

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 井平 圭

学位論文題名

子宮体癌の上皮間葉転換に関わる miR-124/IQGAP1 シグナル経路に関する研究
(Study on the miR-124/IQGAP1 signaling axis during EMT in endometrial cancer)

【背景と目的】子宮体癌は我が国を含めた工業先進国で増加傾向にある。臨床経過、疫学、組織学的な観察をもとにして、1983年に Bokhman らによりタイプⅠとタイプⅡに分類され現在まで使用されている。すべての進行期、組織型を含む子宮体癌全体の5年生存率は約80%であり、他の婦人科癌と比較して良好と言えるが、早期にリンパ節転移や播種をきたし予後不良となる高悪性度子宮体癌が存在する。申請者の所属教室では北海道大学病院婦人科と北海道がんセンターの協力で、子宮体癌における予後規定因子を後方視的コホート研究で解析し、その結果を Lancet (2010) に報告した。この中で、タイプⅡは骨盤+傍大動脈リンパ節郭清に化学療法を加えても予後不良であることが示されており、タイプⅡの高悪性度子宮体癌に対する新たな治療戦略の開発が求められる。癌の転移や浸潤に関わる重要な現象に上皮間葉転換 (EMT; epithelial-to-mesenchymal transition) がある。EMT が生じると細胞間の接着が解かれ、細胞は遊走能を獲得すると考えられているが、この EMT が癌細胞の転移、浸潤に深く関わっていることが明らかにされ多くの研究がされている。近年、EMT を制御する機構において microRNA (miRNA) が重要な役割を担うことも明らかにされている。miRNA はわずか20塩基程度の一本鎖 RNA であるが、細胞の発生、分化、増殖、apoptosis まであらゆる生命現象に深く関わることを示されている。IQGAP1 (IQ-domain GTPase-activating protein 1) は、細胞接着に関わる重要なタンパクで、E-cadherin による細胞間接着を負に制御している。IQGAP1 の過剰発現は EMT を誘導し、細胞の遊走能や浸潤能が向上すると考えられており、大腸癌、卵巣癌、膵臓癌、非小細胞肺癌など多数の固形癌において IQGAP1 の発現亢進を認め、いずれも予後不良と関連することが報告されているが、子宮体癌に関する報告はまだない。子宮体癌の転移・浸潤に EMT が関与し、E-cadherin の喪失が予後不良因子であることから、他癌腫で EMT を誘導することが示されている。IQGAP1 の子宮体癌における役割に焦点を置き、その分子機構を明らかにすることで高悪性度子宮体癌の予後改善に貢献できると考え研究した。

【材料と方法】ヒト子宮体癌細胞株（高分化類内膜腺癌：HEC-1，低分化類内膜腺癌：HEC-50，HEC-50 から分離された特に高悪性度を示す細胞集団：HI），対照としてヒト子宮内膜不死化細胞：EM を用いて以下に示す検討を行った。

1. ヒト子宮体癌細胞株 (HEC-1, HEC-50, HI) における内因性の IQGAP1 の発現レベルを qRT-PCR と Western-Blot により比較した。2. HEC-1, HI に IQGAP1-vector あるいは IQGAP1-siRNA を導入し、EMT との関連 (E-cadherin, N-cadherin などの発現) を Western-Blot により検討し、悪性形質 (細胞の遊走能, 浸潤能, 増殖能) に及ぼす影響を、それぞれ migration assay, invasion assay, proliferation assay により in vitro で検討した。3. マイクロアレイ分析により、HEC-50 に比較して HI で発現が低下している miRNA を検索し、miR-124 を研究標的 miRNA とした。4. HEC-1, HI に miR-124 mimic あるいは anti-miR-124 inhibitor を導入し、EMT との関連 (E-cadherin,

N-cadherin などの発現) を Western-Blot と qRT-PCR により検討し、悪性形質 (細胞の遊走能, 浸潤能, 増殖能) に及ぼす影響を, それぞれ migration assay, invasion assay, proliferation assay により in vitro で検討した. 5. HI における IQGAP1 mRNA レポーター活性を, Dual-luciferase reporter assay system により検討した.

