

令和元年6月21日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20183

研究課題名(和文) 子宮内膜癌におけるMig-6の機能とMPA、HDAC阻害剤併用効果の検討

研究課題名(英文) The function of MIG6 and the effect of combination treatment of MPA and HDAC inhibitor in endometrial cancer

研究代表者

安藤 大史(Ando, Hirofumi)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：80722925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：プロゲステロン受容体(PR)陽性(Ishikawa)・PR陰性(HEC1B、AN3CA)子宮内膜癌細胞株においてHDAC阻害剤LBH589はPR mRNA・タンパク発現、PR下流因子MIG6 mRNA発現を増強させ、酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)併用でMIG6発現は相乗的に増加した。LBH589・MPA併用は相乗的に細胞増殖を抑制し、HEC1Bのヌードマウス異種移植腫瘍の増大を相乗的に抑制した。この腫瘍では、LBH589投与によりPRとMIG6発現の陽性化、Ki67陽性細胞の減少が観察された。以上から、LBH589併用はMPA療法の効果を相乗的に高めることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、日本では子宮内膜癌患者が急激に増加し、40歳未満の若年成人患者も増加傾向であり、酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)による妊孕性温存療法の重要性が増している。MPA療法の適応は筋層浸潤のないIIA期で、黄体ホルモン受容体(PR)陽性率の高い類内膜癌Grade1に限定されており、病変完全消失率も55%と十分な効果とは言えず、黄体ホルモン療法の効果を高める治療法の開発が望まれる。本研究結果はHDAC阻害剤がMPA療法の効果を高め、同剤の併用により妊孕性温存療法の適応拡大につながる可能性を示したものであり、意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Panobinostat (LBH 589), an HDAC inhibitor, enhances the expression of progesterone receptor (PR) mRNA ( $P < 0.05$ ) and protein in the PR-positive (Ishikawa) and PR-negative (HEC1B, AN3CA) endometrial cancer cell lines. Combination treatment of LBH589 and medroxyprogesterone acetate (MPA) synergistically enhances the expression of MIG6 mRNA, a downstream factor of PR, and synergistically suppresses cell proliferation/viability of those cell lines. In addition, the combination therapy of LBH589 and MPA synergistically suppresses the growth of the HEC1B-xenograft tumor in nude mice. In these tumors, positive staining of PR and MIG6 and reduction of Ki67-positive cells are observed by LBH589 administration. These results suggest that the combined administration of LBH589 may enhance the effect of MPA therapy and may lead to the extension of indications for fertility preservation therapy.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜癌 黄体ホルモン療法 ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 妊孕性温存療法 MIG6 黄体ホルモン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

日本において子宮内膜癌 (EC) は増加傾向にあり、2010 年の統計では年間 10000 例以上の新規患者が発生し、39 歳未満の若年 EC 罹患数も 1200 人以上に達している (国立がん研究センターがん対策情報センター)。EC 治療の基本方針は子宮全摘術であるが、妊孕性温存を希望する場合には、病変が子宮内膜に局限した高分化型類内膜癌である場合に限り、酢酸メドロキシプロゲステロン (MPA) を用いた黄体ホルモン療法が施行される。しかしながら、MPA 療法では病変完全消失率 55%、再発率 47% と報告されており (Ushijima et al. J Clin Oncol, 2007)、満足できる効果ではない。また MPA 療法の適応拡大も望まれるが、黄体ホルモン受容体 (PR) 発現率が低い低分化型や非類内膜癌では効果が期待できない。

このようなことから黄体ホルモン療法の効果を増強する治療法開発が期待されるが、そのためには黄体ホルモンの EC に対する抗腫瘍効果の作用機序の解明が必要である。我々はこれまでに、黄体ホルモンが PR を介して、ユビキチンリガーゼである Skp2 の発現を抑制し、p27 の分解抑制・蓄積から細胞増殖を抑制すること (Miyamoto et al. Gynecol Endocrinol. 2010)、エストロゲン受容体 (ER) の負の共役因子 NCoR の発現を増強させ、エストロゲンによる増殖を抑制すること (Kashima et al. Anticancer Res. 2009) などを報告してきた。

