

令和元年5月14日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11123

研究課題名(和文) 子宮体癌の微小環境を増悪させるマイクロRNA-EZH2フィードバックループの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the miRNA-EZH2 feedback loop regulating endometrial cancer microenvironment

研究代表者

金野 陽輔 (Konno, Yosuke)

北海道大学・医学研究科・助教

研究者番号：10572703

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)：我々は、子宮体癌(体癌)細胞におけるmiRNA/EZH2フィードバックループによるEZH2高発現の調節機構とIL-6/8産生誘導におけるEZH2の役割を明らかにすることを目的として本研究を行った。その結果、EZH2と癌抑制的miRNA群が相互に負のフィードバックループを形成し、EZH2の発現亢進及び癌抑制的miRNAの発現低下を招き、下流分子経路を介し、IL-6/8過剰産生及び体癌の悪性化を導くという重要な成果が得られた。本研究により得られた知見は、今後体癌の根絶を目指す基盤研究の発展及び新しい治療法の開発に大きく貢献していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EZH2と癌抑制miRNA群が相互に負のフィードバックループを形成して、EZH2の発現亢進及びlet-7bなどのmiRNAの発現低下を招き、下流にあるTwist、Snail、STAT3経路、NF- κ B経路及びWnt/ β -catenin経路の活発化を介して、IL-6/8過剰産生及び体癌の悪性化を導くという重要な成果が得られている。本研究により得られた知見は、今後体癌の根絶を目指す基盤研究の発展及び新しい治療法の開発に大きく貢献していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify whether the miRNA-EZH2 feedback loop contributes to EZH2 overexpression in endometrial cancer and whether EZH2 induces the expression of IL-6/8 through miRNAs-mediated signaling pathways. We found that EZH2 and tumor suppressor miRNAs mutually form a negative feedback loop, resulting in enhanced expression of EZH2 and decreased expression of tumor suppressor miRNAs and that EZH2 induces the overproduction of IL-6/8 via miRNAs-mediated pathways in endometrial cancer cells. These findings suggest that targeting and inhibition of EZH2 represents a potential therapeutic strategy for endometrial cancer.

研究分野：子宮体癌

キーワード：microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌(体癌)は最も頻度の高い婦人科悪性腫瘍の一つであり、患者数(特に若い世代)は年々増加傾向にある。体癌の大半を占める類内膜腺癌は比較的に良好な予後を示すが、悪性度の高い進行癌や漿液性腺癌転移の制御は未だ満足できる状況ではなく、患者の死亡の最大の原因となる。体癌の進展に関わる分子基盤は十分には理解されておらず、依然として有望な創薬標的分子の同定は急務である。

腫瘍細胞を取り巻く局所(微小)環境が癌の転移に密接な関係がある。腫瘍局所環境では、体癌などの癌細胞は宿主側の調節を受けながら、代表的な炎症性サイトカイン IL-6/8 の産生と分泌を行い、転移に有利な環境を整え、癌細胞自身の悪性形質(増殖・浸潤)を促進できる(J Endocrinol 2010)。IL-6/8 は正常内膜に比べ、体癌組織で高発現を示し、その異常産生に関わるメカニズムの解明は体癌進展の制御に向けた研究と治療法の開発の鍵である。

IL-6/8 の発現は、癌遺伝子(Twist、Snail)、Wnt/ β -catenin 経路、STAT3/NF- κ B 経路によって正に制御される。一方、microRNA (miRNA)は、標的 mRNA の分解と翻訳抑制を介して組織特異的に、複数の遺伝子発現を抑制することで、癌転移に深く影響している。let-7b は IL-6 を抑制して、抗転移的に作用する(Cell 2009)。これまで、体癌における IL-6/8 の制御に関する遺伝子及び miRNA の研究報告はまだ少ない。

様々な癌腫において、ポリコム遺伝子 EZH2 の高発現は腫瘍の形成や進展に関わっており、乳癌細胞の IL-6/8 産生を促進する(Cancer Res 2013)。EZH2 はヒストン(H3K27)をメチル化することで、癌細胞での miR-101/let-7b 発現を抑制する(Cancer Res 2012)。逆に前立腺癌で EZH2 は let-7b の直接的な標的である(PLoS One 2012)。我々は、体癌細胞で、miR-101 が EZH2 の発現を抑制し、Wnt/ β -catenin 経路の活性を抑えること明らかにした(Oncotarget 2014)。miRNA と EZH2 の相互作用による EZH2 高発現の調節機構や IL-6/8 産生誘導に対する EZH2 機能亢進の役割と作用機構の検討は、体癌の高悪性化の機序解明に資するものと考えられる。

