

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

課題番号：19591937

研究課題名（和文） 子宮頸癌発癌過程とエピジェネティクスの変化：癌化予測および治療への応用

研究課題名（英文） Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis：Prediction of carcinogenesis and application for cancer treatment.

研究代表者

岩坂 剛（IWASAKA TSUYOSHI）

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：60117067

研究成果の概要（和文）：これまで、子宮頸癌発癌には、HPV感染が重要な役割を果たしていることが報告されてきた。さらに、病変の進展には、検出されるHPVの型およびHLA class IIの違いが関係していることも報告されている。本研究では、エピジェネティックな変化という観点から、子宮頸部病変の進展のリスクを検索することを目的とした。子宮頸癌における癌抑制遺伝子であるレチノイン酸レセプターβ2（RARβ2）の発現低下の機構を明らかにするため、子宮頸癌細胞株および子宮頸癌組織におけるRARβ2の発現および同遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化およびヒストン修飾の状態を解析した。その結果、浸潤子宮頸癌組織および頸癌細胞株では、DNAのメチル化により、RARβ2のプロモーター領域の発現低下が高頻度に認められた。ほとんどのRARβ2陰性の頸癌ではメチル化が認められたが、メチル化が見られないにもかかわらずRARβ2の発現低下が見られる一群が観察された。こうしたメチル化が起こっていないRARβ2陰性の頸癌では、プロモーター領域のヒストンの修飾が観察された。こうした頸癌では、ヒストンの脱アセチル化阻害剤を作用させることによりRARβ2の発現が再活性化した。加えて、メチル化も起こっている頸癌もあるが、こうした頸癌のRARβ2発現を再活性化するために、DNAの脱メチル化剤は有効であったが、ヒストンの脱アセチル化阻害剤は無効であった。結論として、RARβ2の発現低下には、DNAのメチル化およびヒストンの修飾といった2つの主要なエピジェネティックな経路が考えられる。HPV DNAの存在とRARβ2発現との関係をみると、HPV陰性の子宮頸癌細胞株では、すべてRARβ2の発現がみられ、その癌化過程にRARβ2のエピジェネティックな変化が関係していない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the silencing mechanism of *retinoic acid receptor* β2 (*RARβ2*) in cervical carcinogenesis, we investigated *RARβ2* expression and the status of both DNA methylation and histone modifications at the promoter in cervical cancer cell lines. *RARβ2* was frequently repressed in cancer cell lines and in primary cancers of the cervix. Although the majority of *RARβ2*-negative cancers had methylated promoter, *RARβ2* was repressed with hypomethylated promoter in a substantial fraction of the cancers. The *RARβ2*-negative cells with hypomethylated promoters showed a repressive histone modification pattern at the promoter. *RARβ2* was reactivated by a histone deacetylase inhibitor, accompanied by formation of active histone modifications. The repressive modification was also observed in cells repressed with hypermethylated promoter, but *RARβ2* was reactivated only by DNA demethylating agent and not by histone deacetylase

inhibitor. Our results suggest that *RARβ2* is silenced by either of the two key epigenetic pathways, DNA methylation or repressive histone modifications, depending on the individual cancer cells. Furthermore, DNA demethylating agent and histone deacetylase inhibitor might be useful for the treatment of cervical cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	900,000	270,000	1,170,000
平成20年度	800,000	240,000	1,040,000
平成21年度	700,000	210,000	910,000
平成22年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学、子宮頸癌、エピジェネティクス、メチル化、ヒストン修飾、HPV

1. 研究開始当初の背景

塩基配列の変化を伴わずに、DNAメチル化やヒストン修飾により遺伝子発現に影響を及ぼすエピジェネティクスは、個体発生、生殖、加齢、クローン動物などの多くの生命現象と密接に関連し、その異常はがんをはじめ、様々な疾患の発症に関与していることが明らかになっている。

