

令和元年6月10日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11128

研究課題名(和文) 転写補助因子Ncoa6のエストロゲン感受性調節を介した子宮体癌発症抑制機序の解明

研究課題名(英文) The functional analysis of the nuclear receptor coactivator-6 (Ncoa6) which may modulate the estrogen sensitivity in the human endometrium and involves in the development of endometrial cancer.

研究代表者

川越 淳 (Kawagoe, Jun)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：60375342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：倫理委員会の承認の下、ヒト子宮内膜組織、および、子宮内膜癌組織中のNcoa6の発現を免疫組織化学染色により検討した。ヒト子宮内膜では上皮および間質細胞にてNcoa6の発現を認め、他方、子宮体癌組織では、Ncoa6の発現低下を認め、組織分化度が低下するほどNcoa6の発現率が低下する傾向をみとめた。また、ヒト子宮内膜間質細胞(HESCs)の単離培養を行い、Ncoa6の発現を確認後、siRNAを用いてNcoa6の発現抑制を行い、脱落膜化に与える影響を検討した。その結果、Ncoa6発現抑制により、形態学的には脱落膜化が抑制され、それがactin分布の調整機構に関与するためであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究において、マウスではNcoa6が子宮内膜におけるエストロゲン受容体の転写活性調節と発現抑制を介したエストロゲン感受性調節に重要な機能を持ち、内膜の脱落膜化や胚着床に対して重要な機能を持つことが報告されていた。しかし、ヒト子宮内膜におけるNcoa6の機能に関しては全く報告がなく、今回の我々の研究は、その点において初めての研究報告となる。我々は、Ncoa6の発現が子宮内膜の機能にとって重要であることを示し、その発現低下が類内膜腺癌の悪性度と関連し、また、脱落膜化障害を引き起こすことを明らかにした。これは、Ncoa6が妊娠成立と将来的な内膜癌発症抑制に重要な因子であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We revealed that the strong expression of nuclear receptor coactivator-6 (Ncoa6) in both epithelial cells and stromal cells of normal human endometrium by using immunohistochemistry (IHC). Moreover, in the endometrioid adenocarcinoma of human endometrial cancer, we found that the expression of Ncoa6 was decreased or lost in some cases and there was negative correlation between tumor grade and strength of Ncoa6 expression (more grade, less Ncoa6 expression).

Then, we also investigated the function of Ncoa6 on in vitro decidualization of human endometrial stromal cells (HESCs) using primary culture of HESCs. We found that the suppression of Ncoa6 expression using siRNA technology resulted in the failure of morphological decidual change of HESCs after in vitro decidualization stimuli. Then, we also found that Ncoa6 regulates the expression of some genes involving in the actin binding and regulates the actin distribution during decidualization.

