

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09796

研究課題名（和文）子宮体癌の代謝プロファイル異常の解明と治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of abnormal metabolic profile of endometrial cancer

研究代表者

三橋 暁 (Mitsubishi, Akira)

千葉大学・大学院医学研究院・特任教授

研究者番号：40302541

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）：糖尿病治療薬メトホルミンは、子宮体癌に対し増殖抑制効果が得られている。そこで、子宮体癌培養細胞株にメトホルミンを添加し、マイクロアレイで遺伝子発現変化を検討した。メトホルミン添加でGIF、FAM20A、CDRT15、BACH2での発現増加、SLC12A7、C8orf37-AS1、ZCCHC1での発現低下が認められた。メトホルミンの作用に一定の知見を得ることができたが、代謝に関連する共通の遺伝子発現変化は確認できなかった。今回、ゲノム編集を利用した機能喪失スクリーニングでは、子宮体癌に関連する代謝異常は同定できなかった。子宮体癌発癌や増殖に代謝異常が関与している可能性はあり、今後検討を続ける。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満や糖尿病とも関連し子宮体癌が増加傾向にあるが、癌における糖代謝、アミノ酸代謝と増殖の関連性を解明することは子宮体癌の予防戦略に結びつく。本研究では、残念ながら子宮体癌に関連する代謝異常に対し有意な見解を得ることはできなかったが、糖尿病治療薬メトホルミンの体癌に対する作用が推測された。

研究成果の概要（英文）：Metformin, which is a diabetes drug, has shown to inhibit the growth of endometrial cancer. Metformin was included to cultured endometrial cancer cell lines and examined the changes in gene expression using microarrays. Microarray analysis revealed the increased expressions of GIF, FAM20A, CDRT15, and BACH2 and decreased expressions of SLC12A7, C8orf37-AS1, and ZCCHC1. Although no common cancer metabolism-related genetic alterations were observed, we obtained certain findings on the action of metformin. We examined the loss-of-function using genome editing and did not obtain any results. However, we will continue to examine cancer metabolism abnormalities as they may be involved in endometrial cancer carcinogenesis and proliferation.

研究分野：子宮体癌

キーワード：子宮体癌 肥満 メトホルミン インスリン抵抗性 癌代謝

1. 研究開始当初の背景

癌と代謝

多くの腫瘍では、好気条件下にもかかわらず、酸化的リン酸化を抑制し、乳酸生成に向かう糖代謝(解糖系)の亢進を認めることが、古くから Warburg 効果として知られる。癌の増殖に ATP のみならず、アミノ酸や脂肪酸の合成促進が必要なためと解釈されているが、子宮体癌における局所代謝は十分に解明されていない。

TCA サイクルの異常として、SDH や FH の変異が原因とされる家族性腫瘍や、IDH1 および IDH2 変異による白血病や膠芽細胞腫が知られている (*Science*. 2008; 321:1807-12, *Lancet Oncol* 2011;12:83-91)。変異した IDH1 により α -ketoglutarate が 2-hydroxyglutarate(2-HG) に代謝され、2-HG による HIF-1 の活性化や DNA メチル化の異常が起こるとされる。また近年、RNA 干渉に基づく機能喪失スクリーニングにより、乳癌や悪性黒色腫で PHGDH の亢進が報告された (*Nature* 2011;476:346-50, *Nat Genet* 2011;43:869-74)。PHGDH の作用で、セリンやグリシン代謝が亢進するが、PHGDH の抑制で癌の増殖が抑制される。このように、癌では、糖・アミノ酸代謝性酵素の発現異常による代謝の変化が、腫瘍形成・癌増殖の一因となることが示唆された。

一方、子宮体癌は、肥満との関連が最も強い癌として知られ、糖尿病の合併も多く、インスリン抵抗性・高インスリン血症が発癌・増殖に関与している。しかし、子宮体癌における局所代謝関連因子の発現異常に対する検討は少ない。これまで我々は糖尿病治療薬であるメトホルミンが子宮体癌の増殖を抑制し、再発を抑制することを確認してきた。メトホルミンは AMPK を活性化・ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I を抑制し、解糖系を亢進する薬剤として知られている。同効薬のフェンフォルミンもミトコンドリア呼吸鎖複合体 I を抑制し、アスパラギン酸の産生を抑制する。さらに GOT 1 抑制でその作用が増強されることが報告された (*Cell* 2015;162: 540-51)。

これらの知見から、子宮体癌でも 糖、アミノ酸合成の亢進など代謝異常を有し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I を標的とする酸化的リン酸化阻害剤で、抗腫瘍効果が得られる可能性があるかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、子宮体癌培養細胞株で CRISPR/Cas9 sgRNA ライブラリーを用いた機能喪失スクリーニングを行い、子宮体癌の増殖に必要な代謝関連原因遺伝子の同定と、同時にメトホルミン

