HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Elucidating the role of microRNA-101 as a new therapeutic target for aggressive endometrial cancer
Author(s)	金野, 陽輔
Description	配架番号：2123
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11599号
Issue Date	2014-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11599
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57778
Type	doctoral thesis
File Information	Yosuke_Konno.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

Elucidating the role of microRNA-101 as a new therapeutic target for aggressive endometrial cancer

（高悪性度子宮体癌における新たな治療標的候補としての microRNA-101 の機能に関する研究）

2014 年 12 月

北海道大学

金野　陽輔

目　　　　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・　　１頁
緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　２頁
略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５頁
実験方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　６頁
実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１４頁
考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４０頁
総括および結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４４頁
謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４５頁
引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４６頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

１． Yosuke Konno, Peixin Dong, Ying Xiong, Fumihiko Suzuki, Jiabin Lu, Muyan Cai, Hidemichi Watari, Takashi Mitamura, Masayoshi Hosaka, Sharon JB Hanley, Masataka Kudo and Noriaki Sakuragi

MicroRNA-101 targets EZH2, MCL-1 and FOS to suppress proliferation, invasion and stem cell-like phenotype of aggressive endometrial cancer cells

Oncotarget. 2014 Aug;5(15):6049-62

本研究の一部は以下の学会・研究会・シンポジウムに発表した.

１． Yosuke Konno, Peixin Dong, Noriaki Sakuragi

MicroRNA-101: a potential therapeutic target for aggressive endometrial cancer.

The 4th Bilateral Symposium on Gynecologic Malignancies between Department of Gynecology, Hokkaido University and Obstetrics and Gynecology Hospital, Fudan University

2014 年 6 月 11 日・札幌

１. 金野　陽輔、董　培新、鈴木　史彦、保坂　昌芳、井平　圭、遠藤　大介、福本　俊、嶋田　知紗、宇田　智浩、加藤　達矢、三田村　卓、小林　範子、武田　真人、渡利　英道、工藤　正尊、水上　尚典、櫻木　範明

MicroRNA-101 は EZH2、MCL-1、FOS を制御して高悪性度子宮体癌細胞の増殖、浸潤、がん幹細胞様形質を抑制する

第 2 回婦人科がんバイオマーカー研究会

2014 年 7 月 5 日・東京

緒言

子宮体癌(Endometrial cancer: EC)は全世界でみて7番目に多い女性の癌であり、米国においては婦人科癌でもっとも頻度の高い癌である．産業先進国では発生頻度は10万あたり10-20人だが、発展途上国ではその約10分の１である．日本においては生活習慣の欧米化にともなって発生頻度が増加している．リスクファクターとしては肥満、未経産、タモキシフェンの使用などが報告されている[1]．子宮体癌の各進行期、組織型を含めた全体としての5年生存率は約80%と他の婦人科癌と比べて比較的予後良好であるが、組織型によって高浸潤、高転移能を有する予後が悪いサブグループもある[2].

子宮体癌はBokhmanらにより、生物学的特性、臨床経過、予後などによって組織学的にタイプ１とタイプ２の２つに分類され、この分類は現在広く普及している[3]．タイプ１ECは子宮体癌全体の約80%を占めており、高分化・中分化型（Grade1-2）類内膜腺癌(Endometrioid endometrial carcinoma-EEC)が大部分である．タイプ２ECは漿液性腺癌(Endometrial serous carcinoma: ESC)、明細胞腺癌、低分化類内膜腺癌が主であり、子宮体癌全体の約20%を占めている．タイプ１ECは閉経前後での発症が多く、エストロゲン単独刺激(unopposed estrogen)が密接に関与し、癌周辺部に子宮内膜増殖症を伴うことが多く、子宮内膜増殖症からの発生も示唆されており、比較的早期に診断されることが多く、予後は比較的良好である（5年生存率約85%）．一方、タイプ２ECは、一般的に高齢者に発症し、背景は萎縮性内膜でエストロゲン依存性はなく子宮内膜増殖症を伴わない．診断時には深い筋層浸潤、リンパ節転移がある進行がんが多く、予後不良である（5年生存率約50%）[3-7]．同じStageで比較しても、タイプ１ECに比べて、タイプ２のEC患者の予後は不良であると報告されており[8]、治療抵抗性で予後の悪い子宮体癌のサブグループに対する新たな治療戦略がより重要になってくると考えられる．

タイプ分類は形態的なクラス分けであるが、タイプ１とタイプ２のECは各々に存在する分子、遺伝子変異のパターンもまた異なっている．この分子生物学的性格の違いが、異なる腫瘍の臨床的性質に反映されていると考えられている．遺伝子の変化から見ると、PTEN 遺伝子の異常が子宮体癌全体の70-80%に見出されるが、多くはタイプ１ECであり、p53の遺伝子変異はタイプ２ECに集積していることから、タイプ２の子宮体癌の発生にp53が強く関与していると考えられる．特に、ESCでは90%もの高率に変異が認められたという報告があり、またHER2遺伝子異常もタイプ２のECに多く認められる[7].

Grade３EECをどちらのタイプに分類すべきかは議論があるところである[6]．Grade３EECの5年生存率は約45%、ESCの5年生存率は36%と生存率に有意な

差がなく、Grade３EEC はGrade１、２EEC より ESC のほうにより近い予後不良な経過をたどることが報告され[9]、また遺伝子発現プロファイルも、ESC は分子生物学的に Grade１EEC より Grade３EEC に近いことが示唆されている[10]. そこで、本研究では、予後不良である Grade３EEC と ESC を高悪性度子宮体癌と呼び、共通の分子メカニズムを解明することが、診断や治療戦略の向上につながり、しいては予後の改善に寄与すると考え研究の対象にした.

近年、浸潤、転移にかかわる癌細胞の特徴の一つに上皮間葉移行(epithelial to mesenchymal transition ： EMT)があり、盛んに研究が進められている. EMT というのは、胎児の発生、創傷の治癒、悪性腫瘍の進展と転移過程に見られる現象で、EMT が生じると、上皮細胞が間葉系の細胞形態を示し、細胞間接着が解除され、細胞が運動能を獲得できると言われている. 癌の浸潤では、癌細胞同士の結合に関わる細胞間接着が低下し、高い運動能を獲得し、原発巣から癌細胞が離脱しやすくなるため、EMT は癌転移の初期段階での重要な現象であると考えられている[11].現在までに EMT 誘導の分子機構は多数の研究がなされており、主な経路として、EGF-PI3K/MAPK pathway、TGF-β-Smad pathways、Wnt/β-catenin pathway などの伝達経路が互いに密接にリンクしながら、協調的に働いて、Twist1、ZEB1、Bmi-1、Snail、Slug などの転写因子の発現を制御することで、上皮系の分子 E-cadherin、ZO-1 の発現が低下し、間葉系分子 N-cadherin、Vimentin の発現が増加し、EMT を誘導していると考えられている[12]. EMT を起こした腫瘍細胞は sphere 形成能、抗がん剤耐性、幹細胞マーカーの上昇などの癌幹細胞様の特徴を獲得するといわれている[13,14]. また幹細胞 signal pathway にかかわるとされる Notch、hedgehog、Wnt、TGF-β は EMT マーカーも誘導することがわかってきている[15].

したがって、EMT と癌幹細胞形質の間には、それらの誘導や進展に共通したメカニズムが存在する可能性が高いと考えられ、EMT も本研究の対象のひとつとした.最近、EMT を制御する重要なものの一つとして microRNA が研究されている.

MicroRNA （miR）は non-coding RNA の一つで、細胞内に存在する長さ 20 から 25 塩基ほどの１本鎖 RNA であり、他の遺伝子の発現を調節する機能を有する. MiR 遺伝子から転写され Drosha によってプロセスされた 70 塩基程度のマイクロ RNA 前駆体は、Dicer によって 20-24 塩基程度の成熟 miR となり、RISC 複合体になって標的遺伝子の mRNA の３´-UTR に相補的に結合し、標的遺伝子の mRNA を分解、あるいは蛋白への翻訳を抑制する[16]. MiR は増殖、アポトーシス、老化、分化、浸潤などの多様な細胞機能を制御している[17,18]. 細胞の種類、あるいは標的遺伝子の機能によって、miR は腫瘍抑制遺伝子，または癌遺伝子として、癌細胞の悪性形質を制御している[19].いくつかの miR は特定の腫瘍にのみ発現が認められ組織特異性をもつが[20]、miR-101 や miR-145 などは様々な癌で関連が示唆さ

れ、多くの細胞機能を制御しているとされている[21,22]. EC においては、miR-125b[23]は癌遺伝子として、miR-194[24]、miR-130b[25]、miR-106b[26]and miR-34[27]などは癌抑制遺伝子として報告されている.

日本人女性の EC 組織と正常内膜とのマイクロアレイ解析研究では類内膜腺癌と漿液性腺癌の両方ともに減少していたのは 48 個の miR で、そのうち miR-101 と 155 が ESC において独立予後因子として報告されている[27,28]. MiR-101 は乳癌[29]、大腸癌[30]、肺癌[31]、卵巣癌[32]、胃癌[33]など多くの癌において、細胞増殖、運動、浸潤、抗がん剤抵抗性、癌幹細胞様形質など様々な細胞機能を制御する癌抑制因子として報告されており、miR-101 を研究対象に絞り込んだ. MiR-101 は ESC 細胞株 SPAC-1-L の増殖を抑制するとされている[28]が、高浸潤性体癌において miR-101 の増殖抑制以外の浸潤、EMT などの生物学的機能や、標的遺伝子などはわかっていない. 本研究では、miR-101 が高悪性度体癌において腫瘍抑制 miR として機能しているのではないかと仮説をたて、もしその仮説が正しければ、miR-101 は有用な治療標的になりうるのではないかと考え下記の実験を施行した.

MiR-101 は高悪性度子宮体癌細胞において、すくなくとも *EZH2*、*MCL-1*、*FOS* を標的遺伝子として抑制することにより、増殖、運動、浸潤、EMT/癌幹細胞形質を抑制できることを報告する. この結果は高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 が複数の重要癌遺伝子を同時に制御し癌抑制 miR として働くことを証明したものである.

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

AC	Anti-miR-negative control
EC	Endometrial cancer
EEC	Endometrioid endometrial carcinoma
EGF	Epidermal growth factor
EMT	Epithelial mesenchymal transition
ESC	Endometrial serous carcinoma
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FGF	Fibroblast growth factor
FLRT3	Fibronectin leucine rich transmembrane protein 3
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCL-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
miR	MicroRNA
NC	Negative control
NEK7	NIMA-related kinase 7
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
shRNA	Small hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TGF	Transforming growth factor
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labeling
UBE2D1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D1
UTR	Untranslated region

実験方法

1.細胞培養

ヒト子宮体部漿液性腺癌由来細胞株である SPAC-1-L と SPAC-1-S は同一患者の漿液性腺癌組織から樹立された細胞株で p53 変異を持ち、高増殖性、高浸潤性の特徴がある．東北大学産婦人科学教室の鈴木史彦博士の御厚意により譲り受け、RPMI-1640 medium(Sigma-Aldrich, St. Louis)に、10%牛胎児血清を添加し培養した．

ヒト子宮体部類内膜腺癌細胞株である HEC-50 は低分化類内膜腺癌組織から樹立された細胞株で p53 遺伝子の欠失を持ち、野生型 PTEN を発現し、ホルモンレセプターは陰性である．HOUA-I は低分化類内膜腺癌組織から樹立された細胞株でホルモンレセプターは陰性で､p53 変異はない.HEC-50 は JCRB 細胞バンク（大阪)より、HOUA-I は RIKEN CELL BANK（筑波）より購入し、DMEM/F12 medium(Sigma-Aldrich、St. Louis）に、10%牛胎児血清を添加し培養した．

ヒト子宮内膜由来不死化細胞株 EM は外因性の不死化遺伝子であるヒトテロメラーゼ逆転写酵素発現遺伝子 hTERT とヒトパピローマウイルス 16 型Ｅ7 遺伝子及びヒトパピローマウイルス 16 型Ｅ6 遺伝子が導入され不死化に成功した細胞株であり、島根大学産婦人科学教室の京哲博士の御厚意により譲り受け、DMEM/F12 medium に 10%牛胎児血清を添加し培養した．

5 種類の細胞株はともに 37℃、5%CO2 の条件下で培養した．

2. Transient transfection

miR-101 の前駆体 mimics である pre-miR-101(101)、その陰性対照である pre-miR-negative control(NC)、miR-101 の発現を抑制する anti-miR-101 inhibitor（AS-101)、その陰性対照である anti-miR-negative control（AC)、また、siRNA-EZH2(siEZH2)、-MCL-1(siMCL-1)、-FOS(siFOS)、siRNA negative control(siNC)は Ambion 社から購入し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad)を使用してそれぞれ細胞に導入した．

Transfection の手順の概略は以下の通りである．

①前日に抗生物質不含の血清入り培地に transfection 時に 60-70%コンフルエントになるように一定量の細胞をまいた．

②microRNA または siRNA を無血清培地で希釈し、室温で 5 分間インキュベートしておいた Lipofectamine 2000 と混合しさらに室温で 20 分間インキュベートした．Lipofectamine 2000 は導入 RNA15pm あたり 1μl 使用した．

③上記の混合液を最終濃度が miR は 40nM、siRNA は 10nM になるように、

transfection する細胞が入った血清入り培地に添加し、37℃、5%CO2 の条件で培養した.
④4 時間後に検鏡し、細胞毒性を認められればその時に、認めなければ翌日に培地交換を行った.

3. Stable transfection

Pre-miR-101-3p を安定発現させるためのプラスミド pCMV-miR-101-3p vector(pCMV-101)とその陰性対照である pCMV-miR-negative control(pCMV-NC)は OriGene 社(Rockville)から購入し Lipofectamine PLUS Reagent (Invitrogen, Carlsbad)を使用してそれぞれ SPAC-1-L 細胞にトランスフェクションした. 400μg/ml の濃度の G418(Sigma-Aldrich, St. Louis)で有効にトランスフェクションされた細胞を選別し、単細胞由来のコロニーからなる安定発現細胞株を樹立した.

手順の概略は以下の通りである.
①前日に 10cm ディッシュに抗生物質不含の血清入り培地に transfection 時に 60-70%コンフルエントになるように一定量の細胞をまいた.
②無血清培地に 40μl のプラスミドと 20μl の PLUS reagent を加え室温で 15 分間インキュベートし、Lipofectamine 30μl と混合後さらに室温で 15 分間インキュベートした.
③無血清培地へ培地交換しておいた細胞の入ったディッシュへ上記の混合液を加えた.
④4 時間後に血清入り培地に培地交換した.
⑤100%コンフルエントになった時点で、うすく細胞をまき直し G418 で細胞選別をおこなった.
⑥十分に選別が行われたと判断したあとに、さらに単細胞からなるコロニーを得るためにうすくまき直した.
⑦単細胞からなるコロニーをトリプシンを含ませた小濾紙片で pick up し G418 は 200μg/ml の濃度に減量し培養継続した.
⑧トランスフェクション後 6 週間の選別期間を経て安定細胞株を樹立した.