研究分野：産婦人科学

キーワード：脱落膜化 子宮体癌 子宮内膜 転写補助因子

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

### 1. 研究開始当初の背景

適切なエストロゲン刺激は子宮内膜の機能に対し必須だが、過剰なエストロゲン刺激はかえって内膜の機能にとっては有害であると報告されている。高度生殖医療の際に、分泌期における過剰なエストロゲン濃度はその妊娠治療成績を悪化させると報告されている。また、エストロゲンの持続的かつ過剰な作用は、子宮体癌の発症にも関与する。子宮体癌はその発症についてエストロゲン依存性の type 1 と非依存性の type 2 に大別されるが、本邦では子宮体癌の約 8 割を type 1 である類内膜腺癌が占めている。エストロゲンの作用調節は、エストロゲンの濃度、および、エストロゲン受容体に対する転写活性調節により行われる。核内受容体である ER $\alpha$  は、その作用発現にあたって複数の転写補助因子と複合体を形成し、転写活性調節を受けている。その転写補助因子の一つに Nuclear receptor coactivator-6 (Ncoa6)がある。培養細胞を用いた研究報告では、Ncoa6 は ER $\alpha$  の転写を活性化する転写活性化補助因子であると報告されている。しかし、遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* の研究では、Ncoa6 はエストロゲンの活性調節に関して、転写活性化とは相反し、ER $\alpha$  のコピキチン化を促し、プロテアソーム経路を介した ER $\alpha$  の分解をも促進することでその発現量を抑制し、エストロゲン活性を抑制する機能を持つことが報告されている。このため、Ncoa6 を子宮内膜特異的にノックアウトした上記のマウスモデルでは、胚受容期における ER $\alpha$  の発現抑制が認められず、ER $\alpha$  の過剰発現に伴うエストロゲン活性の亢進により、子宮内膜上皮への胚接着と内膜間質細胞の脱落膜化が障害され、マウスの胚着床が阻害されるため女性不妊症になることが報告されている。このことは、Ncoa6 が子宮内膜におけるエストロゲン感受性調節に重要な機能を持つことを示しているが、いまのところ、ヒト子宮内膜における Ncoa6 の機能を詳細に検討した報告は存在しなかった。また、マウスとヒトにおいては子宮内膜の構造や機能に違いがある。そこで、ヒト子宮内膜における Ncoa6 の機能を明らかにすることを目的に研究を行った。

### 2. 研究の目的

エストロゲンの感受性調節には、転写補助因子によるエストロゲン受容体の転写活性調節が重要な機能を果たす。我々は、マウスを用いた研究で、転写活性化補助因子である Nuclear receptor coactivator-6 (Ncoa6)が、エストロゲン受容体の 1) 転写活性化と、2) コピキチン・プロテアソーム経路を介した発現抑制、と相反する機能を持つことを明らかにしている。マウスでは、Ncoa6 の機能低下は、エストロゲン受容体の発現増加によりエストロゲン感受性を上昇させ、子宮内膜の胚受容能を阻害する。また、過剰なエストロゲン刺激は、子宮体癌の発症のリスク因子であるが、閉経後の女性に子宮体癌が後発するメカニズムの一つとして、エストロゲン感受性調節の異常があるのではないかと考え、エストロゲン感受性を増加させる因子の一つとして Ncoa6 の発現異常が関与する可能性を考えた。そこで、本研究では、この Ncoa6 の機能低下が、1) 子宮体癌の発生と関連があるか否か、組織学的検討を行い、また、2) ヒト子宮内膜間質細胞の初代培養細胞を樹立し、Ncoa6 の発現を siRNA を用いて抑制することで、その機能へ与える影響を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 正常子宮内膜組織、および、子宮内膜癌における Ncoa6 発現の、免疫組織化学染色を用いた検討。

山形大学倫理委員会に実験計画内容の審査、承認を得て、手術のより切除されたヒト子宮内膜組織を用いて、内膜組織中の Ncoa6 の発現を検討した。良性婦人科疾患に対して山形大学医学部附属病院で子宮全摘術を行った症例、または子宮体部腫瘍に対して手術を行った症例から、腫瘍組織の病理組織を得た。子宮内膜組織のホルマリン固定後パラフィン包埋切片を利用し、Ncoa6 の発現を免疫組織化学染色にて検討した。子宮体癌組織の検討は、類内膜腺癌の症例に限定した。臨床的項目として、各種パラメーターを、診療録から後方視的に抽出した。手術進行期分類 (stage) は FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) ステージ、類内膜腺癌の grade は WHO grading system を使用した。

細胞の Ncoa6 陽性率の評価は、子宮内膜上皮細胞と子宮内膜間質細胞で異なる方法を用いた。子宮内膜上皮細胞の Ncoa6 陽性率は、子宮体癌組織と比較するため、2 人の検者による顕鏡を行い陰性 (Ncoa6 陽性細胞が 0%)、弱陽性 (Ncoa6 陽性細胞が 1-49%)、陽性 (Ncoa6 陽性細胞が 50%以上) に分類した。子宮内膜間質細胞の Ncoa6 陽性率は、画像解析ソフト TissuemorphDP (Olympus, Japan) を用いて、各検体の 5 視野の陽性率の平均を求めた。