や酸化的リン酸化阻害剤との相互作用を探索し、子宮体癌におけるアミノ酸代謝経路、解糖系をターゲットとした治療法の構築を目的とする。

本研究の特徴は、ゲノム編集を利用した機能喪失スクリーニングにより、子宮体癌における糖・アミノ酸代謝異常の検索を行うことである。この技術で、最近新規の癌抑制遺伝子も同定されており、癌の増殖に関連する因子が同定できると推測する。癌で亢進している代謝関連因子が同定されれば、その抑制が治療のターゲットになる可能性がある。代謝異常プロファイルを同定し、代謝経路をターゲットとした治療法は、従来の化学療法や分子標的薬に加え、子宮体癌の新たな治療戦略となると考える。

3. 研究の方法

(1) 子宮体癌培養細胞に対するメトホルミンの効果

子宮体癌培養細胞株にメトホルミン10mMを添加、24h後にRNAを抽出、メトホルミン非添加細胞から抽出したRNAとで、マイクロアレイで各種遺伝子の発現を比較する。本実験で、まずメトホルミンにより発現に変化のある遺伝子群を同定する。

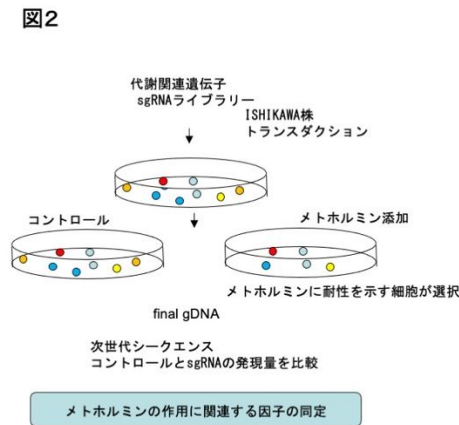
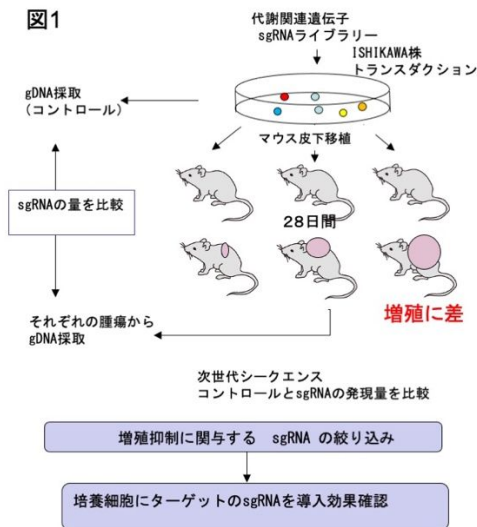
(2) ゲノム編集を利用した機能喪失スクリーニング(図1)

1) 子宮体癌培養細胞株で増殖に関連する代謝関連遺伝子の同定

代謝関連遺伝子をターゲットにした sgRNA ライブラリーを用いて、子宮体癌の増殖に関連する遺伝子を同定する。プール型 sgRNA ライブラリーを CRISPR/Cas9 法により ISHIKAWA 株に導入し、 10^5 - 10^6 細胞をマウスの皮下に移植し 4 週間後に腫瘍を回収する。複数の形成腫瘍より抽出した DNA と、コントロール sgRNA 導入細胞から抽出した DNA を比較。腫瘍形成能に影響のある sgRNA の絞り込みを行う。解析は Illumina の次世代シーケンサーを用いて受託で行う。腫瘍増殖に影響した sgRNA をスクリーニング(ノックダウンにより細胞増殖が抑制される遺伝子を同定)することで、癌の増殖に重要な遺伝子を抽出する。ISHIKAWA 株に同定された遺伝子の sgRNA を導入し、MTT 法で増殖抑制効果を確認する。増殖抑制効果が検証できれば、治療ターゲットの候補とする。

2) 子宮体癌に対する酸化的リン酸化阻害剤の効果と相互作用(図2)

子宮体癌培養細胞株にメトホルミンやミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 阻害剤(IACS-010759)を添加し、MTT 法で増殖抑制効果を確認する。また、IACS-010759、メトホルミン添加時のアミノ酸産生の変化を ELISA 法で、作用機序をウエスタンブロット法で検索する。同時に、代謝関連遺伝子をターゲットにした sgRNA ライブラリーを用いて、IACS-010759 およびメトホルミンの効果へ影響を及ぼす因子を探索する。本解析により、野生型に対して、IACS-010759 やメトホルミンに抵抗性の因子や、作用増強効果のある因子を同定することができる。