4.定量リアルタイム RT-PCR(qRT-PCR)による miRNA と mRNA の発現解析

細胞株の全 RNA は TRIzol reagents (Invitrogen, Carlsbad)を使用して採取した. ディッシュからトリプシンではがした細胞に、TRIzol を加え、室温で 5 分間インキュベートし、TRIzol の 20%量のクロロホルムを加えて激しく撹拌した. 4℃、12,000g で 15 分間の遠心分離後に得られた上清に等量のイソプロパノ

ールを添加し室温で 10 分間インキュベート後、さらに 4℃、12,000g で 15 分間遠心分離しペレットを得た．ペレットを 99%エタノールで洗浄し、風乾後に RNAase free H20 で融解し全 RNA を抽出した．

MicroRNA-101 の qRT-PCR は NCode miRNA qRT-PCR analysis (Invitrogen, Carlsbad))を使用し行った．全 RNA に含まれる microRNA に Poly A Polymerase によってポリアデニル化したのちに、SuperScript® III RT と Universal RT Primer を使用して逆転写反応を行い First strand cDNA を合成した．各 mRNA は PrimeScript® RT reagent(Takara, Japan)で逆転写反応を行い First strand cDNA を合成した．37℃、15 分間の逆転写反応を行った後に、85℃、5 秒で反応を終了させた．

MiR-101-3p に対する specific forward Primer （5’ -CCGGTACAGTACTGTGATAACTGAA-3’）と reverse primer として Universal qPCR Primer を使用し、各 mRNA の primer は the PrimerBank database (http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/)から得た．Applied Bio systems Takara SYBR Premix Ex Taq II (Takara, Japan)を用いて、7300 real-time PCR system (Applied Biosystems)にて 94℃ 15 分の反応の後、95℃ 15 秒, 60℃ 25 秒、72℃ 20 秒の反応サイクルを 40 回繰り返し qPCR を施行した．GAPDH を内部標準として使用した．

以下に各 mRNA の Primer list を示す

Forward Primer(F), Reverse Primer(R)	Sequence (5’ -> 3’)
GAPDH	F:GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	R:GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
E-cadherin	F:CGAGAGCTACACGTTCACGG
	R:GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG
ZO-1	F:CAACATACAGTGACGCTTCACA
	R:CACTATTGACGTTTCCCCACTC
Desmoplakin	F:GCAGGATGTACTATTCTCGGC
	R:CCTGGATGGTGTTCTGGTTCT
Vimentin	F:GACGCCATCAACACCGAGTT
	R:CTTTGTCGTTGGTTAGCTGGT
N-cadherin	F:TCAGGCGTCTGTAGAGGCTT
	R:ATGCACATCCTTCGATAAGACTG
Twist1	F:GTCCGCAGTCTTACGAGGAG
	R:GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT

S100A4	F:GATGAGCAACTTGGACAGCAA
	R:CTGGGCTGCTTATCTGGGAAG
TIMP3	F:CATGTGCAGTACATCCATACGG
	R:CATCATAGACGCGACCTGTCA
ALDH	F:ATGGCAAGCCCTATGTCATCT
	R: CCGTGGTACTTATCAGCCCA
NANOG	F:TTTGTGGGCCTGAAGAAAACT
	R:AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG
MDR1	F:TTGCTGCTTACATTCAGGTTTCA
	R:AGCCTATCTCCTGTCGCATTA
EZH2	F:AATCAGAGTACATGCGACTGAGA
	R:GCTGTATCCTTCGCTGTTTCC
MCL-1	F:TGCTTCGGAAACTGGACATCA
	R:TAGCCACAAAGGCACCAAAAG
FOS	F:CCGGGGATAGCCTCTCTTACT
	R:CCAGGTCCGTGCAGAAGTC
NEK7	F:GCCTTACGACCGGATATGGG
	R:CACTAAATTGTCCGCGACCAA
UBE2D1	F:TAGCGCATATCAAGGTGGAGT
	R:TGGTGACCATTGTGACCTCAG
FLRT3	F:CCTCATCGGGACTAAAATTGGG
	R:ATGGATGTCAGAAAGCGATCATT

5. 生細胞数測定

生存細胞は、マルチスペクトロマイクロプレートリーダーである Varioskan Flash(Thermo Scientific)で測定の 4 時間前に Cell Counting Kit-8 溶液 (Dojindo, Kumamoto)10μl を各 well に加え 450nm の吸光度にて測定した.

a)パクリタキセル腫瘍増殖抑制試験

各細胞 5×10^3 個を 96well 培養プレートに播種し 5%CO2 下、37℃で 24 時間培養し、0-300nM の各濃度になるようにパクリタキセル(Cell Signaling Technology, Beverly)を添加した. DMSO の毒性を考慮し等量になるように DMSO の量を調節した. 薬剤添加後 24 時間に吸光度を測定し、viability は DMSO のみ添加した細胞との吸光度の百分率比で示した.

b) 細胞増殖試験

各細胞 2.5×10^3 個を 96well 培養プレートに播種し 5%CO2 下,37℃で培養した. 24、48、72、96 時間後に吸光度を測定した.

6. Colony formation assay

各細胞 500 個を 6well 培養プレートに播種し 5%CO2 下、37℃で 12 日間培養し、10%ホルマリン溶液で固定し、10%ギムザ溶液で染色した. 倒立型位相差顕微鏡 (OLYMPUS CKX-41) を用いて、50 個以上の細胞数からなるコロニー数を数えた.

7. Wound healing assay

Wound healing assay は Loughlin らの方法に従って行った[34]. 6well 培養ディッシュで 100%コンフルエントの状態にある各細胞に 200μl のピペットチップで直線の傷を作成し、細胞増殖の影響を抑えるために、Mitomycin C (5 μg/ml) を加えた培養液で、5%CO2 下, 37℃で 12 時間培養した. 同一の部分で測定するために、ディッシュの底に油性マジックで水平線をあらかじめ引いておき目印とした. 0、12 時間目に顕微鏡で写真を撮影し、12 時間目の細胞移動面積を 0 時間目の傷の面積で除することにより創治癒を百分率で示した.

8. Transwell cell migration and invasion assay

細胞浸潤試験は、Transwell system (8-μm pore size, matrigel-coated polycarbonate membrane BD Biosciences, Bedford) を用いた. まず各細胞 5×10^4 個が入った無血清培地 500μl を上のチャンバー内にいれ、下のチャンバーには 10%血清を含む培養液 750μl をケモアトラクタントとして加え、5%CO2 下、37℃で 24 時間培養後、10%ホルマリン溶液で固定し、10%ギムザ溶液で染色した. 小綿棒でチャンバー表面の細胞を除去し、浸潤した細胞数を顕微鏡下に中心と周辺を含むランダムな 10 視野で数えた. 細胞遊走試験はメンブレンがマトリゲルでコーティングされていないのと、培養時間が 12 時間である以外は浸潤試験と同様の手順で行った.

9.アポトーシスアッセイ (TUNEL アッセイ)

アポトーシスの評価は terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)法を用い、DeadEnd Colorimetric TUNEL System(Promega, Madison)を使用した. 上記の如くトランスフェクションした細胞を培養 72 時間後に、10%ホルマリン溶液で固定し洗浄後、プロテアーゼ K による処理を行った. TdT 反応溶液を加え 37℃, 1 時間インキュベーションし、DNA 断片の 3'-OH 末端をビオチン化ヌクレオチドで標識した. 次に内因性ペルオキシダーゼを阻害するために 0.3%過酸化水素水で処理し、ホースラディシュペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (streptavidin-HRP) を加え 30 分間

室温でインキュベートし、最後に diaminobenzidine (DAB) と過酸化水素を加え発色させた. 核がこげ茶色に染色されたものをアポトーシス細胞と判定し数えた. DNase 処理したものを positive control とした.

10. Senescence assay (SA-β-gal staining)

細胞老化のマーカーとして、senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal)活性を Cellular Senescence Assay Kit (Chemicon International, Temecula)を用い測定した. 上記の如くトランスフェクションした細胞を培養 72 時間後に固定液を加え室温で 10 分間インキュベートした. 固定液を除去、洗浄後に SA-β-gal detection solution を加え、37℃、CO2 なしで、光が当たらないようにして一晩インキュベートした. 顕微鏡下で観察し、青く染色された細胞を陽性と判定し、150-200 細胞のうちの陽性細胞の割合を百分率で示した.

11. Caspase-Glo 3/7 assay

まず各細胞 3×10^3 個を 96well 培養プレートに播種し、上記のように miR-101 または NC をトランスフェクションした. Caspase-Glo® 3/7 Reagent (Promega、Madison) を各ウェルに 100μl ずつ加え、室温で 3 時間インキュベート後に、Turner Designs Luminometer Model TD-20/20(Promega) で発光量を測定しカスパーゼ 3/7 活性を NC との Fold change で示した.

12. Western blot analysis

M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce Biotechnology, Woburn) を細胞に加え、可溶化し全タンパクを抽出した. 核タンパクは Nuclear Extraction Kit (Chemicon International, Temecula) を用いて抽出した. 全タンパクは 40μg、核タンパクは 10μg を 10% SDS-PAGE で泳動し、ニトロセルロース膜に転写し、下記に示す 1 次抗体と反応させた

anti-EZH2 (5246, Cell Signaling, Danvers)
anti-PARP (9542, Cell Signaling, Danvers)
rabbit polyclonal anti-E-cadherin (A01589, GenScript, Edison)
mouse monoclonal anti-N-cadherin (BD, Transduction, San Jose)
rabbit polyclonal anti-Vimentin (A01189, GenScript, Edison)
anti-MCL-1 (sc-819,Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz)
anti-FOS (sc-52, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz)
anti-p21 (sc-397, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz)
anti-Bax (sc-493, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz)
anti-β-catenin (sc-1496, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz)

anti-GAPDH (sc-47724, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz)
anti-lamin B1 (sc-20682, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz)
その後に、それぞれの特異的2次抗体―抗マウス、ヤギ、ウサギIgG－HRP複合体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz)と反応させ、抗原抗体複合体はECL blotting analysis system (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire)にて発光検出した. 全タンパクの内部標準としてGAPDHを、核タンパクの内部標準としてはlamin Bを使用した.

13. Sphere formation assay

1000個の細胞をultra-low attachment plates (Corning, NY) 内で、N2 plus media supplement (Invitrogen, CA), 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF), 20 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen, CA), 4 mg/ml heparin (Sigma-Aldrich, UK) を添加した無血清培地で14日間浮遊培養した. 長径が50μm以上の細胞塊を顕微鏡下に数えた.

14. Microarray analysis

上記のようにmiR101またはNCをトランスフェクションしたSPAC-1-L細胞から得た全RNAを用い、RNAをラベル化し、Superprint G3 Human GE 8x60k Microarray (Agilent Technologies)を使用して、Genome-wide gene expression analysisを行った.NCとmiR-101導入細胞の各遺伝子の発現比率をFold changeで示した.

15. Luciferase activity assay

ホタルルシフェラーゼ遺伝子の下流に各遺伝子の3’-UTRをクローニングしたベクターはEZH2とFOSはOriGene Technologies (Rockville)から、MCL-1はSwitchgear Genomics (Menlo Park)から購入した.

各遺伝子のmiR-101の結合部位の点突然変異はquick-change site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いて作成した.

設計した変異導入プライマーとプラスミドベクターを98℃　30秒の反応の後、98℃　10秒､55℃　5秒､68℃　3分の反応サイクルを12回繰り返しPrimeSTAR® HS DNA Polymeraseを用いて変異鎖を合成した. DpnI 1μlを加え、37℃1時間インキュベーションして、テンプレートを切断し、XL10-Gold Ultracompetent Cells (Stratagene) へトランスフォーム後、培養しニックを修復したのちにコロニーを回収しミニアルカリプレップ法で変異ベクターを精製した.

24well培養プレートで野生型または変異型リポーターベクターを101、NC、AS-101、ACとともにトランスフェクションした. トランスフェクション後24時間5%CO2下, 37℃で培養したのちに、dual-luciferase reporter assay system

(Promega) にてルシフェラーゼ活性を測定した. ルミノメーターは Turner Designs Luminometer Model TD-20/20(Promega) を用いた. MCL-1 ベクター導入細胞は LightSwitch Luciferase Assay Reagent (Menlo Park) で測定した.

16.統計学的解析

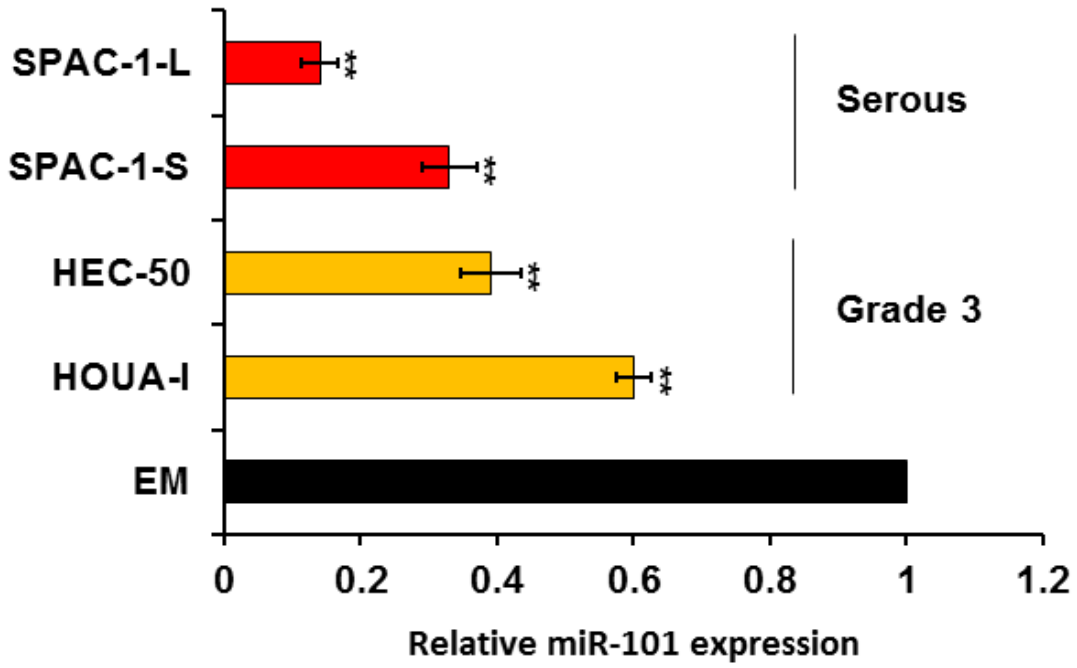
全ての実験は triplicate で行った. 各群の値は平均±標準偏差で表記し、必要に応じ Student’s t-test か Wilcoxon matched-pairs test を用いて検定した. 有意水準は P <0.05 とした.

実験結果

1. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 の発現は低下していた.

子宮体癌細胞における miR-101 の役割を調べるために、最初に４種の高悪性度子宮体癌細胞株（SPAC-1-L, SPAC-1-S, HEC-50, HOUA-I）の内因性の miR-101 の発現レベルを子宮内膜不死化細胞株 EM と qRT-PCR を用いて比較した. SPAC-1-L と SPAC-1-S は ESC 由来で HEC-50 と HOUA-I 低分化 EEC 由来の細胞株である. MiR-101 の発現はこれらの４種の高悪性度子宮体癌細胞株全てにおいて有意に EM細胞株にくらべて低下しており、ESC 由来の高浸潤性細胞株 SPAC-1-L が最も低下していた（Fig 1）. この結果は高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は腫瘍抑制因子として機能している可能性を示唆するものである.

Fig 1

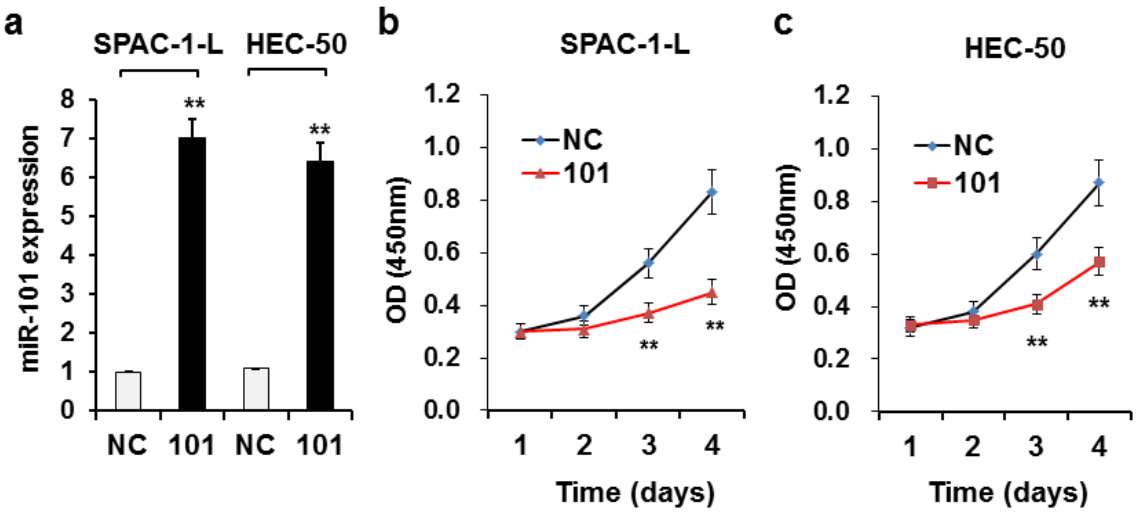


The expression of GAPDH was used as a normalization control, and the results are presented as the fold-change in expression compared with EM. $^{**}P < 0.01$.