さらに、PR の下流分子として働き、上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR) に対する陰性制御因子であり、癌抑制遺伝子として知られている MIG6 (mitogen-inducible gene-6) に注目した。閉経前正常子宮内膜 19 例での MIG6 発現を免疫染色で評価したところ、内因性に黄体ホルモンが分泌される分泌期では、増殖期より発現が増強していた (陽性率: 増殖期  $6.4 \pm 11.1\%$  vs. 分泌期  $54.3 \pm 23.9\%$ ,  $p < 0.05$ )。また、正常子宮内膜腺上皮細胞の初代培養細胞に対して MPA 100nM を添加すると、MIG6 mRNA の発現が上昇した (fold change  $\pm$  SD,  $2.9 \pm 0.73$ ,  $p < 0.001$ )。次に、MPA 療法を受けた EC の前癌病変である子宮内膜異型増殖症 (AH) および EC の 18 例における MIG6 発現を免疫染色スコア (IRS: 0 ~ 12) で評価したところ、MPA 施行中では施行前に比べ増強した (mean IRS:  $4.1$  vs  $1.8$ ,  $p = 0.001$ )。さらに、子宮内膜癌細胞株 Ishikawa、HEC1B、AN3CA に対して MIG6 を強制発現させると細胞増殖が抑制され、siRNA で MIG6 発現を抑制すると細胞増殖が上昇した。また、Ishikawa に対する MPA の増殖抑制効果が、MIG6 の発現抑制により一部キャンセルされた。これらのことから、MIG6 は PR シグナル伝達経路を仲介し、子宮内膜癌細胞株の細胞増殖を抑制していると考えられた。

一般的に PR 発現が低下すると MPA の有効性は低下するが、PR 発現低下には DNA メチル化やヒストン脱アセチル化といった epigenetic な機構が中心的に作用しているとされる (Xiong et al. Gynecol Oncol. 2005)。また最近、肺癌細胞において MIG6 発現がヒストン脱アセチル化で抑制されており、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤により発現が増強することが報告された (Zhang et al. PLoS One. 2012)。このようなことから PR 発現および下流因子である MIG6 発現はヒストン脱アセチル化で epigenetic に抑制されることで MPA の有効性を低下させる一因となっている可能性があり、その関与の解明は、新たな MPA 療法の感受性増強治療法の開発につながる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では子宮内膜腺上皮での PR 経路における MIG6 の作用を明らかにし、HDAC 阻害剤の PR 発現、MIG6 発現と MPA の EC 抑制効果への影響について検討することを目的とする。さらに、MPA と HDAC 阻害剤の併用による新たな治療法開発のための基礎的検討をする。

## 3. 研究の方法

(1) **子宮内膜癌細胞の PR および MIG6 の発現に対する HDAC 阻害剤の効果の検討**: PR 陽性子宮内膜癌細胞株 Ishikawa、および PR 陰性子宮内膜癌細胞株 HEC1B、AN3CA に、HDAC 阻害剤 Trichostatin A (TSA)、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)、Panobinostat (LBH589) を 10 nM、100 nM、1  $\mu$ M で添加し、PR 発現を RT-PCR、Western blotting (WB) で確認した。また、これらの細胞に PR siRNA を導入し、MPA 100nM および LBH589 10nM 添加下に MIG6 発現を RT-PCR で確認した。

(2) **MPA と HDAC 阻害剤の併用効果の検討**: Ishikawa、HEC1B、AN3CA に HDAC 阻害剤 (TSA 500nM、SAHA 1 $\mu$ M、LBH589 10nM) および MPA 100nM を添加し、細胞増殖・生存を WST-1 assay で検討した。また、同様の条件で培養した細胞を Propidium Iodide (PI) による flow cytometry を用いて Sub-G1 分画の apoptosis 細胞の割合を検討した。また HEC1B については AnnexinV/PI 2 重染色でも apoptosis を検討した。さらに MIG6-siRNA による MIG6 発現抑制により、MPA と LBH589 併用効果への影響を WST-1 assay と flow cytometry で検討した。

