

令和 2 年 5 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11280

研究課題名(和文) マイクロRNAを介した子宮体癌の進展制御を司る新たな分子機構の解明

研究課題名(英文) A novel mechanism of endometrial cancer development involving microRNAs

研究代表者

浅野間 和夫 (ASANOMA, KAZUO)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：30380413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：BHLHE40とBHLHE41 (BHLHE40/41)は上皮間葉移行に関わる転写因子であるが、その発現制御機構は不明な点が多い。子宮体癌の組織検体を解析したところBHLHE40/41の発現量がマイクロRNA130 (MIR130)ファミリーの発現量と逆相関していた。BHLHE40/41が3'非翻訳領域を介してMIR301Bにより直接発現抑制されることを示した。MIR130ファミリーがBHLHE40/41の発現抑制を介して上皮間葉移行を促進することが分かった。MIR301B-MIR130Bクラスターのプロモーター領域を解析し、その転写調節にSP1とBHLHE40/41が関わることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は子宮体癌の進展機序である上皮間葉移行においてBHLHE40/41とMIR130ファミリーとの互いの発現制御機構が関わることを世界で初めて見出した。BHLHE40/41とMIR130ファミリーは子宮体癌症例の進展を予測する分子マーカーとして有用であること、また、MIR130 family-BHLHE40/41経路を標的とした分子治療戦略は子宮体癌の進展を抑制する方策として有望であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：BHLHE40 and BHLHE41 (BHLHE40/41) are transcription factors involved in multiple cell activities including epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). However, the expression mechanism of BHLHE40/41 in EMT remains unclear. In the present study, we showed that the expression levels of BHLHE40/41 were negatively correlated with those of the microRNA (MIR) 130 family in endometrial cancer (EC) specimens. Our in vitro assays indicated that the expression of BHLHE40/41 was suppressed directly by the MIR130 family in a 3'-untranslated region-mediated manner. In EC cells, the MIR130 family promoted EMT and tumor cell invasion by suppressing the expression of BHLHE40/41. We identified the critical promoter region of the MIR301B-MIR130B cluster for its basal transcription by SP1. We also found that BHLHE40/41 suppressed the expression of MIR301B and MIR130B, and we identified a binding site in the promoter region for BHLHE40/41.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：マイクロRNA 上皮間葉移行 子宮体癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は以前より子宮体癌の増殖や浸潤に関わる分子機構の解明に取り組んできた。最近では転写因子である BHLHE40 と BHLHE41 が浸潤促進因子 TWIST1 の転写を抑制して、子宮体癌細胞の浸潤・運動能を抑制することを見出した (Asanoma et al., 2015)。この中で実際の子宮体癌組織検体を用いた発現解析を実施したところ、BHLHE40 と BHLHE41 は mRNA レベル、蛋白質レベルの両方において、いずれも浸潤を有さない早期癌で発現が高く進行癌で低いことが分かった。また、BHLHE40 と BHLHE41 の発現は高い正の相関を有しており、この 2 つの遺伝子が共通の機構により発現調節されていることが示唆された (Asanoma et al., 2015)。よって進行期癌において BHLHE40 と BHLHE41 の発現を同時に抑制する機序が存在すると考えた。癌抑制遺伝子の制御機構としてよく知られている DNA メチル化に関して BHLHE40 のプロモーター領域を調べた研究によると癌化に伴うメチル化状態に大きな変化が無い (Senchenko et al., 2013; Dmitriev et al., 2015)。その他の有望な発現調節機構としてマイクロ RNA による制御に注目した。アルゴリズムを用いて BHLHE40 と BHLHE41 の 3' 非翻訳領域を探ると、両方に共通して作用するマイクロ RNA として MIR130 family が抽出された。予備実験として、MIR301B の mimic (擬似 RNA) を子宮体癌細胞株 HHUA 細胞に導入したところ BHLHE40 と BHLHE41 の両方が発現抑制されることを見出した。