2.高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は細胞増殖を抑制する.

MiR-101 の生物学的機能を評価するために、まず子宮体癌細胞での miR-101 の細胞増殖に関する効果を調べた. SPAC-1-L、HEC-50 細胞に pre-miR-101(101)、NC を導入し、cell counting kit-8 を用いて細胞増殖を測定した. MiR-101 の発現レベルは q RT-PCR で評価し、確かに 101 導入 SPAC-1-L 細胞は約 7 倍、101 導入 HEC-50 細胞は約 6 倍 NC と比較して上昇していることを確かめた (Fig 2a). SPAC-1-L、HEC-50 細胞において、miR-101 過剰発現が 72 時間、96 時間目において有意に細胞増殖を抑制した.

Fig 2



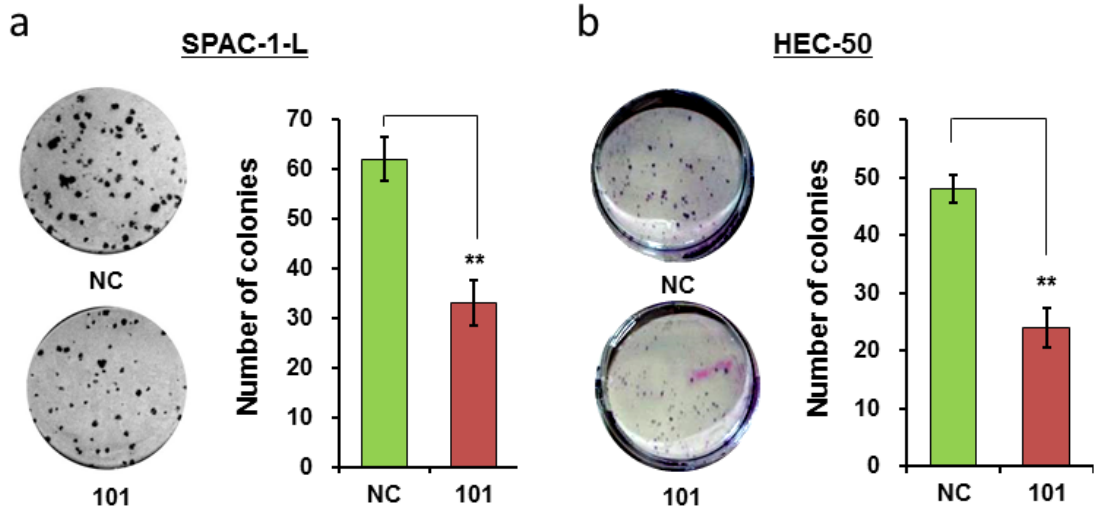
NC: pre-miRNA control; 101: pre-miR-101; $^{**}P < 0.01$.

qRT-PCRs were conducted to quantify the relative miR-101 levels in SPAC-1-L and HEC-50 cells transfected with 101 or NC(a). Effects of ectopic expression of miR-101 on the proliferation of SPAC-1-L cells (b) and HEC-50 cells (c) were assessed with cell counting kit-8 assay.

2-2. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 はコロニー形成能を抑制する

さらに、miR-101 の長期間の細胞増殖への及ぼす影響を調べるために、SPAC-1-L、HEC-50 細胞に 101、NC を導入し、Colony formation assay を施行した. 12 日間の培養後に、予想通り miR-101 の過剰発現は両細胞株において有意にコロニー数を減少させ、コロニー形成能を抑制した(Fig 3a, b).

Fig 3



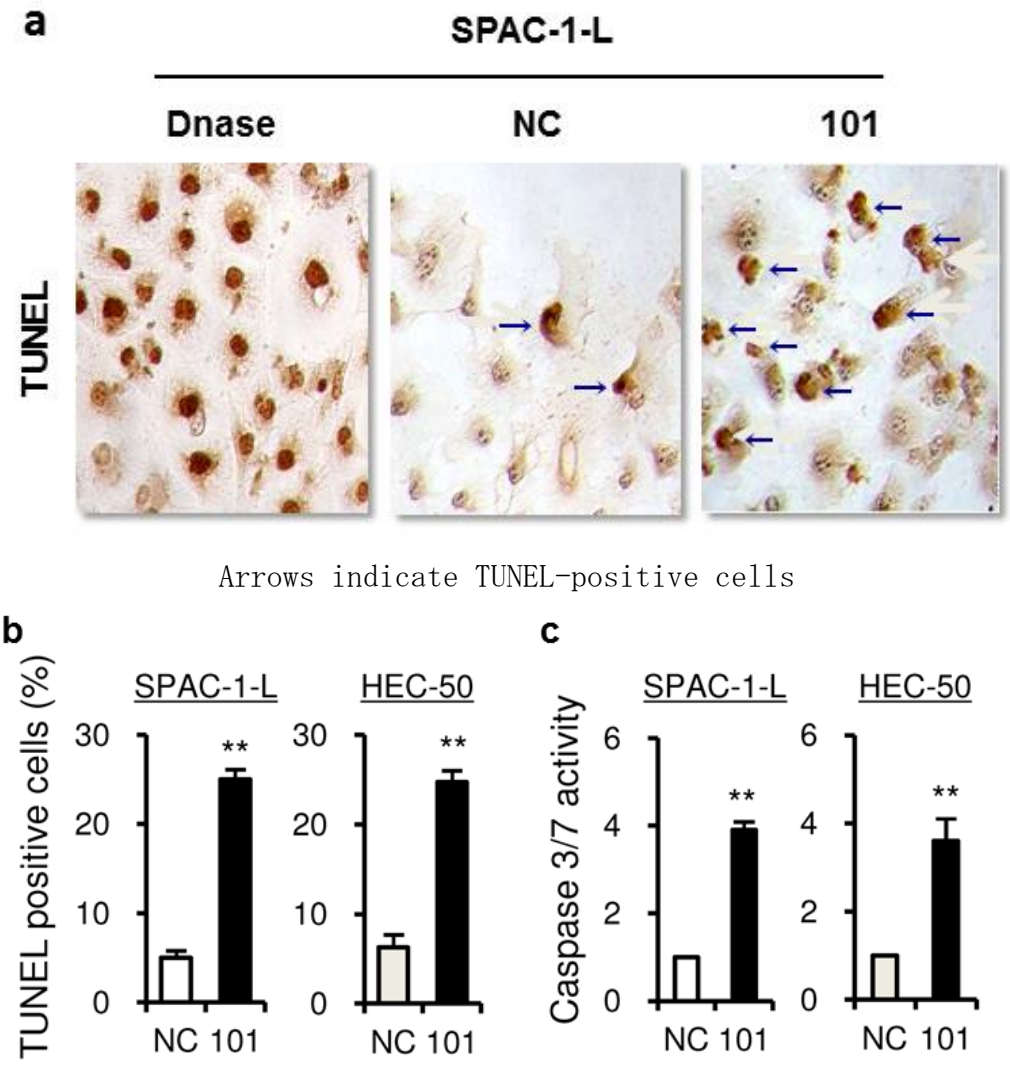
NC: pre-miRNA control; 101: pre-miR-101; $^{**}P < 0.01$.

Clone formation assays were performed in SPAC-1-L (a) and HEC-50 (b) cells transduced with pre-miR-101 (101) or pre-miRNA negative control (NC)

2-3.高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 はアポトーシスを誘導する

MiR-101 の細胞増殖抑制効果にアポトーシスが関連しているかどうか調べるため、アポトーシスを起こしている細胞は DNA が断片化することを利用した TUNEL staining assay を施行した. Dnase 処理を施行したものは DNA が断片化し TUNEL 陽性となり強い染色性を示すため、これを positive control とした (Fig 4a). 細胞核が茶色に染色されたアポトーシス細胞の割合は、NC と比較して miR-101 導入 SPAC-1-L、HEC-50 細胞ともに、有意に上昇していた (Fig 4b). 加えてアポトーシスの指標の一つである Caspase 3/7 活性も NC に比べ 101 導入 SPAC-1-L、HEC-50 細胞ともに有意に上昇していた (Fig 4c).

Fig 4

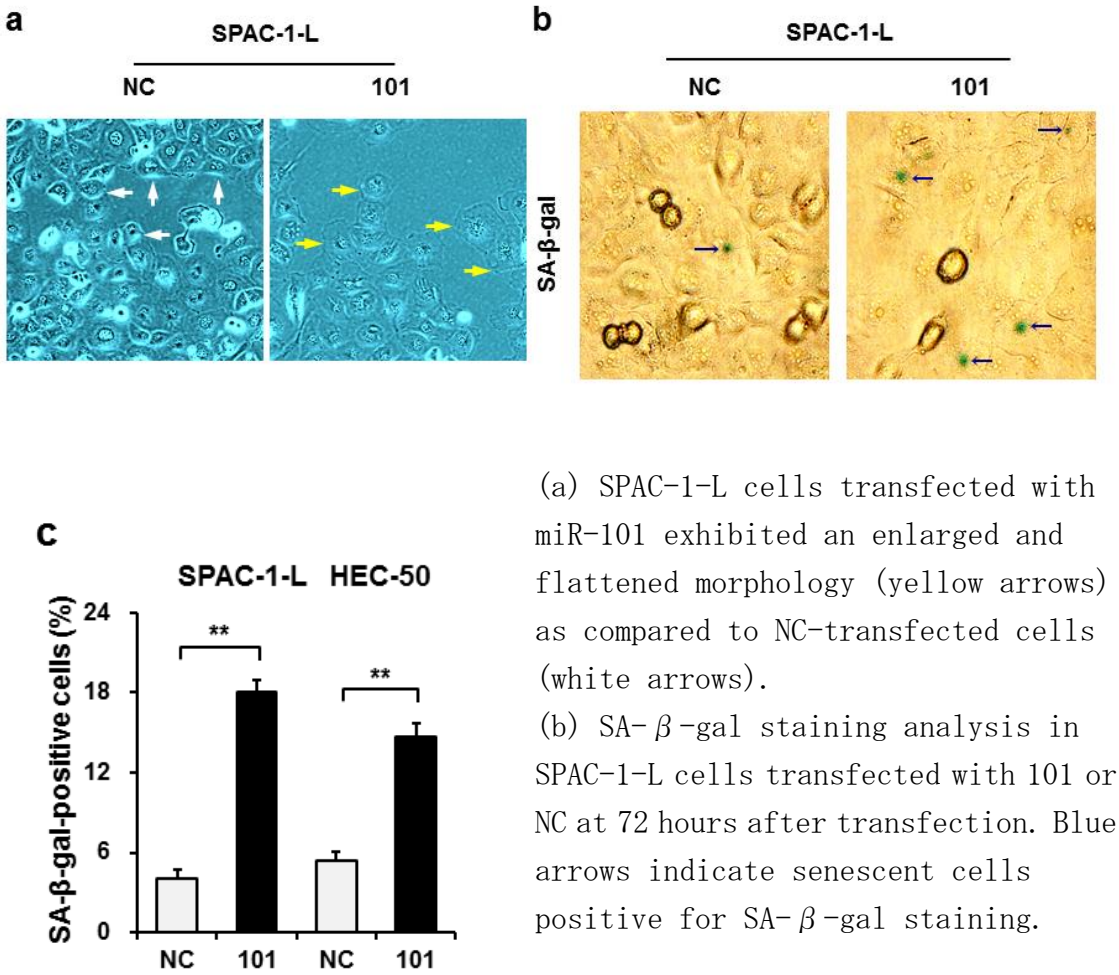


(b) The percentages of TUNEL-positive SPAC-1-L and HEC-50 cells. (c) The relative ratio of caspase-3/7 activities. $^{**}P < 0.01$

2-4. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は細胞老化を誘導する

MiR-101 をトランスフェクションした SPAC-1-L 細胞は老化の特徴的な形態変化とされる細胞の拡張、扁平化を示す細胞の増加を認めたため(Fig 5a)、miR-101 の増殖抑制効果に細胞老化も関わっているのではないかと推測し、SA-β-gal staining assay を行った. SPAC-1-L、HEC-50 細胞ともに、miR-101 導入細胞は NC にくらべて有意に老化細胞が増加していた (Fig 5b, c).

Fig 5



(a) SPAC-1-L cells transfected with miR-101 exhibited an enlarged and flattened morphology (yellow arrows) as compared to NC-transfected cells (white arrows).

(b) SA-β-gal staining analysis in SPAC-1-L cells transfected with 101 or NC at 72 hours after transfection. Blue arrows indicate senescent cells positive for SA-β-gal staining.

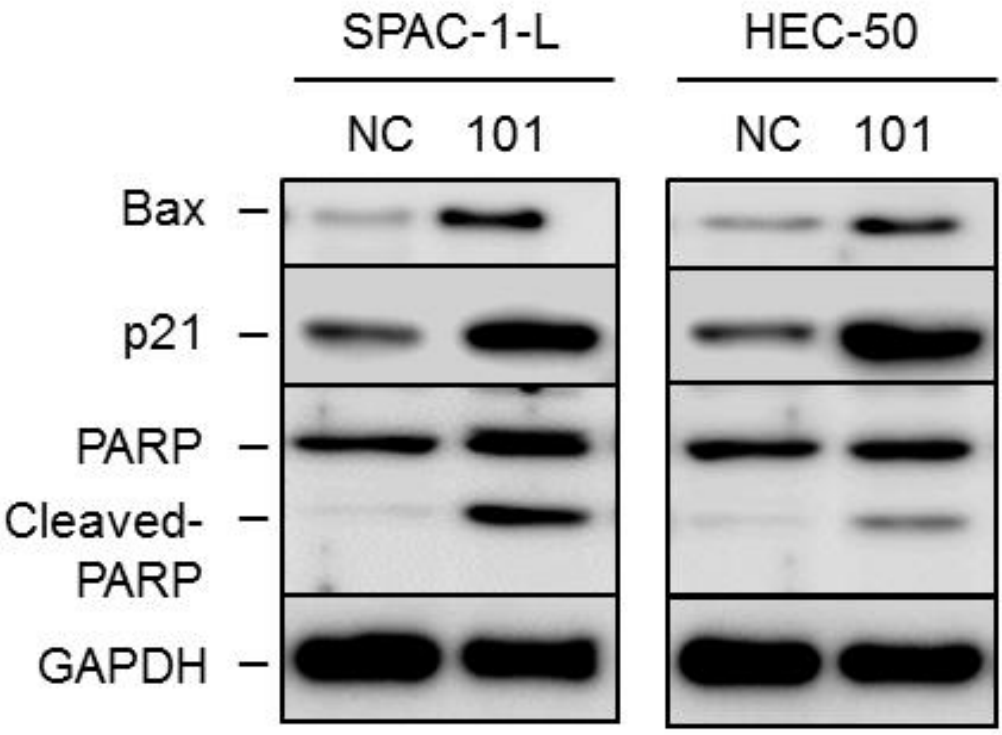
(c) The percentages of SA-β-gal-positive SPAC-1-L and HEC-50 cells. $^{**}P < 0.01$.

2-5. 高悪性度子宮体癌細胞株においてmiR-101はアポトーシスおよび細胞老化関連タンパク発現レベルも上昇させる

次にこれらのmiR-101のアポトーシスおよび細胞老化誘導効果が実際に起きているかを調べるために、アポトーシスおよび細胞老化マーカーの蛋白発現レベルの変化をWestern blot analysisで測定した. SPAC-1-L、HEC-50細胞ともに、miR-101過剰発現細胞はNCに比べてアポトーシスマーカーであるBax、Cleaved PARPの有意な上昇を認め、さらに老化マーカーであるp21も有意な上昇を認めた (Fig 6).

