

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462529

研究課題名(和文) 転写調節機構から見た子宮体癌の浸潤・転移機構を司る新たな分子機構の解明

研究課題名(英文) A novel regulatory mechanism of endometrial cancer invasion and metastasis by transcription factors

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌における転写因子DEC1とDEC2の発現解析を行ったところ、DEC1とDEC2はいずれもmRNAレベル、蛋白レベルにおいて病期IA期で高発現を認め、IB期以上の浸潤癌においては明らかな発現低下を認めた。DEC1、DEC2は癌細胞の浸潤能を抑制した。DEC1、DEC2の標的遺伝子としてTWIST1を同定した。DEC1、DEC2は二量体を形成し、TWIST1のプロモーター領域への結合をSP1と競合することによりTWIST1の転写を抑制することから、この機序により癌の浸潤を抑制することが示唆された。以上の結果を論文として発表した(Asanoma et al., 2015)。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we demonstrated that the expression of DEC1 and DEC2 was controlled in a pathological stage-dependent manner in human endometrial cancer (HEC). Our in vitro assays showed that DEC1 and DEC2 suppressed tumor cell invasion. DEC1 and DEC2 also suppressed the transcription of the EMT effector, TWIST1. We elucidated that the transcription factor SP1 was involved in the basal transcriptional activity of TWIST1 and that DEC1 and DEC2 competed with SP1 for DNA binding to regulate the gene transcription. We presented these results as a paper (Asanoma et al., 2015).

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮内膜癌 上皮間葉移行 転写因子

1. 研究開始当初の背景

我々は以前より子宮体癌の増殖・浸潤に関わる分子機構の研究を行ってきた。成果としては我々が以前、絨毛癌抑制遺伝子として同定した新規ホメオボックス遺伝子 HOPX (NECC1) が子宮体癌についても造腫瘍能抑制効果を持つことを証明した (Asanoma et al., 2003; Yamaguchi and Asanoma et al., 2009)。我々は HOPX が bHLH 型の転写因子である DEC1 の発現を下げることを見出した。さらに我々の予備実験によると DEC1 の mRNA レベルは正常子宮内膜に比べて子宮体癌で増加しており子宮体癌の癌化や進展において何らかの機能を持つことが予想される。DEC1、DEC2 については以前より細胞の増殖や分化を制御する転写因子としてさまざまな細胞種において研究がなされてきた。しかし、子宮体癌においてはほとんど知見がなかった。

2. 研究の目的

子宮体癌の進展における DEC1、DEC2 の機能を明らかにするとともに DEC1、DEC2 の標的遺伝子の転写調節機構を明らかにすることを目的とした。本研究で特に焦点を当てた DEC1、DEC2 の機能はこれまで知見のほとんどない癌の浸潤と上皮間葉移行である。

3. 研究の方法

(1)DEC1 と DEC2 の発現解析: 早期から進行期の子宮体癌 (内膜癌) の組織検体を用いて DEC1、DEC2 の発現を real-time RT-PCR 法ならびに免疫組織染色法によって mRNA レベル、タンパクレベルで発現解析を行った。
(2) DEC1、DEC2 の子宮体癌細胞における上皮間葉移行、浸潤能における機能解析: DEC1、DEC2 を発現している HHUA 細胞で DEC1、DEC2 をノックダウンする、または DEC1、DEC2 を発現していない HEC1、HEC6、Ishikawa 細胞に DEC1、DEC2 を強制発現させて上皮間葉移行のマーカー遺伝子の発現、細胞浸潤能を観察した。
(3)DEC1、DEC2 の標的遺伝子の同定とプロモーター解析: DEC1、DEC2 の発現を操作した際に生じる上皮間葉移行のマーカー遺伝子の発現変化から標的遺伝子の候補を抽出した。この中で特に TWIST1 に焦点を絞りそのプロモーター領域を様々な長さで有するレポーターを作成し、DEC1、DEC2 が標的とする部位を同定した。さらにゲルシフト解析、クロマチン免疫沈降法を用いてそこに結合する SP1、DEC1、DEC2 と TWIST1 のプロモーター領域との相互作用を検討した。
(4)SP1 と DEC1、DEC2 の相互作用の解析: TWIST1 プロモーターの GC 豊富な近位領域に SP1、DEC1、DEC2 のいずれもが結合することが分かった。そこで、SP1、DEC1、DEC2 の相互作用を免疫沈降法を用いて検討した。
(5)SP1 阻害による効果解析: DEC1、DEC2 が SP1 の DNA 結合を阻害することにより TWIST1

の転写を阻害することが分かったことから SP1 のノックダウンや SP1 阻害剤 WP631 を用いることにより DEC1、DEC2 の発現と同様の作用が得られるかを細胞浸潤能、レポーター解析、ゲルシフト解析を用いて検討した。