2. 研究の目的

食生活の欧米化や寡産により近年、子宮体癌の罹患率は増加を続けている。早期癌は手術療法により予後が良いものの、進行期癌は集学的治療をおこなっても再発頻度が高く予後不良であることが多い。子宮体癌の癌化機序・進展機構は十分に解明されたとはいえない。我々はこれまで特に子宮体癌の浸潤機構に焦点を絞って研究を進めてきた。本研究では転写因子 BHLHE40 と BHLHE41 の発現制御機構についてマイクロ RNA、特に MIR130 family に注目して、その子宮体癌の進展に果たす役割、特に上皮間葉移行を背景とする癌細胞の浸潤機構や転移機構に焦点を絞り、機能解析や発現解析を行うこととした。

3. 研究の方法

組織検体を用いた発現解析: MIR130 family は MIR130A, MIR130B, MIR301A, MIR301B, MIR454 からなる subfamily で同一の標的配列 (seed 配列) を標的としている。子宮体癌組織における MIR130A, MIR130B, MIR301A, MIR301B, MIR454 の発現量を TaqMan プローブ法を用いた逆転写 real-time PCR 法により検討する。得られたデータを基に浸潤の無い早期癌と進行期癌のサンプルを比較し、進行期癌での発現が高いマイクロ RNA、また BHLHE40 や BHLHE41 の発現と逆相関を呈するマイクロ RNA を抽出した。

MIR130 family による BHLHE40/BHLHE41 の発現制御: 子宮体癌細胞株を集めてそれぞれの MIR130 family と BHLHE40、BHLHE41 の発現を確認後、MIR130 family の mimic (擬似 RNA) と inhibitor (阻害 RNA) を導入して BHLHE40 と BHLHE41 の mRNA レベル、蛋白質レベルでの発現変化を調べた。BHLHE40 と BHLHE41 の両方の 3' 非翻訳領域に MIR130 family が相互作用する配列 (seed 配列) が同定し、この配列を pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega, Madison, WI) に 3' 非翻訳領域を挿入し、MIR130 family の mimic または inhibitor とともに子宮体癌細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。また、seed 配列に変異を導入したレポーターも作成し同様に検討した。また、MIR301B の seed 配列への相互作用が直接的なものであることを確認するため、MIR301B に biotin 修飾した mimic を HHUA 細胞に遺伝子導入し、ストレプトアビジンで被覆した磁気ビーズでプルダウン解析 (miRNA プルダウン解析) を行った。

細胞株を用いた機能解析: 子宮体癌細胞に MIR130 family の mimic または inhibitor を導入し、細胞の腫瘍形質 (細胞増殖能、浸潤能、運動能) を *in vitro* で検討した。細胞増殖能はプレート上で細胞数を継時的に WST 法にて計測し、細胞運動能や浸潤能はトランスウェル・チャンバーをそのまま、またはマトリゲルを敷いたものを用意し、メンブレンの小孔を通過する細胞数を計測した。MIR130 family の癌細胞への効果が BHLHE40 と BHLHE41 の発現抑制を介したものであるか否か検証した。BHLHE40 と BHLHE41 の両方を高発現している細 HHUA 細胞を用いて BHLHE40 と BHLHE41 を shRNA を用いてノックダウンさせる、または、逆にレンチウイルス・ベクターを用いて HHUA 細胞に 3' 非翻訳領域を持たない BHLHE40 と BHLHE41 を過剰発現させ、コントロール細胞とともに MIR130 family の mimic が及ぼす効果を比較した。

MIR301B-MIR130B クラスターの転写調節機構を探る: MIR301B-MIR130B クラスターのプロモーター領域に注目して解析した。まず動物種間で保存されている配列を探り、その配列を挿入したルシフェラーゼ・レポーターを作成した。長いプロモーターから徐々に配列を削っていき、転写活性部位を同定し、そこに作用する可能性のある転写因子をアルゴリズムを用いて予測した。候補転写因子として BHLHE40/BHLHE41、SP1 を同定した。これらを発現するベクター、またはノックダウンする siRNA を作成し、レポーター解析にて転写活性化能を確認する。また、クロマチン免疫沈降法とゲルシフト解析を用いて、候補転写因子が実際にプロモーター領域に結合することを確認した。