これらの結果を合わせると、miR-101による細胞増殖抑制はアポトーシス、老化の誘導が関係していると推測された.

Fig 6



Western blot analysis of p21, Bax, total PARP and cleaved PARP in SPAC-1-L and HEC-50 cells after transduction with 101 or NC.
Bax: pro-apoptotic gene p21: senescence marker
Cleaved-PARP: apoptosis marker GAPDH: normalization control

3. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は運動、浸潤、EMT を抑制する

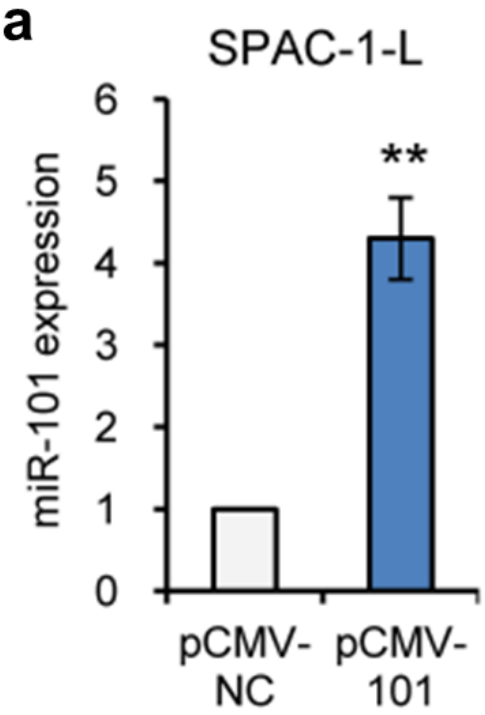
次に miR-101 の運動能、浸潤能、EMT にあたえる影響を調べるために、miR-101 の過剰発現と発現低下細胞で各実験を行った.

3-1. miR-101 安定発現 SPAC-1-L 細胞において、miR-101 過剰発現は細胞運動能を抑制する.

次に SPAC1-L において miR-101 の安定発現株を樹立し運動能に与える影響を、wound healing assay をもちいて評価した. MiR-101 の導入効率は qRT-PCR で約 4 倍の発現レベルの上昇を確認した (Fig 7).

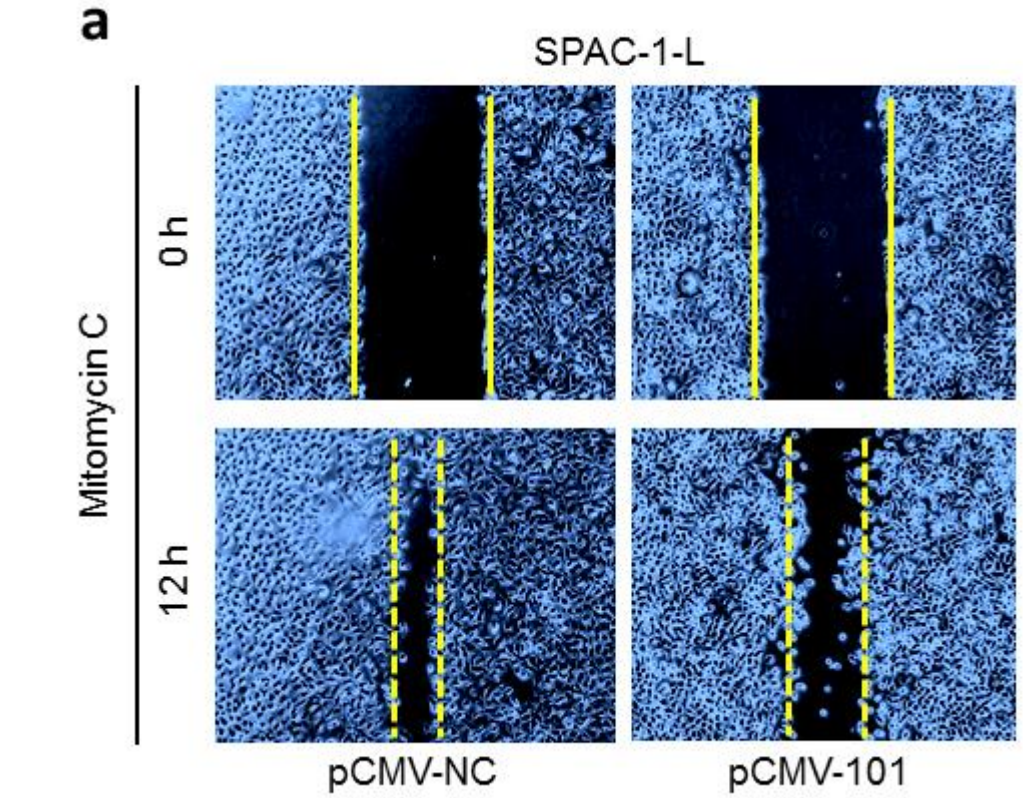
細胞増殖の影響を排除するために Mitomycin C(5 μg/ml)を添加し 12 時間培養した. MiR-101 安定過剰発現 SPAC-1-L 細胞 (pCMV-101) は傷をつけてから 12 時間後において、pCMV-control vector (pCMV-NC) に比較して傷がふさがった面積が約半分に減少し、運動能が有意に抑制された (Fig 8a, b).

Fig 7



qRT-PCR measurements of miR-101 levels in pre-101 (pCMV-101) or control vectors (pCMV-NC)-expressing SPAC-1-L cells. $^{**}P < 0.01$.

Fig 8



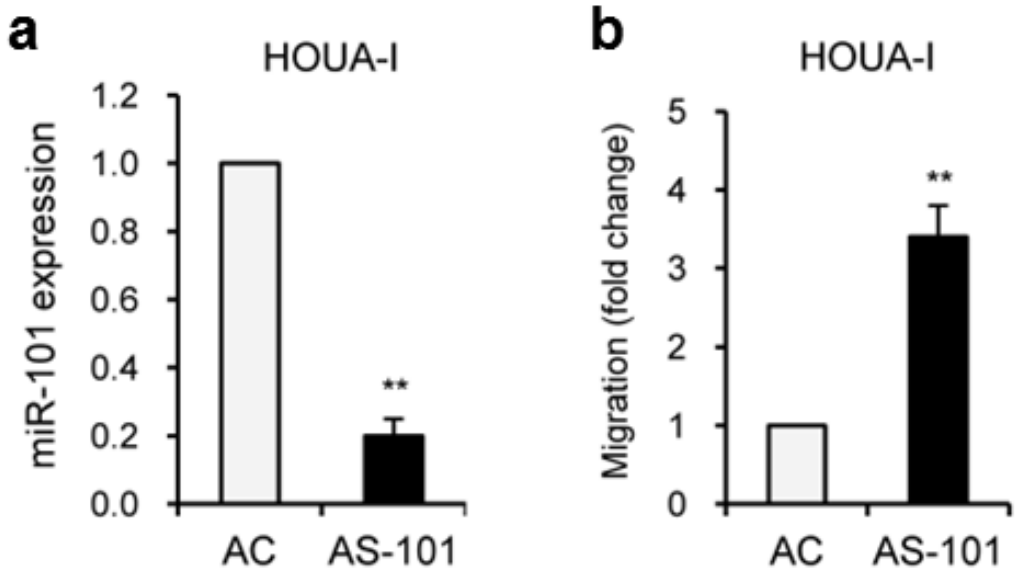
The scratch wound healing assay was performed in SPAC-1-L cells transfected with either 101 or NC in the presence of Mitomycin C. The wound healing was determined at the time points as indicated. Solid lines: the initial wound boundaries; dashed lines: the boundaries of migrated cells. Bars represented the percentage of wound healing.

$^{**}P < 0.01$.

3-2.HOUA-I 細胞において miR-101 の発現低下が細胞運動能を促進させる.

さらに miR-101 の発現を低下させたときに、運動能を促進させるかどうか調べるために、miR-101 の発現レベルが比較的高い HOUA-I 細胞を用いて、transwell cell migration assay を行った. 内因性の miR-101 の発現の低下には miR-101-specific inhibitor (AS-101)をトランスフェクションし、qRT-PCR で確認した(Fig 9a).MiR-101 発現低下 HOUA-I 細胞は anti-miRNA negative control (AC) と比較して有意に運動細胞数が増加していた (Fig 9b).

Fig 9

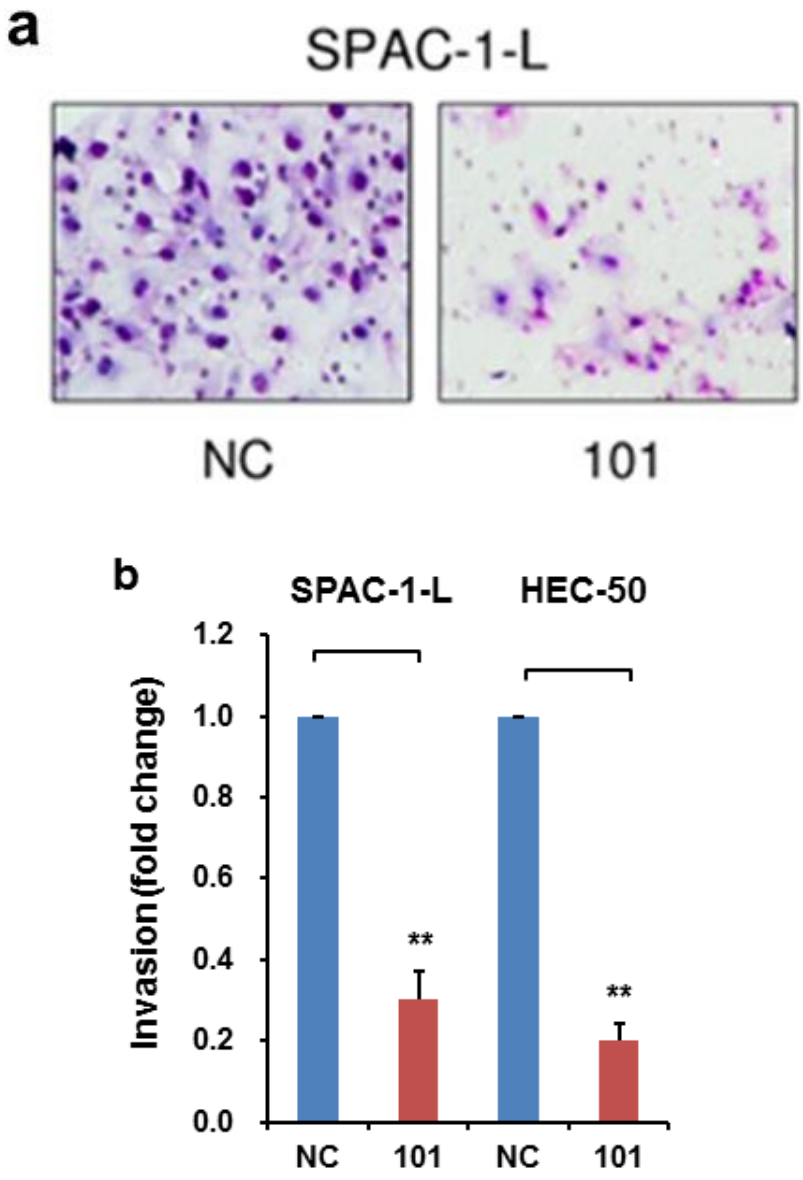


Knockdown of miR-101 in HOUA-I cells (b) induced cell migration in a transwell migration assays. $^{**}P < 0.01$.

3-3. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は浸潤を抑制する.

次に浸潤能に与える影響を調べるために、matrigel invasion assay を施行した. SPAC1-L 及び HEC-50 細胞の浸潤能は、miR-101 の過剰発現により、有意に抑制され、Fold change として 3 倍以上減少した (Fig 10a, b).

Fig 10

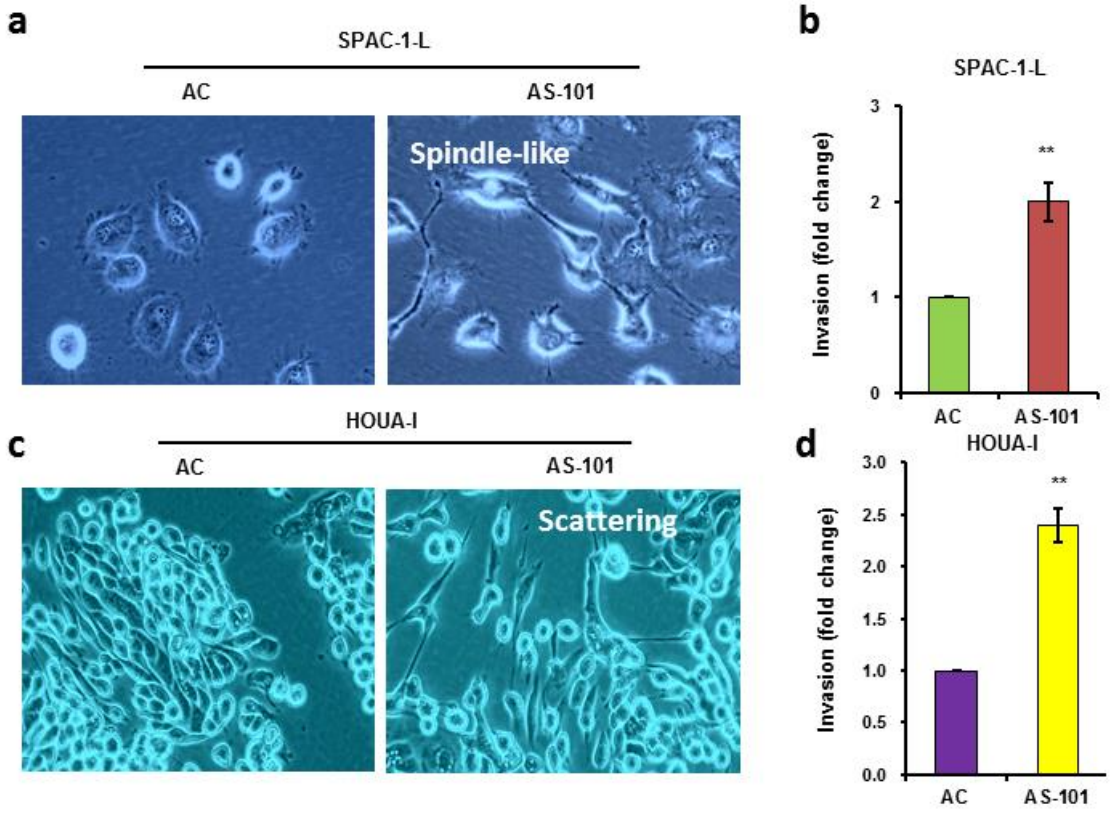


SPAC-1-L and HEC-50 cells were transfected with 101 or NC, and subjected to invasion assay. Photos were representative fields of invasive cells on the membrane in SPAC-1-L. $^{**}P < 0.01$.

3-4　高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 の抑制が、細胞形態をより間葉系に変化させ、同時に浸潤能を促進する.

SPAC-1-L 細胞は、高浸潤能を示すが、やや上皮系の形態を示すため、miR-101 発現と EMT の関連を調べる目的で、miR-101 抑制による細胞形態と浸潤能の変化を調べた. SPAC1-L 細胞において、miR-101 の抑制によって紡錘様形態の細胞が増加し (Fig 11a)、浸潤細胞数が約 2 倍と有意に増加した (Fig 11b). HOUA-I 細胞においても、間葉系変化の特徴である細胞間の接着の減少による細胞のばらつきを認め (Fig 11c)、有意な浸潤細胞の増加を認めた (Fig 11d). MiR-101 の抑制によって EMT が誘導され浸潤能が増加したと推察する結果であった.

