

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10710

研究課題名(和文) 子宮内膜症癌化過程におけるサイトカインとミスマッチ修復異常の関与に関する研究

研究課題名(英文) Roles of cytokine and mismatch repair abnormality in the carcinogenetic process of ovarian endometriosis

研究代表者

岡 賢二(Oka, Kenji)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：40345749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：不死化卵巢表層上皮細胞OSE2aにおいて、TNF 100pg/ml添加72時間後のMLH1およびMSH2発現抑制が観察された。この作用はNF- κ B阻害薬で相殺されたことからNF- κ Bを介していると考えられた。子宮内膜癌細胞株Ishikawa、HEC1BではTNF 添加、鉄イオン添加によりMLH1およびMSH2発現抑制が観察され、卵巢子宮内膜症内でこれらがミスマッチ修復(MMR)機能低下にかかわることが示唆された。子宮内に発がん物質メチルニトロソ尿素(MNU)を注入することによるマウス内膜癌発生モデルでは、高エストロゲンはMMR蛋白の発現亢進を誘導し、癌化をむしろ抑制している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The stimulation by 100 pg/mL TNF for 72 hours suppressed the expression of MLH1 and MSH2 in the immortalized ovarian surface epithelial cells, OSE2a. Because this effect was canceled by the addition of NF- κ B inhibitor, it might be mediated by NF- κ B pathway. In the endometrial carcinoma cell lines, Ishikawa and HEC1B, the addition of TNF or ferric ion suppressed the expression of MLH1 and MSH2. This result suggests that these factors abundantly accumulated in ovarian endometriotic cyst might be involved in the mismatch repair (MMR) dysfunction. In the mouse endometrial carcinogenesis model by intrauterine injection of the carcinogen, N-methyl-N-nitrosourea, we found that high serum estrogen level induces the strong expression of MMR proteins and may rather inhibit carcinogenesis.

研究分野：産婦人科学、婦人科腫瘍学

キーワード：ミスマッチ修復 サイトカイン TNF 子宮内膜症 卵巢癌 子宮内膜癌

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、子宮内腔・筋層以外での子宮内膜組織の存在によって特徴づけられる婦人科疾患で、閉経前女性の10~15%が罹患していると考えられている。卵巣子宮内膜症(OEM)では、卵巣にチョコレートクリーム状の血性貯留液による嚢胞を形成するが、“癌化”する可能性があることが知られている。我々の卵巣癌543例の検討では、類内膜癌(EMC)および明細胞癌(CCC)はOEMを合併した症例において高頻度であり(Horiuchi, et al. Gynecol Oncol. 2003)、これらの癌がOEMから発生する過程が存在するものと考えられた。

子宮内膜症は形態学的、内分泌学的特徴から、発癌過程における子宮内膜癌との類似性が示唆されているが、子宮内膜癌発生過程ではミスマッチ修復(MMR)異常によるマイクロサテライト不安定性(MSI)を示す頻度が高い(Koshiyama, et al, Cancer J, 1998)。OEMに関連した卵巣癌では、子宮内膜癌同様にPTEN、PIK3CA、ARID1A等の遺伝子変異が報告されている。子宮内膜癌ではこれらの変異はMSIを伴う場合に高頻度であり、MMR機能異常と関連するとされ、OEMの癌化過程にもMMR機能異常が関与している可能性がある。

これまでの我々の検討では、OEM 27例、OEM合併卵巣癌25例、CCC 14例、EMC 12例に対し、代表的なMMR蛋白であるMLH1、MSH2の発現を免疫染色にて検討した結果、両タンパク発現は、OEMに比較して癌で有意に低下していた。さらに、MSI陽性率は、正常子宮内膜(NEM)0%、OEM 15%、OEM合併卵巣癌のOEM部分17%、癌部分25%、卵巣癌41%と、NEMよりOEM、さらに癌で高頻度であり、OEMでは既にMMR機能異常が存在しており、癌化に重要である可能性を報告した(Fuseya C, et al. Hum Pathol. 2012)。

