

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09255

研究課題名(和文) Arid1a機能喪失の子宮内膜癌化と薬剤感受性への影響の検討

研究課題名(英文) The loss of Arid1a function on endometrial carcinogenesis and drug sensitivity

研究代表者

内川 順子 (UCHIKAWA, Junko)

信州大学・医学部・助教(特定雇用)

研究者番号：00722927

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)：子宮内膜腺上皮に遺伝子ノックアウト(KO)を誘導可能なマウスモデルにおいて、Arid1a-KOでは表現型に変化なく、Pten-KOでは1週後に異型増殖症となり、6～8週程度で多くが癌化した。Arid1aとPtenのダブルKOでは、10日以内に全例が癌化し、悪性度も高く6週間には死亡例が出始めた。このダブルKOの子宮内膜癌は、シスプラチン、HDAC阻害剤・メドロキシプロゲステロン酢酸併用療法、化合物A、Niraparib、天然化合物Bなどに対し、治療抵抗性を示した。また我々はマウス腹腔内に子宮内膜症性嚢胞を発症させるマウスモデルを確立し、ダブルKOを誘導することで癌化を誘導することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりARID1A機能欠失がAEHからEECへの進行を促進することが明らかとなった。EEC発癌マウスモデルは今後の薬物療法検討に役立つと考えられる。また、同様に子宮内膜症発癌マウスモデルは、子宮内膜症発癌研究や薬物療法研究に役立つ可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have established a mouse model capable of inducing gene knockout (KO) specifically in the endometrial epithelium. In this mouse model, Arid1a-KO did not change its phenotype, Pten-KO developed atypical hyperplasia after one week, and half of them became adenocarcinoma in about 6 to 8 weeks. In the double-KO of Arid1a and Pten, all cases became adenocarcinoma within ten days. Using this double-KO endometrial carcinoma mouse model, we examined the sensitivity of several drugs, including cisplatin, HDAC inhibitor/medroxyprogesterone acetate combination therapy, Niraparib, compound A, natural compound B. However, none of them were effective. We also established a mouse model that develops endometriotic cysts in the abdominal cavity of mice and succeeded in inducing carcinoma by inducing double-KO.

研究分野：産婦人科学

キーワード：ARID1A 子宮内膜癌 子宮内膜症 薬剤感受性 マウスモデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

わが国では子宮内膜癌（EMC）罹患数・死亡数とも急速に増加しており、新規治療法確立が急務である。EMCの80%以上を占める類内膜癌（EEC）では、The Cancer Genome Atlas (TCGA)の包括的ゲノム解析から、PI3K経路を制御する癌抑制遺伝子PTENの変異頻度が約82%と高率であったが[1]、PTEN変異は前癌病変である子宮内膜異型増殖症(AEH)でも高頻度に見られ、予後に影響を与える抗癌剤耐性のような悪性形質の獲得に直接関与する因子ではない。実際PTEN下流のPI3K経路を抑制するmTOR阻害剤の効果は限定的であり[2]、EMCに対する新たな治療標的の探索が重要である。

ARID1AはSWI/SNF複合体のDNA結合subunitであり、この複合体の作用部位を規定する重要な因子である。SWI/SNF複合体はDNAクロマチン構造を変化させることによって転写を調節し癌抑制的に機能している(図1)。我々の米国の共同研究者(Shih IM and Wang TL)は、卵巣明細胞癌の原因遺伝子としてARID1A変異を見出し大きな注目を集めたが[3]、その後EECにおいてもARID1A変異・欠失が30~40%に認められることが示された[1,4]。またShihらはARID1A欠失が進行EECでの無増悪生存期間の有意な短縮と関連すること[5]、抗癌剤耐性を示す卵巣明細胞癌でARID1A変異頻度が高い(57%)ことを報告しており[3]、ARID1A機能喪失がEECの細胞学的悪性度の亢進や薬剤耐性と深く関連することを示唆している。一方、EECにおいてARID1A機能喪失と薬剤感受性の関連を示した報告はない。また他癌においても、薬剤耐性を誘導する分子機序は解明されていない。

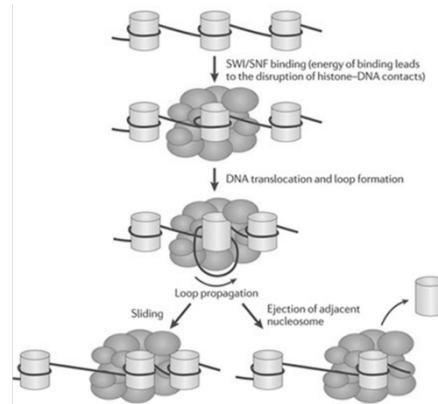


図1: SWI/SNF複合体のクロマチン構造変化による転写調節 (Boris G, et al. Nature Reviews Cancer 11, 481-492)