4. 研究成果

(1)DEC1 と DEC2 の発現解析: DEC1、DEC2 の発現は mRNA レベル、タンパクレベル共に IA 期で高く、IB 期以上で低かった。また、下記で DEC1、DEC2 の標的遺伝子として同定した TWIST1 の発現も同じ検体で調べたところ、DEC1 と TWIST1; DEC2 と TWIST1 の発現は逆相関を示した。さらに、DEC1 と DEC2 の発現は高い正の相関関係を示した。
(2) DEC1、DEC2 の子宮体癌細胞における上皮間葉移行、浸潤能における機能解析: HHUA 細胞で DEC1、DEC2 をノックダウンすると、上皮系マーカーの発現が低下し、間葉系マーカーの発現が上昇し、細胞浸潤が上昇した。また、HEC1、HEC6、Ishikawa 細胞に DEC1、DEC2 を強制発現させると逆の現象が観察された。DEC1 と DEC2 の作用は上皮間葉移行を抑制し、細胞浸潤を抑制する点では同様であったが、同じ発現量では特に DEC2 の作用が顕著であった。
(3)DEC1、DEC2 の標的遺伝子の同定とプロモーター解析: DEC1、DEC2 の標的遺伝子として TWIST1 に焦点を絞り解析した。そのプロモーター領域を -1876 ~ +418 から近位に向けて削っていき、様々な長さで有するレポーターを作成し、DEC1、DEC2 の反応性を確認していったところ最終的に DEC1、DEC2 が標的とする部位を GC 豊富な近位領域: +151 ~ +184 と同定した。この領域は DEC1、DEC2 の反応性を規定するとともに転写因子 SP1 の作用する候補配列であることが分かった。そこでゲルシフト解析で確認したところ、SP1 のみでなく DEC1、DEC2 も +151 ~ +184 (SP1BS) と結合することが分かった。また、SP1 と SP1BS との結合は DEC1、DEC2 の存在下において低下する結果が得られた。さらにクロマチン免疫沈降法を用いて解析したところ、ゲルシフト解析と同様に DEC1、DEC2 発現下において SP1 と SP1BS との結合が低下した。さらに DEC1、DEC2 非存在下においては PCAF が、存在下においては HDAC1 が SP1BS に結合していた。
(4)SP1 と DEC1、DEC2 の相互作用の解析: TWIST1 プロモーターの SP1BS に SP1、DEC1、DEC2 のいずれもが結合することが分かった。そこで、SP1、DEC1、DEC2 の相互作用を免疫沈降法を用いて検討した。SP1 は DEC1、DEC2 のいずれとも結合せず、DEC1-DEC1、DEC1-DEC2、DEC2-DEC2 の結合は認められた。特に DEC2-DEC2 の複合体は他の 2 つに比べて格段に多く、ホモ二量体形成能が高いことが示唆された。DEC1 より DEC2 の方が作用が強い原因として、DEC1 よりも DEC2 の方が二量体を形成しやすく、転写抑制効果が発揮しやすいことが示唆された。

(5)SP1 阻害による効果解析：SP1 のノックダウンにより上皮間葉移行と細胞浸潤は抑制された。また、同時に TWIST1 の転写・プロモーター活性も抑制された。SP1 阻害剤 WP631 を用いたところ、SP1 ノックダウンと同様に上皮間葉移行と細胞浸潤は抑制された。また、同時に TWIST1 の転写・プロモーター活性も抑制され、この作用は SP1 と SP1BS との結合阻害を介するものであることが分かった。以上の結果を論文として発表した (Asanoma et al., 2015)。

(6) DEC1 と DEC2 の発現制御機構の解明：上述したように子宮体癌において、DEC1 と DEC2 の発現量は mRNA レベル、タンパクレベルの両方において高い正の相関を認めた。このことから DEC1 と DEC2 の転写が共通の機構により制御されていることが示唆される。DEC1 のプロモーターを様々な癌種で解析した研究によると、癌化の過程で DEC1 のプロモーター領域のメチル化は明らかな変化を示さないことが報告されている。そこで我々はその他の機構があると考え、マイクロ RNA に注目した。TargetScan と miRanda のアルゴリズムを用いて解析したところ、DEC1 と DEC2 の 3' 非転写領域に共通するマイクロ RNA family の結合配列 (seed 配列) を見出した。このマイクロ RNA family のひとつを子宮内膜癌の細胞株に遺伝子導入すると、予想通り DEC1 と DEC2 の発現が低下し、細胞の浸潤能が亢進した。この結果は当該マイクロ RNA family が DEC1 と DEC2 の発現が低下させ、細胞の浸潤能を亢進させることを示唆する結果である。今後さらに発現解析・機能解析を進め、DEC1 と DEC2 を介した癌抑制機構を明らかにしていく予定である。

(7) アクチン結合分子 Calponin1 は卵巣癌の播種に関わる：アクチン結合分子 Calponin1 が卵巣癌の播種に関わることが知られていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。そこで Calponin1 の部位特異的な機能解析を行った。様々な欠損変異体を作成し、細胞における局在や細胞の増殖・浸潤・運動能を検討し、Calponin1 の癌抑制機能に必要な最小領域を同定した。同定した小さなアクチン結合部位のみで細胞質でのアクチン重合を促進し、同時に卵巣癌の増殖・浸潤・運動能を抑制することが分かった (Yamane et al., 2015)。当研究代表者が研究の指導を行い、corresponding author を務めた。

