

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462593

研究課題名(和文) 子宮内膜の性周期および発癌過程におけるPITX1発現とテロメラーゼ制御の解析

研究課題名(英文) PITX1 expression and the telomerase control in an endometrial menstrual cycle and carcinogenic process

研究代表者

蝦名 康彦 (Ebina, Yasuhiko)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90322809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜における月経周期および発がん過程に関する、PITX1遺伝子によるテロメラーゼ制御機構について検討した。PITX1蛋白は、子宮体がん低分化症例の腫瘍部において発現を認めるものの、90%以上の体がん組織において発現を認めず、子宮体がんにおけるテロメラーゼ高発現に關与している可能性が示唆された。一方、正常内膜腺にPITX1発現が明らかとなった。しかし、月経周期との関連、正常内膜から増殖症をへて体がんに至る段階については、明確な関連性を見出すことはできなかった。病理組織学的因子、予後、Ki-67, ER⁺, PR発現との関連を含め、解析対象となるデータが多岐にわたるため、今後も解析を継続する。

研究成果の概要(英文)：PITX1 protein was expressed in the tumor of the case with poorly-differentiated uterine cancer. However, no expression of PITX1 in more than 90% of the case with uterine cancer. Therefore, this might be associated with telomerase overexpression. PITX1 expression was detected in normal endometrium. Specific relationships could not be obtained regarding to menstrual cycle and carcinogenesis. I keep on analyzing the data that can be got throughout this period.

研究分野：外科系臨床医学

キーワード：子宮内膜

1. 研究開始当初の背景

(1) テロメア・テロメラーゼ研究と *PITX1* 遺伝子

テロメアは細胞分裂に伴い短縮し、ある閾値を超えると細胞は増殖を停止する。しかし癌細胞はテロメアを維持する分子機構を獲得しており、その代表的なものがテロメラーゼの活性化である。テロメラーゼは、多くのがん細胞で活性の上昇が明らかになっており、一方、生殖細胞と血球系、上皮系の幹細胞以外の体細胞で活性は検出されない。したがって、テロメラーゼ活性は正常細胞のもつ生理的機能の一つであり、テロメラーゼ活性を抑制する機構が存在すると考えられてきた。テロメラーゼ活性は触媒サブユニットである TERT の発現で調節されており、活性化因子 (c-Myc, Sp1, エストロゲン, HPV E6) や、抑制因子 (Mad1, WT1, Rb, MZF-2, TGF β , BRCA1) の関与が報告されているが、その調節機構については解明されていない。

PITX1 遺伝子は、ホメオドメインを保持することから発生や分化に深く関わっていることが以前から知られていたが、それ以外の機能についての報告はなかった。*PITX1* による TERT の顕著な抑制効果がレポーター解析において確認され、また *hTERT* のプロモーター領域において、予想された 3 カ所の *PITX1* 結合サイトのうち、2 カ所に結合していることが示唆された。これらのことから、*PITX1* 遺伝子は *hTERT* のプロモーター領域に結合し、直接的なテロメラーゼ発現制御に関わるがん抑制遺伝子である可能性が示された。(Qi DL et al. Mol Cell Biol 2011) この研究は、メラノーマ細胞株を用いて行われており、また胃癌、大腸がん、膀胱がんの臨床検体において *PITX1* の発現低下が報告されている。しかしで子宮内膜で検討を行った報告はない。