4. 研究成果

- 1) メトホルミン添加により ISHIKAWA 株、HEC1B 株、HEC265 株の 3 株共通に発現が変化している遺伝子を同定した。発現増加は GIF、FAM20A、CDRT15、BACH2 遺伝子に認め、発現低下は SLC12A7、C8orf37-AS1、ZCCHC1 に見られた。メトホルミン添加で 3 株共通な代謝に関連する遺伝子発現変化は認められなかった。代謝関連ではないが、今回抽出された遺伝子の役割とメトホルミンの効果について、今後 siRNA 等でのノックダウン実験を検討する。
- 2) 代謝関連遺伝子をターゲットにした CRISPR/Cas9 sgRNA ライブラリーを子宮体癌培養細胞株にレンチウイルスを用いて導入し、継代後の生存細胞にメトホルミンを添加して非添加群と添加群の DNA を抽出した。また CRISPR/Cas9 sgRNA ライブラリー非導入株からも DNA を抽出、導入後の株との比較を行った。代謝関連遺伝子群の CRISPR/Cas9 sgRNA ライブラリー導入後は、予定通りには生存細胞数が得られなかった。これは本ライブラリーに含まれる生存に寄与する遺伝子の影響が強く、細胞増殖が抑制されたものと考えられる。回収できた生存細胞にメトホルミンを添加し次世代シーケンスにより比較したが、今回の系では差のある sgRNA が同定できず、ターゲットとなる代謝関連遺伝子は確認できなかった。代謝関連遺伝子をターゲットにした機能喪失スクリーニングは期間中には達成できなかったが、現在条件を変えて実験継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Habu Yuji, Mitsuhashi Akira, Hanawa Shinsuke, Usui Hirokazu, Horikoshi Takuro, Uno Takashi, Shozu Makio	4. 巻 124
2. 論文標題 High prevalence of pulmonary embolism prior to cancer therapies in patients with ovarian and endometrial cancers detected by contrast enhanced CT using D dimer as an index	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 106 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jso.26471	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Tatsuya, Ishikawa Hiroshi, Ishii Kumiko, Sato Asuka, Nakamura Natsuko, Saito Yoshiko, Hasegawa Hisataka, Fujita Maki, Mitsuhashi Akira, Shozu Makio	4. 巻 11
2. 論文標題 Time-lapse monitoring of fertilized human oocytes focused on the incidence of OPN embryos in conventional in vitro fertilization cycles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98312-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Konno Y, Asano H, Shikama A, Aoki D, Tanikawa M, Oki A, Horie K, Mitsuhashi A, Kikuchi A, Tokunaga H, Terao Y, Satoh T, Ushijima K, Ishikawa M, Yaegashi N, Watari H.	4. 巻 32
2. 論文標題 Lymphadenectomy issues in endometrial cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gynecol Oncol	6. 最初と最後の頁 e25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3802/jgo.2021.32.e25.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Baba S, Taguchi A, Kawata A, Hara K, Eguchi S, Mori M, Adachi K, Mori S, Iwata T, Mitsuhashi A, Maeda D, Komatsu A, Nagamatsu T, Oda K, Kukimoto I, Osuga Y, Fujii T, Kawana K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Differential expression of human papillomavirus 16-, 18-, 52-, and 58-derived transcripts in cervical intraepithelial neoplasia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12985-020-01306-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takekuma M, Takahashi F, Mabuchi S, Kudaka W, Horie K, Ikeda M, Shikama A, Mitsuhashi A, Nagao S, Suzuki S, Mizuno M, Nishio S, Tokunaga H, Ota Y, Kasamatsu T, Kitagawa R, Toita T, Kobayashi H, Ishikawa M, Yaegashi N	4. 巻 20
2. 論文標題 Propensity score-matched analysis of systemic chemotherapy versus salvage hysterectomy for persistent cervical cancer after definitive radiotherapy/concurrent chemoradiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-07672-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuhashi Akira, Kawasaki Yohei, Hori Makoto, Fujiwara Tadami, Hanaoka Hideki, Shozu Makio	4. 巻 10
2. 論文標題 Medroxyprogesterone acetate plus metformin for fertility-sparing treatment of atypical endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma: trial protocol for a prospective, randomised, open, blinded-endpoint design, dose-response trial (FELICIA trial)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e035416 ~ e035416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjopen-2019-035416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuhashi Akira, Shozu Makio	4. 巻 46
2. 論文標題 New therapeutic approaches for the fertility-sparing treatment of endometrial cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 215 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuhashi Akira, Habu Yuji, Kobayashi Tatsuya, Kawarai Yoshimasa, Ishikawa Hiroshi, Usui Hirokazu, Shozu Makio	4. 巻 30
2. 論文標題 Long-term outcomes of progestin plus metformin as a fertility-sparing treatment for atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancer patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3802/jgo.2019.30.e90	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Seki Kumiko, Ishikawa Hiroshi, Hashimoto Rei, Mitsuhashi Akira, Ikeda Jun-ichiro, Shozu Makio	4. 巻 31
2. 論文標題 Development of localized cul-de-sac endometrioid carcinoma associated with deep infiltrating endometriosis during remission of early endometrial cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 100526 ~ 100526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gore.2019.100526	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Mitsuhashi A, Gu W, Habu Y, Kobayashi T, Shozu M.
2. 発表標題 Metformin may attenuate the effect of hyperprolactinemia induced by medroxyprogesterone acetate during fertility-sparing treatment for patients with atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancer
3. 学会等名 ESGO 2019 (国際学会)
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
研究分担者	羽生 裕二 (Habu Yuji) (40816162)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	
研究分担者	安西 尚彦 (Anzai Naohiko) (70276054)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

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
---------	---------