(2) 子宮内膜間質細胞の初代培養

山形大学倫理委員会に実験計画内容の審査、承認を得て、良性疾患 (子宮筋腫または子宮腺筋症) に対して子宮を摘出した症例から、インフォームドコンセントを得た上で、正常子宮内膜間質細胞 (human endometrial stromal cells: HESCs) を得た。対象症例は 50 歳以下の有経の女性とした。摘出した子宮から子宮内膜組織を採取し、collagenase Type 1 (3.2 mg/ml, Worthington Biochemical Corporation, USA)、hyaluronidase (62.5 U/ml, Sigma Aldrich, USA)、penicillin / streptomycin (9.4 nM, Sigma Aldrich, USA) を含んだ 37 °C の HBSS (Wako, Japan) 中で 1-2 時間攪拌した。HESCs を 40  $\mu$ m のセルストレーナー (Falcon, USA) で分離し、培養液中で培養した。培養

液として、フェノールレッド不含の Dullbecco Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific, USA) と MCDB-105 (Sigma Aldrich, USA) を 3:1 で混合したものに、10% vol/vol の活性炭処理済みウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) (Biological Industries, Israel) 、1 mM のピルビン酸 (Sigma Aldrich, USA) 、100 U/ml のペニシリン、250 ng/ml のアムホテリシン B、100  $\mu$ g/ml のストレプトマイシン、50  $\mu$ g/ml のゲンタマイシン (Sigma Aldrich, USA) を添加したものを使用した。以降の実験には、継代が 4 回以内の HESCs を使用した。

### (3) HESCs 中の Ncoa6 の発現確認、および siRNA による発現抑制

HESCs の Ncoa6 発現について、細胞免疫染色で評価した。Ncoa6 の発現を評価するため、Ncoa6 陽性細胞率を画像解析ソフト TissuemorphDP で算出した。各標本において 4 視野の陽性率の平均値を比較した。さらに、HESCs の Ncoa6 を siRNA でノックダウンした。Non-target (NT) siRNA および Ncoa6 siRNA (Dharmacon, UK) を使用した。HESCs を 6-well プラスチックディッシュで 70% confluent まで培養し、25 nmol/L の各 siRNA と DharmaFECT1 (Dharmacon, UK) を加え、抗菌薬非存在下で 48 時間培養した。

### (4) HESCs の脱落膜化

in vitro で HESCs の脱落膜化を起こすために、0.5 mM 8-bromo-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) (Nacalai tesque, Japan) と 10<sup>-6</sup> M medroxyprogesterone acetate (MPA) (Wako, Japan) を添加した培養液中で HESCs を 1~3 日間培養した。

脱落膜化にともなう、各種マーカーや、ホルモンシグナルに関連するタンパクや mRNA の発現については、それぞれ、Western blotting 法や RT-PCR 法を用いて検討した。

### (5) mRNA シークエンス

初代培養で得た HESCs を 5 症例分混合し、プラスチックディッシュ上で培養した。NT siRNA と 2 種類の Ncoa6 siRNA をトランスフェクションした HESCs を、それぞれ 3 ディッシュずつ作成した。各ディッシュから tRNA を抽出し、Ion Proton System (Thermo Fisher Scientific, The Netherlands)を用いて RNA シークエンスを行った。NT siRNA と Ncoa6 siRNA をトランスフェクションした HESCs の遺伝子発現を、student T test で比較した。FDR (false discovery rate) < 0.20 を有意差ありとして発現に差のある遺伝子を抽出し、MeV (Multiple Experiment Viewer v.4.9.0)を用いてヒートマップを作製した。また、抽出した遺伝子に対して、DAVID v 6.8 (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>)を用いて Gene Ontology (GO) 解析を行った。

### (6) 統計学的解析

統計学的解析には EZR または GraphPad Prism 5 を使用した。2 群間の比較には Mann-Whitney U test、Student-t test、Fisher's exact test を用いた。多重比較には Kruskal Wallis non-parametric および Dunn's multiple comparison test を用いた。多変量解析にはロジスティック回帰分析を用いた。P<0.05 を有意差ありとした。