我々の予備実験の結果から、癌抑制 miRNA と EZH2 が相互に負のフィードバックループを形成して、miR-101/let-7b などの miRNA の発現低下を招き、EZH2 の活性を高めること、また EZH2 の発現亢進は、下流にある let-7b、Twist、Snail 及び Wnt/ β -catenin 経路を介して IL-6/8 過剰産生を導く可能性が示唆された。

2. 研究の目的

体癌での miRNA-EZH2 フィードバックループによる EZH2 高発現の調節機構と IL-6/8 産生誘導における EZH2 役割を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 我々の研究室で体癌細胞 HEC-50 (類内膜腺癌由来)と SPAC1-L (漿液性腺癌由来)から樹立された高浸潤性亜細胞株と親株の miRNA 発現を比較することで、高浸潤性亜細胞株で発現量が低値を示す miRNA を、浸潤抑制に関わる miRNA 候補として同定する。
- (2) EZH2 を標的とする miRNA 群を *in silico* で予測する。更に、発見した候補 miRNA と照合して、EZH2 の制御に関わる癌抑制 miRNA 候補を絞り込む。
- (3) 同定された miRNA 候補を強制過剰発現またノックダウンするため、Pre-miRNA Precursor また Anti-miRNA inhibitor (Ambion)をそれぞれ体癌細胞に導入して、候補 miRNA の機能解析を行う。癌細胞の浸潤能を invasion assay で、増殖能を clone formation assay で、スフェア形成能を sphere formation assay で、抗癌剤に対する耐性を MTT assay で、EMT、増殖関連遺伝子及び癌幹細胞マーカー遺伝子発現の変化を Realtime PCR と Western blot 法により検討することで、体癌細胞の悪性形質を抑制する miRNA の同定を行う。
- (4) miRNA の導入による EZH2 遺伝子の mRNA とタンパク発現の低下を Realtime PCR と Western blot 法により検討し、EZH2 発現を負に調節する miRNA を確定する。
- (5) 見出した miRNA 群が EZH2 遺伝子の非翻訳領域と直接に結合するかについて、体癌細胞に候補 miRNA と EZH2 の非翻訳領域を含むレポータープラスミド(Origene)を同時に導入し、luciferase assay で EZH2 の直接標的 miRNA を確認する。
- (6) miRNA マイクロアレイを実施し、EZH2 遺伝子のノックアウトによって、発現が亢進する miRNA を、EZH2 によって負に調節される miRNA として洗い出し、Realtime PCR により確認する。その機能は体癌細胞を用いて、解明する。
- (7) 更に miRNA のプロモーター配列を含むルシフェラーゼベクターを作製して、EZH2 発現ベクターと同時に体癌細胞に導入して、ルシフェラーゼアッセイによって EZH2 により直接的に発現抑制される miRNA を同定する。
- (8) EZH2 cDNA の過剰発現とノックアウトによる IL-6/8 など炎症性サイトカインの発現量の変化を定量的に測定し、上清に分泌された IL-6/8 の量を調べる。
- (9) IL-6/8 など炎症性サイトカインの存在下での体癌細胞悪性形質の評価を行う。
- (10) let-7b などの発現を変化させ、体癌細胞での IL-6 の発現を Western blot 法により検討する。TargetScan などのデータベースを用いて、IL-6/8 を標的とする miRNA 群を同定して、miRNA を介する EZH2 による IL-6/8 の産生亢進のメカニズムを明らかにする。
- (11) EZH2 の発現を変化させ、また EZH2 特異的阻害剤 GSK343 の処理で EZH2 の不活性化を誘導することで、潜在的な下流シグナル分子(Twist、Snail、p-STAT3、NF- κ B、 β -catenin)の

蛋白質発現を Western blot 法により解析する。

- (12) 更に Twist と Snail 遺伝子の特異的ノックダウン、また STAT3 阻害剤 BP-1-102、NF- κ B 阻害剤 BAY11-708、Wnt/ β -catenin 経路抑制剤 ICG-001 の投与が、体癌細胞の IL-6/8 産生及び分泌量、また癌細胞悪性形質に与える影響検討することで、IL-6/8 異常産生に關する EZH2 の下流シグナル伝達経路の特定を試みる。