【結果】 1. 高悪性度子宮体癌細胞株において IQGAP1 の発現は亢進していた. 2. 高悪性度子宮体癌細胞株において IQGAP1 の過剰発現は EMT を誘導し, 細胞遊走能, 浸潤能, 増殖能を亢進した. 3. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-124 の発現が低下していた. 4. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-124 の過剰発現は遊走能, 浸潤能, 増殖能を抑制した. 5. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-124 は IQGAP1 mRNA 3'-UTR を直接標的とし, IQGAP1 の発現を抑制した.

【考察】 本研究により, 多くの癌腫で発現が亢進し予後不良因子と報告されていた IQGAP1 が, 子宮体癌細胞株においても発現が亢進しており, EMT の誘導や細胞の悪性形質の獲得に関与していることを明らかにした. また IQGAP1 の発現を抑制的に制御する miRNA として miR-124 を同定し, miR-124 が tumor suppressor としての機能を有することを初めて報告した.

IQGAP1 は CDC42, Rac1, β -catenin, B-Raf, ERK (extracellular signal-regulated kinase) そして E-cadherin といった種々のキナーゼやシグナル分子と相互採用して, 細胞内シグナル伝達の足場蛋白として多彩な分子機能を有する. また, 大腸癌, 卵巣癌, 膵臓癌, 非小細胞肺癌など子宮体癌以外の多くの固形癌で過剰発現しており, いずれも予後不良と相関すると報告されている. IQGAP1 の oncogenic な機能は, IQGAP1 が主に E-cadherin による細胞間接着に作用することで EMT を誘導し, 腫瘍細胞の遊走, 浸潤, 増殖などをもたらすことによることが明らかにされている. 本研究で, 子宮体癌においても IQGAP1 の発現が亢進していることが示され, gain-of-function 及び loss-of-function experiments により, IQGAP1 が E-cadherin の発現を抑制することで EMT を誘導し, 浸潤, 遊走などの悪性形質を強化していることを示すことができた. この結果は, すでに報告されている E-cadherin の機能低下が子宮体癌の予後不良因子であるという事実を補強するものであり, 子宮体癌における IQGAP1 の oncogenic な役割についての基礎的 evidence を初めて提供したものである.

われわれは, 高悪性度子宮体癌細胞株において IQGAP1 の発現を抑制する miRNA として miR-124 を同定した. miR-124 が IQGAP1 mRNA 3'-UTR を直接標的にしてその発現を抑制することで, EMT を制御し, 子宮体癌細胞の遊走能, 浸潤能, 増殖能などの悪性形質を抑制することを初めて示した. 今後 in vivo での検討や臨床検体での検討が進めば, IQGAP1 の過剰発現や miR-124 の発現低下が子宮体癌の予後予測因子となる可能性がある. さらに 5-AZA を用いた実験により, miR-124 の発現の一部は DNA メチル化により抑制されていることが明らかになった. DNA 脱メチル化薬により miR-124 の発現を回復させることは, 高悪性度子宮体癌の有効な治療法になる可能性がある.

本研究は in vitro のみの検討であり, miR-124-IQGAP1 の経路が実際に抗腫瘍効果を示すか in vivo で検討する必要がある.

【結論】 高悪性度子宮体癌細胞において IQGAP1 の発現が亢進しており, IQGAP1 の過剰発現が EMT を促進し, 遊走能, 浸潤能, 増殖能といった悪性形質を高めることを初めて示した. さらに IQGAP1 を直接の標的として発現を抑制する tumor suppressor として miR-124 を同定した. 今後は IQGAP1 の子宮体癌予後因子としての意義を, 他の確立された予後因子と比較するとともに, IQGAP1 が予後予測バイオマーカーあるいは新規治療の標的となる可能性について引き続き研究を進めることが必要である.