OEMの発症に伴い、TNF、IL6、IL8等様々な炎症性サイトカインがOEM内で上昇する(Paola-Vigano, et al, Human Reprod, 2006)。近年、サイトカインと発癌との関連が報告されているが(Coussens, et al, Nature, 2002; Balkwill, et al, Lancet, 2001)、OEMの癌化への関与は明らかではない。我々は培養細胞を用いた予備実験で、炎症性サイトカインがMMR蛋白発現を低下させる結果を得ており、MMR機能異常を介してOEM癌化に関与している可能性がある。また近年、低酸素環境が種々の癌の悪性度を増強させることが報告されており、我々もこれまでに、低酸素環境が卵巣癌細胞に与える影響を検討し(Imai, Horiuchi, et al, Am J Pathol, 2003)、OEMから発生する頻度が高いCCCで低酸素関連因子であるhypoxia inducible factor 1(HIF-1)核発現が高頻度であったことを報告している(Osada, Horiuchi, et al, Human Pathol, 2007)。大腸癌細胞において、HIF-1がMMR蛋白発現を抑制することも報告されており(Koshiji, et al. Mol Cell.

2005) OEM癌化に低酸素環境によるMMR機能異常が関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

OEM癌化過程に重要と考えられるMMR機能異常が引き起こされる分子機構を、特に以下の観点から明らかにする。

- 1) OEM内で増加している炎症性サイトカインのMMR機能異常への関与について検討する。
- 2) 低酸素環境などの微小環境がMMR機能に与える影響について検討する。
- 3) 鉄イオンなど、OEM内で上昇している他の因子がMMR機能に与える影響について検討する。
- 4) 子宮内膜症治療薬がMMR機能に与える影響について検討する。
- 5) その他のMMR機能に影響する因子について検討する。

3. 研究の方法

1) TNFおよび鉄イオンのMMR蛋白発現への影響の検討

正常子宮内膜上皮細胞(NEG)は患者の同意をえて、月経開始から2週間以内の増殖期に、子宮筋腫や子宮頸部異形成などの子宮内膜病変を伴わない良性疾患で子宮全摘された子宮より子宮内膜を採取し、そこから腺上皮細胞を分離培養したものである。このNEGと不死化卵巣表層上皮細胞(OSE2a)および子宮内膜癌細胞株(Ishikawa)を組み換えTNF 50もしくは100pg/mLもしくはFeCl₃ 100μM添加下で24~72時間培養した後、蛋白およびRNAを抽出し、MLH1やMSH2といったMMR因子の発現を検討した。蛋白発現はWestern blotting法で、mRNA発現はreal-time RT-PCR法で検討した。

また、TNFはTNF受容体を介して、NF Bを活性化して作用を発現する。そこでNF B阻害剤併用添加下にTNFの作用が相殺されるか検討した。

さらに子宮内膜症治療薬であるDienogestがTNF存在下でのMMR発現への影響についても検討した。

2) 低酸素環境などの微小環境がMMR機能に与える影響の検討

NEG、OSE2a子宮内膜癌細胞株HEC1Bを、20%酸素のnormoxiaと2%酸素のhypoxiaの条件で72時間培養を行い、MLH1、MSH2蛋白発現をWestern blotting法で検討した。

3) 癌化過程におけるMMRの関与の検討

発癌過程での遺伝子変異蓄積状況を検討する目的で、同時に正常子宮内膜腺上皮(NE)前癌病変である子宮内膜異型増殖症(EH)子宮内膜類内膜腺癌Grade1(EC)部分を併せ持つ患者より、同意をえてこれらの部分の新鮮凍結組織切片より、laser microdissectionで各組織を採取し、それらより抽出したゲノムDNAを用いて、全エクソン配列(WES)に

よる変異解析を行った。解析に際して、NE 部分を対照として、EH および EC での体細胞変異を抽出した。

4) 発癌マウスモデルによる検討

Niwa らが報告した発癌マウスモデルを改変して用いた (Niwa K, et al. Cancer Lett, 2018)。即ち、発癌物質であるメチルニトロソ尿素 (MNU) を子宮内に注入し、同時に卵巣を摘出する。その後、エストラジオール (E2) 投与の有無でグループ化し 24 週後に子宮を摘出して癌化状況及び MLH1、MSH2 発現を検討した。また血液採取を行い血性 E2 値を ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

