

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592432

研究課題名(和文) 子宮内膜癌における新規レチノイン酸受容体標的遺伝子の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification of novel genes for retinoic acid receptors and its function in endometrial cancer.

研究代表者

宇都宮 裕貴 (UTSUNOMIYA, Hiroki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10359507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：RAR とER に直接結合する新規共通転写制御領域に着目し、その同定を行い、新たな分子機構の解明を試みた。

初めに、RAR とER の互いに相反する作用が明らかにした。次に、クロマチン免疫沈降cloningの手法を用いてAM580添加後にRAR とER の標的結合領域を同定したところ、SMAD3遺伝子のプロモーター領域が得られた。そして、RAR をノックダウンしAM580を添加したところ、ノックダウンしない状況と比較してSMAD3の発現が有意に低下した。以上より、SMAD3はRAR との関連によりRA治療に関連すると期待された。

研究成果の概要(英文)：We focused on the novel target areas of mutual transcription factor for RARα and ERα. And then, we tried to detect the genes and its novel molecular mechanism.

At first, we revealed the opposite functions between RARα and ERα. And then, we studied the target binding area of RARα and ERα using ChIP cloning technique, and found the promoter lesions of SMAD3. In addition, SMAD3 was significantly decreased after knock-down for RARα and addition of AM580 treatment compared with the control data.

Our findings suggested that SMAD3 genes, which were deeply correlated with AM580 treatment, might play important biological roles in endometrial cancer.

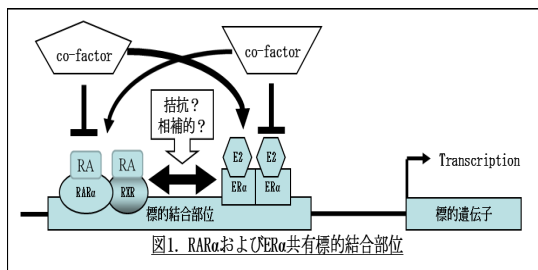
研究分野：医歯薬学

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：子宮内膜癌 レチノイン酸 エストロゲン受容体 レチノイン酸受容体 SMAD3

## 1. 研究開始当初の背景

レチノイン酸(RA)はビタミンAの誘導体で、核内受容体であるレチノイン酸受容体(RAR)およびレチノイドX受容体(RXR)に結合することによりその転写活性を調節し、個体の発生レベルでの制御を担うと考えられている。さらに、レチノイン酸は様々な細胞の増殖を停止し、分化・アポトーシスを誘導する。RARとRXRにはそれぞれ3つのサブタイプ(、)が存在するが、全てヘテロ二量体を形成し、特異的な標的遺伝子群プロモーターに結合する。また、RARを介するシグナル伝達の阻害により、癌の発症や増殖・進展が引き起こされると報告されている。ところが最近になり、RARはエストロゲンレセプター(ER)と標的結合領域を広範囲に共有していることが乳癌で相次いで報告され、互いに拮抗または相補的な作用を有すること、また種々のco-factorがその作用発現に深く関与していることが明らかになってきた(図1)。



子宮内膜癌は乳癌と同様にエストロゲン依存性の疾患であり、本邦での罹患数は著しい増加傾向にある。我々はこれまでに、子宮内膜癌においてRARが強発現していること、レチノイン酸投与により局所におけるエストロゲン活性が減弱すること、さらにRARをknock downすることにより腫瘍局所のエストロゲン活性が有意に上昇することを報告してきた。また、子宮内膜癌細胞株にRAR特異的なレチノイン酸(AM580)を添加し(100nM: 1, 3, 6時間)、マイクロアレイにて網羅的解析を行いその変動を定量PCRにて検証したところ、RA代謝酵素や細胞周期調節因子、アポト

ーシス誘導因子に有意な変動が認められた。以上より、子宮内膜癌の増殖・進展の抑制において、乳癌同様にRARが非常に重要な役割を果たしていると仮定し、ER陽性の子宮内膜癌細胞株を使用し、RAR標的結合領域に焦点を当てて検討した。

## 2. 研究の目的

代表的な子宮内膜癌細胞株を用いて、RARおよびERと共に直接結合する新たな転写制御領域を同定し、その機能解析を行う。そして、子宮内膜癌に対する新しい治療法の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

(1) ER陽性子宮内膜癌細胞株におけるRARおよびERノックダウンによる、細胞増殖やアポトーシス誘導に及ぼす影響

RARおよびERに対する20~23 bpのShort Interfering (si)RNAをデザインし、Dharmacon社へ合成を委託した。さらに、Lipofectamine 2000を用いてtransfectionし、遺伝子ノックダウンによる細胞の活動性およびアポトーシス誘導を検討した。トリパン・ブルーを用いて死亡細胞数を確認し、さらにpoly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage Western Blot assayを用いてアポトーシス誘導を検討した。