(2) 子宮内膜に関するテロメラーゼ研究

子宮体癌におけるテロメラーゼの関与については、申請者は TRAP 法により子宮体癌の 89% がテロメラーゼ活性を有しており、半定量法によりテロメラーゼ活性強度は、進行期および骨盤リンパ節転移と関連を有していることを明らかにした (Ebina Y et al. Int J Cancer 1999)。しかし、テロメラーゼ活性そして *hTERT* 発現は、癌に限らず正常の増殖期内膜 (92%)、分泌期内膜 (67%) でも認められる。定量的検討 (*hTERT* mRNA の realtime PCR および定量的 TRAP 法) においては、両者ともに体癌では正常内膜に比べ有意に高く、また正常内膜において増殖期内膜は分泌期や萎縮内膜に比して低い傾向が得られた。またわれわれが行った予備実験により以下のことが明らかになった。子宮体癌組織標本に対し、*PITX1* の免疫組織化学を行ったところ、93% (13/14 症例) の腫瘍部位において *PITX1* 陰性であった。一方、非癌部の萎縮内膜腺の核では *PITX1* 陽性が確認された。子宮体癌において進行期や分化度にかかわらず *PITX1* タンパクは発現していないことが予測されるが、1) 前癌状態である異型内膜増殖症、そして正常性周期内膜における検討が必要である、2) タンパク発現がみられないとしても、mRNA レベルの検討、エピジェネティクスの関与も考慮しなければならない。正常子宮内膜基底層には幹細胞の性格を有する fraction が存在し、定常的にテロメラーゼ活性陽性の細胞が供給されているとされるが、*PITX1* が、*hTERT* の抑制を介して、正常子宮内膜の増殖・分化に関与している可能性があると考えている。

2. 研究の目的

子宮内膜における正常性周期ならびに発癌過程における、新規テロメラーゼ活性制御遺伝子として同定された *PITX1* の発現とテロメラーゼ制御に関する研究を、以下の計画方法に沿って実施する。それにより、*PITX1*

による *TERT* の発現制御と子宮内膜の生理機構と病態を統合的に理解することを目的とする

3. 研究の方法

(1) 手術により摘出した、同意を取得した子宮組織を用いて、*PITX1*, *TERT*, ER などの免疫組織化学を行う。正常子宮内膜(月経周期, 閉経前後, ホルモン分泌状態など様々な状態), 内膜増殖症, 子宮体癌のそれぞれに関して、発現の違いおよびその組織学的局在について検討する。子宮体癌症例については、進行期, 組織型, 予後との関連についても検討を行う。

(2) 手術もしくは内膜生検により採取した、同意を得た子宮内膜を用いて、(1)と同様に mRNA 発現の検討を行う。

4. 研究成果

手術治療を行った子宮体がん症例、または子宮筋腫など良性疾患の手術症例における、子宮内膜組織標本に対して、*PITX1*, *hTERT* の免疫組織化学を用い、テロメラーゼ抑制遺伝子産物の発現を検討した。コントロールとなり得る非がん部の子宮内膜については、年齢、月経周期(増殖期、分泌期、月経期)、閉経の有無との関連について解析した。一方、体がん症例においては、年齢、閉経の有無、臨床進行期、組織型、型/型、などの臨床病理学的因子、予後、治療前腫瘍マーカーとの関連について解析した。*PITX1* 蛋白は、子宮体がん低分化症例の腫瘍部において発現を認めるものの、90%以上の体がん組織において発現を認めず、子宮体がんにおけるテロメラーゼ高発現に関与している可能性が示唆された。一方、正常内膜腺の核に *PITX1* 発現が明らかとなった。しかし、月経周期との関連、そして正常子宮内膜から、子宮内膜増殖症、そして体がんに至る段階については明確な関連性を見出していない。病理組織学的

因子、予後、Ki-67, ER, PR 発現との関連を含め、解析対象となるデータが多岐にわたるため、今後も解析を継続する。

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 23 件)