1) TNF は MMR タンパクの発現を抑制する。

NEG 細胞に 50 もしくは 100pg/mL の TNF を添加して 24 時間後および 72 時間培養後の MMR 蛋白発現を Western blotting で検討したところ、100 pg/mL 72 時間後の時点で MLH1、MSH2 とともに有意な発現の減弱が観察された (図 1)。またこの発現減弱は real-time RT-PCR でも観察され、TNF は転写レベルで MMR 蛋白の発現調節に関与していると考えられた (図 2)。また NF- κ B 阻害薬の添加は mRNA、蛋白の両レベルで TNF による MLH1、MSH2 発現の抑制作用を相殺したことから (図 2) TNF は NF- κ B を介してこれらの発現調節を行っていると考えられた。

また NEG を Dienogest 添加下に培養すると TNF による MLH1、MSH2 発現抑制作用は相殺され、120 時間の培養ではさらに、これら MMR 蛋白の発現増強が観察された。

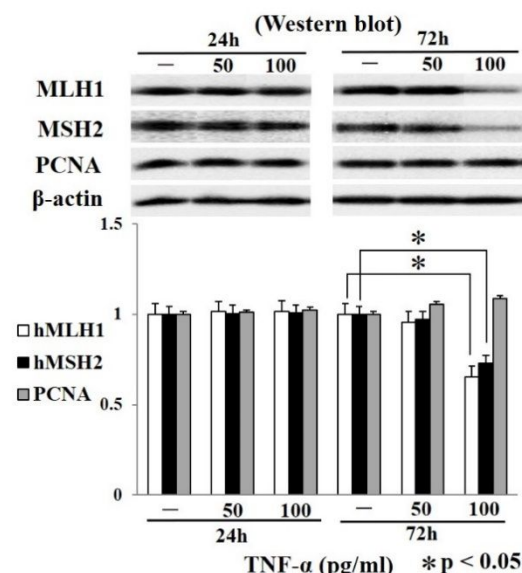


図 1 : NEG 細胞の Western blotting 結果。下段のグラフはバンドを densitometry で読み取り、数値化したものである。100pg/ml の TNF 添加 72 時間後に、MLH1、MSH2 タンパクの有意な減少が観察された。

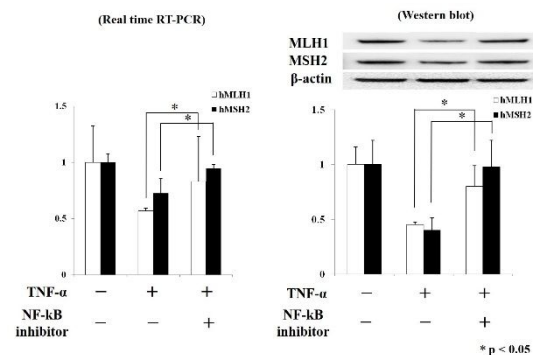


図 2 : NEG 細胞の real-time RT-PCR および Western blotting 結果。TNF による MLH1 および MSH2 発現抑制は mRNA、蛋白の両レベルで観察された。この発現抑制は NF- κ B 阻害薬の添加により、相殺された。

2) TNF、鉄イオンは MMR 蛋白発現を抑制する。

TNF による MMR 蛋白発現の抑制は OSE2a 細胞や Ishikawa 細胞でも観察された (図 3)。また OEM 内に多量に蓄積する鉄イオンの関与の可能性を検討するために、100 μ M FeCl₃ を添加して Ishikawa 細胞を培養したところ、MLH1、MSH2 とともに蛋白発現が抑制された (図 3)。これらの因子は MMR 機能を抑制する可能性が示された。

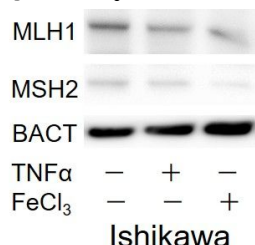


図 3 : Ishikawa 細胞での MLH1、MSH2 発現 (Western blotting) 両蛋白とも TNF、FeCl₃ 添加により発現減弱が観察された。

3) 低酸素環境は MMR 蛋白発現を抑制する。

OSE2a 細胞、HEC1B 細胞を 20%酸素の正常酸素と 2%酸素の低酸素の条件での正常酸素環境で 72 時間培養したところ、低酸素環境での MLH1 発現の減弱が観察された (図 4)。興味深いことに、MSH2 蛋白発現には明らかな変化を認めなかった。NEG 細胞では、2%酸素濃度 72 時間の培養条件では細胞が死滅するため、結果が得られなかった。これらのことから、低酸素環境は MLH1 発現の抑制から MMR 機能を抑制する可能性があることが示された。