(3) **マウス異種移植モデル (HEC1B) における LBH589 と MPA の併用効果の検討**: 6 週齢のヌードマウス (BALB/c nu-nu) の腰背部皮下に HEC1B  $10^6$  cell/body を異種移植し、その 1 週間後より MPA 100mg/kg 経口投与および LBH589 10mg/kg 腹腔内投与を 5 回/週で 4 週間行い、形成された異種移植腫瘍の体積を検討した。また、有害事象の変化を形成された腫瘍を摘出し、PR、MIG6、Ki-67 発現を免疫染色で検討した。

#### 4. 研究成果

(1) **HDAC 阻害剤の PR 発現に対する効果**: HDAC 阻害剤は子宮内膜癌細胞株 Ishikawa、HEC1B、AN3CA の viability を濃度依存性に抑制し(図 1a-c)、PR mRNA 発現を有意に増強したが、その効果は LBH589 で最も強かった(図 1d-f、\*: NT, DMSO との間に有意差あり。P < 0.05)。LBH589 による PR タンパク発現増強も WB で確認された。このことから HDAC 阻害剤は PR 発現陰性株であっても子宮内膜癌細胞の PR 発現を増強させることが示された。

(2) **HDAC 阻害剤の MIG6 発現に対する効果**: 3 種の子宮内膜癌細胞株において、MIG6 mRNA 発現は MPA 添加のみでは有意な増強を認めなかったが、LBH589 添加で有意に増強を認めた。さらに Ishikawa と HEC1B では MPA と HDAC 阻害剤の併用により MIG6 発現は相乗的に増強した(図 1g-i、\*: NT との間に有意差あり、P < 0.05)。この併用の相乗効果は PR siRNA で PR 発現を抑制することでキャンセルされたことから、PR を介していると考えられる。これらのことから、HDAC 阻害剤、特に LBH589 は MIG6 発現を増強させるが、その作用は特に MPA との併用で、より強く認められることが示された。

(3) **MPA と LBH589 併用の効果**: MPA は Ishikawa、HEC1B、AN3CA 細胞の増殖を殆ど抑制しないが、LBH589 との併用により相乗的に有意な増殖抑制作用を示した(図 1j-l)。Flow cytometry を用いた sub-G1 分画の解析では、特に Ishikawa と HEC1B において apoptosis 細胞の sub-G1 分画が、MPA と LBH589 併用療法で有意に増加しており(図 2)、AnnexinV/PI 2 重染色でも同様の結果であった。この LBH589 による sub-G1 分画増加は MIG6 siRNA 導入によりキャンセルされることから、MIG6 を介していると考えられる。

(4) **in vivo での MPA と LBH589 併用療法の効果**: PR 陰性子宮内膜癌細胞株 HEC1B の異種移植片に対する治療効果の検討では、MPA と LBH589 併用療法は MPA 単剤および LBH589 単剤より大きな腫瘍増殖抑制効果を示し、in vivo でも両剤の相乗効果を認めた。また摘出腫瘍の免疫染色結果では、control 群では PR 発現陰性で MIG6 発現もほとんど認めないが、LBH589 治療群では PR 発現を認めるようになり、MIG6 発現の増強、Ki67 陽性細胞の減少が観察された(図 3)。