1. Ebina Y, Shimada S, Deguchi M, et al. Divergence of helper, cytotoxic, and regulatory T cells in the decidua from miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* 76, 199-204, 2016, 査読有
2. Shinozaki N, Ebina Y, Deguchi M, et al. Protein S deficiency complicated pregnancy in women with recurrent pregnancy loss. *Gynecol Endocrinol.* 3, 1-3, 2016, 査読有
3. Yamada H, Deguchi M, Ebina Y et al. Medium-dose intravenous immunoglobulin therapy for women with six or more recurrent miscarriages. *J Reprod Immunol.* 109, 48-51, 2015, 査読有
4. Astuti Y, Nakabayashi K, Ebina Y et al. Human recombinant H2 relaxin induces AKT and GSK3 β phosphorylation and HTR-8/SVneo cell proliferation. *Kobe J Med Sci.* 61, E1-8, 2015, 査読有
5. Tanimura K, Nishikawa A, Ebina Y, et al. The IgG avidity value for the prediction of *Toxoplasma gondii* infection in the amniotic fluid. *J Infect Chemother.* 21, 668-671, 2015, 査読有
6. Ebina Y, Minematsu T, Morioka I, et al. Rapid increase in the serum cytomegalovirus IgG avidity index in women with a congenitally infected fetus. *J Clin Virol.* 66, 44-47, 2015,

- 査読有
7. Ebina Y, Ieko M, Naito S, et al. Low levels of plasma protein S, protein C and coagulation factor XII during early pregnancy and adverse pregnancy outcome. *Thromb Haemost.* 114, 65-69, 2015, 査読有
 8. Tanimura K, Yamasaki Y, Ebina Y, et al. Prediction of adherent placenta in pregnancy with placenta previa using ultrasonography and magnetic resonance imaging. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 187, 41-44, 2015, 査読有
 9. Tanimura K, Jin H, Ebina Y, et al. β 2-glycoprotein I / HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. *Blood.* 125, 2835-2844, 2015, 査読有
 10. Kobayashi Y, Morioka I, Ebina Y, et al. Low total IgM values and high cytomegalovirus loads in the blood of newborns with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Perinat Med.* 43, 239-343, 2015, 査読有
 11. Kitajima K, Tanaka U, Ebina Y, et al. Role of diffusion weighted imaging and contrast-enhanced MRI in the evaluation of intrapelvic recurrence of gynecological malignant tumor. *PLoS One.* 10, e0117411, 2015, 査読有
 12. Yamada H, Tairaku S, Ebina Y et al. Nationwide survey of mother-to-child infections in Japan. *J Infect Chemother.* 21, 161-164, 2015, 査読有
 13. Maesawa Y, Yamada H, Ebina Y et al. History of biochemical pregnancy was associated with the subsequent reproductive failure among women with recurrent spontaneous abortion. *Gynecol Endocrinol.* 31, 306-308, 2015, 査読有
 14. Kawakami F, Semba S, Ebina Y, et al. Pathogenesis of combined high-grade squamous intraepithelial lesion and adenocarcinoma in situ of the uterine cervix: human papillomavirus genotype and methylation status and immunohistochemical study. *Kobe J Med Sci.* 60, E66-73, 2014, 査読有
 15. Tanimura K, Tairaku S, Ebina Y, et al. Prophylactic intravenous immunoglobulin injections to mothers with primary cytomegalovirus infection. *Kobe J Med Sci.* 60, E25-29, 2014, 査読有
 16. Kitajima K, Ebina Y and Sugimura K: Present and future role of FDG-PET/CT imaging in the management of gynecologic malignancies. *Jpn J Radiol.* 32, 313-323, 2014, 査読有
 17. Uenaka M, Tanimura K, Ebina Y, et al. Risk factors for neonatal thyroid dysfunction in pregnancies complicated by Graves' disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 177, 89-93, 2014, 査読有
 18. Miyahara Y, Makiyama N, Ebina Y, et al. In vitro fertilization-embryo transfer pregnancy was a risk factor for hemorrhagic shock in women with placental polyp. *Gynecol Endocrinol.* 30, 502-504, 2014, 査読有
 19. Ebina Y, Nakamachi Y, Tanimura K, et al. Management of thromboembolism in pregnant women with inherited antithrombin deficiency: genotype-phenotype analysis. *Exp Clin Cardiol.* 20, 145-159, 2014, 査読有
 20. Ebina Y, Minematsu T, Sonoyama A, et

al. The IgG avidity value for the prediction of congenital cytomegalovirus infection in a prospective cohort study. J Perinat Med. 42, 755-759, 2014, 査読有

