

令和元年5月20日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11154

研究課題名(和文) エピゲノム異常を標的とした子宮内膜癌の新たな診断・治療法の探索

研究課題名(英文) The study of novel diagnosis and treatment for endometrial cancer targeting aberrant DNA methylation

研究代表者

阪埜 浩司 (Banno, Kouji)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：70265875

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)：(1) 腫瘍部において異常高メチル化を認める子宮内膜癌患者と認めない子宮内膜癌患者の末梢血DNAにおける遺伝子プロモーター領域のメチル化をゲノムワイドに比較した結果、Differentially Methylated CpG (DMC) およびDifferentially Methylated Region (DMR)としてmiR-663aを同定した。(2) プロゲステロン製剤および2型糖尿病薬を併用することにより、子宮内膜癌細胞に対し殺細胞効果が認められることをin vitroおよびin vivo実験にて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1) 腫瘍部において異常高メチル化を認める子宮内膜癌患者は、正常細胞においても一部の遺伝子に異常メチル化を認めた。正常細胞における異常メチル化が癌のフェノタイプに寄与する可能性が示唆された。今後、癌の予防や早期発見に繋がる結果と考えられる。(2) 本研究において抗癌剤としての有用性を検討した薬剤は、既に他の疾病に対し処方されているため、安全性や副作用の情報が蓄積されている。新規の抗癌剤開発にかかる時間短縮・費用削減など、臨床応用されれば意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：(1) Based on genome-wide bisulfite sequencing, peripheral blood cells(PBCs) DNA in M-H cases had significant hypermethylation in the miR-663a promoter region, compared to U cases (meth. Diff. > 25%, q-value < 0.01). Consistent with this methylation status, miR-663a expression was lower in M-H PBCs than in U PBCs. DNMTs expression levels in M-H endometrial cancer were higher than those in U endometrial cancer. (2) Metformin had a dose-dependent anticancer effect on endometrial cancer cell lines. Moreover, the combined treatment also caused lower cell viability. The microarray analysis indicated that EDN2 expression was upregulated in cells subject to the combined treatment. EDN2 expression was upregulated in each cell line upon treatment with a demethylating agent.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮内膜癌 異常メチル化 miR-663a メトホルミン

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は我が国を含めて、近年罹患数および罹患率ともに増加傾向を示している。全婦人科悪性腫瘍の約半数を占めるとされ、2011年では米国において約8000人が子宮内膜癌で死亡していると推測されている。日本産科婦人科学会の統計でも、昨年の子宮内膜癌の新規登録数は約9000人と10年前に比べ、約3倍となっている。さらに、子宮内膜癌の発生のピークも若年化の傾向が認められ、女性の妊孕性とも密接に関連する子宮内膜癌の征圧は急務とされる。

子宮内膜癌の征圧には、その発癌機構の解明が最も重要である。従来、子宮内膜の発癌には肥満、多嚢胞性卵巣などのエストロゲン過剰刺激が重要とされてきたが、詳細な分子機構は遺伝子変異、いわゆる genetic な異常だけでは十分に説明されていない。2013年には TGCA Research Network が子宮内膜癌の統合的ゲノム解析を用いて、遺伝子変異とマイクロサテライト不安定性により4つのカテゴリーに分類した (Cancer Genome Atlas Research Network. Nature 497, 2013)。しかしながら、この分類には遺伝子変異によらない、いわゆるエピゲノム異常の視点が反映されていない問題点がある。

2. 研究の目的

がん細胞に存在するエピゲノム異常には、DNA のメチル化異常、ヒストン修飾異常、非翻訳 RNA 制御異常、そしてクロマチンの構造異常が知られている。この中でもがん関連遺伝子のプロモーター領域の異常高メチル化による発現抑制はよく研究されており、我々も以前よりこの DNA 異常メチル化が子宮内膜癌、とくに類内膜腺癌において高率に存在していること、発癌の早期に生じていること、この epigenetic な異常が genetic な遺伝子変異を誘発していることなどを報告してきた (Kawaguchi M, Banno K, et al. Int J Oncol 35, 2009.、Banno K, et al. Epigenomics 4, 2012.)。chromatin writer (書き込み)とも称される DNA 異常メチル化は、他のエピゲノム異常に比べ安定した修飾とされ、癌の個性に影響していると考えられており癌のリスク診断のマーカーとしての応用が期待されている。また、DNA のメチル化は可逆的でありメチル化酵素阻害薬により脱メチル化が可能であることから、アザシチジンが骨髄異形成症候群の治療薬として登場してきたように、DNA メチル化を標的としたがん治療も期待されている。