以上の結果から、HDAC 阻害剤 LBH589 は、子宮内膜癌細胞に対し、それ自体による細胞障害性作用のみでなく、PR

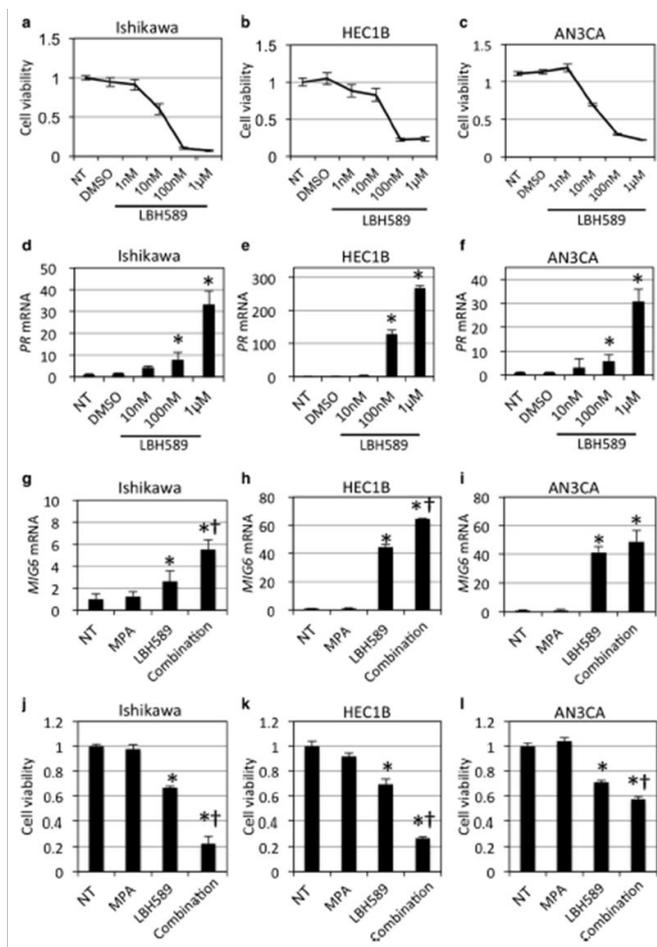
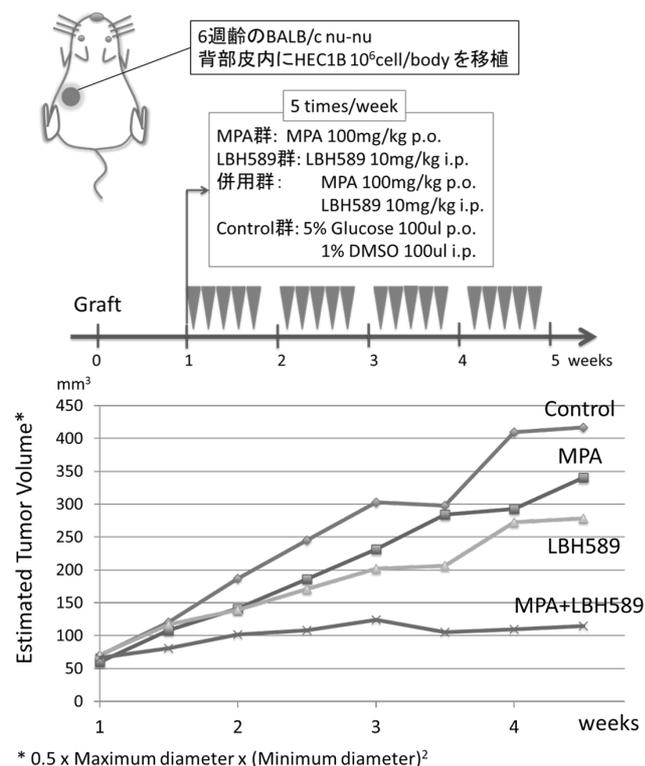


図1: HDAC阻害剤LBH589添加による効果。a-c: Cell viability (WST-1 assay)、d-f: PR mRNA発現 (real-time RT-PCR)、g-i: MIG6 mRNA発現 (real-time RT-PCR)、j-l: MPAとの併用による増殖抑制効果 (WST-1 assay) (引用文献①より引用)



\* 0.5 x Maximum diameter x (Minimum diameter)<sup>2</sup>

図2: PR陰性子宮内膜癌細胞株HEC1Bのマウス異種移植腫瘍に対するMPAとHDAC阻害剤LBH589の併用療法の効果

発現の増強や MIG6 発現の増強から MPA 療法に対する感受性を高めると考えられる。LBH589 により PR 陰性子宮内膜癌細胞株 HEC1B の PR 発現回復も認めており、LBH589 併用により、PR 陰性の子宮内膜癌に対してもホルモン療法の適応を拡大できる可能性があり、今後さらなる研究が必要であると考えられる。