近年、がん抑制遺伝子の不活化の機構として、突然変異に加え、プロモーター領域のCpGアイランドのメチル化、あるいはヒストン修飾による遺伝子サイレンシングが重要と考えられている。消化器腫瘍を中心に、エピジェネティクスの変化と発癌との関係の研究が進められているが、婦人科腫瘍についてはこの方面の研究は未だ少ない。ただ、ゲノムインプリンティングと腫瘍発生という関係で、胞状奇胎および卵巣成熟奇形種については、研究が進められている。

子宮頸癌については、国内外合わせても、癌におけるDNAメチル化の報告を散見する程度である。我々は、多くの上皮性悪性腫瘍において、その機能が抑制されていると言われている*RARβ2*癌抑制遺伝子機能が、子宮頸癌でも抑制されていることを観察し、この機能抑制にDNAのメチル化が高率に関与していることを明らかにした。さらに、DNAのメチル化が見られないものには、ヒストンの脱アセチル化が起こっていることを明らかにした。子宮頸癌においてヒストンの脱アセチル化が起こっているという報告は国内外で最初である。

本研究では、子宮頸癌前駆病変におけるエ

ピジェネティクスの変化の検索はもとより、エピジェネティクスの修飾のパターンから癌化のリスクを類推する試み、および阻害剤を用いた治療への応用の試みはが最初である。

2. 研究の目的

エピジェネティクスの変化の最大の特徴は、その変化がDNAの変異を伴わないので可逆的であることである。このことは適当な阻害剤を用いることで表現型を元に戻すことが可能であることを示唆している。また、子宮頸癌の発癌過程には、前癌病変と考えられている頸部異形成の状態が存在するが、個々の症例において正確に癌化を予測することは困難である。したがって、癌化のリスクの程度を示す分子マーカーを確立することは、早期治療の観点から、極めて重要である。

本研究では、子宮頸部病変における*RARβ2*癌抑制遺伝子のDNAメチル化やヒストン修飾の実態を細胞レベルで観察することにより、子宮頸癌のハイリスク群を早期発見できる分子診断法を確立することを目的とする。さらに、こうした修飾パターンと、阻害剤あるいは抗癌剤の効果との相関を検討し、がん治療へ応用することを最終目的とする。

3. 研究の方法

(1) 浸潤子宮頸癌組織では、DNAメチル化により、癌抑制遺伝子であるレチノイン酸レセプターβ2 (*RARβ2*)のプロモーター領域の発現低下が高頻度に認められる。子宮頸癌発癌過程のどの段階からこうしたエピジェ

ネティックな変化が起こっているかを検証するため、子宮頸癌細胞株、子宮頸部異形成由来の細胞株、および我々の研究室で HPV DNA を導入することによって得られた各種の癌化過程にある細胞株を用い、上記遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化の状態を解析する。さらに、最近、この遺伝子の発現低下にヒストンの修飾状態が関与していることが明らかとなっており、この点も解析する。

(2) 現在、「HPV と子宮頸癌発がん」の文部科学省の班研究として、軽度～中等度異形成病変の病変進展に関わるリスク因子抽出のコホート研究が平行して進行中である。本研究では、エピジェネティクスの観点から、病変進展のリスクを検索する予定である。子宮頸部異形成病変から細胞診標本を採取する際、同様の方法で細胞標本を採取し、これらの病変における RAR β 2 のプロモーター領域の DNA メチル化の状態、ならびにヒストン修飾状態を解析する。その後、異形成病変を前方視的に follow-up し、進展しやすい病変とそうでない病変の間のエピジェネティクスの変化の相違を検討する。

(3) エピジェネティクスの変化は、DNA そのものの変化ではないので、可逆的と考えられる。そこで、エピジェネティクスの変化を標的とした治療を試みる。ホルモンレセプター遺伝子プロモーターの DNA メチル化阻害剤、ヒストン脱アセチル化阻害剤、および各レセプターのリガンドで細胞を処理し、遺伝子発現の回復および細胞増殖速度の解析を行う。これらの結果から、子宮頸癌における各レセプター遺伝子のエピジェネティックな発現制御機構の解明とともに、上記薬剤の子宮頸癌治療への応用の可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) コホート研究で、子宮頸癌発癌には、HPV 感染が重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、病変の進展には、検出される HPV の型および HLA class II の違いが関係していることも明らかになった。