(2)クロマチン免疫沈降(ChIP)クローニング

ER陽性の子宮内膜癌細胞株2種類(Ishikawa, RL95-2)を使用した。手法は以前にER標的遺伝子を同定した際のもの若干変法して施行した。これまでの我々の検討と他施設の報告より、AM580処理は100nM, 1時間とする。実験のため、これらの細胞にホルマリンを用いて架橋構造を作り、1.5mlチューブに回収しタンパク分解酵素阻害剤を添加

し-80度で保存した。そして、これらの細胞株を用いて、クロマチン免疫沈降クローニングを行った。

Sonic Dismembrator Model 100 (Fisher Scientific 社)を使用して断片化を行った。通常の ChIP assay では 200~1000bp のサイズに切断するが、その長さではクローニング不可能なことも多く、500~3000bp と長く切断して使用した。

RAR 抗体による免疫沈降を行う際、抗体の選択がこの実験の成否に大きく関わると言われている。これまでの MCF-7 細胞を用いた検討で使用されていた SantaCruz 社の抗体を使用した。

回収された DNA には非特異的なものが多く含まれることが予想される。通常の ChIP assay では回収した DNA-Antibody 複合体に対し 4~5 回の洗浄を行うが、クローニングを行う際には 8~10 回洗浄し、可能なかぎり非特異的なものを除去した。

回収した DNA (RAR 結合領域) を制限酵素で処理し、linker ligation や pGEM-T Easy Vector System を使用してクローニングした。さらに、シークエンスを確認し BLAT search function (University of California Santa Cruz genome browser) を用いて遺伝子を同定した。

### (3) real-time PCR を用いた SMAD3 発現の変化

RL95-2 細胞を用いて RAR を siRNA 法でノックダウンし、AM580 を添加して SMAD3 の発現変化を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) Ishikawa 細胞、RL95-2 細胞における RAR および ER ノックダウンによる、細胞増殖やアポトーシス誘導の変化

初めに 2 つの子宮内膜癌細胞株を用いて

siRNA 法で RAR および ER を knockdown し、mRNA およびタンパクの発現変化を見た。すると mRNA レベルで約 80-90%、タンパクレベルで 50-60% のノックダウン効率が得られた (図 2)。

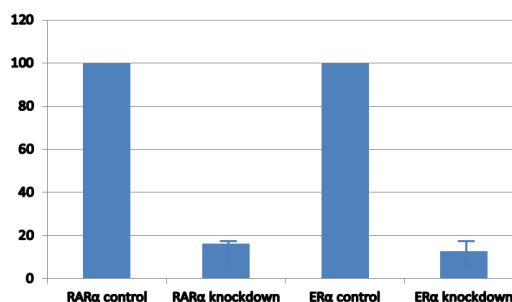


図 2 . siRNA 法による mRNA 発現低下率

また、RAR をノックダウンすると細胞増殖は亢進し、アポトーシスは抑制された。一方、ER をノックダウンすると細胞増殖は抑制され、強いアポトーシスの誘導を認めた (control vs. 96h,  $p < 0.05$ ) (図 3)。以上より、子宮内膜癌細胞において RAR および ER は相反する働きがあると推察された。

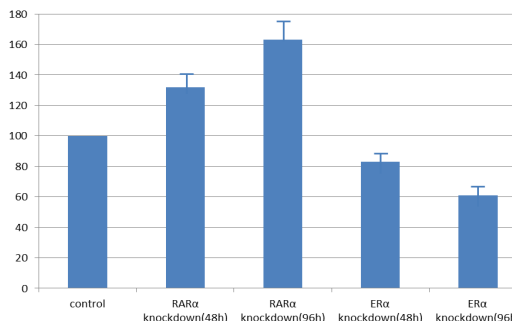


図 3 . siRNA 法による細胞増殖率

### (2) クロマチン免疫沈降(ChIP)クローニングによる Ishikawa 細胞や RL95-2 細胞における RAR および ER 結合部位の同定

RAR 結合部位を同定するために、RAR 抗体を用いて ChIP クローニングを行い、236 個の標的遺伝子が同定された。ER に関しては従来の検討で 47 個の標的部位が得られている。今回の検討では以前に行った ER 抗体を用いた検討と同様に、RAR 標的遺伝子は、従来からエストロゲンの働きに深く関わ