21. Ebina Y, Watari H, Kaneuchi M, et al. Impact of FDG PET in optimizing patient selection for cytoreductive surgery in recurrent ovarian cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 41, 466-451, 2014, 査読有
22. Lodhi RS, Nakabayashi K, Ebina Y, et al. Relaxin has anti-apoptotic effects on human trophoblast-derived HTR-8/SV neo cells. Gynecol Endocrinol. 29, 1051-1054, 2013, 査読有
23. Miyahara Y, Yoshida S, Ebina Y, et al. Less invasive new vaginoplasty using laparoscopy, atelocollagen sponge, and hand-made mould. Kobe J Med Sci. 58, E138-144, 2013, 査読有

〔学会発表〕(計9件)

【国際学会 招請講演】

1. Ebina Y. Toward optimized therapy plans using FDG PET/CT for the patients with gynecologic Cancers, Joint Symposium of University of Liege and Kobe University, Kobe, 2015
2. Ebina Y. Impact of FDG PET in optimizing patient selection for cytoreductive surgery in recurrent ovarian cancer, 5th International Workshop on Molecular Functional Imaging for Brain and Gynecologic Oncology, Fukui, 2014

【国際学会 ワークショップ】

3. Ebina Y. The IgG avidity value for the prediction of congenital

cytomegalovirus infection in a prospective cohort study, 39th Annual International Herpesvirus Workshop, Kobe, 2014

【国際学会 一般演題】

4. Ebina Y. MRI and FDG-PET/CT in the clinical evaluation of patients undergoing secondary debulking (cytoreductive) surgery for gynecologic malignancy. 68th JSOG annual meeting, Tokyo, 2016
5. Ebina Y. Low levels of plasma protein S, protein C and coagulation factor XII during early pregnancy and adverse pregnancy outcome. 67th JSOG annual meeting, Tokyo, 2015
6. Ebina Y. Low levels of plasma protein S, protein C and coagulation factor XII during early pregnancy and adverse pregnancy outcome. International Society for the hypertension in Pregnancy (ISSHP) European Congress, Budapest, 2015
7. Ebina Y. Association between protein C, protein S, factor XII, and spontaneous abortion, adverse pregnancy outcome. 66th JSOG annual meeting, Tokyo, 2014
8. Ebina Y. Diagnostic value of IgG avidity for prediction of congenital cytomegalovirus Infection. 17th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, Lisbon, 2013
9. Ebina Y. Phenotypic differences of T cells and macrophages in the decidua obtained from spontaneous abortion. 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility, Kobe, 2013

〔図書〕(計6件)

1. 蝦名康彦：卵巣がん～プラチナ抵抗性再発～．患者さんご家族のための子宮頸がん・子宮体がん・卵巣がん治療ガイドライン 第2版．日本婦人科腫瘍学会編 金原出版，東京，196-198頁，2016
2. 山田秀人，蝦名康彦：パルボウイルス感染．症例から学ぶ周産期診療ワークブック．日本周産期・新生児医学会 教育・研修委員会 メジカルビュー社，東京，206-209頁，2016
3. 平久進也，蝦名康彦、山田秀人：NIPT．不妊・不育診療指針．柴原浩章 中外医学社，東京，392-396頁，2016
4. 蝦名康彦：子宮頸癌の罹患率、死亡率の推移について教えてください．婦人科癌診療 Q&A．鈴木 直，岡本愛光，井篁一彦 中外医学社，東京，2-7頁，2014
5. 蝦名康彦：腫瘍減量手術に適する再発卵巣癌患者の選択における FDG-PET の意義 メディカルレビュー社，東京，全6頁，2014
6. 蝦名康彦、宮原義也、山田秀人：子宮体癌：再発癌に対して推奨される化学療法とは？EBM 婦人科疾患の治療2013-2014．杉山 徹，苛原 稔，原田 省，鈴木 直，川名 敬 中外医学社，東京，335-341頁，2013

6．研究組織

(1)研究代表者

蝦名 康彦 (Ebina Yasuhiko)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90322809