今回、我々は子宮内膜癌において約80%を占める類内膜癌におけるエピゲノム異常、特に DNA 異常メチル化に注目し、新たに登場した次世代シーケンサーを用いた全ゲノムレベルでのバイサルファイトシーケンスを用いて、新たな子宮内膜癌の発癌機構の解明による内膜癌のリスク診断への可能性を検討する。また、子宮内膜癌に対する DNA メチル化制御による新たな薬物治療の可能性とその標的分子の探索を行う目的で、以下の研究を遂行する。

3. 研究の方法

(1) エピゲノム解析による子宮内膜発癌の標的探索とリスク診断への応用

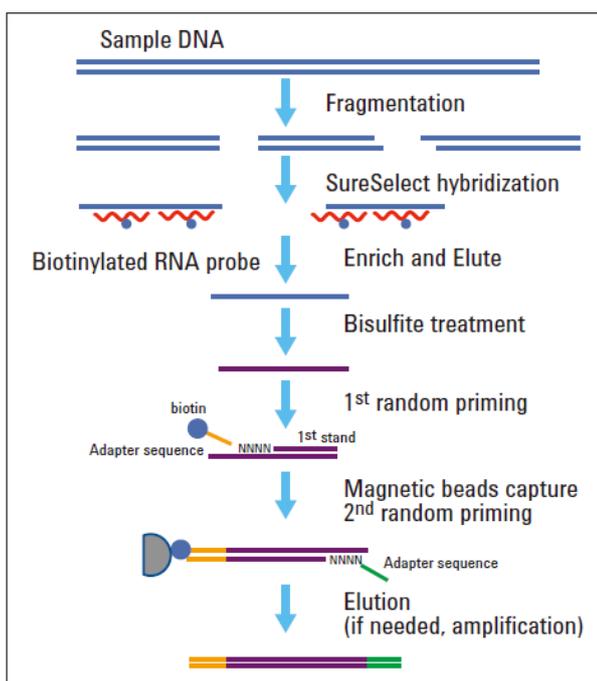
① DNA 異常高メチル化子宮内膜癌患者の選出

当院で子宮内膜癌と診断された患者のうち、書面による同意を得られた類内膜腺癌症例から末梢血および子宮内膜癌組織を得る。得られた子宮内膜癌組織から DNA を抽出し、hMLH1、E-cadherin および APC の DNA 異常メチル化を MSP (Methylation Specific PCR) 法にて解析する。

3種のうち2種以上の遺伝子に異常メチル化が認められる子宮内膜癌を Methyl-High (M-H) 群、hMLH1 にのみ異常メチル化が認められる子宮内膜癌を Methyl-Low (M-L) 群、1つも異常メチル化が認められない子宮内膜癌を Unmethyl (U) 群として選別する。

② 次世代シーケンサーを用いた各群の正常細胞および腫瘍細胞における DNA メチル化解析

Fig. 1



解析により選別された各群の患者のうち、年齢、組織型、分化度、進行期に偏りが生じないように各群5例程度を選別する。選別された患者の正常細胞DNA および腫瘍細胞DNAを用いて、Methyl-seqを行う(Fig. 1)。

得られたシーケンスデータから、各群の正常細胞におけるメチル化と腫瘍細胞におけるメチル化を比較し、各群に共通して発癌に寄与する遺伝子および各群独自に発癌に寄与する遺伝子の同定を行う。さらに、各群の正常細胞におけるメチル化を比較することで、より多くのメチル化異常により子宮内膜癌を発症したM-H群の特徴を明らかとし、DNA異常メチル化による子宮内膜癌の発癌機構を解明し、標的遺伝子を同定する。

## (2) エピゲノム治療薬としてのメトホルミン、ジェノゲスト併用療法とその標的の探索

### ①子宮内膜癌細胞に対するメトホルミンとプロゲステロン製剤の併用効果

子宮内膜癌細胞株のうち、PR(プロゲステロンレセプター)発現陽性細胞株であるIshikawaとPR発現陰性細胞株であるHEC-1Bに対し、メトホルミン単剤・MPA単剤・内因性プロゲステロン単剤をそれぞれ段階的に希釈し作用させる。MTTアッセイにより、単剤処理時における細胞生存率を測定する。その後、単剤処理ではほとんど効果の無い濃度(細胞生存率80%程度)を用いてメトホルミンとプロゲステロン製剤をそれぞれ併用し、細胞生存率を測定し、併用効果が得られるか検討する。