Fig 11

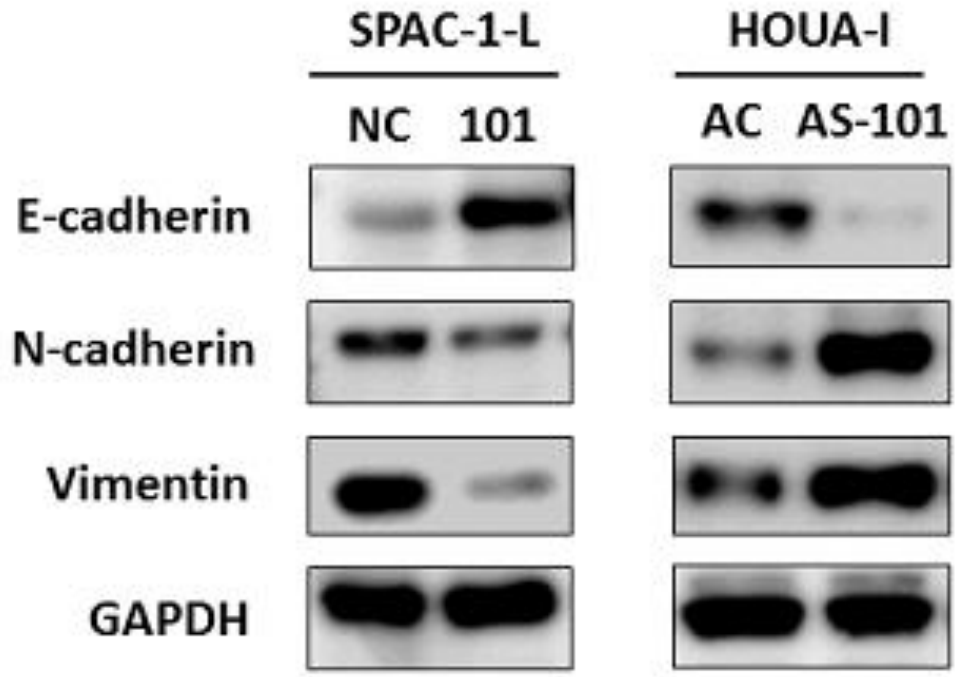


SPAC-1-L cells transfected with AS-101 exhibited a more mesenchymal morphology (a) and enhanced invasive ability (b). Downregulation of miR-101 in HOUA-I cells was associated with EMT-like cell scattering (c) and increased invasion (d). $^{**}P < 0.01$.

3-5. 高悪性度子宮体癌細胞株においてmiR-101はEMT関連タンパク発現レベルを制御する.

このmiR-101によるEMT誘導が、蛋白レベルでも証明できるか確認するためにWestern blot analysisを施行した. SPAC-1-L細胞にmiR-101を過剰発現させると、NCに比べて上皮系マーカーであるE-cadherinは増加し、間葉系マーカーであるN-cadherinとVimentinは減少した.また、HOUA-I細胞においてmiR-101の発現レベルを低下させると、逆にE-cadherinは減少し、間葉系マーカーであるN-cadherinとVimentinは増加することを確認した (Fig 12).

Fig 12

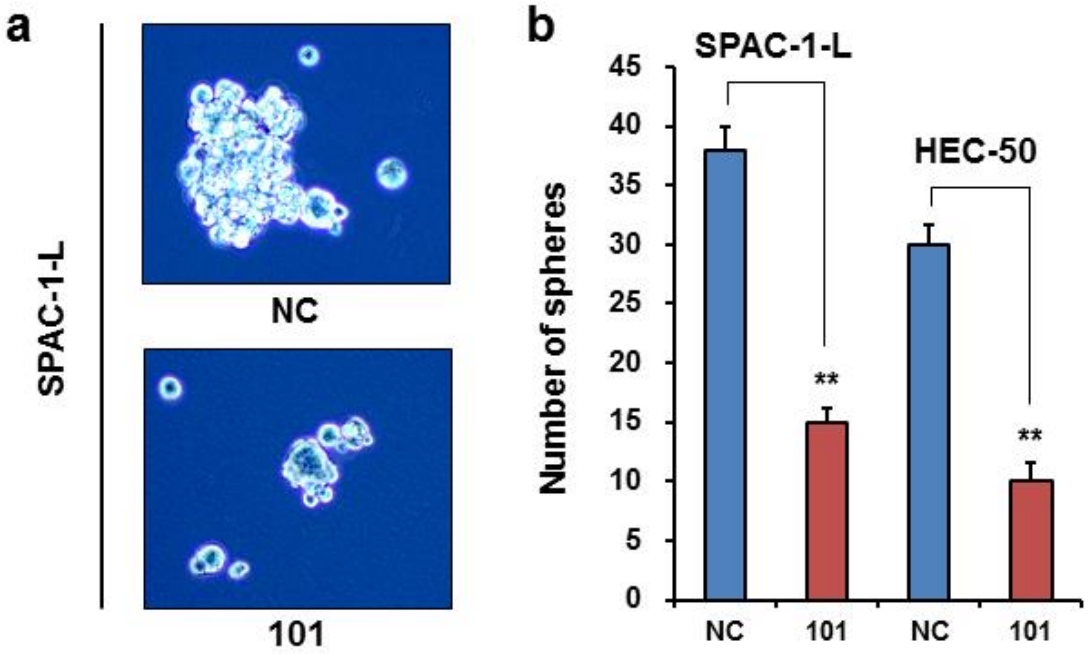


Epithelial marker: E-cadherin
Mesenchymal marker: N-cadherin and Vimentin
Normalization control: GAPDH
Western blot analysis of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin was performed in SPAC-1-L and HOUA-I cells at 72 hours after 101 or anti-miR-101 inhibitor (AS-101) transfection, respectively.

3-6. 高悪性度子宮体癌細胞株においてmiR-101過剰発現はsphere形成能を低下させる.

EMTと浮遊培養におけるsphere形成、抗がん剤耐性、幹細胞マーカーなどの癌幹細胞様形質との関連が示唆されているため、miR-101が癌幹細胞形質も制御しているのではないかと考え、次にsphere formation assayをおこなった. SPAC1-L、HEC-50細胞ともにmiR-101の過剰発現によって、sphereを小さくさせ（Fig 13a)、またsphereの数を有意に減少させた（Fig 13b).

Fig 13

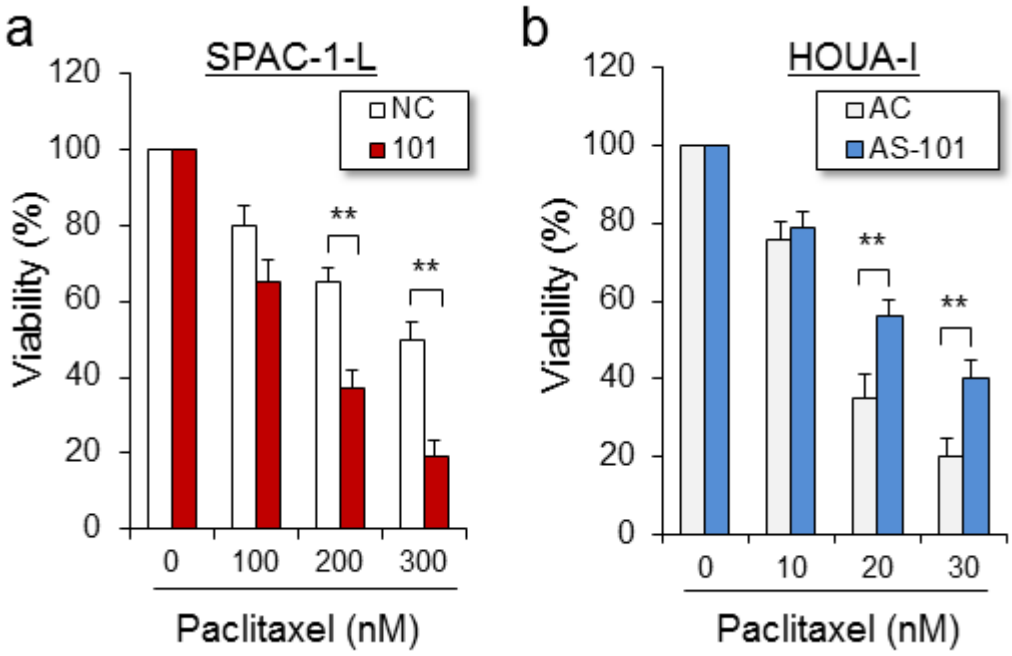


Representative images (a) and quantification (b) of sphere formation in SPAC-1-L and HEC-50 cells transfected as indicated. $^{**}P < 0.01$.

3-7. 高悪性度子宮体癌細胞株においてmiR-101はパクリタキセルに対する感受性を制御する.

次に癌幹細胞様形質の一つである抗がん剤感受性に対するmiR-101が及ぼす影響を調べるために、パクリタキセル添加後の細胞増殖の変化をcell counting kit-8 assayで測定した. MiR-101過剰発現によりSPAC-1-L細胞はパクリタキセルに対する感受性が亢進し（Fig 14a)、反対にmiR-101発現低下によりHOUA-I細胞はパクリタキセルに対する感受性が低下した（Fig 14b).

Fig 14



SPAC-1-L cells transfected with 101 or NC and HOUA-I cells transfected with AS-101 or AC were treated with Paclitaxel for 24 hours. Cell viability was measured with cell counting kit-8 assay. $^{**}P < 0.01$.

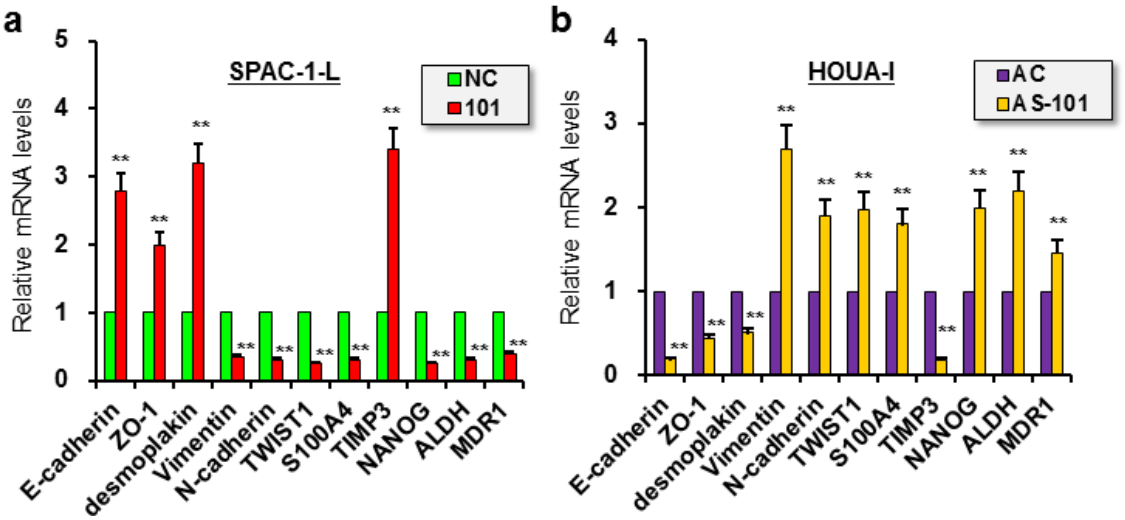
3-8. 高悪性度子宮体癌細胞株においてmiR-101はEMT/転移/幹細胞関連mRNA発現レベルを制御する.

上記に示したEMT関連の変化がmRNAレベルで説明可能か確かめるために、miR101過剰発現SPAC1-L細胞とNCのmRNAの発現レベルを比較した.

上皮系マーカーであるE-cadherin、ZO-1、desmoplakinは上昇し、間葉系マーカーであるvimentin、N-cadherinは有意に低下した. また、EMT inducerのtwist１、転移マーカーであるS100A4は低下し、転移抑制マーカーのTIMP３は有意に上昇した. 癌幹細胞マーカーのALDH、NANOG、抗がん剤抵抗マーカーのMDR1は低下していた(Fig 15a). HOUA-IのmiR101低下細胞では、NCと比較して逆の変化を起こすことを確認した(Fig 15b).

上記の結果を総合するとmiR101はEMT関連形質を制御していることが示唆された.

Fig 15



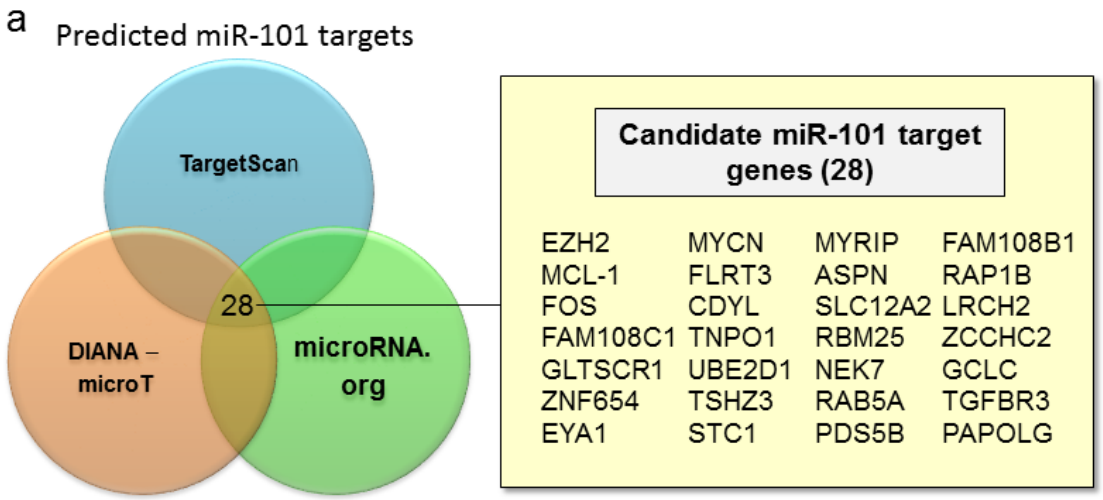
Relative mRNA expression of EMT, invasion and stemness-related genes (normalized to GAPDH) in SPAC-1-L cells after miR-101 overexpression (a), or in HOUA-1 cells following miR-101 knockdown (b), were determined using qRT-PCRs. Anti-miRNA negative control (AC). $^{**}P < 0.01$.

4. MiR-101 は *EZH2*、*MCL-1*、*FOS* を直接制御する.

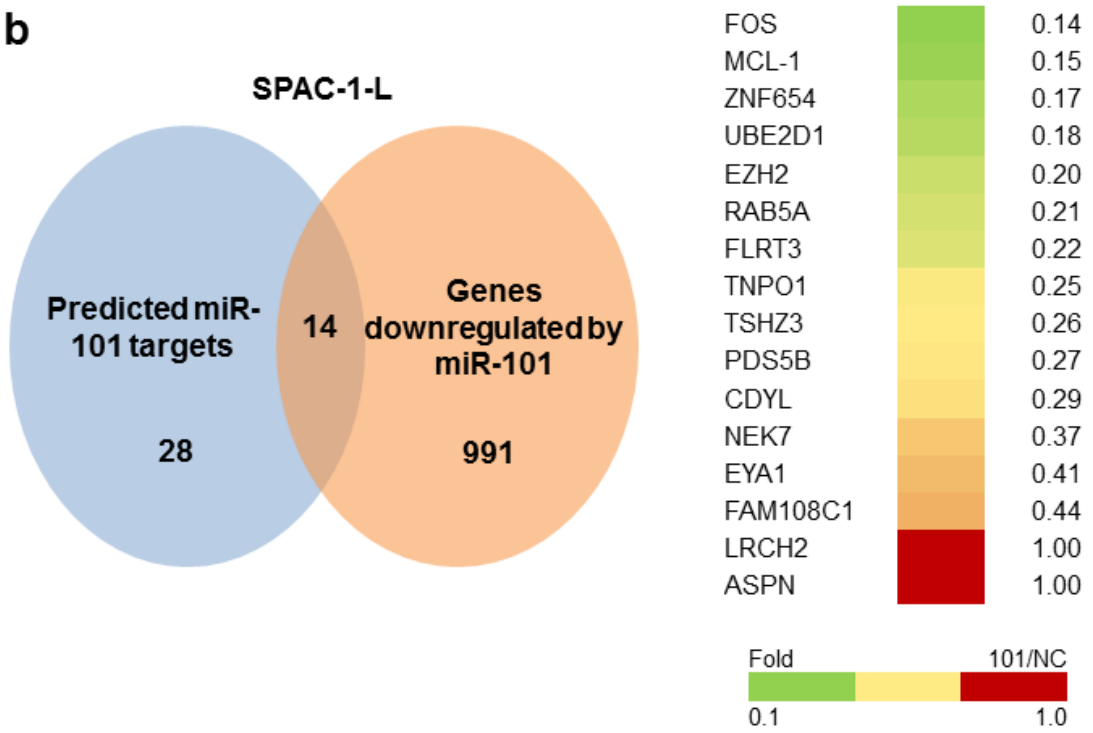
4-1. 14 個の遺伝子が、microRNA 標的候補予測プログラムと microarray analysis によって miR-101 の標的候補として絞り込まれた.

