

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09828

研究課題名（和文）エリスロポエチンの子宮筋腫に対する増大効果をターゲットとした分子標的療法の開発

研究課題名（英文）Leiomyoma therapy targeting growth effect of erythropoietin

研究代表者

浅野 涼子（Asano, Ryoko）

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教

研究者番号：70806471

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）：子宮筋腫はありふれた疾患であるが、増大の予測や、抑制をする方法が確立されていない。我々は子宮筋腫のMED12遺伝子の変異の有無がエリスロポエチン発現量、増大傾向の差につながると考え、検討している。

本研究ではMED12野生型の子宮筋腫はMED12変異型と比較してCDK8活性が高く、血管成長因子であるエリスロポエチン発現は高いがVEGF発現は低いことを示した。また、子宮筋腫に対する偽閉経療法にも差があり、MED12野生型ではより縮小しやすいことが理解された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりMED12野生型の子宮筋腫はMED12変異型と比較してCDK8活性が高く、血管成長因子であるエリスロポエチン発現は高いがVEGF発現は低いことが示された。また、子宮筋腫に対する偽閉経療法にも差があり、MED12野生型ではより縮小しやすいことが理解された。

これらの結果から、MED12野生型と変異型の筋腫では異なる増大機構が働いており、その要因にCDK8活性とそれによるエストロゲン受容体感受性関連していると考えることができ、今後の子宮筋腫に対する新たな治療開発に向けての検討につながった。

研究成果の概要（英文）：Uterine leiomyoma is highly common in women all over the world. However, the methods to predict or prevent leiomyoma growth are not present. We hypothesize that MED12 gene mutation is one of the main reason for the difference in the erythropoietin expression and growth manner of these tumors.

In this study, we have found that MED12 wild-type leiomyomas have higher CDK8 activation, higher erythropoietin expression, and lower vascular endothelial growth factor expression compared to MED12 mutated leiomyomas. From these findings, we suspect that different cascades work as the main mechanism in the growth of leiomyomas in MED12 wild-type and mutated leiomyomas.

研究分野：婦人科良性腫瘍

キーワード：子宮筋腫 MED12 エリスロポエチン 腫瘍増大

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

子宮筋腫とは子宮の平滑筋から発生する女性において最も頻度が高い腫瘍であり、50歳では70%以上の女性に子宮筋腫があると推定されている (Baird et al., Am J Obstet Gynecol. 2003)。子宮筋腫の増大は女性ホルモンであるエストロゲンとプロゲステロンに依存し、多くの子宮筋腫は緩徐に増大する。しかし、一部の子宮筋腫は急速に増大し、時に骨盤腔を超えるような巨大な腫瘤を形成するが、その原因は解明されていない。我々は急速に増大する子宮筋腫と緩徐に増大する子宮筋腫にはその増殖に関わる分子生物学的機構に違いがあり、そこに子宮筋腫細胞による EPO 発現が関与しているとの仮説を立てている。

EPO は主に腎臓で産生され、低酸素に反応して赤芽球前駆細胞の増殖分化を誘導し、赤血球増加させ、血中ヘモグロビンと組織中の酸素レベルを正常に保っている。最近では、EPO に細胞増殖能、抗アポトーシス作用、血管増殖作用、血管成熟作用など造血以外の作用があることが報告されている (Nekoui and Blaise, Am J Med Sci. 2017)。これらの作用から EPO は悪性腫瘍細胞に対し増殖作用を持ち、虚血に対する神経保護作用、皮膚の創傷治癒促進作用があることが示されている。

一方、子宮筋腫の発生には遺伝子異常が関与しており、最も頻度が高い遺伝子変異は MED12 遺伝子の変異で、約 70% の子宮筋腫に認められる (Mäkinen et al., Science. 2011)。MED12 変異がある子宮筋腫は野生型と比べると小さい傾向がある (Asano et al., Fertil Steril. 2019)。MED12 遺伝子は mediator complex のサブユニットをコードし、様々な標的遺伝子の転写に関与しているが、MED12 変異型の子宮筋腫では cyclin dependent kinase 8 (CDK8) の活性が低下している (Turunen et al., Cell Rep. 2014)。CDK8 はエストロゲン受容体の感受性と深くかかわっている (McDermott et al., Cancer Res. 2016)、MED12 変異は子宮筋腫の増大に負の要因として働くと我々は推測している。すなわち、MED12 野生型でのみエストロゲン依存性に EPO 発現が亢進し、増大しやすい可能性がある。