### ②子宮内膜癌細胞におけるメトホルミン・ジェノゲスト併用によるDNAメチル化に対する影響と標的の探索

これまでの報告により、メトホルミンやジェノゲストはDNAのメチル化に影響を及ぼす可能を示唆されている(L Yan, et al. Oncogene 34, 2015.)。そこで、IshikawaおよびHEC-1Bを用いて通常培養時、メトホルミン単剤、ジェノゲスト単剤、メトホルミン・ジェノゲスト併用時のゲノムのメチル化変化をMethyl-seqにて全ゲノムレベルで解析する。2つの細胞株に共通して併用時のみメチル化変化を認めた遺伝子を同定する。さらに、同定された標的遺伝子の発現制御実験を行い、併用効果の機序解明、および抗腫瘍効果を検討する。

### ③In vivoでのメトホルミン・ジェノゲストの併用効果の検討

6週齢の雌ヌードマウス皮下に子宮内膜癌細胞(HEC-1B)を移植し腫瘍を形成させる。その後、未処理群、メトホルミン単剤群、ジェノゲスト単剤群、メトホルミン・ジェノゲスト併用群の4群(各群n=5)に分け、薬剤投与を行う。薬剤投与後から経時的に皮下腫瘍径を測定し、メトホルミン・ジェノゲスト併用効果がin vivoでも認められるか検討する。観察終了後に皮下腫瘍を摘出し、TUNEL・Ki67染色を行い、in vivoでの抗腫瘍効果を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) エピゲノム解析による子宮内膜癌の標的探索とリスク診断への応用

#### ①DNA異常高メチル化子宮内膜癌患者の選出

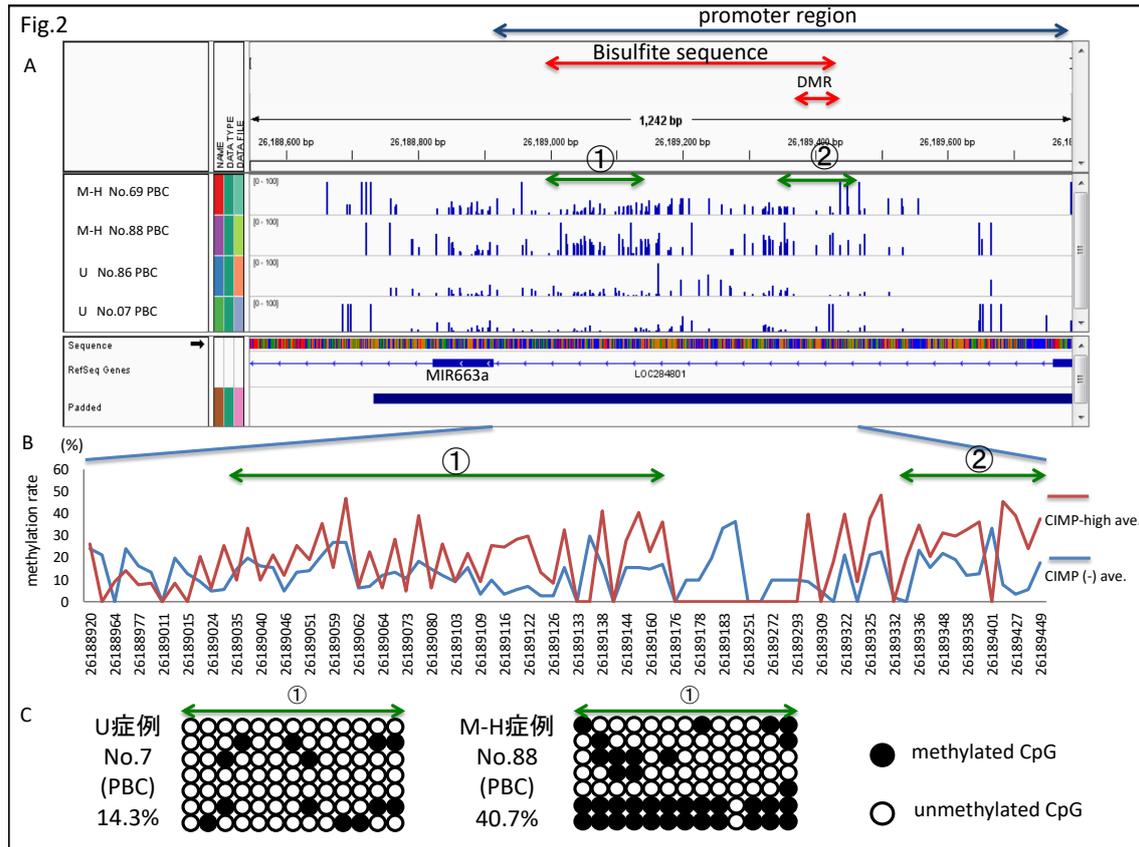
106人の子宮内膜癌患者のうち癌部組織および末梢血の両方が研究に使用可能であった25人より書面による同意を得た上で各サンプルよりDNAおよびRNAを抽出した。子宮内膜癌組織におけるMLH1, APC, E-cadherin遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化をMSP法にて解析した結果、25例中2例がM-H群、7例がM-L群、16例がU群であった。