4. 研究成果

- (1) まず、マイクロアレイを用いて、我々の研究室で体癌細胞 HEC-50 から樹立された高浸潤性癌細胞株と親株の miRNA 発現を比較することで、高浸潤性癌細胞株で発現量が低値を示す miR-124 と let-7b などを、浸潤抑制に關わる miRNA 候補として同定した。TargetScan と miRDB などのデータベースを用いて、EZH2 を標的とする miRNA 群を同定した。miR-124 と let-7b を強制過剰発現またノックダウンすることで、体癌細胞の悪性形質を抑制する miRNA の同定を行った。その結果、miR-124 と let-7b は EZH2 遺伝子の非翻訳領域と直接に結合し、EZH2 遺伝子の mRNA とタンパク発現の発現を負に調節し、癌細胞の浸潤能、増殖能、スフェア形成能、抗癌剤に対する耐性また EMT 形質を抑制することを明らかにした。
- (2) そして、EZH2 遺伝子のノックアウトによって、発現が亢進する miRNA を、EZH2 によって負に調節される miRNA (let-7b、miR-101 及び miR-361) として洗い出し、更に定量 PCR 法により確認した。これらの miRNA の機能を検討することで、体癌細胞の悪性形質を抑制する miR-361 などを同定した。また、EZH2 蛋白質は、miR-361 のプロモーター領域配列に結合して、直接的にその発現を抑えることで、体癌細胞の浸潤能、増殖能、スフェア形成能、抗癌剤に対する耐性また EMT 形質を促進することを明らかにした。
- (3) 更に、EZH2 遺伝子のノックアウトと let-7b の過剰発現による IL-6/8 の発現低下を確認した。IL-6/8 の添加による体癌細胞悪性形質の増強を確認した。また、EZH2 による let-7b など複数の miRNA 発現の抑制が、IL-6/8 産生量の増加を導いたことを明らかにした。EZH2 特異的阻害剤 GSK343 の処理で、EZH2 の不活性化を誘導すると、Twist、Snail、p-STAT3、NF- κ B 及び β -catenin の蛋白質発現及び IL-6/8 の産生量の低下を認めた。また、STAT3 阻害剤 BP-1-102、NF- κ B 阻害剤 BAY11-708、Wnt/ β -catenin 経路抑制剤 ICG-001 の投与により、EZH2 は下流に位置する STAT3 経路、NF- κ B 経路及び Wnt/ β -catenin 経路の活性化を介して、体癌細胞における IL-6/8 の異常産生また体癌細胞悪性形質の増強を促進することを明らかにした。EZH2 特異的抑制剤 GSK343 の添加により、体癌細胞の増殖能と浸潤能は、濃度依存性に抑制されたことも明らかになった。また、GSK343 と 5-AZA の組み合わせによる相乗的な癌抑制効果を認めた。両者の併用で相乗的な抗腫瘍効果を発揮することで、新たな体癌治療法として十分に期待できると考えられる。

以上の研究によって、EZH2 と癌抑制 miRNA 群が相互に負のフィードバックループを形成して、EZH2 の発現亢進及び let-7b などの miRNA の発現低下を招き、下流にある Twist、Snail、STAT3 経路、NF- κ B 経路及び Wnt/ β -catenin 経路の活性化を介して、IL-6/8 過剰産生及び体癌の悪性化を導くという重要な成果が得られている。本研究により得られた知見は、今後体癌の根絶を目指す基層研究の発展及び新しい治療法の開発に大きく貢献していると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

Ji L, Zhao G, Zhang P, Huo W, Dong P, Watari H, Jia L, Pfeffer LM, Yue J, Zheng J. Knockout of MTF1 Inhibits the Epithelial to Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer Cells. *J Cancer*. 2018 Nov 11;9(24):4578-4585. doi: 10.7150/jca.28040. 査読有

Wang B, Li X, Zhao G, Yan H, Dong P, Watari H, Sims M, Li W, Pfeffer LM, Guo Y, Yue J. miR-203 inhibits ovarian tumor metastasis by targeting BIRC5 and attenuating the TGF β pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Sep 21;37(1):235. doi: 10.1186/s13046-018-0906-0. 査読有