4. 研究成果

(1) 正常子宮内膜と子宮体癌組織における MIR130 family (MIR130A, MIR130B, MIR301A, MIR301B, MIR454) の発現を調べたところ MIR130A, MIR130B, MIR454 は癌組織に比して正常組織で高く、MIR301A, MIR301B は正常組織と癌組織で有意差が見られなかった。癌組織においては MIR301A, MIR301B が早期に比して進行期において有意に高値を示した。癌組織において MIR130 family と BHLHE40 と BHLHE41 の発現の発現量を比較すると、MIR454 以外で有意な逆相関を示した。

(2) 次に細胞株を用いた解析を行った。BHLHE40 と BHLHE41 の両方を発現している子宮体癌細胞株 HHUA に MIR301B の mimic を遺伝子導入して強制発現させると、BHLHE40 と BHLHE41 のタンパク発現が低下した。MIR301B だけでなく、MIR130A, MIR130B, MIR301A の mimic を導入しても、BHLHE40 と BHLHE41 のタンパク発現は低下した。また、MIR301B の mimic を HHUA 細胞に導入すると、細胞増殖が上昇し、上皮間葉移行・細胞浸潤能が上昇した。BHLHE40 と BHLHE41 の両方をノックダウンまたは 3'UTR を持たない BHLHE40 と BHLHE41 を過剰発現させると、MIR301B の mimic による効果が抑制された。また、MIR301B と MIR130B を発現抑制することで、BHLHE40/BHLHE41 の発現が上昇するかどうかを子宮体癌細胞株 HEC-1、HEC-6 を用いて解析した。MIR301B と MIR130B の inhibitor を HEC-1、HEC-6 細胞に遺伝子導入したところ、特に MIR301B と MIR130B の両方を阻害した場合、BHLHE40 と BHLHE41 の発現が上昇した。

(3) BHLHE40 と BHLHE41 の 3' 非翻訳領域を組み込んだルシフェラーゼ・レポーターを作成し、MIR301B の mimic と共に HHUA 細胞に導入するとレポーター活性が低下し、inhibitor と共に導入すると活性が上昇した。また、seed 配列の変異体レポーターを作成し 3' 非翻訳領域の MIR301B が作用する配列領域を同定した。miRNA プルダウン解析を行い、MIR301B と seed 配列の関係が直接的なものであることを示した。