2. 研究の目的

本研究ではARID1A機能喪失変異が①子宮内膜癌化・進展に及ぼす影響、②薬剤感受性に及ぼす影響、③それらの分子機構を解明することを目的とする。最終的にはARID1A変異をマーカーとした子宮内膜癌の新規治療法開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) AEH, EECでのARID1A発現の検討

信州大学で子宮全摘術が施行されたAEH部分を含むEEC症例44例の子宮全摘組織をARID1A抗体(Sigma-Aldrich HPA005456, polyclonal, 1:2000)を用いて免疫染色を施行し、染色性を、完全機能lossを示すC complete loss、部分的機能lossを示すClonal loss、野生型(WT)を示すRetainに分類して検討した。

(2) 子宮内膜特異的遺伝子ノックアウト(KO)のマウスモデルでの検討

我々の米国での共同研究者Shihらは、Tet-on Cre systemによって、doxycycline(DOX)経口投与によって子宮内膜腺上皮特異的に遺伝子ノックアウト(KO)を誘導できる遺伝子改変C57BL/6マウスを樹立し、このsystemを用いてArid1aとPtenのKOを誘導するマウスモデルを作成した。Arid1a-KOのみ、Pten-KOのみ、Arid1aとPtenのダブル-KOを行い、子宮内膜癌発症について検討を行った。

(3) ダブル-KOマウスモデルを用いた薬剤感受性の検討

上記のダブル-KOマウスを用いて、薬剤感受性の検討を行った。DOX経口投与でダブル-KOを誘導し、その1週間後より以下のような薬物療法を4週間行い、子宮摘出して癌の有無を確認した。

- ① シスプラチンCDDP(5 mg/kg)weekly 腹注投与群と溶媒のみ腹注のControl群の比較。
- ② PARP阻害薬Niraparib 50mg/kg/day 連日経口投与群と溶媒のみ経口投与のControl群の比較。
- ③ メドロキシプロゲステロン酢酸(MPA) 25µg/kg/day 連日皮下注と溶媒のみ皮下注のControl群の比較。
- ④ HDAC阻害薬Panobinostat 10mg/kg 週5回経口投与群、MPA100mg/kg 週5回経口投与群、両剤併用投与群、および溶媒のみ経口投与のControl群の比較
- ⑤ 我々が開発中の抗腫瘍化合物A weekly 腹注投与群と溶媒のみ腹注のControl群の比較。なお、この抗腫瘍薬剤Aは子宮内膜癌細胞株のxenograftを用いた検討では強い抗腫瘍効果が認められている。
- ⑥ 天然化合物B 週5回経口投与群と溶媒のみ経口投与のControl群の比較。

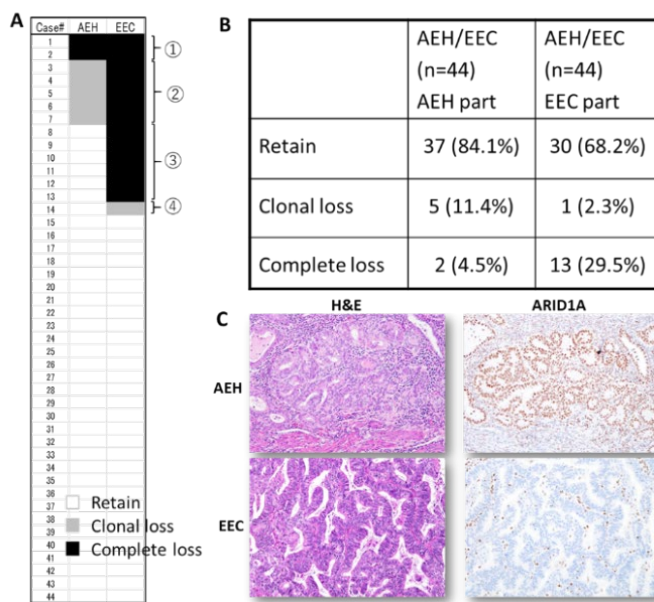
(4) 子宮内膜癌発症マウスモデルの検討

ダブル-KOマウスモデルの子宮を他のC57BL/6マウス腹腔内に移植し、4週間後に開腹し、形成された病変を摘出して病理像を検討した。同様の方法で移植を行った4週後にDOX経口投与を行い、その4週後に病変を摘出して、病理像を検討した。

4. 研究成果

(1) AEHを併存したEEC症例における各病変部分のARID1A染色パターン [6]