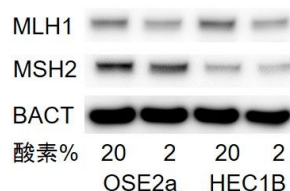


図 4 : OSE2a 細胞、HEC1B 細胞での各酸素濃度による MMR タンパク発現 (Western blotting) 両

細胞とも低酸素環境で MLH1 タンパク発現の減少が観察された。MSH2 には明らかな変化はなかった。

4) MMR および POLE 変異は癌化の初期段階での遺伝子不安定性に関与する。

前癌病変である EH および EC 部分の WES による変異解析では、EH に 2751 力所、EC に 3977 力所の変異を認め、そのうち 1512 力所と多くの変異が両者に共通していたことから (図 5) EH と EC は連続した病変として矛盾しない結果であった。MMR 遺伝子および遺伝子不安定性に関与する POLE 遺伝子の機能喪失変異を、EH と EC に共通した変異として認めた。また、本例は遺伝子頻度が EH の段階で既に非常に高く、PTEN、ARID1A の機能喪失変異、PIK3CA 活性化型変異などの変異が認められた。これらのことから、MMR 遺伝子や POLE 遺伝子変異による遺伝子不安定性が癌化過程の初期段階で重要であり、それによる PTEN や PIK3CA などの変異の蓄積により癌化に至ったと考えられた。

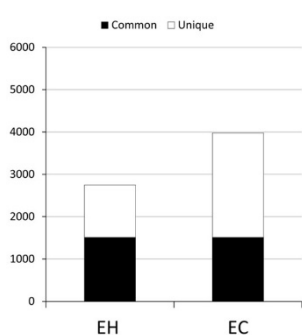


図 5: EH、EC の WES による変異解析結果。EH に 2751 力所、EC に 3977 力所、そのうち 1512 力所と多くの両者に共通の変異 (黒) であった。

5) 高エストロゲン環境は MMR 蛋白発現を亢進させる。

発癌マウスモデル 29 匹中、8 匹に EH、5 匹に EC が発生していたが、それらの平均血清 E2 値はそれぞれ 190pg/mL、6.7pg/mL であった。高 E2 の方がむしろ癌化に至っていないことが示された。また、MMR 蛋白発現は、血清 E2 値が高値ほど増強する傾向を認め、特に MLH1 では有意差も認められた (図 6)。このことから E2 は MMR 活性に影響がある可能性が示され、血清 E2 高値では MMR 活性が増強し、癌化に抑制的に作用する可能性が考えられた。

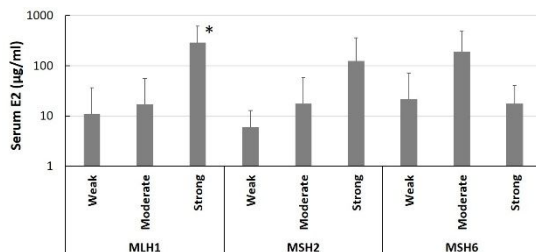


図 6: マウス血清 E2 値と MMR 蛋白発現。血清 E2 値が高いほど MMR 蛋白発現が増強している傾向が認められた。

本研究の成果をまとめる。

- ・ OEM 内で上昇している TNF や鉄イオンは MMR 蛋白発現を抑制し、これによる遺

伝子不安定性が OEM 癌化に促進的に作用する可能性が考えられた。またこの MMR 発現抑制は NF B を介していると考えられた。

- ・ 低酸素環境や血清 E2 値の低下は MMR 発現に抑制的に作用する可能性が示された。OEM 癌化が E2 値の低下してくる 50 歳代に多いことと関連する可能性が考えられた。

- ・ 子宮内膜症治療薬 Dienogest は、TNF による MMR 蛋白発現抑制作用を相殺し、さらに MMR 発現増強に作用することで、OEM 癌化に抑制的に作用する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 10 件)