ると考えられている遺伝子、これまで関連の認められなかった遺伝子、これまで重要と認識されていなかったイントロン内の ER 結合領域、に分類された。そして、最終的に RAR 抗体および ER 抗体に共通する物には、SMAD3 や GATA3 などに関連する重要な遺伝子が含まれていた。

### (3) RAR knockdown 後のレチノイン酸投与による SMAD3 の発現変化

今回、AM580 および ATRA を用いて、子宮内膜癌で強発現している RAR および ER に直接結合する新たな共通の転写制御領域を同定し、その機能解析を行うために ER 陽性の 2 種の子宮内膜癌細胞株を用いて検討を行った。その結果、RL95-2 細胞を用いた共有標的遺伝子の検討で、SMAD3 遺伝子のプロモーター領域が候補としてあがった。この領域は、以前に行ったレチノイン酸添加後の遺伝子発現変化を時間ごとに調べた検討でも指摘された遺伝子領域であった。また、RL95-2 細胞を用いて RAR をノックダウンし AM580 を添加したところ、ノックダウンしない状況と比較し SMAD3 の発現が有意に低下した (control vs. 48h and 96h,  $p < 0.05$ ) (図 4)。

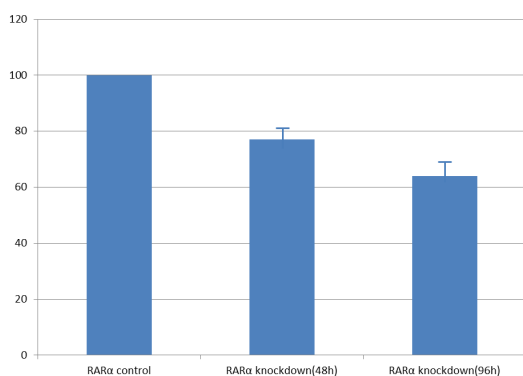


図 4 . siRNA 法による細胞増殖率

## 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 10 件)

Clinical outcome of pelvic exenteration in patients with advanced or recurrent uterine cervical cancer. Tanaka S, Utsunomiya H, et al. (13 名中 9 番目) *Int J Clin Oncol*. (査読有) (2014) 19(1):133-138. doi: 10.1007/s10147-013-0534-9.

Feasibility study of gemcitabine plus docetaxel in advanced or recurrent uterine leiomyosarcoma and undifferentiated endometrial sarcoma in Japan. Takano T, Utsunomiya H, et al. (18 名中 5 番目) *Int J Clin Oncol*. (査読有) (2013) [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24149774

Expression of steroid and xenobiotic receptor in uterine carcinosarcoma, leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma. Yue X, Utsunomiya H, et al. (8 名中 2 番目) *Oncol Lett*. (査読有) 5:835-839 (2013) PubMed PMID: 23443531

Food intake and the risk of endometrial endometrioid adenocarcinoma in Japanese women. Takayama S, Utsunomiya H, et al. (10 名中 8 番目) *Nutr Cancer*. (査読有) 65:954-960. (2013) doi: 10.1080/01635581.2013.818158.

Tracer injection sites and combinations for sentinel lymph node detection in patients with endometrial cancer. Niikura H, Utsunomiya H, et al. (10 名中 5 番目) *Gynecol Oncol*. (査読有) 131(2):299-303. (2013) doi: 10.1016/j.ygyno.2013.08.018.

Laparoscopic strassman metroplasty in a postmenarcheal adolescent girl with herlyn-werner-wunderlich müllerian anomaly variant, obstructed noncommunicating didelphic uterus without gartner duct pseudocyst.

Nabeshima H, Utsunomiya H, et al. (5 名中 4 番目) *J Minim Invasive Gynecol*. (査読有) 20:255-258. (2013) doi: 10.1016/j.jmig.2012.10.016.

Small Cell Carcinoma of the Uterine Cervix: Clinical Outcome of Concurrent Chemoradiotherapy with a Multidrug

Regimen. Tokunaga H, Utsunomiya H, et al. (14 名中 10 番目) *Tohoku J Exp Med.* (査読有) 229:75-81 (2013) PubMed PMID: 23269283

子宮体がん性とステロイド合成阻害剤 (特集: ホルモン依存性悪性腫瘍 - 特徴と対処を考える - ) 宇都宮裕貴、他 産婦人科の実際 (査読無)

62:1201-1206(2013)

Prospective Study of Sentinel Lymph Node Biopsy Without Further Pelvic Lymphadenectomy in Patients With Sentinel Lymph Node-Negative Cervical Cancer. Niihara H, Utsunomiya H, et al. (10 名中 5 番目) *Int J Gynecol Cancer.* (査読有) 22:1244-1250. (2012) doi: 10.1097/IGC.0b013e318263f06a.

