

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 加藤 宏章

論 文 名 LIM1 は子宮内膜癌の悪性化に寄与する

---

### 学位論文要旨

#### <緒言>

子宮体がん発生率は世界的に増加し、国内では全年齢でその発症率が上昇している。特に、若年から発症しやすい子宮内膜がんでは、特異的な診断マーカーがなく、再発進行がんや転移性がんになると治療薬の選択肢は少なく予後不良である。このため、子宮体がんに対する新規の分子マーカーや治療標的の同定が望まれている。我々は、データベースに登録された初期子宮体がんと進行期子宮体がんの遺伝子発現プロファイルを比較し、進行期子宮体がん有意に発現上昇している転写因子 LIM homeobox 1 (LIM1)を同定した。本研究では、子宮内膜がんにおける LIM1 の機能を細胞株や Xenograft モデルを用いて解析し、LIM1 が進行期子宮体がんの治療標的分子となりうるのか検証することを目的とした。

#### <方法>

TCGA (The Cancer Genome Atlas)に登録された子宮内膜がん組織 (I期:255例, II期-IV期:110例)の RNA-seq による遺伝子発現プロファイルを用いて、Gene Ontology (GO)解析と Kaplan-Meier (KM)解析を行った。子宮内膜がん細胞株の Ishikawa 細胞 (Grade 1) と HEC50B 細胞 (Grade 3) を用いて、RT-qPCR による LIM1 発現および細胞増殖能の比較を行った。HEC50B 細胞を用いて LIM1 ノックダウン安定株 (LIM-KD 細胞) を作成し、細胞増殖能、遊走能、浸潤能を対照株 (Control 細胞) と比較した。ヌードマウスに LIM-KD 細胞と Control 細胞を移植した異種移植腫瘍 (Xenograft) を作成し、腫瘍増生を比較した。RNA-seq で LIM-KD 細胞と Control 細胞の遺伝子発現差を比較し、発現変動した遺伝子を Ingenuity Pathway Analysis (IPA) で解析した。リン酸化 CREB の発現を LIM-KD 細胞と Control 細胞は Western Blot で、移植腫瘍組織は免疫染色で解析し

氏名 加藤 宏章

た。尚、動物実験は愛媛大学動物実験委員会にて承認されている。(承認番号:37A12-16)

<結果>

TCGA に登録された RNA-seq データの再解析と GO 解析の結果、子宮体がんの早期 (I 期) に対して進行期 (II 期-IV 期) で 2 倍以上発現上昇した遺伝子は、転写因子として働く Homeobox 遺伝子群に濃縮していた。また、進行期がんで有意に発現上昇している Homeobox 遺伝子群のうち、KM 解析により高発現が予後不良と相関する ARX1、POU2F3、TLX2、LIM1 の 4 遺伝子を同定した。RT-qPCR により 4 遺伝子の発現を Grade の異なる Ishikawa 細胞と HEC50B 細胞で比較したところ、LIM1 が HEC50B 細胞で有意に発現上昇していた。また、細胞増殖能は Ishikawa 細胞と比較して HEC50B 細胞で有意に高かった。そこで、HEC50B 細胞を用いて LIM-KD 細胞を作成し、細胞増殖能、遊走能、浸潤能を Control 細胞と比較したところ、LIM1-KD 細胞では腫瘍の増殖と浸潤能が有意に低下した。In vivo での Xenograft モデル解析では、LIM1-KD を移植したマウスで有意に腫瘍重量が減少した。LIM1 による遺伝子発現制御機構を明らかにするため、RNA-seq を行ったところ、Control 細胞と比べ LIM-KD 細胞で発現減少した遺伝子は 451 個あり、CREB のリン酸化に関連する一連の遺伝子の発現が低下していることが IPA 解析で示された。そこで、CREB のリン酸化を解析したところ、LIM-KD 細胞および LIM-KD 細胞由来腫瘍ともに CREB のリン酸化が有意な低下を示した。

<考察>

本研究では、子宮内膜がんにおける転写因子 LIM1 による遺伝子発現調節が、細胞増殖等の様々な生体反応に働く CREB のリン酸化を通じて腫瘍の悪性化に寄与していることを示した。CREB シグナル関連を含む子宮体がん増悪因子の遺伝子発現を直接制御する LIM1 の役割は明らかでなく、ChIP-seq などの包括的な解析が必要である。補足資料に示すように、Ishikawa 細胞の LIM1 過剰発現を用いた in vitro 解析では細胞増殖能や遊走能に影響を与えなかった。仮説として、LIM1 がコファクターと複合体を形成し転写活性をもつ可能性が考えられる。また IPA 解析で、LIM-KD 細胞においてスタスミン発現関連遺伝子の低下が示された。スタスミンは子宮体がんに適応される抗がん剤のパクリタキセルによる微小管安定化作用に拮抗することが示されている。以上のことから、子宮体がんに対する LIM1 抑制をターゲットとした治療は、CREB を介した腫瘍増生を抑制することや既存の化学療法への感受性を向上させることが期待され今後、さらなる研究が必要である。

キーワード (3~5)	子宮体癌 LIM1 (LIM homeobox 1) RNA-seq Ingenuity Pathway Analysis
-------------	--