Dong P, Xiong Y, Yu J, Chen L, Tao T, Yi S, Hanley SJB, Yue J, Watari H, Sakuragi N. Control of PD-L1 expression by miR-140/142/340/383 and oncogenic activation of the OCT4-miR-18a pathway in cervical cancer. *Oncogene*. 2018 Sep;37(39):5257-5268. doi: 10.1038/s41388-018-0347-4. 査読有

Dong P, Xiong Y, Yue J, Hanley SJB, Watari H. miR-34a, miR-424 and miR-513 inhibit MMSET expression to repress endometrial cancer cell invasion and sphere formation. *Oncotarget*. 2018 May 1;9(33):23253-23263. doi: 10.18632/oncotarget.25298. 査読有

Aoyama-Kikawa S, Fujita H, Hanley SJB, Kasamo M, Kikuchi K, Torigoe T, Matsuno Y, Tamakoshi A, Sasaki T, Matsuura M, Kato Y, Dong P, Watari H, Saito T, Sengoku K, Sakuragi N. Comparison of human papillomavirus genotyping and cytology triage, COMPACT Study: Design, methods and baseline results in 14 642 women. *Cancer Sci*. 2018 Jun;109(6):2003-2012. doi: 10.1111/cas.13608. 査読有

Zhang T, Zhao G, Yang C, Dong P, Watari H, Zeng L, Pfeffer LM, Yue J. Lentiviral

vector mediated-ASAP1 expression promotes epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Oncol Lett.* 2018 Apr;15(4):4432-4438. doi: 10.3892/ol.2018.7834. 査読有

Dong P, Xiong Y, Yue J, Hanley SJB, Kobayashi N, Todo Y, Watari H. Long Non-coding RNA NEAT1: A Novel Target for Diagnosis and Therapy in Human Tumors. *Front Genet.* 2018 Oct 15;9:471. doi: 10.3389/fgene.2018.00471. 査読有

Dong P, Xiong Y, Yue J, Hanley SJB, Watari H. Tumor-Intrinsic PD-L1 Signaling in Cancer Initiation, Development and Treatment: Beyond Immune Evasion. *Front Oncol.* 2018 Sep 19;8:386. doi: 10.3389/fonc.2018.00386. 査読有

Dong P, Xiong Y, Yue J, Hanley SJB, Watari H. B7H3 As a Promoter of Metastasis and Promising Therapeutic Target. *Front Oncol.* 2018 Jul 6;8:264. doi: 10.3389/fonc.2018.00264. 査読有

Dong P, Xiong Y, Hanley SJB, Yue J, Watari H. Musashi-2, a novel oncoprotein promoting cervical cancer cell growth and invasion, is negatively regulated by p53-induced miR-143 and miR-107 activation. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017 Oct 26;36(1):150. doi: 10.1186/s13046-017-0617-y. 査読有

Zhao G, Wang Q, Gu Q, Qiang W, Wei JJ, **Dong P**, Watari H, Li W, Yue J. Lentiviral CRISPR/Cas9 nickase vector mediated BIRC5 editing inhibits epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Oncotarget.* 2017 Oct 17;8(55):94666-94680. doi: 10.18632/oncotarget.21863. 査読有

Zhang Q, **Dong P**, Liu X, Sakuragi N, Guo SW. Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2) induces epithelial-mesenchymal transition in endometriosis. *Sci Rep.* 2017 Jul 28;7(1):6804. doi: 10.1038/s41598-017-06920-7. 査読有

Xiong Y, Sun F, **Dong P**, Watari H, Yue J, Yu MF, Lan CY, Wang Y, Ma ZB. iASPP induces EMT and cisplatin resistance in human cervical cancer through miR-20a-FBXL5/BTG3 signaling. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017 Apr 11;36(1):48. doi: 10.1186/s13046-017-0520-6. 査読有

Ihira K, **Dong P**, Xiong Y, Watari H, **Konno Y**, Hanley SJ, Noguchi M, Hirata N, Suizu F, Yamada T, Kudo M, Sakuragi N. EZH2 inhibition suppresses endometrial cancer progression via miR-361/Twist axis. *Oncotarget.* 2017 Feb 21;8(8):13509-13520. doi: 10.18632/oncotarget.14586. 査読有

Dong P, Xiong Y, Watari H, Hanley SJ, **Konno Y**, Ihira K, Suzuki F, Yamada T, Kudo M, Yue J, Sakuragi N. Suppression of iASPP-dependent aggressiveness in cervical cancer through reversal of methylation silencing of microRNA-124. *Sci Rep.* 2016 Oct 21;6:35480-35491. doi: 10.1038/srep35480. 査読有