我々はこれまでに子宮筋腫は EPO 発現量と腫瘍径が相関する傾向があることを示した。また MED12 野生型であると大きく、MED12 野生型では優位に EPO 発現が高いこと、また、MED12 野生型はエストロゲンに反応し EPO 発現が亢進するが、変異型は反応しないことを見出している。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでの研究で子宮筋腫が成長因子の一つである erythropoietin (EPO) を分泌しており、EPO を高発現している子宮筋腫は巨大化する傾向があることを報告した。我々は EPO の自己分泌作用が子宮筋腫を増大させる大きな要因と考えている。また、子宮筋腫には発生段階における遺伝子異常に違いがあり、MED12 野生型か変異型かがメインとして子宮筋腫細胞の性格、増殖スピードを決定づけていると考える。MED12 野生型の子宮筋腫のみが CDK8 活性が高く、エストロゲン依存性に EPO を高発現し、EPO の成長因子としての作用を介して急速に増大すると仮説を立てている。

本研究は子宮筋腫の EPO 発現が亢進し腫瘍増大をきたすまでの分子機構を解明し、新たな治療ターゲットの開発や、症状の出現予測に役立てることを目的にしている。

### 3. 研究の方法

本研究は横浜市立大学附属病院の倫理委員会の認可を得て施行しており、全ての症例より

文書による同意を得て行われた。

子宮筋腫に対して横浜市立大学附属病院で子宮摘出または子宮筋腫摘出術を施行された症例を対象にした。

MED12 変異はサンガーシーケンス法で解析した。MED12 野生型子宮筋腫を MED12WT、変異型子宮筋腫を MED12MUT と定義した。手術時に凍結保存した子宮筋腫組織 108 個の EPO mRNA、vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA、angiopoietin-1 (ANG1) mRNA の発現量を Real-time RT-PCR 法で定量した。続いて、子宮筋腫の凍結組織検体を用いて共免疫沈降を行い、RNA ポリメラーゼ C 末端ドメイン(CTD)を基質として、抗 MED12 抗体で共沈してきた CDK8 のセリン・スレオニンリン酸化酵素活性をリン酸化 CTD 特異的に認識する抗体で観察した。

子宮筋腫に対して術前に施行した偽閉経療法、Gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) による縮小率を検討する検討では術前治療として GnRHa を用いた 41 例に対して治療前後の magnetic resonance imaging (MRI)による最大筋腫の縮小率を計測した。

#### 4. 研究成果

##### (1) MED12 変異の有無による血管成長因子の差

MED12MUT、MED12WT の子宮筋腫組織内の血管成長因子を解析したところ、EPO mRNA は MED12WT で高く、VEGF mRNA は MED12MUT で有意に高かった(図 1, 図 2,  $P<0.05$ )。また、ANG1 mRNA は MED12 変異の有無により発現量に差は無かった(図 3)。

このことから、MED12 変異型の子宮筋腫は VEGF に、MED12 野生型の子宮筋腫は EPO に成長をサポートされている可能性が考えられた。これまでの検討と合わせると、MED12 野生型の子宮筋腫は EPO 発現が高いために血管成熟能が促進され、巨大化しやすく、VEGF に血管新生をサポートされている変異型よりも有利に成長する可能性を考えた(Asano et al. ASRM 2019, 国際学会)。

