した抗癌剤 (シスプラチン、アドリアマイシン、パクリタキセル) を作用させ、miR-34b 添加時と非添加時で細胞生存率の変化を MTT 法にて解析した。その結果、シスプラチンおよびアドリアマイシンを作用させた時は、3種とも miR-34b 添加による細胞生存率の変化は見られなかった。しかし、パクリタキセルを作用させた時は、全ての細胞株において miR-34b 添加時に細胞生存率の低下が認められた (図3)。



さらに、パクリタキセルに対し抵抗性を示す HEC-1B をヌードマウスの皮下に移植し、①パクリタキセル単独群、②パクリタキセル + nega-miR 群、③パクリタキセル + miR-34b 群の3群に分け薬剤を投与し、腫瘍径を経時的に計測した。その結果、③パクリタキセル + miR-34b 群は他の群に比し有意に腫瘍の増殖が抑制された ( $P < 0.05$ , 図4)。



## 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4件)

- Banno K, Yanokura M, Kisu I, Yamagami W, Susumu N, Aoki D. MicroRNAs in endometrial cancer. Int J Clin Oncol. 2013;18(2):186-92. doi: 10.1007/s10147-013-0526-9. 査読有り
- Banno K, Kisu I, Yanokura M, Masuda K, Kobayashi Y, Ueki A, Tsuji K, Yamagami W, Nomura H, Susumu N, Aoki D. Endometrial Cancer and Hypermethylation Regulation of DNA and MicroRNA by Epigenetics.

Biochem Res Int. 2012;2012:738274.  
doi: 10.1155/2012/738274. 査読有り

3. Banno K, Kisu I, Yanokura M, Masuda K, Ueki A, Kobayashi Y, Susumu N, Aoki D. Epigenetics and genetics in endometrial cancer: new carcinogenic mechanisms and relationship with clinical practice. Epigenomics. 2012 Apr;4(2):147-62. doi: 10.2217/epi.12.13. Review. 査読有り

4. Yanokura M, Banno K, Kobayashi Y, Kisu I, Ueki A, Ono A, Masuda K, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D. MicroRNA and endometrial cancer: Roles of small RNAs in human tumors and clinical applications (Review). Oncol Lett. 2010 Nov;1(6):935-940. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22870090> 査読有り

[学会発表] (計5件)

1. 阪埜 浩司

Aberrant epigenetic DNA hypermethylation in liquid-based endometrial cytology samples: evaluation and potential use in diagnosis.

37th European congress of Cytology  
2012年10月1日ドブロボニク(クロアチア)

2. 矢野倉 恵

子宮体癌に対する miR-34b とパクリタキセル併用による抗腫瘍効果の検討  
第71回日本癌学会学術総会  
2012年9月21日(札幌)

3. 矢野倉 恵

子宮体癌においてエピジェネティクに制御される miR-34b の同定とその癌抑制効果  
第64回日本産科婦人科学会学術講演会  
2012年4月13日(神戸)

4. 阪埜 浩司

専攻医教育プログラム 卵巣がん  
第64回日本産科婦人科学会学術講演会  
2012年4月13日(神戸)

5. 阪埜 浩司

子宮体癌培養細胞株を用いたエピジェネティクに制御される癌抑制遺伝子として機能する microRNA の検索

第62回日本産科婦人科学会学術講演会

2010年4月23日(東京)

[図書] (計0件)

[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  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪埜 浩司 (BANNO KOUJI)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 70265875

(2) 研究分担者

矢野倉 恵 (YANOKURA MEGUMI)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教  
研究者番号: 20433732

(3) 連携研究者

なし