- [1] 宮本 強, 塩沢 丹里 .【婦人科がん(第 2 版)-最新の研究動向-】子宮体がん 子宮体癌の発生 子宮体癌の発がん機構 . 日本臨床(査読なし) 2018 年 76 巻増刊 2 婦人科がん Page378-383
- [2] 宮本 強, 塩沢 丹里 .【婦人科がんの予防 update】女性ホルモン製剤とがんの発生リスク .産婦人科の実際(査読なし) 2017 年 66 巻 12 号 Page1685-1690
- [3] Mvunta DH, Miyamoto T, Asaka R, Yamada Y, Ando H, Higuchi S, Ida K, Kashima H, Shiozawa T. Overexpression of SIRT1 is Associated With Poor Outcomes in Patients With Ovarian Carcinoma. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 査読有 2017; Vol.25(6):415-421.
- [4] 鹿島 大靖, 宮本 強, 塩沢 丹里【黄体ホルモン up to date】内膜増殖症・子宮体癌と黄体ホルモン .産婦人科の実際(査読なし) 2017 年 66 巻 5 号 Page601-606
- [5] Mvunta DH, Miyamoto T, Asaka R, Yamada Y, Ando H, Higuchi S, Ida K, Kashima H, Shiozawa T. SIRT1 Regulates the Chemoresistance and Invasiveness of Ovarian Carcinoma Cells. Transl Oncol. 査読有 2017; Vol.10(4):621-631.
- [6] Ando H, Miyamoto T, Kashima H, Higuchi S, Ida K, Mvunta DH, Shiozawa T. Panobinostat Enhances Growth Suppressive Effects of Progestin on Endometrial Carcinoma by Increasing Progesterone Receptor and Mitogen-Inducible Gene-6. Horm Cancer. 査読有 2017; Vol.8(4): 257-267.
- [7] 岡 賢二, 樋口 正太郎, 岸田 大, 矢崎 正英, 中村 昭則, 内川 順子, 山田 靖, 小原 久典, 鹿島 大靖, 宮本 強, 塩沢 丹里 月経期の発熱を契機に診断された家族性地中海熱の 8 例 . 日本女性医学学会雑誌(査読有) 2017 年 25 巻 1 号 Page34-38
- [8] Ando H, Miyamoto T, Kashima H, Takatsu

A, Ishii K, Fujinaga Y, Shiozawa T. Usefulness of a management protocol for patients with cervical multicystic lesions: A retrospective analysis of 94 cases and the significance of GNAS mutation. J Obstet Gynaecol Res. 査読有 2016; Vol.42(11):1588-1598.

- [9] Yamada Y, Miyamoto T, Kashima H, Kobara H, Asaka R, Ando H, Higuchi S, Ida K, Shiozawa T. Lipocalin 2 attenuates iron-related oxidative stress and prolongs the survival of ovarian clear cell carcinoma cells by up-regulating the CD44 variant. Free Radic Res. 査読有 2016; Vol.50(4):414-25.
- [10] Asaka R, Miyamoto T, Yamada Y, Ando H, Mvunta DH, Kobara H, Shiozawa T. Sirtuin 1 promotes the growth and cisplatin resistance of endometrial carcinoma cells: a novel therapeutic target. Lab Invest. 査読有 2015; Vol.95(12):1363-73.

〔学会発表〕(計4件)

- [1] Koichi Ida, Tsutomu Miyamoto, Hirofumi Ando, Ryoichi Asaka, Yasushi Yamada, Hodaka Takeuchi, Tanri Shiozawa. Mutation analysis by whole exome sequencing of endometrial hyperplasia and carcinoma from one patient. The 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology 2017年
- [2] Koichi Ida, Tsutomu Miyamoto, Shotaro Higuchi, Hirofumi Ando, Ryoichi Asaka, Yasushi Yamada, Hiroyasu Kashima, Hisanori Kobara, David Hamsi Mvunta, Tanri Shiozawa: Mutation analysis by whole exome sequencing of endometrial hyperplasia and carcinoma in one patient. 日本癌学会 2017年
- [3] 安藤大史、宮本強、高津亜希子、山田靖、David Mvunta Hamisi、樋口正太郎、井田耕一、鹿島大靖、塩沢丹里。子宮頸部多嚢胞性病変に対する当科の対応と転帰 94例の後方視的検討とGNAS遺伝子変異の意義 中日本産婦人科セミナー 2016年
- [4] 宮本強：子宮頸部嚢胞の取扱い。第130回関東連合産科婦人科学会学術集会 2015年

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡 賢二 (OKA KENJI)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：40345749

(2)研究分担者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA TANRI)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20235493

山田 靖 (YAMADA YASUSHI)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：60646652

宮本 強 (MIYAMOTO TSUTOMU)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：70418721