これらの miR-101 の腫瘍抑制効果が直接どんな遺伝子制御によって行われているか調べるために、３つの microRNA の標的予想プログラム（TargetScan, miRNA.org, DIANA-microT）を使用して miR101 の直接標的遺伝子を 28 遺伝子に絞り込んだ（Fig 16a). さらに候補遺伝子を絞り込むために、miR-101 過剰発現 SPAC-1-L 細胞と NC を導入した細胞の遺伝子発現を microarray で比較した。991 個の遺伝子が 101 導入によって減少しており、これらの遺伝子の中で 14 個がプログラムで絞り込んだ 28 個の遺伝子と共通していた（Fig 16b).

Fig16



Twenty eight genes were identified as potential targets of miR-101 by three prediction softwares (TargetScan, miRNA.org and DIANA-microT).

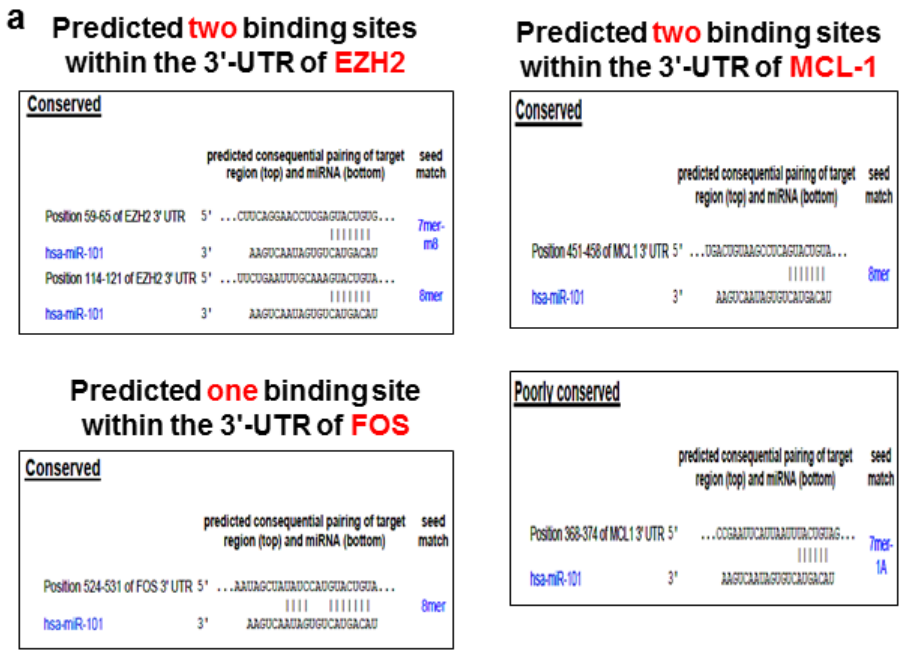


Total RNAs of SPAC-1-L cells transduced with 101 or NC were used for a microarray analysis. Predicted 28 potential targets of miR-101 were shown (left). Transcripts of 991 genes were found to be downregulated by miR-101 mimic (right). The overlapping 14 genes were determined. The heatmap (green and yellow: downregulated 14 genes by miR-101; red: two predicted miR-101 target genes ASPN and LRCH2 whose expression was not affected by transfection with 101). The numbers indicated the fold change of gene expression (Fold 101/NC) in SPAC-1-L cells transduced with 101 compared to NC, as determined by microarray.

4-2. EZH2、MCL-1、FOS は miR-101 の腫瘍抑制効果にかかわる有望な候補遺伝子として浮上した.

これらの 14 個の遺伝子のうち、*EZH2*、*MCL-1*、*FOS* の 3 つにまず注目した. マイクロアレイ解析で、miR-101 導入 SPAC-1-L 細胞は NC と比較して Fold change は 0.2 以下と著明に減少しており (Fig 16b)、Target scan プログラムで検索すると確かに、それぞれの 3'-UTR に miR-101 の結合領域を 1 または 2 個もっていた (Fig 17a). さらに前立腺癌、肺癌、肝癌、卵巣癌などの疾患において、miR-101 の標的として多くの報告があるため (Fig 17b)、この 3 つの遺伝子が高悪性度子宮体癌における miR-101 の標的遺伝子ではないかと考えた.

Fig 17



b

Reported miR-101 targets in human diseases	
Gene name	No. of Studies
EZH2	14
COX-2	4
MCL-1	3
FOS	2

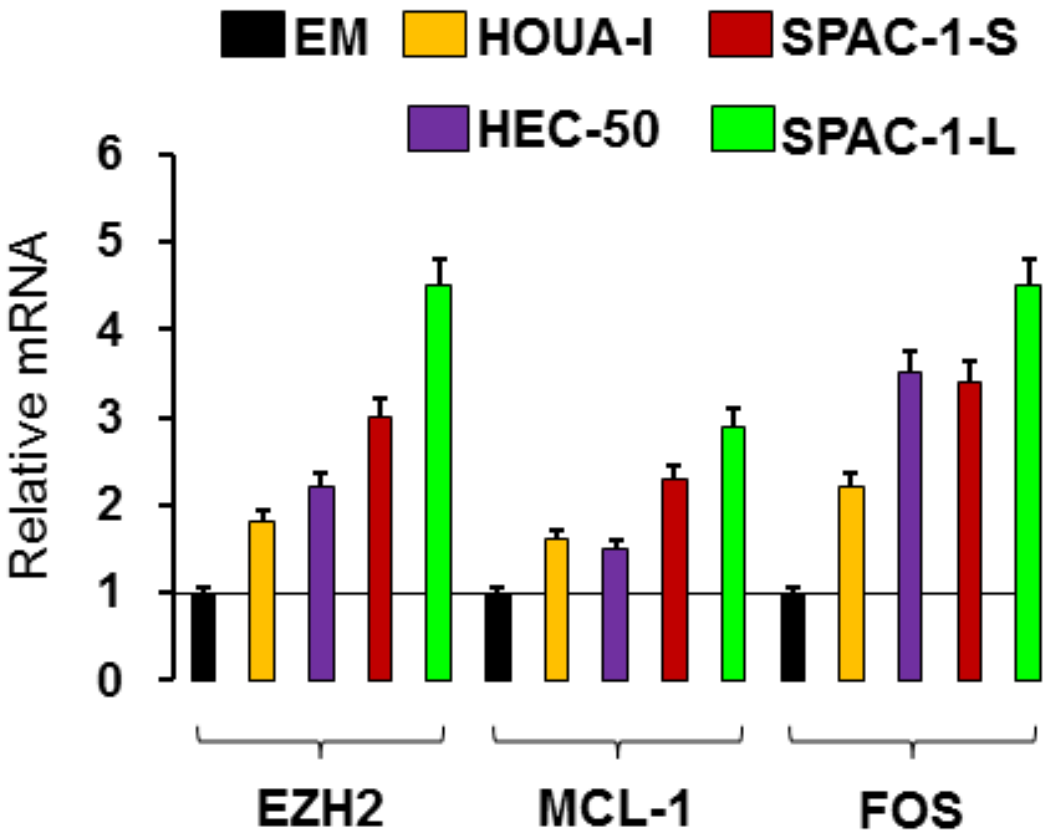
(a)Predicted (TargetScan) binding sites within the 3'-UTR of EZH2 (two binding sites), MCL-1 (two binding sites) and FOS (sole binding site). (b) EZH2, MCL-1 and FOS were known miR-101 targets in human diseases except endometrial cancer.

4-3. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 の発現レベルと *EZH2*、*MCL-1*、*FOS* の mRNA 発現レベルは反比例している.

子宮体癌において、miR-101 が *EZH2*、*MCL-1*、*FOS* を制御する報告はまだない.

実際に高悪性度子宮体癌細胞で miR-101 がこれらの遺伝子を制御しているか調べるために、まず高悪性度子宮体癌細胞株 4 種(SPAC-1-L&S, HEC-50, HOUA-I)と不死化内膜細胞株(EM)において、これら 3 つの遺伝子の mRNA 発現レベルを qRT-PCR で測定した. 4 種の高悪性度子宮体癌細胞株において、*EZH2*、*MCL-1*、*FOS* の mRNA 発現レベルは EM より高く、また内因性 miR-101 の発現レベルと反比例しており、miR-101 がこれらの遺伝子を抑制的に制御している可能性が示唆された (Fig 1、18).

Fig 18

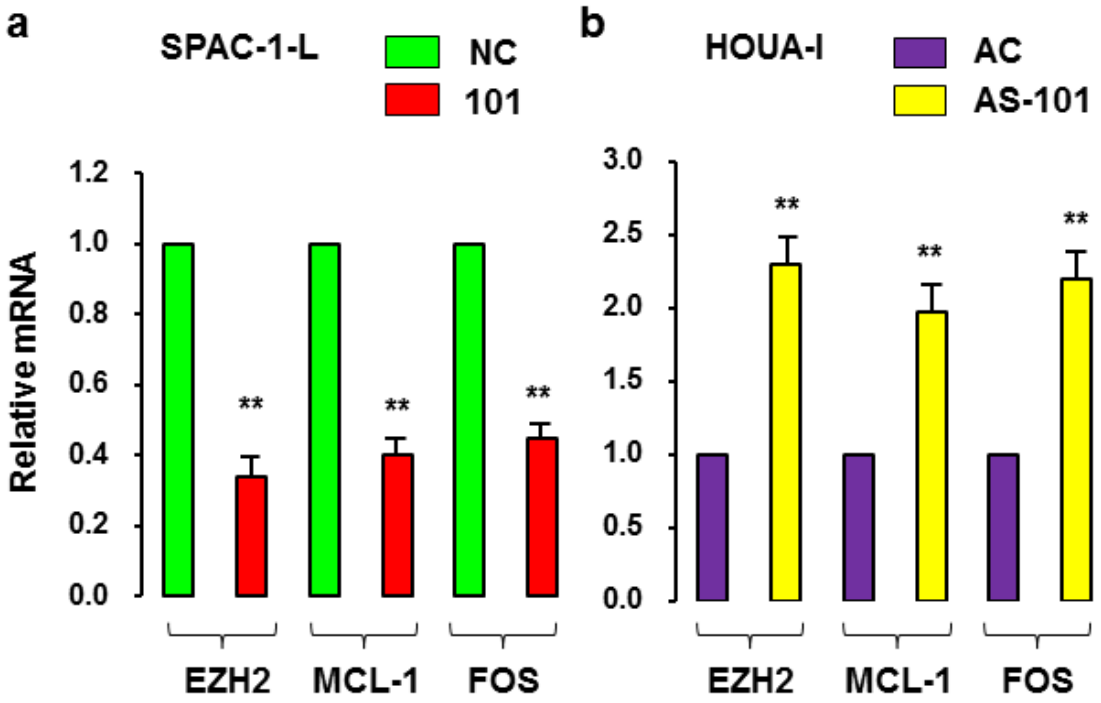


qRT-PCR analysis of EZH2, MCL-1 and FOS in four aggressive endometrial cancer cell lines and immortalized epithelial cell line EM.
Normalization control: GAPDH

4-5. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は *EZH2*、*MCL-1*、*FOS* の mRNA 発現レベルを制御する.

次に miR-101 の発現を変化させたときに、これら 3 つの遺伝子の mRNA 発現レベルが変化するかどうかを調べた. MiR-101 過剰発現 SPAC-1-L 細胞は NC と比較して有意にこれら 3 つの遺伝子の mRNA 発現が低下し (Fig 19a)、逆に miR-101 低下 HOUA-I 細胞は AC に比べて *EZH2*、*MCL-1*、*FOS* の mRNA 発現レベルは有意に上昇した (Fig 19b).

Fig 19

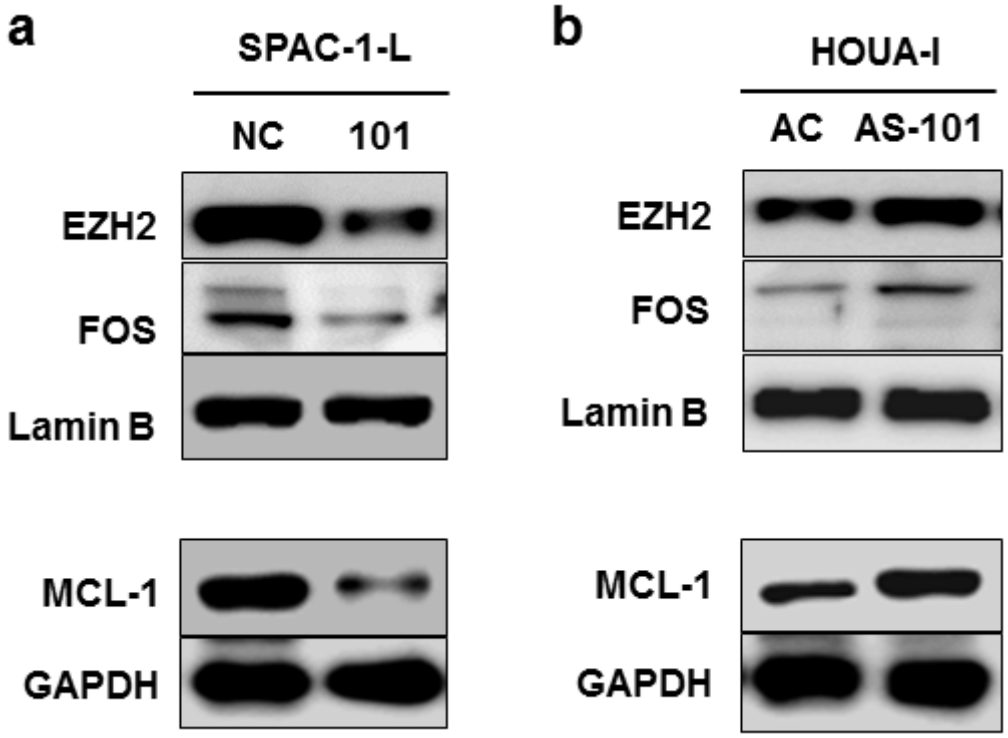


qRT-PCRs showed the downregulation of EZH2, MCL-1 and FOS after miR-101 overexpression in SPAC-1-L cells (a), and the upregulation of these genes after miR-101 knockdown in HOUA-I cells (b).
Normalization control: GAPDH. $^{**}P < 0.01$.

4-6. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は *EZH2*、*MCL-1*、*FOS* のタンパク発現レベルを制御する.

さらに miR-101 の発現を変化させたときに、これら 3 つの遺伝子のタンパク発現レベルが変化するかどうかを調べた. MiR-101 過剰発現 SPAC-1-L 細胞は NC と比較して有意にこれら 3 つの遺伝子のタンパク発現が低下し (Fig 20a)、逆に miR-101 低下 HOUA-I 細胞は AC に比べて EZH2、MCL-1、FOS のタンパク発現レベルは有意に上昇した (Fig 20b).