(4) 次に MIR301B と MIR130B は約 250bp を隔ててタンデムに並んでおり、共通の転写機構を有すると考えられたため、この MIR301B-MIR130B クラスターに注目して研究を進めた。MIR301B-MIR130B クラスターのプロモーター領域を用いてレポーター解析したところ、BHLHE40/BHLHE41 により(特に BHLHE41)レポーター活性の抑制を認めた。また、BHLHE40/BHLHE41 を強制発現、またはノックダウンすることにより、MIR301B、MIR130B の発現はそれぞれ発現抑制または発現上昇した。さらにこの転写調節機構をゲルシフト解析、クロマチン免疫沈降解析より明らかとした。すなわち、BHLHE40 と BHLHE41 の両方が MIR301B/MIR130B クラスターの転写調節領域の E-box モチーフに直接作用すること、またこの転写因子複合体に HDAC1 が含まれることを証明した。一方で MIR301B/MIR130B クラスターの転写調節領域にユビキタスに発現している転写因子 SP1 が作用することを見出した。SP1 は MIR301B/MIR130B クラスターの転写調節領域に存在する GC 豊富な配列に直接作用し、転写を正に制御することをレポーター・アッセイ、ゲルシフト・アッセイ、クロマチン免疫沈降アッセイにより明らかとした。また、この GC 豊富な配列には一塩基多型 rs861843 が存在することを発見した。rs861843 の G/C 多型がこの領域に対する SP1 の結合に強く影響した。すなわち rs861843 が G に比べ C の場合、明らかに SP1 との親和性が高く、転写活性が高いことを見出した。rs861843 の多型頻度はヨーロッパ人、アフリカ人では 10~20%と高いのであるが、東アジア人では 0.1%にとどまる。実際、我々の解析では 300 人の子宮体癌患者、150 人の健常対照者のすべてが C/C のアリルを有していた。以上の結果を論文発表した (Asanoma et al., 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohmaru-Nakanishi Takako, Asanoma Kazuo, Fujikawa Mai, Fujita Yasuyuki, Yagi Hiroshi, Onoyama Ichiro, Hidaka Nobuhiro, Sonoda Kenzo, Kato Kiyoko	4. 巻 188
2. 論文標題 Fibrosis in Preeclamptic Placentas Is Associated with Stromal Fibroblasts Activated by the Transforming Growth Factor-1 Signaling Pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 683 ~ 695
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2017.11.008	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 Asanoma Kazuo, Horii Emiko, Yoshida Sachiko, Yagi Hiroshi, Onoyama Ichiro, Kodama Keisuke, Yasunaga Masafumi, Ohgami Tatsuhiro, Kaneki Eisuke, Okugawa Kaoru, Yahata Hideaki, Kato Kiyoko	4. 巻 10
2. 論文標題 Mutual suppression between BHLHE40/BHLHE41 and the MIR301B-MIR130B cluster is involved in epithelial-to-mesenchymal transition of endometrial cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 4640 ~ 4654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27061	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 Yahata Hideaki, Sonoda Kenzo, Okugawa Kaoru, Yagi Hiroshi, Ohgami Tatsuhiro, Yasunaga Masafumi, Onoyama Ichiro, Kaneki Eisuke, Asanoma Kazuo, Kato Kiyoko	4. 巻 45
2. 論文標題 Survey of the desire to have children and engage in sexual activity after trachelectomy among young Japanese women with early stage cervical cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 2255 ~ 2259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.14099	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 Yagi Hiroshi, Onoyama Ichiro, Asanoma Kazuo, Horii Emiko, Yasunaga Masafumi, Kodama Keisuke, Kijima Masako, Ohgami Tatsuhiro, Kaneki Eisuke, Okugawa Kaoru, Yahata Hideaki, Kato Kiyoko	4. 巻 33
2. 論文標題 G13-mediated LATS1 down-regulation contributes to epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 13683 ~ 13694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201901278R	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuo Asanoma
2. 発表標題 Mutual regulation between MIR301B-MIR130B and BHLHE40-BHLHE41 is involved in epithelial-to-mesenchymal transition of uterine endometrial cancer cells
3. 学会等名 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ASANOMA kazuo, Ohmaru takako, SONODA kenzo, WAKE norio, KATO kiyoko
2. 発表標題 The MIR130 families suppress epithelial-to-mesenchymal transition of uterine endometrial cancer cells by inhibiting the expression of BHLHE40 and BHLHE41.
3. 学会等名 69th Annual Congress of the Japan Society of OB/GY
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 ASANOMA kazuo, SONODA kenzo, KATO kiyoko
2. 発表標題 The MIR130 families enhance epithelial-to-mesenchymal transition of uterine endometrial cancer cells by inhibiting the expression of BHLHE40 and BHLHE41.
3. 学会等名 The 59th Meeting of the Japan Society of Gynecologic Oncology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 ASANOMA kazuo, YAGI hiroshi, ONOYAMA ichiro, SONODA kenzo, KATO kiyoko
2. 発表標題 Mutual regulation between MIR301B-MIR130B and BHLHE40-BHLHE41 is involved in epithelial-to-mesenchymal transition of uterine endometrial cancer cells
3. 学会等名 71th Annual Congress of the Japan Society of OB/GY
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
--	---------------------------	-----------------------	----