### (7) 倫理的配慮

ヒト組織を用いて行う研究に関して、山形大学倫理委員会に実験計画内容の審査を受け、承認を得て行った。

## 4. 研究成果

### (1) 正常ヒト子宮内膜上皮細胞における Ncoa6 の発現状況について

病理組織検査の際に作成された組織切片の内層部分を用いて、免疫組織化学染色法により Ncoa6 の発現状況の確認を行った。その結果、ヒト子宮内膜の腺上皮細胞では、月経周期や有経・閉経に関係なく Ncoa6 陽性であった。

### (2) 正常ヒト子宮内膜間質細胞における Ncoa6 の発現状況について

次に、正常ヒト子宮内膜間質細胞における Ncoa6 の発現について検討した。ヒト子宮内膜間質細胞では、Ncoa6 の発現様式には月経周期による変動があることを明らかにした。内膜間質細胞における Ncoa6 の発現は、増殖期では機能層、基底層ともに強く発現しているのに対し、分泌期では、基底層では増殖期と比較して Ncoa6 陽性率が有意に低下しており、一方、機能層では増殖期と分泌期で Ncoa6 陽性率に差を認めなかった。

### (3) 子宮体部類内膜癌における Ncoa6 発現と組織学的・臨床的特徴との関連

子宮体部類内膜癌の組織中での Ncoa6 の発現状況について、正常内膜の検討と同様に摘出組織の病理切片を用いて、免疫組織化学染色法により検討を行った。98 例の類内膜癌症例について解析し、組織学的 Grade は、50 例が Grade 1 (G1)、35 例が Grade 2 (G2)、13 例が Grade 3 (G3)であった。結果(1)で前述したように、正常子宮内膜の免疫組織化学染色では正常腺上皮細胞は全例で Ncoa6 陽性であったが、類内膜癌では Ncoa6 陰性例の割合は G1 で 14%、G2 で 17%、G3 で 38%

であり、高 Grade になるほど、すなわち組織分化度が低下するほど Ncoa6 の発現率が低下する傾向にあった。

さらに、類内膜癌の Ncoa6 発現と子宮体癌症例の臨床的事項の関連を検討した。Ncoa6 陰性症例と Ncoa6 陽性・弱陽性症例を比較すると、単変量解析では、Ncoa6 陰性例で有意に BMI 25 未満が多く、stage 以上の進行例が多く、脈管侵襲陽性例が多かった。多変量解析では、Ncoa6 陰性症例で stage - の症例が有意に多かった (オッズ比 5.11、95%信頼区間: 1.13-23.1、 $P=0.0336$ )。Ncoa6 陰性例では悪性度が高い可能性が示唆された。

また、子宮体部類内膜癌の ER 発現についても免疫組織化学染色を行い、H-score で評価した。Ncoa6 の発現と ER の発現との関連については、Ncoa6 陰性と比較して Ncoa6 弱陽性・陽性の方が ER の H-score は高い傾向にあったが、有意差は認めなかった。Ncoa6 と ER の発現は相関しないと考えられた。

#### (4) ヒト子宮内膜間質細胞 (HESCs) の樹立と Ncoa6 の発現の確認および発現抑制

非悪性腫瘍性病変で外科的に切除された子宮より、正常子宮内膜を少量採取し、内膜上皮細胞および間質細胞それぞれを分離し体外培養を行った。単離培養した内膜上皮細胞は、継代を行うことができず、培養を継続できなかったため、上皮細胞を用いた細胞実験は断念した。対して、間質細胞は体外における初代培養および継代が可能であったため、以降の研究は、採取したヒト内膜間質細胞 (HESCs) における Ncoa6 の機能について検討した。細胞免疫染色で Ncoa6 を染色しその発現を検討し、HESCs の細胞質および核内に Ncoa6 の発現を確認した。続いて、細胞中の Ncoa6 の発現を、siRNA を用いて抑制が可能か否か検討した。ネガティブコントロールである NT siRNA をトランスフェクションした HESCs の Ncoa6 陽性率を 1 とすると、Ncoa6 特異的 siRNA (No.3、No.18) をトランスフェクションした HESCs の Ncoa6 陽性率はそれぞれ 0.19 と 0.42 で、いずれの siRNA を用いても Ncoa6 の発現低下をみとめた。