図2 ([6]のFig. 3より改変)に結果を示す。EEC部分でARID1A lossを伴う症例は31.8%であり、これまでの報告と同様であった。AEHでARID1A lossを伴うものは15.9%であり、そのうち11.4%は部分的なlossであるClonal lossであった。これらAEHでのARID1A loss症例は全例EEC部分ではcomplete lossとなっており、AEH中のARID1A lossのcloneから発癌したと考えられる。また、EEC部分にのみcomplete lossとなっている症例が6例(13.7%)あった。これらのことからARID1A lossはAEHからのEEC発癌に重要な役割を果たすと考えられた。



(2) EEC発癌マウスモデル[7]

DOX経口投与により、子宮内膜腺上皮にArid1a-KOのみを誘導しても、表現型には変化がなかった。Pten-KOのみを誘導した場合、約10日でAEHを認めるようになり、2週間後にはEECを認める例も出てくるが、20週後でも全例は癌化していなかった。一方、Arid1aとPtenのダブル-KOを誘導したマウスでは、DOX内服後最短4日で癌化例を認め、10日で全例がEECとなっていた(図2)。また進行も早く、6週後には大部分が外層の筋層まで浸潤し、リンパ節転移を認める進行癌となっており、6週目から癌死する例も認められた。このマウスモデルからもArid1a機能欠失が、子宮内膜癌化を著明に促進し、悪性度も上昇させると考えられた。

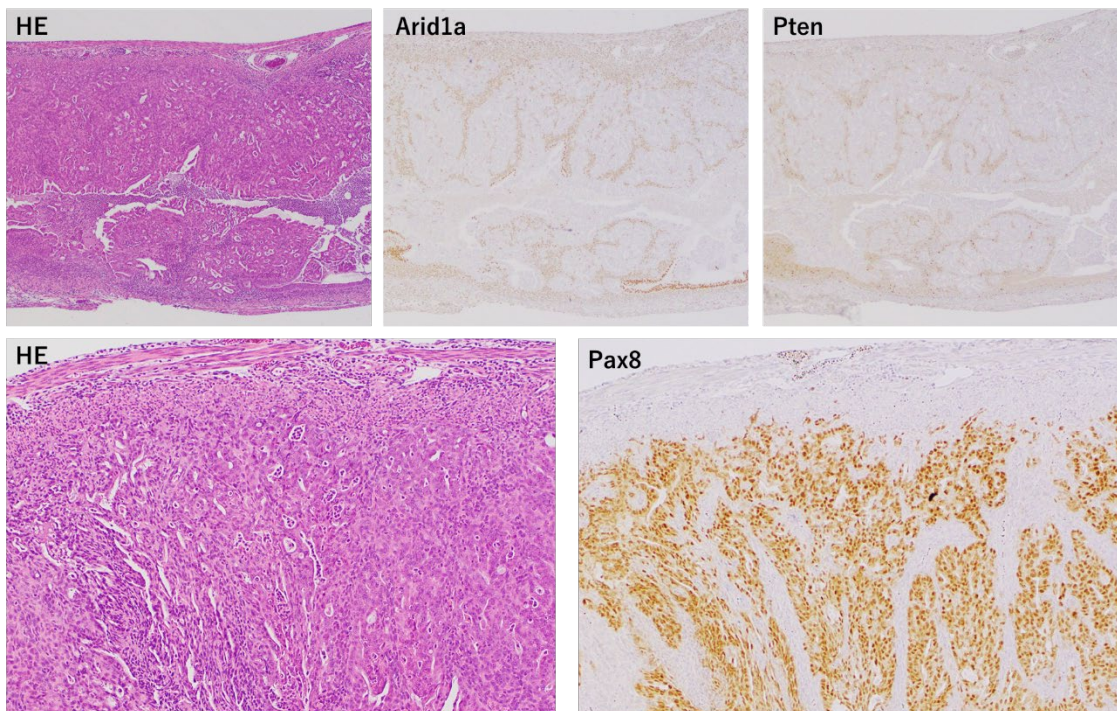


図3: DOX経口投与10日後の摘出子宮。上段: 40倍拡大。子宮内膜腺が著明に増生し、EECが形成されている(HE)。腫瘍部分はArid1a、Pten免疫染色で両タンパク発現が欠失しており、子宮内膜腺特異的にダブル-KOが誘導されていることがわかる。下段: 100倍拡大。腫瘍と筋層の境界は不明瞭である(HE)。EEC細胞(Pax8陽性)の小細胞集塊が筋層(Pax8陰性)に浸潤している。