#### ②次世代シーケンサーを用いた各群の正常細胞および腫瘍細胞におけるDNAメチル化解析

異常高メチル化子宮内膜癌の発癌メカニズム解明のため、M-H群子宮内膜癌患者2例とU群子宮内膜癌患者2例の末梢血DNAを用いてMethyl-seq用libraryを作成し、CpGアイランドを中心とした370万個のCpGについてtargeted bisulfite sequenceを行った。M-H群とU群間におけるDMC(Differentially methylated CpG)およびDMR(Differentially methylated region)を解析した結果、DMCとDMRに共通して同定されたのはmiR-663aプロモーター領域のみであった(Fig. 2A)。

miR-663aのプロモーター領域は、ヒト成人正常組織では低メチル化領域と報告されていることから、M-H症例に見られるメチル化は異常メチル化と推測された。さらに、miR-663aプロモーター領域のうちM-H群のメチル化がU群に比し高い傾向を示した領域A(Fig. 2B)について、バイサルファイトシーケンスを行いMethyl-seqのバリデーションを行った。その結果、M-H症例の末梢血DNAのメチル化率が高いことが確認された(Fig. 2C)。また、この領域は同一患者の癌部において72.2%メチル化されていることから、癌化と深く関わっている可能性が示唆された。さらに、semi-quantitative RT-PCRの結果、M-H症例の末梢血におけるmiR-663aの発現は、他の群に比べ低いことが明らかになった。また、CIMP陽性大腸癌ではDNMT群の発現が亢進しているとの報告があることから、M-H症例およびU症例の子宮内膜癌部におけるDNMT1, 3a, 3bの発現をRT-qPCRにて解析した。その結果、子宮内膜癌部ではDNMT1およびDNMT3b

の発現が M-H 群の方が高いことが明らかとなった。これらの結果から、DNMT 群の発現亢進が M-H 子宮内膜癌の phenotype に寄与している可能性が示唆された。



今回、子宮内膜癌患者末梢血 DNA において、miR-663a が異常メチル化されていることを初めて報告した。今後、miR-663a の発現消失が子宮内膜癌の発癌に寄与するかどうか functional assay 等による解析を行いたい。

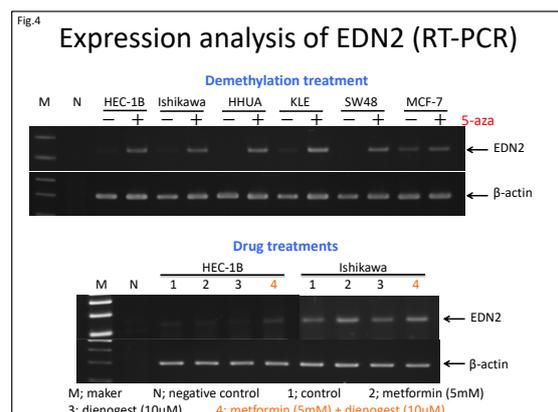
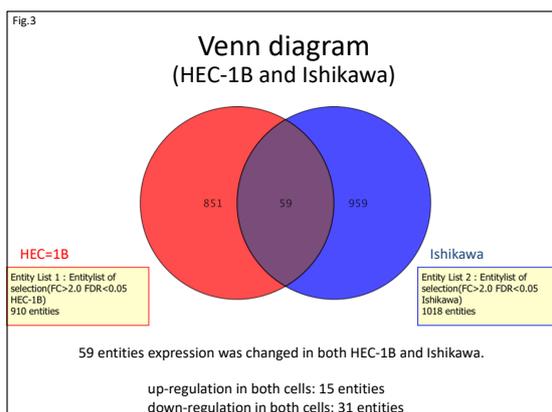
## (2) エピゲノム治療薬としてのメトホルミン、ジエノゲスト併用療法とその標的の探索