Individualized Radical Hysterectomy Procedure Using Intraoperative Electrical Stimulation for Patients with Cervical Cancer. Nagai T, Utsunomiya H, et al. (13 名中 6 番目) *Int J Gynecol Cancer.* 22:1591-1596 (2012) doi:

10.1097/IGC.0b013e31826fd684.

[学会発表](計 18 件)

石橋ますみ、宇都宮裕貴、他「当院における広汎子宮頸部摘出術と妊娠成績の検討」第 51 回東北生殖医学会、青森、2013 年 11 月 2 日

宇都宮裕貴「ホルモン補充療法の最近の話題～ガイドライン改訂をふまえて～」福島県産婦人科医会県中地区学術講演会 (招待講演) 郡山、2013 年 9 月 19 日

宇都宮裕貴「エストロゲン依存性腫瘍の治療戦略」第 61 回北日本産科婦人科学会 (招待講演) 旭川、2013 年 9 月 7 日  
重田昌吾、宇都宮裕貴、他「日本人女性における食物摂取と子宮体部類内膜腺癌発症リスクについての症例対照研究」第 61 回北日本産科婦人科学会、旭川、2013 年 9 月 7 日

宇都宮裕貴「生殖医療の最近の話題」平成 25 年第 1 回宮城県産婦人科医会コ・メディカル研修会プログラム (招待講演) 仙台、2013 年 7 月 20 日

辻圭太、宇都宮裕貴、他「当院における婦人科悪性腫瘍脳転移症例の検討」第 54 回日本婦人科腫瘍学会、東京、2013 年 7 月 19 日

宇都宮裕貴「東北大学で開始したロボット支援手術」第 581 回宮城産科婦人科学会集談会 (招待講演) 仙台、2013 年 7 月 13 日

Okamoto S, Utsunomiya H, et al.

“Evaluation of endocervical glandular lesions using a scoring system” The 18th International Congress of Cytology, Paris (France) 2013 年 5 月 25 日

西本光男、宇都宮裕貴、他「子宮内膜癌における Steroid sulfatase 阻害剤の有効性に関する検討」第 65 回日本産科婦人科学会、札幌、2013 年 5 月 11 日

鈴木史彦、宇都宮裕貴、他「子宮体部漿液性腺癌における microRNA-34b の癌抑制的な機能の検討」第 65 回日本産科婦人科学会、札幌、2013 年 5 月 10 日

西本光男、宇都宮裕貴、他「子宮内膜癌における Steroid Sulfatase 阻害剤の有用性に関する検討」第 25 回日本内分泌学会東北地方会、秋田、2012 年 11 月 17 日

北村真理、宇都宮裕貴、他「月経痛患者における月経前症候群(PMS)症状に対するヤーズ配合錠の有効性検討」第 27 回日本女性医学学会、山形、2012 年 10 月 14 日

宇都宮裕貴、他「SXR は卵巣癌治療の有望な標的遺伝子である」第 71 回日本癌学会、札幌、2012 年 9 月 21 日

鈴木史彦、宇都宮裕貴、他「子宮体部漿液性腺癌において miR-34b はエピジェネティクに制御され、癌の浸潤・転移に関与する」第 71 回日本癌学会、札幌、2012 年 9 月 21 日

Shogo Shigeta, Hiroki Utsunomiya, et al. “Identification of novel estrogen receptor target gene and its function in endometrial cancer” 60th Annual Clinical Meeting of the American College of Obstetricians and Gynecologists. San Diego (USA) 2012 年 5 月 7 日

志賀尚美、宇都宮裕貴、他「閉塞性病変を伴う Muller 管発生異常症例に関する後方視的検討」第 64 回日本産科婦人科学会、神戸、2012 年 4 月 13 日

鈴木史彦、宇都宮裕貴、他「子宮体部漿液性腺癌において miRNA-34b は浸潤性および足場非依存性増殖能を制御する」第 64 回日本産科婦人科学会、神戸、2012 年 4 月 13 日

宇都宮裕貴、他「The mechanism of retinoic acid treatment in endometrial cancer cell」第 70 回日本癌学会学術集会、名古屋国際会議場、2011 年 10 月 4 日

〔その他〕

東北大学医学部産婦人科ホームページ  
(<http://www.ob-gy.med.tohoku.ac.jp/index.html>)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇都宮 裕貴 (UTSUNOMIYA, HIROKI)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：10359507

### (2) 研究分担者

鈴木 史彦 (SUZUKI, FUMIHIKO)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20400343