(8) 妊娠高血圧腎症の胎盤線維芽細胞は活性化した TGFB1 シグナルにより線維化を促進させている：妊娠高血圧腎症患者の胎盤は、線維化が促進されており、線維化シグナルが活性化されている。胎盤から線維芽細胞を単離して解析したところ、妊娠高血圧腎症由来の線維芽細胞においても TGFB1 をはじめとする線維化シグナルが活性化されており、機能的にも線維化能が高いことが示された。この線維芽細胞の線維化能には活性化した TGFB1 シグナルが必須であり、胎盤の線維化に

TGFB1 シグナルが深く関わっていることが示唆された。この結果を論文にまとめ、現在、投稿準備中である。当研究代表者が研究の指導を行い、corresponding author を務める。

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6件)

Liu G, Asanoma K, Takao T, Tsukimori K, Uchi H, Furue M, Kato K, Wake N. Aryl hydrocarbon receptor SNP -130 C/T associates with dioxins susceptibility through regulating its receptor activity and downstream effectors including interleukin 24. *Toxicology Letters*, 232: 384-392, 2015, doi: 10.1016/j.toxlet.2014.11.025.

Okamoto K, Tsunematsu R, Tahira T, Sonoda K, Asanoma K, Yagi H, Yoneda T, Hayashi K, Wake N, Kato K. SNP55, a new functional polymorphism of MDM2-P2 promoter, contributes to allele-specific expression of MDM2 in endometrial cancers. *BMC Medical Genetics*. 16: 67, 2015, doi: 10.1186/s12881-015-0216-8.

Yamane T, Asanoma K*, Kobayashi H, Liu G, Yagi H, Ohgami T, Ichinoe A, Sonoda K, Wake N, Kato K. Identification of the Critical Site of Calponin 1 for Suppression of Ovarian Cancer Properties. *Anticancer Reserach*, 35: 5993-5999, 2015. *corresponding author, <http://ar.iiarjournals.org/content/35/1/5993.long>

Asanoma K*, Liu G, Yamane T, Miyanari Y, Takao T, Yagi H, Ohgami T, Ichinoe A, Sonoda K, Wake N, Kato K. Regulation Mechanism of TWIST1 Transcription by BHLHE40 and BHLHE41 in Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 35: 4096-4109, 2015. *corresponding author, doi: 10.1128/MCB.00678-15.

Yagi H, Asanoma K, Ohgami T, Ichinoe A, Sonoda K, Kato K. GEP oncogene promotes cell proliferation through YAP activation in ovarian cancer. *Oncogene*. 35: 4471-4480, 2016, doi: 10.1038/onc.2015.505.

Kitade S, Onoyama I, Kobayashi H, Yagi H, Yoshida S, Kato M, Tsunematsu R, Asanoma K, Sonoda K, Wake N, Hata K, Nakayama KI, Kato K. FBXW7 is involved in the acquisition of the malignant phenotype in epithelial ovarian tumors. *Cancer Science*. 107: 1399-1405, 2016, doi: 10.1111/cas.13026.

[学会発表](計5件)

ASANOMA Kazuo, KOBAYASHI Hi roaki, WAKE

Norio, KATO Kiyoko, Transcription factors, DEC1 and DEC2 cooperatively regulate epithelial-to-mesenchymal transition of uterine endometrial cancer cells. The 66th Annual Congress of Japan Society of Obstetrics & Gynecology, 2014-04-18 - 2014-04-20. Tokyo

ASANOMA Kazuo, SONODA Kenzo, WAKE Norio, KATO Kiyoko, Basic HLH type of transcription factors, DEC1 and DEC2 suppress epithelial-to-mesenchymal transition of uterine endometrial cancer cells. The 67th Annual Congress of Japan Society of Obstetrics & Gynecology, 2015-04-10, Yokohama

ASANOMA Kazuo, SONODA Kenzo, WAKE Norio, KATO Kiyoko, Basic HLH type of transcription factors, BHLHE40 and BHLHE41 suppress epithelial-to-mesenchymal transition of uterine endometrial cancer cells by inhibiting SP1 function. The 68th Annual Congress of Japan Society of Obstetrics & Gynecology, 2016-04-22, Tokyo

ASANOMA Kazuo, SONODA Kenzo, WAKE Norio, KATO Kiyoko, BHLHE40 and BHLHE41 suppress epithelial-to-mesenchymal transition of uterine endometrial cancer cells by inhibiting SP1 function. The 58th Meeting of the Japan Society of Gynecologic Oncology, 2016-07-09, Yonago

ASANOMA Kazuo, SONODA Kenzo, WAKE Norio, KATO Kiyoko, BHLHE40 and BHLHE41 suppress epithelial-to-mesenchymal transition of uterine endometrial cancer cells by inhibiting SP1 function. The 75th Annual Meeting of the Japan Cancer Association, 2016-10-08, Yokohama

〔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

浅野間和夫 (ASANOMA Kazuo)
九州大学医学部医学研究院・地域医療学講座・准教授
研究者番号：30380413

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

無し ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

無し ()