### ①子宮内膜癌細胞に対するメトホルミンとプロゲステロン製剤の併用効果

ヒト子宮内膜癌細胞株に対し、メトホルミンとジエノゲストを作用させ、MTT アッセイにより細胞生存率を測定した結果、それぞれ単剤では殺細胞効果の無い濃度でも併用することで、細胞生存率の低下を引き起こすことが明らかとなった。

### ②子宮内膜癌細胞におけるメトホルミン・ジエノゲスト併用による DNA メチル化に対する影響と標的の探索

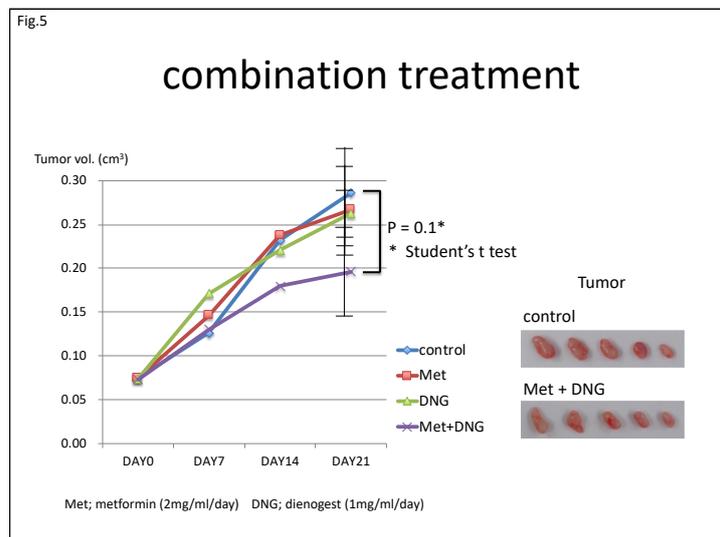
併用効果に寄与する遺伝子を検索するためマイクロアレイ解析を行った結果、2 薬剤併用時にのみ特異的に発現上昇する遺伝子として Endothelin-2 (EDN2) 遺伝子を同定した (Fig. 3)。子宮内膜癌細胞において EDN2 はプロモーター領域のメチル化により発現が抑制されており、脱メチル化処理またはメトホルミン・ジエノゲスト併用により発現が回復することが明らかになった (Fig. 4)。さらに、メトホルミン・ジエノゲスト併用時には DNA 全体の脱メチル化が確認された。



### ③In vivo でのメトホルミン・ジェノゲストの併用効果の検討

ヌードマウスを用いた検討では、薬剤投与後 21 日目でメトホルミン・ジェノゲスト併用群は、メトホルミン単剤群およびジェノゲスト単剤群に比し皮下腫瘍の増殖抑制傾向が認められた (Fig. 5)。

本研究により、メトホルミンおよびジェノゲストの抗腫瘍効果のメカニズムを明らかにすることができた。今後は、臨床検体でも EDN2 に異常メチル化が認められるか等、臨床応用に向けた解析を行いたい。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件) すべて査読有り

1: Takeda T, [Banno K](#), Yanokura M, Anko M, Kobayashi A, Sera A, Takahashi T, Adachi M, Kobayashi Y, Hayashi S, Nomura H, Hirasawa A, Tominaga E, Aoki D. Synchronous endometrial and ovarian cancer in Lynch syndrome with a MSH2 germline mutation: A case report. *Mol Clin Oncol*. 2018 Nov;9(5):479-484. doi:10.3892/mco.2018.1723. Epub 2018 Sep 17. PubMed PMID: 30402230; PubMed Central PMCID: PMC6201051.