(3) EEC発癌マウスモデルを用いた薬剤感受性の検討

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

ダブル-KO マウスでは 10 日目には確実に癌化していることから、このマウスを用いて、各種薬物療法の効果を検討した。シスプラチン、PARP 阻害薬 Niraparib、MPA、HDAC 阻害薬 Panobinostat と MPA の併用療法、抗腫瘍化合物 A、天然化合物 B のいずれも、明らかな有効性を確認できず、Control マウスと同様に筋層浸潤を伴う EEC が認められた。このことから、Arid1a 機能欠失により薬剤耐性も増強されていると考えられた。

(4) 子宮内膜症発癌マウスモデル

ダブル-KO マウスモデルの子宮を他の C57BL/6 マウス腹腔内に移植し、DOX 投与なしで 4 週後に開腹すると、全例で移植部位に嚢胞が形成されていた。摘出して病理標本を作製して HE 染色で確認したところ、一層の上皮で裏打ちされており、免疫染色ではミューラー管上皮マーカー Pax8 が陽性であったことから、移植した子宮内膜による子宮内膜症性嚢胞と判断した。次に、同様に移植して 4 週後に KO 誘導目的に DOX 経口投与を行い、さらに 4 週経過後に嚢胞病変を摘出したところ、一部の Pax8 陽性の上皮部分が重層化した乳頭状腫瘍を形成しており、癌化と考えられた。また同部では Pten、Arid1a 発現が欠失しており、ダブル-KO が誘導されていた。一方、一層の上皮部分では両タンパクの発現が認められた。

EEC における PTEN 変異率の高さから、ARID1A 機能欠失を伴う EEC の多くも PTEN 変異を伴っている可能性が高い。ARID1A 欠失は AEH から EEC への進行を促進し、悪性度上昇や治療抵抗性にも深く関与する可能性が考えられた。ARID1A により転写調節される因子は多岐にわたり、ARID1A 機能欠失に伴う癌に有効性の高い治療薬は見出されておらず、今後のさらなる研究が必要である。

子宮内膜症発癌マウスモデルはこれまでに報告がなく、今後、このマウスモデルが子宮内膜症発癌研究にも有用である可能性がある。

<参考文献>

1. Cancer Genome Atlas Research Network; Kandoth C, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013; 497: 67-73.
2. Oza AM, et al. Phase II study of temsirolimus in women with recurrent or metastatic endometrial cancer: a trial of the NCIC Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 3278-85.
3. Jones S, Wang TL, Shih IM, et al. Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science*. 2010; 330: 228-31.
4. Guan B, et al. Mutation and loss of expression of ARID1A in uterine low-grade endometrioid carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2011; 35: 625-32.
5. Allo G, et al. ARID1A loss correlates with mismatch repair deficiency and intact p53 expression in high-grade endometrial carcinomas. *Mod Pathol*. 2014; 27: 255-61.
6. Yen TT, Miyamoto T (equally contributed), et al. Loss of ARID1A expression in endometrial samplings is associated with the risk of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2018; 150: 426-431.
7. Suryo Rahmanto Y, Shen W, Shi X, Chen X, Yu Y, Yu ZC, Miyamoto T, et al. Inactivation of Arid1a in the endometrium is associated with endometrioid tumorigenesis through transcriptional reprogramming. *Nat Commun*. 2020; 11: 2717.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ting-Tai Yen, Tsutomu Miyamoto, Shiho Asaka, M. Herman Chuic, Yeh Wang, Shiou-Fu Lin, Rebecca L. Stone, Amanda N. Fader, Ryoichi Asaka, Hiroyasu Kashima, Tanri Shiozawa, Tian-Li Wang, Ie-Ming Shih, Edward J. Tanner III	4. 巻 150
2. 論文標題 Loss of ARID1A expression in endometrial samplings is associated with the risk of endometrial carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 426-431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygyno.2018.06.025.	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

1. 著者名 Suryo Rahmanto Yohan, Shen Wenjing, Shi Xu, Chen Xi, Yu Yu, Yu Zheng-Cheng, Miyamoto Tsutomu, Lee Meng-Horng, Singh Vivek, Asaka Ryoichi, Shimberg Geoffrey, Vitolo Michele I., Martin Stuart S., Wirtz Denis, Drapkin Ronny, Xuan Jianhua, Wang Tian-Li, Shih Ie-Ming	4. 巻 11
2. 論文標題 Inactivation of Arid1a in the endometrium is associated with endometrioid tumorigenesis through transcriptional reprogramming	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16416-0	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	塩沢 丹里 (SHIOZAWA Tanri) (20235493)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	
研究分担者	竹内 穂高 (TAKEUCHI Hodaka) (30816351)	信州大学・医学部附属病院・助教（診療） (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	宮本 強 (MIYAMOTO Tsutomu) (70418721)	信州大学・学術研究院医学系・准教授 (13601)	

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