Fig 20



Western blot analysis of EZH2, MCL-1 and FOS was performed in SPAC-1-L and HOUA-I cells at 72 hours after 101 or anti-miR-101 inhibitor (AS-101) transfection, respectively.
Normalization control for nuclear EZH2 and FOS protein: Lamin B
Normalization control for MCL-1 protein: GAPDH

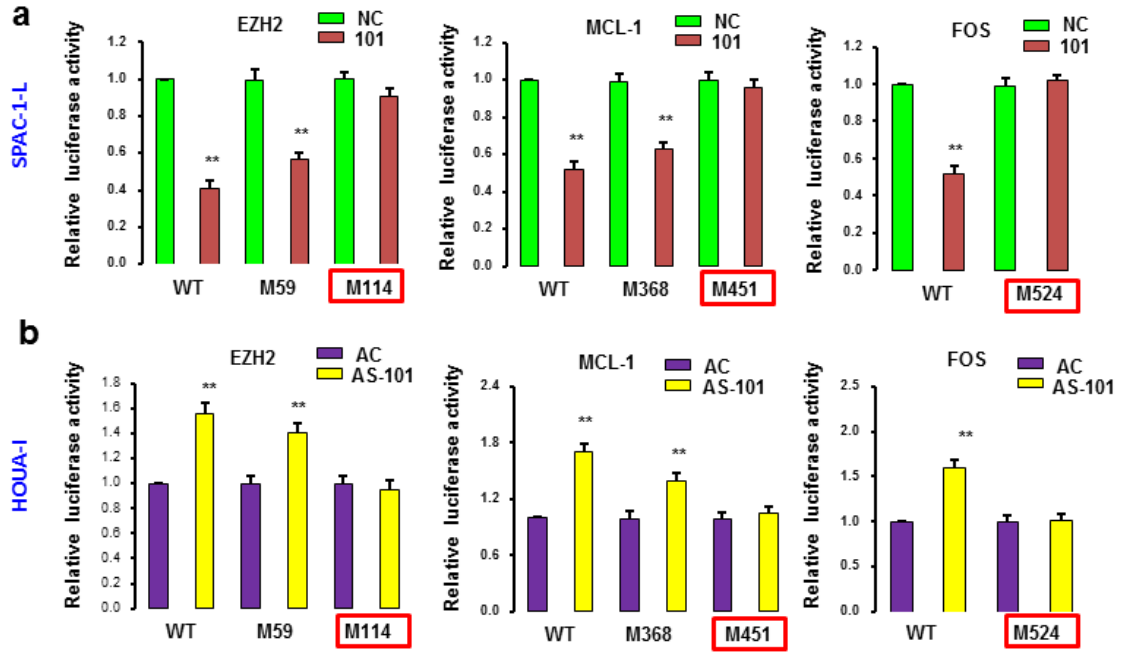
4-7. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は *EZH2*、*MCL-1*、*FOS* の 3´-UTR を介して直接制御することが示唆された.

これらの遺伝子の発現レベルの変化が、miR101 が直接的に 3'-UTR への結合によるものかを調べるために luciferase reporter assay を施行した. それぞれの 3'-UTR を luciferase 遺伝子の下流に導入し、miR-101 もしくは、anti-101、そのコントロールとともにトランスフェクションした.

それぞれの一番左が Wild type であるが、3 遺伝子ともに SPAC-1-L 細胞において、miR-101 を導入すると luciferase 活性は減弱し (Fig 21a)、HOUA-I 細胞で miR-101 を knockdown すると luciferase 活性は増加した (Fig 21b). これらの結果は miR-101 がそれぞれの 3'-UTR を介して直接制御する可能性が示唆された.

また、それぞれの遺伝子は複数の結合領域をもつため、point mutation を作成した. EZH2 では 114-121、MCL-1 では 451-8、FOS では 524-31 の結合領域に mutation を作成すると miR-101 の効果を抑制し、この領域が miR-101 の結合の主な責任領域であると考えられた. これらの領域は 3 遺伝子ともに 8mer－perfect match であった.

Fig 21



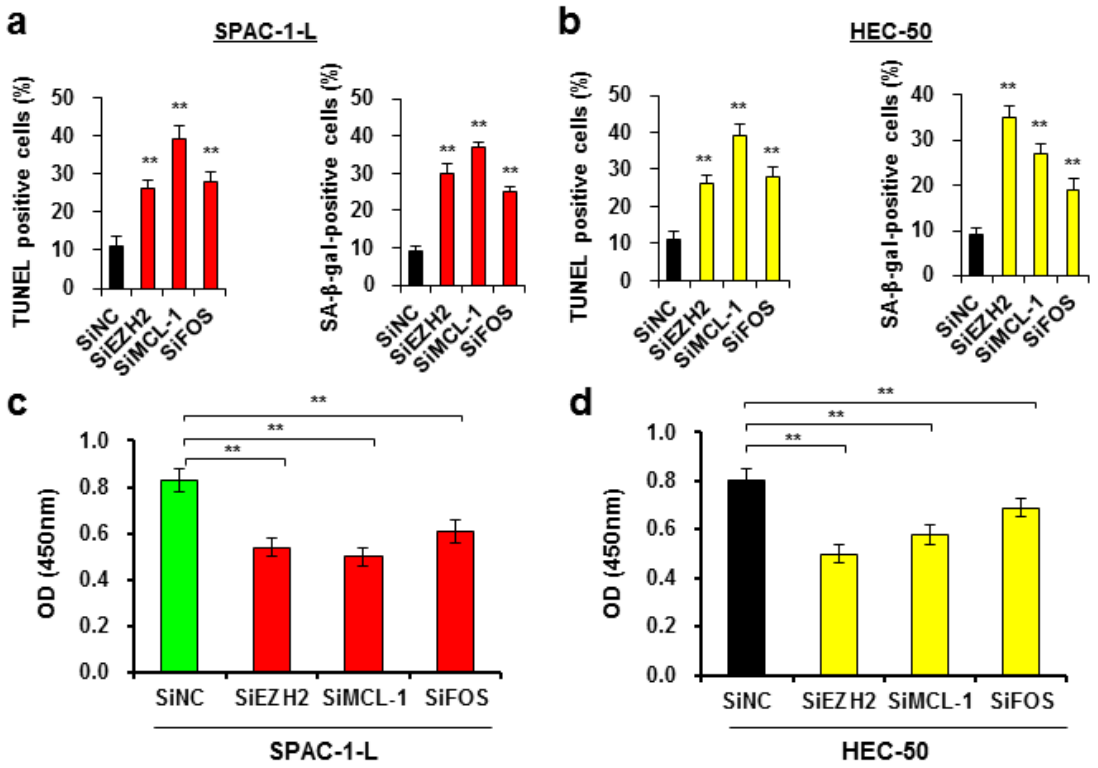
Luciferase reporter assays confirmed that *EZH2*, *MCL-1* and *FOS* were direct targets of miR-101 in SPAC-1-L (a) and HOUA-I cells (b). WT: Wild-type; M: Mutant 3'-UTR. $^{**}P < 0.01$.

5.　高悪性度子宮体癌細胞株において EZH2、MCL-1、FOS の発現の低下が、細胞増殖、浸潤、癌幹細胞様形質を抑制させる.

5-1. 高悪性度子宮体癌細胞株において EZH2、MCL-1、FOS の発現を低下させると、アポトーシス、老化を誘導し、細胞増殖を抑制する.

つぎに miR-101 のアポトーシス、老化を伴う増殖抑制効果が予測した EZH2、MCL-1、FOS の変化によるものかを調べるために、siRNA を用いて各遺伝子を低下させて各種実験を行った. SPAC-1-L 細胞において、各遺伝子の knockdown 細胞では有意に TUNEL 陽性細胞 、SA-β-gal 陽性細胞を増加させ (Fig 22a)、増殖も抑制した(Fig 22c). これらの変化は HEC-50 細胞でも同様の結果を得た(Fig 22b, d). 各 siRNA が各遺伝子のタンパク発現を低下させたことは後述する Western blot analysis で確認した (Fig 24).

Fig 22

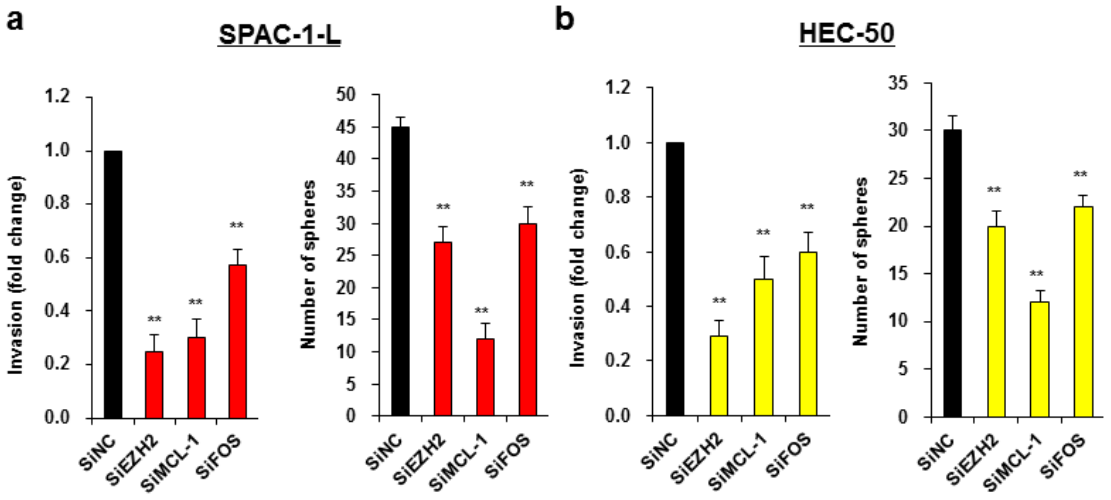


Cell apoptosis and senescence were quantified using SA-β-gal staining assay and TUNEL assay, respectively in SPAC-1-L(a) and HEC-50(b) cells after transduced with specific siRNAs (siEZH2, siMCL-1, siFOS) or control siRNA (siNC). Cell proliferation of SPAC-1-L (c) and HEC-50 (d) cells transfected with specific siRNAs (siEZH2, siMCL-1, siFOS) or control siRNA were quantified using cell counting kit-8 assays. $^{**}P < 0.01$.

5-2. 高悪性度子宮体癌細胞株において EZH2、MCL-1、FOS の発現の低下が細胞浸潤と sphere 形成能を低下させる.

さらに miR-101 の細胞浸潤、sphere 形成能抑制効果が予測した EZH2、MCL-1、FOS の変化によるものかを調べるために、同様に siRNA を用いて各遺伝子を低下させて invasion assay と sphere formation assay を行った. SPAC-1-L 細胞, において、各遺伝子の発現抑制は有意に浸潤、sphere 形成能を低下させた (Fig 23a). HEC-50 細胞においても同様の結果が得られた (Fig 23b). これらの結果は高悪性度子宮体癌細胞において miR-101 が及ぼす腫瘍抑制効果と類似していた.

Fig 23



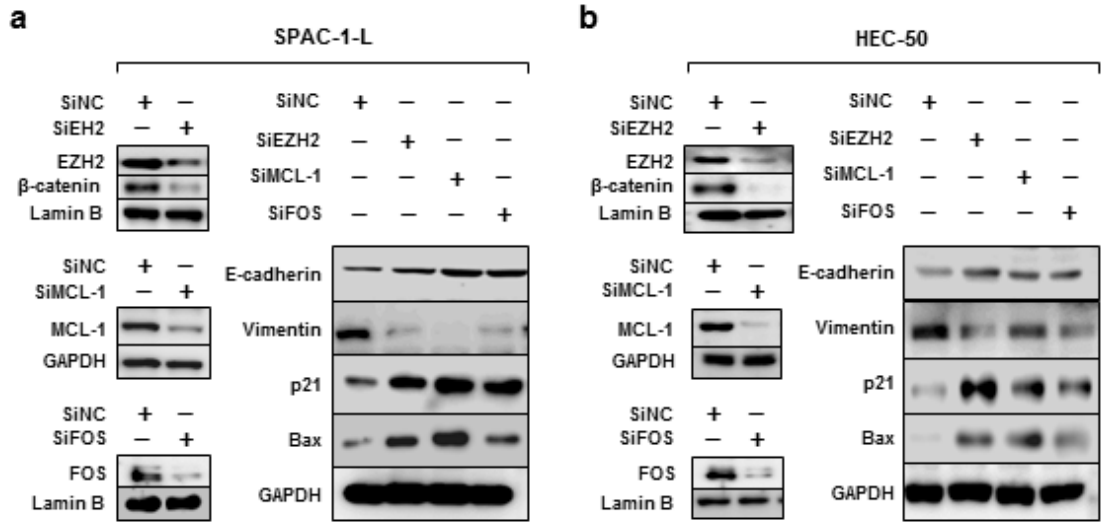
SPAC-1-L and HEC-50 cells were transduced with specific siRNAs (siEZH2, siMCL-1, siFOS) or control siRNA (siNC) along with analysis of cell invasion and sphere formation ability (a and b) were conducted as indicated.
$^{**}P < 0.01$.

5-3. 高悪性度子宮体癌細胞株においてEZH2、MCL-1、FOSの発現の低下は細胞老化、アポトーシス関連タンパクの発現を誘導し、EMT/癌幹細胞様関連タンパクを低下させる.

さらに、これらの細胞機能の変化をタンパクレベルで確かめるためにwestern blot analysisを行った. SPAC-1-L細胞において、siRNAを用いて各遺伝子の発現を低下させると、細胞老化関連タンパクp21、アポトーシスマーカーBax、上皮系マーカーE-cadherinは上昇し、間葉系マーカーvimentin、癌幹細胞にかかわるとされるβ-cateninは低下した（Fig 24a). HEC-50細胞においても同様の結果が得られた（Fig 24b).

以上のことを総合すると、miR-101による*EZH2*、*MCL-1*、*FOS*を含む多数の癌遺伝子の抑制が細胞増殖、浸潤、EMT/癌幹細胞様形質を制御していることが推察された.

Fig 24

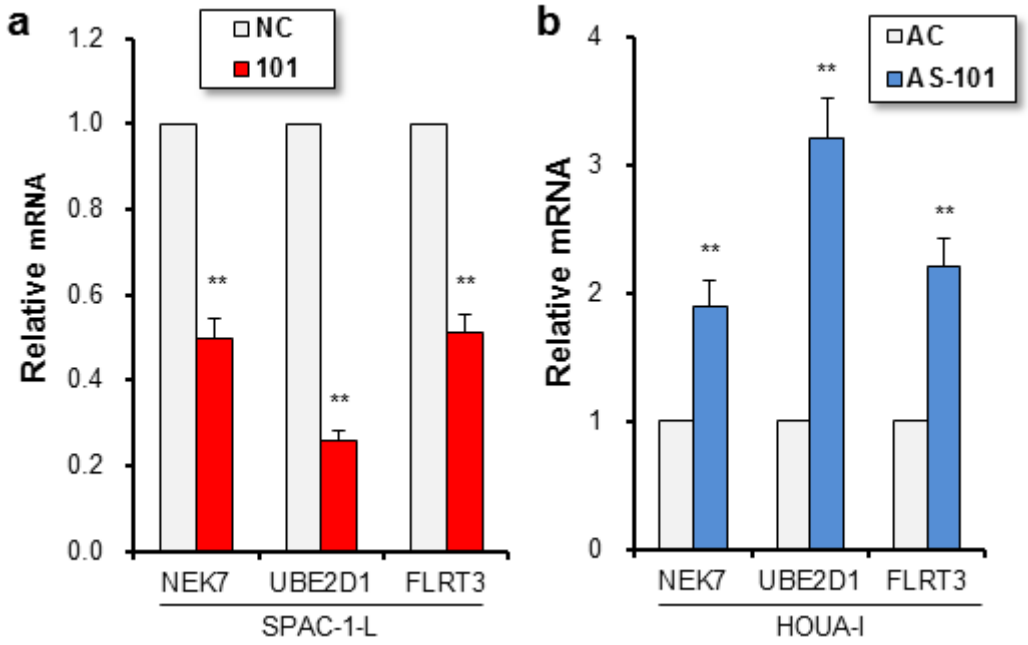


Western blot analysis was performed in SPAC-1-L and HOUA-I cells at 72 hours after specific siRNA transfection, respectively.
Normalization control for nuclear EZH2, FOS and β-catenin protein: Lamin B
Normalization control for MCL-1, E-cadherin, Vimentin, p21 and Bax protein: GAPDH

6. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は癌関連遺伝子 *NEK7*、*UBE2D1* 、FLRT3 の mRNA 発現も抑制する.