2: Yanokura M, [Banno K](#), Kobayashi Y, Nomura H, Hayashi S, Tominaga E, Aoki D. Recent findings on epigenetic gene abnormalities involved in uterine cancer. *Mol Clin Oncol*. 2017 Nov;7(5):733-737. doi: 10.3892/mco.2017.1428. Epub 2017 Sep 20. PubMed PMID: 29181164; PubMed Central PMCID: PMC5700276.

3: Yanokura M, [Banno K](#), Adachi M, Aoki D, Abe K. Genome-wide DNA methylation sequencing reveals miR-663a is a novel epimutation candidate in CIMP-high endometrial cancer. *Int J Oncol*. 2017 Jun;50(6):1934-1946. doi:10.3892/ijo.2017.3966. Epub 2017 Apr 19. PubMed PMID: 28440489; PubMed Central PMCID: PMC5435325.

4: Takeda T, [Banno K](#), Yanokura M, Adachi M, Iijima M, Kunitomi H, Nakamura K, Iida M, Nogami Y, Umene K, Masuda K, Kobayashi Y, Yamagami W, Hirasawa A, Tominaga E, Susumu N, Aoki D. Methylation Analysis of DNA Mismatch Repair Genes Using DNA Derived from the Peripheral Blood of Patients with Endometrial Cancer: Epimutation in Endometrial Carcinogenesis. *Genes (Basel)*. 2016 Oct 14;7(10). pii: E86. PubMed PMID: 27754426; PubMed Central PMCID: PMC5083925. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.kras1.lib.keio.ac.jp/pmc/articles/PMC5083925/>

5: Irie H, [Banno K](#), Yanokura M, Iida M, Adachi M, Nakamura K, Umene K, Nogami Y, Masuda K, Kobayashi Y, Tominaga E, Aoki D. Metformin: A candidate for the treatment of gynecological tumors based on drug repositioning. *Oncol Lett*. 2016 Feb;11(2):1287-1293. Epub 2016 Jan 7. PubMed PMID: 26893732; PubMed Central PMCID: PMC4734273. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.kras1.lib.keio.ac.jp/pmc/articles/PMC4734273/>

〔学会発表〕（計 20 件）

1. 子宮体癌および子宮内膜異型増殖症に対する MPA 療法の治療予後予測因子の検討  
坂井 健良, 山上 亘, 平野 卓朗, 眞壁 健, 二宮 委美, 千代田 達幸, 野村 弘行, 片岡 史夫,  
平沢 晃, 阪埜 浩司, 進 伸幸, 青木 大輔  
第 56 回日本癌治療学会学術集会 (2018)
2. 若年子宮体癌/子宮内膜異型増殖症に対する高用量黄体ホルモン療法の再発例の検討  
北澤 晶子, 山上 亘, 眞壁 健, 平野 卓朗, 坂井 健良, 千代田 達幸, 小林 佑介, 野村 弘之,  
片岡 史夫, 阪埜 浩司, 進 伸幸, 青木 大輔  
第 136 回関東連合産科婦人科学会 (2018)
3. 子宮体癌/子宮内膜異型増殖症での MPA 療法の効果判定における子宮内膜細胞診の有用性  
坂井 健良, 山上 亘, 平野 卓朗, 眞壁 健, 野村 弘行, 片岡 史夫, 平沢 晃, 阪埜 浩司, 進  
伸幸, 青木 大輔  
第 59 回日本臨床細胞学会 (2018)
4. Lynch 症候群 婦人科腫瘍としてのリンチ症候群 婦人科医の視点から  
阪埜 浩司  
第 43 回日本外科系連合学会 (2018)
5. 子宮体癌および子宮内膜異型増殖症に対する MPA 療法後の長期予後についての検討  
平野 卓朗, 山上 亘, 進 信幸, 坂井 健良, 眞壁 健, 二宮 委美, 野村 弘行, 片岡 史夫, 平  
沢 晃, 阪埜 浩司, 田中 守, 青木 大輔  
第 69 回日本産科婦人科学会 (2017)
6. CIMP-H 子宮体癌患者の末梢血を利用した Targeted bisulfite sequencing  
矢野倉 恵, 阪埜 浩司, 安達 将隆, 梅根 紀代子, 小林 佑介, 山上 亘, 富永 英一郎, 進 伸  
幸, 青木 大輔  
第 75 回日本癌学会総会 (2016)
7. 次世代の子宮内膜症治療 子宮性不妊症の次世代治療 子宮移植の現状と展望  
阪埜 浩司  
第 37 回日本エンドメトリオーシス学会 (2016)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

※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。