#### (5) Ncoa6 を knock down した HESCs は形態的な脱落膜化障害をきたすが、他方で生化学的マーカーについてはむしろ脱落膜化反応の亢進を示した

続いて、Ncoa6 が内膜間質細胞の脱落膜化へ与える機能について検討するため、HESCs を用いて *in vitro* での脱落膜化誘導実験を行った。Ncoa6 発現に影響しない、コントロールである NT-siRNA をトランスフェクションした HESCs に cAMP と MPA を投与し脱落膜化誘導を行うと、HESCs は、紡錘形の線維芽細胞様の形態から、脱落膜化細胞に典型的な敷石状に形態変化する脱落膜化を認めた。一方で、Ncoa6 特異的 siRNA で Ncoa6 を knockdown した HESCs に脱落膜化刺激を加えると、細胞形態は紡錘形から変化せず、形態的な脱落膜化変化は認めなかった。そこで、次に、一般的に脱落膜化マーカーとされている、PRL と IGFBP-1 の mRNA 発現について、qPCR 法によって測定した。qPCR 法による解析では、Ncoa6 を knock down した上で脱落膜化刺激を加えると、コントロールとなる NT-siRNA をトランスフェクションした HESCs と比較して、IGFBP-1 は増加傾向となり、PRL は有意に増加した。Ncoa6 の knock down により、脱落膜化マーカーの過剰発現が誘導される結果となった。この結果は、形態的な脱落膜化障害と生化学的な脱落膜化マーカーの発現亢進が同時に生じていることを示している。しかし脱落膜化に関する過去の報告では、脱落膜化マーカーの上昇は正常な脱落膜化を意味するものとして使用されており、本研究のように脱落膜化細胞の形態異常と生化学的マーカーの過剰発現を同時に示した報告はない。そのため、何故このような乖離が生じるのかを明らかにするため、脱落膜化に関するシグナル発現の解析を進めることとした。

#### (6) HESCs のホルモン受容体発現

まず、内膜脱落膜化を調節するエストロゲンとプロゲステロンの作用に働くエストロゲンとプロゲステロンのそれぞれの受容体の発現に対する Ncoa6 の影響を検討した。NT-siRNA と Ncoa6 特異的 siRNA をトランスフェクションした HESCs に対して、2 日間 cAMP と MPA で脱落膜化刺激を行った。それぞれの細胞から抽出した蛋白で、ER および PR の発現について Western blotting を行い比較した。HESCs の ER は、Ncoa6 knockdown により増加した。また、脱落膜化に伴う ER の発現への影響は認めなかった。他方、PR-A は、脱落膜化した HESCs において、NT-siRNA と比較して Ncoa6 knock down ではその発現は低下した。したがって、ヒト内膜間質細胞においても、Ncoa6 の発現抑制により ER の発現の増加が認められた。この ER の発現増加は、内膜間質細胞におけるエストロゲン感受性を増加させている可能性が考えられ、続いて、脱落膜化刺激化のエストロゲンおよびプロゲステロンの感受性について、それぞれの標的遺伝子の発現を比較して検討した。

#### (7) HESCs のシグナル発現

NT-siRNA と Ncoa6 特異的 siRNA をトランスフェクションした HESCs に対して、2 日間 cAMP と MPA で脱落膜化刺激を行った。それぞれの細胞から抽出した RNA を用いて、脱落膜化に関与する FOXO1、WNT4、BMP2、NR2F2 の発現を RT-PCR で定量した。脱落膜化した状態で比較すると、ER の下流にあり脱落膜化に関与する FOXO1 は Ncoa6 knockdown により増加傾向、WNT4 は有意に増加し、BMP2 と NR2F2 は明らかな変化を示さなかった。結果(6)で示した通り HESCs の Ncoa6 を knockdown すると ER 発現が増加するため、ER の下流に位置する FOXO1、