(2) 子宮頸癌における癌抑制遺伝子である レチノイン酸レセプター β 2 (RAR β 2) の発現低下の機構を明らかにするため、子宮頸癌細胞株および子宮頸癌組織における RAR β 2 の発現および同遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化およびヒストン修飾の状態を解析したところ、浸潤子宮頸癌組織および頸癌細胞株では、DNA のメチル化により、RAR β 2 のプロモーター領域の発現低下が高頻度に認められた。

(3) ほとんどの RAR β 2 陰性の頸癌ではメチル化が認められたが、メチル化が見られないにもかかわらず RAR β 2 の発現低下が見られる一群が観察された。こうしたメチル化が起こっていない RAR β 2 陰性の頸癌では、プ

ロモーター領域のヒストンの修飾が観察された。

(4) ヒストンの修飾をうけた頸癌では、ヒストンの脱アセチル化阻害剤を作用させることにより RAR β 2 の発現が再活性化した。一方、メチル化が起こっている頸癌では、DNA の脱メチル化剤を作用させることにより RAR β 2 の発現が再活性化した。

(5) HPV DNA の存在と RAR β 2 発現との関係を見ると、HPV 陽性の子宮頸癌細胞株では、すべて RAR β 2 の発現が低下していたが、HPV 陰性の子宮頸癌細胞株では、すべて RAR β 2 の発現がみられ、後者の癌化過程には RAR β 2 のエピジェネティックな変化が関係していない可能性が示唆された。

結論として、RAR β 2 の発現低下には、DNA のメチル化およびヒストンの修飾といった 2 つの主要なエピジェネティックな経路が考えられ、ヒストンの脱アセチル化阻害剤、あるいは DNA の脱メチル化剤の投与が頸癌治療に有効である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Takatsuka N, Mitsuhashi A, Fujii T, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H. Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: a prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, 査読有, 2010, in press

② Koyamatsu Y, Sakamoto M, Miyake K, Muroya T, Sugano K, Nakao Y, Yokoyama M, Iwasaka T. Gene expression profiles and microsatellite instability in uterine corpus Endometrioid adenocarcinoma. *J Obstet Gynecol Res*, 査読有, 36, 2010, 336-343

③ Keiichiro J, Yatsuki H, Higashimoto K, Mukai T, Soejima H. Antisense transcription occurs at the promoter of a mouse imprinted gene, *Commdl*, on the repressed paternal allele. *Journal of Biochemistry*, 査読有, 146, 2009, 771-774

④ Yokoyama M, Noguchi M, Nakao Y, Yasunaga M, Yamasaki F, Iwasaka T. Anti-proliferative effects of the major polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate and retinoic acid in cervical

adenocarcinoma. Gynecologic Oncology, 査読有, 108, 2008, 326-331

⑤ Zhang Z, Joh K, Yatsuki H, Zhao W, Soejima H, Higashimoto K, Noguchi M, Yokoyama M, Iwasaka T, Mukai T. Retinoic acid receptor β 2 is epigenetically silenced either by DNA methylation or repressive histone modifications at the promoter in cervical cancer cells. CANCER Letters, 査読有, 247, 2007, 318-327

[学会発表] (計1件)

① Watanabe S, Kaku T, Tamiya S, Sugishima S, Noguchi M, Uchiyama M, Yasunaga M, Nakao Y, Yokoyama M, Iwasaka T. Morphological Analysis of Nucleoli with Endocervical Glandular Cell Lines. 16th International Congress of Cytology, Vancouver, British Columbia, Canada, May 13-17, 2007.

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩坂 剛 (IWASAKA TSUYOSHI)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：60117067

(2) 研究分担者

城 圭一郎 (JOH KEIICHIRO)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号：90124809

中尾 佳史 (NAKAO YOSHIHUMI)
佐賀大学・医学部・講師
研究者番号：30336119

(2007年度)

野口 光代 (NOGUCHI MITSUYO)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：20432958

(3) 連携研究者

()

研究者番号：