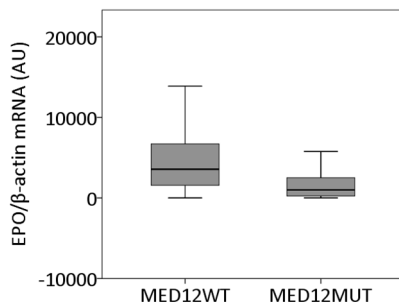


図 1 MED12 変異と EPO mRNA 発現

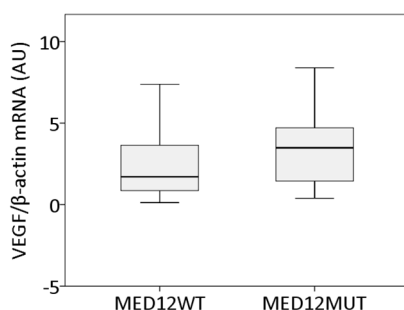


図 2 MED12 変異と VEGF mRNA 発現

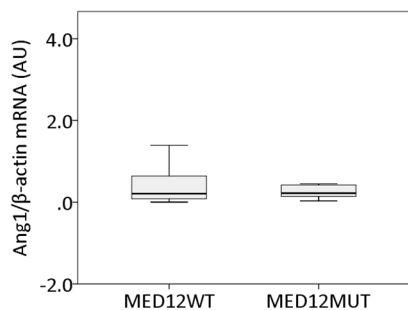


図3 MED12 変異と ANG1 mRNA 発現

(2) MED12 変異と CDK8 活性

MED12MUT においては MED12 に結合している CDK8 リン酸化活性が欠如していた (図4)。その一方, MED12WT では CDK8 リン酸化活性が高く保たれている。我々は CDK8 活性が子宮筋腫のエストロゲン感受性を高める作用があると考えており, エストロゲン感受性が高い MED12WT が EPO 発現を通して筋腫増大をきたす分子機構の解明を進めている。



図4 MED12WT は CDK8 リン酸化活性が高い。

(3) MED12 と偽閉経療法に対する反応

MED12WT はエストロゲンを一時的に低下させる薬物療法, 偽閉経療法の効果が現れやすく, MED12MUT と比較して縮小率に 2 倍以上の差がある (図5,  $P < 0.05$ )。また, MRI の T2 強調像で高輝度な子宮筋腫ほど MED12WT である傾向を認めたことから, MRI は MED12 変異の有無を予測する方法として有効でないかと考察した。

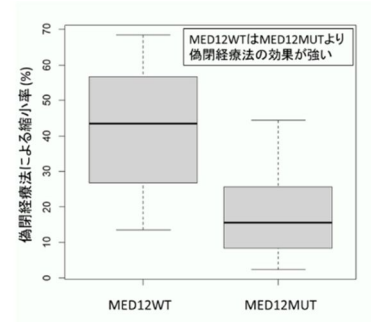


図5 偽閉経療法による子宮筋腫縮小率の比較

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Natsumi Ono, Ryoko Asano, Koichi Nagai, Yoshinobu Sugo, Tomomi Nakamura, Etsuko Miyagi	4. 巻 47
2. 論文標題 Evaluating the safety of dienogest in women with adenomyosis: A retrospective analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The journal of obstetrics and gynaecology research	6. 最初と最後の頁 1433-1440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.14612	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ryoko Asano
2. 発表標題 MED12 wild-type uterine leiomyoma cells increase erythropoietin expression by 17 $\beta$ -estradiol treatment
3. 学会等名 第41回エンドメトリオーシス学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅野 涼子, 佐藤 美紀子, 水島 大一, 中村 朋美, 宮城 悦子
2. 発表標題 子宮筋腫によるエリスロポエチン発現とMED12変異の関連
3. 学会等名 第72回 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅野 涼子, 佐藤 美紀子, 水島 大一, 永井康一, 宮城 悦子
2. 発表標題 子宮平滑筋腫のMED12遺伝子変異と血管新生因子の関連
3. 学会等名 第73回 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷岡沙紀, 浅野涼子, 他
2. 発表標題 閉経後の子宮筋腫に関する病理学的検討
3. 学会等名 第73回 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅野 涼子, 佐藤 美紀子, 水島 大一, 中村 朋美, 宮城 悦子.
2. 発表標題 子宮筋腫によるエリスロポエチン発現のエストロゲン反応性
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryoko Asano.
2. 発表標題 MED12 wild-type uterine leiomyoma cells increase erythropoietin expression by 17 $\beta$ -estradiol treatment
3. 学会等名 第41回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅野涼子, 佐藤美紀子, 水島大一, 中村朋美, 宮城悦子.
2. 発表標題 子宮筋腫によるエリスロポエチン発現とMED12変異の関連
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryoko Asano, Mikiko Asai-Sato, Taichi Mizushima, Etsuko Miyagi.
2. 発表標題 Expressions of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 in MED12 mutated and wild-type uterine leiomyomas
3. 学会等名 ASRM Scientific Congress & Expo (国際学会)
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
研究分担者	宮城 洋平  (Miyagi Yohei)  (00254194)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター (臨床研究所)・臨床研究所・所長   (82713)	
研究分担者	佐藤 美紀子  (Asai-Sato Mikiko)  (70326049)	日本大学・医学部・准教授   (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------