Huo W, Zhao G, Yin J, Ouyang X, Wang Y, Yang C, Wang B, **Dong P**, Wang Z, Watari H, Chaum E, Pfeffer LM, Yue J. Lentiviral CRISPR/Cas9 vector mediated miR-21 gene editing inhibits the epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *J Cancer.* 2017 Jan 1;8(1):57-64. doi: 10.7150/jca.16723. 査読有

Wang B, Shen A, Ouyang X, Zhao G, Du Z, Huo W, Zhang T, Wang Y, Yang C, **Dong P**, Watari H, Pfeffer LM, Yue J. KLF4 expression enhances the efficacy of chemotherapy drugs in ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Mar 11;484(3):486-492. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.062. 査読有

Dong P, Xiong Y, Watari H, Hanley SJ, **Konno Y**, Ihira K, Yamada T, Kudo M, Yue J, Sakuragi N. MiR-137 and miR-34a directly target Snail and inhibit EMT, invasion and sphere-forming ability of ovarian cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016 Sep 5;35(1):132-141. doi: 10.1186/s13046-016-0415-y. 査読有

[学会発表](計 11 件)

Dong P, miR-137 and miR-34a directly target snail and inhibit EMT, invasion and sphere-forming ability of ovarian cancer cells. The 12th World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell-2018, 2018.12.9, Xian, China

Aoyama-Kikawa S, Fujita H, Hanley SJB, Kasamo M, Kikuchi K, Torigoe T, Matsuno Y, Tamakoshi A, Sasaki T, Matsuura M, Kato Y, **Dong P**, Watari H, Saito T, Sengoku K, Sakuragi N: Comparison of HPV genotyping and cytology triage, COMPACT-Study: Design, methods and baseline results in 14,642 women. The 32nd International Papillomavirus Conference, 2018.10.4, Sydney, Australia

Aoyama-Kikawa S, Fujita H, Hanley SJB, Kasamo M, Kikuchi K, Torigoe T, Matsuno Y, Tamakoshi A, Sasaki T, Matsuura M, Kato Y, **Dong P**, Watari H, Saito T, Sengoku K, Sakuragi N: Evaluation of partial genotyping with HPV 16/18 for triage of HPV positive cytology negative Japanese women: Baseline results of the COMPACT study. The 32nd International Papillomavirus Conference, 2018.10.4, Sydney, Australia

Dong P, Musashi-2, a novel oncoprotein promoting cervical cancer cell growth and invasion, is negatively regulated by p53-induced miR-143 and miR-107 activation. IGCS 2018, 2018.9.16, Kyoto, Japan

董 培新, 渡利 英道, 高悪性度子宮体癌細胞に対する EZH2 特異的阻害剤の抗腫瘍効果とその分子機構, 第 27 回日本癌病態治療研究会, 2018.5.31, 千葉市

董 培新, 高悪性度体がんのジェネティック及びエピジェネティック研究, 「総合女性医療システム学分野」記念シンポジウム, 2018.2.24, 札幌

Dong P, Epigenetic aspects of endometrial cancer progression: Insights into interactions of EZH2 and microRNAs, The 4th International Obstetrics & Gynecology Summit · The Red House Forum, 2017.6.4, Shanghai, China

Dong P, Reactivating the expression of silenced miR-124 for endometrial cancer treatment, The 7th Annual World Gene Convention, 2016.11.5, Shanghai, China

董 培新, 井平 圭, 金野 陽輔, 渡利 英道, 櫻木 範明, Suppression of iASPP-dependent aggressiveness in cervical cancer through reversal of methylation silencing of microRNA-124, 第 15 回日本婦人科がん分子標的研究会, 2016.8.20, 札幌

Dong P, Targeting EZH2-miR-361-Twist axis in endometrial cancer, The 6th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology, 2016.4.26, Dalian, China

Ihira K, Dong P, Hanley SJ, Sakuragi N. EZH2 stimulates Twist expression by epigenetic silencing of its suppressor miR-361 through an YY1-dependent mechanism, 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2016.4.2, 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://scholar.google.com/citations?user=Ze3zls4AAAAJ>

https://www.researchgate.net/profile/Peixin_Dong

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：董 培新

ローマ字氏名：DONG, Peixin

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院医学研究院

職名：助教

研究者番号(8桁)：50602504

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。