WNT4 の発現も亢進すると考えられた。一方、BMP2、NR2F2 の発現には PR が関与していると報告されているが、Ncoa6 knockdown では PR 関連シグナルの発現は増加しないと考えられる。

#### (8) HESCs における Ncoa6 knockdown による影響の網羅的解析

ここまでの研究結果から、HESCs において Ncoa6 が ER 関連シグナルを介して脱落膜化に関与することが示唆された。しかし、Ncoa6 knock down による形態的な脱落膜化障害など、ER の経路のみでは説明できない事象も残されている。そこで HESCs における Ncoa6 knock down の影響を RNA シークエンスで解析した。Ncoa6 knock down により発現が有意に変化する遺伝子が 207 抽出され、そのうち発現が増加する遺伝子が 46、発現が減少する遺伝子が 161 であった。発現が減少する遺伝子の GO 解析では、GTP binding、GTPase activity、actin binding の GO term において集積性が認められた(表 6)。この結果から、Ncoa6 の発現抑制により actin binding 関連遺伝子の発現が低下することが明らかとなった。actin は細胞内骨格を形成する重要なタンパクであり、それと結合する因子の発現低下は細胞内骨格または actin 分布へと影響する可能性がある。子宮内膜間質細胞が脱落膜化する時には、細胞質の actin fiber の分布が調節されていることが報告されており、Ncoa6 の発現抑制による脱落膜化の形態変化にも actin fiber の分布が関与すると考えられたことから、続いて Ncoa6 の発現調節が脱落膜化に伴う actin の分布へ影響するか否かについて検討を行った。

#### (9) Actin fiber の蛍光免疫染色

Phalloidin を用いた蛍光免疫染色で HESCs の細胞質中の actin fiber の分布を観察した。脱落膜化刺激を加えない HESCs では、actin fiber は紡錘形の細胞質の中でほぼ平行に分布していた。NT-siRNA をトランスフェクションした HESCs に脱落膜化刺激を加えた場合、細胞質が多角形に変化し、actin fiber の分布は分散した。一方で、Ncoa6 を Knock down して脱落膜化刺激を加えた HESCs では、細胞形態は非脱落膜化細胞の紡錘形に近く、紡錘形に沿って actin fiber の分布が観察された。したがって、Ncoa6 の発現が抑制された場合に起こる形態的な脱落膜化障害は、actin fiber の分布異常を伴っていることが明らかとなり、Ncoa6 は actin fiber の分布の制御にも重要な役割を持っていると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

渡邊憲和、川越淳、永瀬智 The knockdown of Nuclear receptor coactivator-6 (Ncoa6) caused decidualization defects of human endometrial stromal cells in vitro. 第 71 回日本産科婦人科学会学術講演会(名古屋) 2019 年

渡邊憲和、川越淳、永瀬智 Decreased expression of Nuclear Receptor Coactivator-6 (Ncoa6) may correlate with the progression and less differentiation of human endometrioid adenocarcinoma. 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会(仙台) 2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：永瀬 智

ローマ字氏名：NAGASE, Satoru

所属研究機関名：山形大学医学部

部局名：産婦人科

職名：教授

研究者番号(8桁): 00292326

研究分担者氏名：太田 剛

ローマ字氏名：OHTA, Tsuyosi

所属研究機関名：山形大学医学部

部局名：産婦人科

職名：講師

研究者番号(8桁): 50375341

研究分担者氏名：清野 学

ローマ字氏名：SEINO, Manabu

所属研究機関名：山形大学医学部

部局名：産婦人科

職名：助教

研究者番号(8桁): 40594320

(2)研究協力者

研究協力者氏名：渡邊 憲和

ローマ字氏名：WATANABE, Norikazu