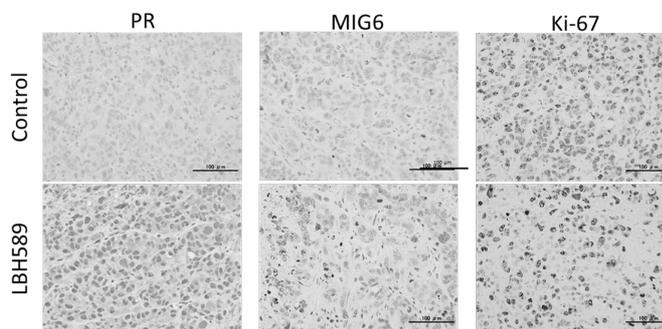


図3：HEC1B異種移植腫瘍の免疫染色結果。下段はLBH589治療群であり、上段のcontrolに比較して、PR発現を認めるようになっており、MIG6発現増強、Ki67陽性細胞の減少を認める。

#### <引用文献>

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*. 2017 Aug;8(4):257-267.

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計5件)

Miyamoto T, **Ando H**, Asaka R, Yamada Y, Shiozawa T. Mutation analysis by whole exome sequencing of endometrial hyperplasia and carcinoma in one patient: Abnormalities of polymerase epsilon and the phosphatidylinositol-3 kinase pathway. *J Obstet Gynaecol Res*. 査読有 Vol.44, 2018, pp179-183. doi: 10.1111/jog.13459.

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 Vol.10, 2017, pp621-631. doi: 10.1016/j.tranon.2017.05.005.

**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 Vol.8, 2017, pp257-267. doi: 10.1007/s12672-017-0295-4.

Miyamoto T, Kashima H, Yamada Y, Kobara H, Asaka R, **Ando H**, Higuchi S, Ida K, Mvunta DH, Shiozawa T. Lipocalin 2 Enhances Migration and Resistance against Cisplatin in Endometrial Carcinoma Cells. *PLOS ONE* 査読有 2016; 11(5):e0155220. doi:10.1371/journal.pone.0155220

**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 Gynecol Res*. 査読有, Vol.42, 2016, pp 1588-1598. doi:10.1111/jog.13083

##### [学会発表](計6件)

井田 耕一, 宮本 強, **安藤 大史**, 高津 亜希子, 竹内 穂高, 樋口 正太郎, 山田 諭, 鹿島 大靖, 塩沢 丹里. 子宮頸部腺癌における カテニン細胞膜発現の免疫組織化学的検討. 第70回日本産科婦人科学会学術講演会 一般演題 2018年

浅香 亮一, 井田 耕一, 樋口 正太郎, **安藤 大史**, 鹿島 大靖, 宮本 強, 塩沢 丹里. マウスモデルにおいて高濃度の血中エストロゲンは子宮内膜癌の発生を抑制する. 第69回日本産科婦人科学会学術講演会 一般演題 2017年

**安藤 大史**, 宮本強, 鹿島大靖, 井田耕一, 樋口正太郎, David Hamisi Mvunta, 山田靖, 塩沢丹里. タヒボ茶はマウス異種移植モデルにおいてヒト子宮内膜癌の増大を抑制する. 第75回日本癌学会学術総会 ポスター発表 2016年

**安藤 大史**, 宮本 強, 鹿島 大靖, 小原 久典, 山田 靖, David Mvunta, 樋口 正太郎, 井田 耕一, 林 琢磨, 塩沢 丹里. タヒボ茶はマウスモデルにおける子宮内膜癌異種移植片に対して抗腫瘍効果を示す 第68回日本産科婦人科学会学術講演会 一般演題 2016年

山田 靖, 宮本 強, **安藤 大史**, 樋口 正太郎, 井田 耕一, David Mvunta, 鹿島 大靖, 塩沢 丹里. Nuclear protein 1はlipocalin2の下流で作用する新規候補因子である. 第68回日本産科婦人科学会学術講演会 一般演題 2016年

樋口 正太郎, 宮本 強, **安藤 大史**, 浅香 亮一, 山田 靖, 鹿島 大靖, 小原 久典, 井田 耕一, David Mvunta, 塩沢 丹里. レーザーマイクロダイセクションによって採取した単一患者の正常子宮内膜・異型増殖症, 類内膜腺癌部分の全エクソシーケンス 第68回日本産科婦人科学会学術講演会 ミニワークショップ3 2016年

##### [図書](計0件)

##### [産業財産権]

出願状況（計 0 件）  
取得状況（計 0 件）  
〔その他〕  
ホームページ等：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。