MiR-101 は EZH2、MCL-1、FOS 以外にも多数の mRNA の発現を抑制しているため、microarray などで絞り込んだ 14 個の遺伝子（Fig 16b）のうち、癌遺伝子との報告がある NEK7、UBE2D1 、FLRT3 に注目し、ｑRT-PCR を行った. QRT-PCR で、miR-101 の過剰発現は SPAC-1-L において各遺伝子の mRNA 発現を抑制し(Fig 25a)、miR-101 の発現低下が HOUA-I において各遺伝子の mRNA 発現の上昇(Fig 25b)が確かめられた. *NEK7* (NIMA-related kinase 7)は、胆のうがんにおいて高発現が予後不良と関係するとされ[35]、UBE2D1(ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1)はｐ53 の抑制因子として[36]、FLRT3(fibronectin leucine rich transmembrane protein 3)は FGF レセプターとともに MAPkinase カスケードを活性化すると報告されている[37]. しかしながら、これの遺伝子は癌遺伝子の可能性が考えられるが、まだ未解明の部分が多く、これらの遺伝子も miR-101 の腫瘍抑制効果に関与している可能性が考えられ、今後の研究課題の一つである.

Fig 25



qRT-PCRs showed the downregulation of NEK7, UBE2D1 and FLRT3 after miR-101 overexpression in SPAC-1-L cells (left), and the upregulation of these genes after miR-101 knockdown in HOUA-I cells (right). $^{**}P < 0.01$.

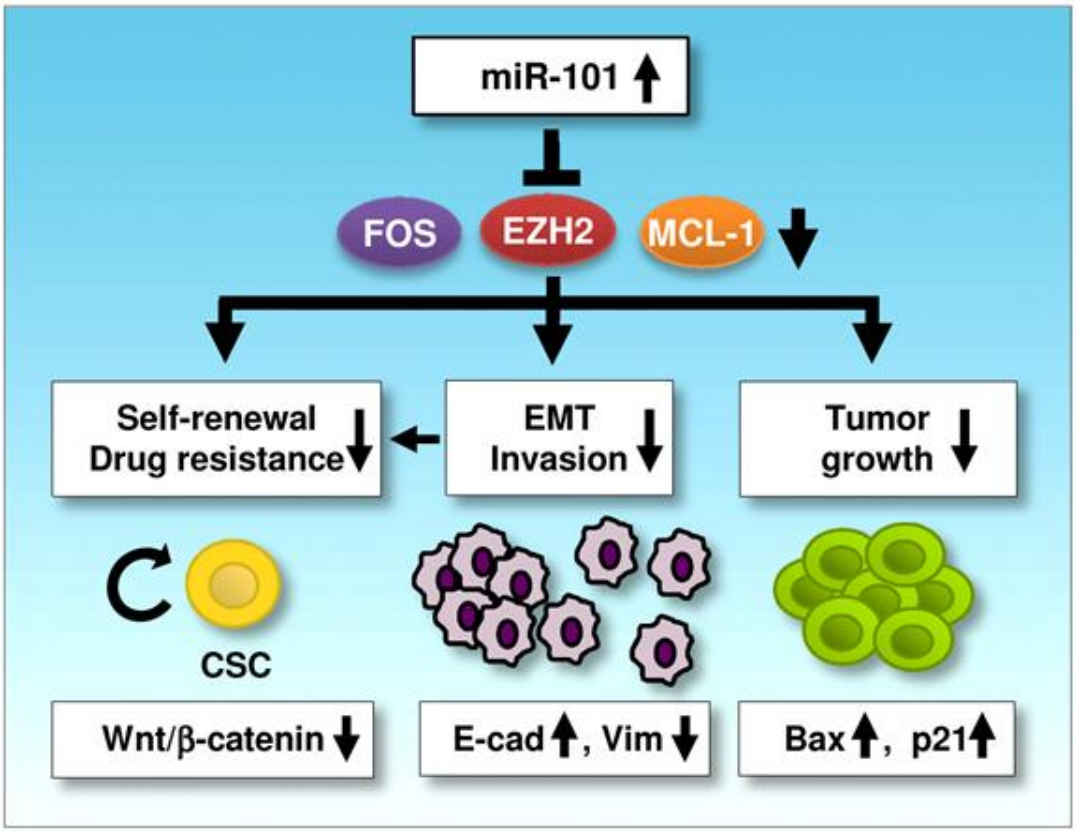
考察

MiRNA は同時に複数の標的遺伝子の発現を抑制する能力をもち、また間接的にその標的遺伝子のパスウエィの下流遺伝子をも制御することによって癌細胞の形質や機能に影響を与える[38,39]. ヒト悪性腫瘍において正常組織と比較して発現レベルが異なる miRNA の細胞に及ぼす機能や、そのメカニズムの解明は新しい miRNA 治療薬の開発につながる非常に重要な知見である. 過去の報告では、ヒト悪性腫瘍において miR-101 は腫瘍抑制的に機能するとの報告が多いが、悪性腫瘍組織において miR-101 の発現上昇が認められたり、特定の条件下では腫瘍促進的に働く可能性をしめす報告もなされている[40-42]. 高悪性度子宮体癌における miR-101 の機能や、その下流の標的遺伝子についての報告はまだなされていなかった.

本研究では、高悪性度子宮体癌細胞株における miR-101 の発現レベルが子宮内膜不死化細胞株と比較して有意に低下していることを証明した. また、高悪性度子宮体癌細胞株において、miR-101 の発現レベルを上昇させると、アポトーシス、細胞老化を誘導し細胞増殖、コロニー形成能を抑制することを示した. さらに、miR-101 過剰発現が間葉上皮転換を生じさせ、細胞運動能、浸潤能、sphere 形成能を抑制し、パクリタキセルに対する耐性を減弱させることも示すことができた. microRNA 標的候補予測プログラムと microarray analysis によって miR-101 の標的候補を絞り込み、その中から *EZH2*、*MCL-1* 、*FOS* の 3 つの遺伝子が miR-101 の直接標的遺伝子であることを luciferase reporter assay を用いて証明した.これら 3 遺伝子を特異的 siRNA によって発現低下させると、高悪性度子宮体癌細胞における miR-101 の腫瘍抑制効果とほぼ類似する抗腫瘍効果を示した. これらの結果は、高悪性度子宮体癌細胞において、miR-101 が細胞増殖、運動、浸潤、癌幹細胞形質などの多数の悪性形質を EZH2、MCL-1、FOS の発現を抑制することによって少なくとも部分的には制御することを証明した最初の報告である (Fig. 26). 本研究の結果は miR-101 の発現低下による子宮体癌の発症や進行のメカニズムの解明に新しい見識をあたえるものと考える.

Fig 26

A proposed model depicting the mechanisms of miR-101-mediated tumor suppression



In aggressive EC cells, miR-101 can downregulate three novel oncogenes (EZH2, MCL-1 and FOS), in turn suppresses tumor cell proliferation, EMT, cell migration, invasion and cancer stemness, and enhances chemosensitivity to paclitaxel.
E-cadherin: E-cad; Vimentin: Vim

EZH2－Enhancer zeste homolog2 はショウジョウバエの胚発生の初期において体節制を決定する遺伝子である Hox gene を抑制する遺伝子として発見された polycomb group protein のひとつで[43]、腫瘍抑制遺伝子を epigenetic に抑制することによって、癌の進展に大きな役割を果たす重要な遺伝子である[44]. 多くのヒト悪性腫瘍組織において、EZH2 の高発現が予後の悪さや、進行度と関係する指標となると報告されている[45]. 細胞株への導入や発現抑制実験において、EZH2 を過剰発現させると腫瘍抑制遺伝子 TIMP-3 を低下させることによって浸潤能を上昇させ、EZH2 を低下させると細胞老化や、アポトーシス、間葉上皮転換を誘導するとされる[46,47].また、癌幹細胞形質の維持に EZH2 の機能が必要であるとの報告もある[48]. 子宮体癌の最近の研究では、EZH2 の高発現が浸潤、転移と関連し[49,50]、子宮体癌細胞の EZH2 発現を shRNA で低下させると、E-cadherin の上昇や、Wnt/β-catenin 経路の抑制によって細胞増殖、運動、浸潤能を抑制することも報告されている[51]. MiR-101 が EZH2 を直接抑制することは、他癌種において証明されているが[21,52]、本研究の結果は、高悪性度子宮体癌細胞において、miR-101 は Bax、p21、上皮系マーカー、TIMP-3 の上昇、間葉系マーカー、Wnt/β-catenin 経路の抑制とともに、EZH2 の発現を抑制するとによってアポトーシス、細胞老化を誘導するだけでなく、EMT、癌幹細胞様形質をも抑制すること示した(Fig 23a、b).

EZH2 に加えて、２つの miR-101 標的遺伝子 *MCL*-1 と *FOS* も、腫瘍増殖や転移に関わるとされており本研究の対象とした.

MCL-1-Myeloid cell leukemia sequence 1 は Bcl-2 family のひとつで、骨髄性白血病細胞株 ML-1 の初期に分化誘導されるものとして発見された抗アポトーシス遺伝子であり[53,54]、細胞老化も抑制する[55]. MCL-1 の発現上昇が、細胞増殖[53]、運動[56]、癌幹細胞の自己複製[57]、パクリタキセルに対する耐性[58]を促進させる. 子宮体癌組織においても、正常子宮内膜と比較して MCL-1 の mRNA の発現上昇が報告されている[59].

FOS-FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog は Finkel-Biskis-Jinkins osteosarcoma virus のがん遺伝子として発見されたもので JUN ファミリーと２量体を形成して、標的遺伝子のプロモーターやエンハンサーに結合して転写を促進する AP-1complex として機能する遺伝子であり、癌細胞の増殖、運動、浸潤、EMT を促進する[60-62]. 子宮体癌組織においても、正常子宮内膜と比較して FOS の mRNA は高発現しており[63]、FOS の高発現は有意にホルモンレセプターの低発現や分化度の低さなどの悪性度と関連する[64]. 最近の研究では、乳癌細胞において、FOS の発現を低下させることにより Bax の発現が上昇しアポトーシスを誘導することが示された[65]. しかしながら、FOS が腫瘍抑制的に機能するとの報告もあり[66]、miR-101 による子宮体癌細胞の増殖、浸潤、癌幹細胞様形質

の抑制にMCL-1、FOSの発現抑制が寄与しているかどうかは明らかになっていなかった. 本研究では、高悪性度子宮体癌細胞において、特異的siRNAを用いて、*MCL-1*、*FOS*の発現をそれぞれ減少させるとアポトーシス、細胞老化を誘導しEMTに関連する細胞浸潤、sphere形成能を抑制することを明らかにした. 肝細胞がんにおいて、miR-101によりMCL-1[67]とFOS[68]の発現が制御されるとの報告と一致して、本研究ではさらにmiR-101が高悪性度子宮体癌細胞においてMCL-1とFOSを直接制御することを示すことができた.

MiR-101は複数の癌遺伝子であるEZH2、MCL-1、FOSを抑制することによって、子宮体癌の増殖、転移を多段階において抑制できる可能性が示唆された.

総括および結論

本研究全体より以下に示す主な 6 項目の新知見が得られた.

1. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 の発現は低下している.
2. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 はアポトーシス、細胞老化を誘導し細胞増殖、コロニー形成能を抑制する.
3. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は細胞運動能、浸潤能、EMT/癌幹細胞形質を抑制する.
4. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は EZH2、MCL-1、FOS を直接制御し発現を抑制する.
5. 高悪性度子宮体癌細胞株において特異的 siRNA による EZH2、MCL-1、FOS の発現の低下が、細胞増殖、浸潤、癌幹細胞様形質を抑制する.
6. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は癌関連遺伝子 NEK7、UBE2D1 、FLRT3 の mRNA 発現も抑制する.

本研究では、高悪性度子宮体癌細胞において、miR-101 は複数の重要な腫瘍促進遺伝子を制御することによって、細胞増殖、浸潤、癌幹細胞様形質を抑制する重要な腫瘍抑制 microRNA であることを証明した. MiR-101-EZH2/MCL-1/FOS 分子経路は子宮体癌における新しい治療標的となり、miR-101 の子宮体癌への補充、EZH2、MCL-1、FOS インヒビター、またその併用が子宮体癌の進行抑制や抗がん剤耐性の解除に寄与できる可能性がある.

MiR-101 の標的遺伝子は NEK7、UBE2D1 、FLRT3 のほかにも多数あり、これらの遺伝子が miR-101 の子宮体癌の腫瘍抑制効果に関与している可能性が考えられ、その機能解析は今後の研究課題である. 本研究は、*in vitro* のみの検討であり、*in vivo* において実際に miR-101 が腫瘍抑制的に機能するかは不明である.

また治療薬としての可能性を考慮すると他の正常臓器や正常子宮内膜への影響の解明や、効果的な腫瘍特異的なドラッグデリバリーシステムの開発も必要であろう. これらの問題を解明し、現時点で治療抵抗性である高悪性度子宮体癌の新しい治療法の発展に貢献していきたい.

謝辞

本研究にあたりご指導をいただきました北海道大学大学院医学研究科生殖内分泌・腫瘍学分野　櫻木範明教授に深謝いたします．また、計画の立案、実験手技、実験結果などのディスカッション、論文作成などでご指導いただきました董　培新先生、徐　祝潔先生に、深くお礼申し上げます．

引用文献

1 Banno, K. et al. Biomarkers in endometrial cancer: Possible clinical applications (Review). Oncol. Lett. 3, 1175-1180 (2012).

2 Creasman, W. T. et al. Carcinoma of the corpus uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. Int. J. Gynaecol. Obstet. 95 Suppl 1, S105-143 (2006).

3 Bokhman, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. Gynecol. Oncol. 15, 10-17 (1983).

4 Plataniotis, G. & Castiglione, M. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann. Oncol. 21 Suppl 5, v41-45 (2010).

5 Slomovitz, B. M. et al. Uterine papillary serous carcinoma (UPSC): a single institution review of 129 cases. Gynecol. Oncol. 91, 463-469 (2003).

6 Alvarez, T., Miller, E., Duska, L. & Oliva, E. Molecular profile of grade 3 endometrioid endometrial carcinoma: is it a type I or type II endometrial carcinoma? Am. J. Surg. Pathol. 36, 753-761 (2012).

7 Samarnthai, N., Hall, K. & Yeh, I. T. Molecular profiling of endometrial malignancies. Obstet. Gynecol. Int. 2010, 162363 (2010).

8 Dunton, C. J., Balsara, G., McFarland, M. & Hernandez, E. Uterine papillary serous carcinoma: a review. Obstet. Gynecol. Surv. 46, 97-102 (1991).

9 Soslow, R. A. et al. Clinicopathologic analysis of 187 high-grade endometrial carcinomas of different histologic subtypes: similar outcomes belie distinctive biologic differences. Am. J. Surg. Pathol. 31, 979-987 (2007).

10 Mhawech-Fauceglia, P. et al. Gene Expression Profiles in Stage I Uterine Serous Carcinoma in Comparison to Grade 3 and Grade 1 Stage I Endometrioid Adenocarcinoma. Plos One 6 , e18066 (2011).

11 Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7, 131-142 (2006).

12 Jing, Y. Y. et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment. Cell Biosci . 1, 29 (2011).

13 Singh, A. & Settleman, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. Oncogene 29, 4741-4751 (2010).

14 Dong, P. et al. Emerging therapeutic biomarkers in endometrial cancer. Biomed. Res. Int. 2013, 130362 (2013).

15 Takebe, N., Warren, R. Q. & Ivy, S. P. Breast cancer growth and metastasis:

interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. Breast Cancer Res.13, 211 (2011).

16 Lujambio, A. & Lowe, S. W. The microcosmos of cancer. Nature 482, 347-355 (2012).

17 Olivieri, F. et al. MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. Ageing Res. Rev.12, 1056-1068 (2013).

18 Croce, C. M. & Calin, G. A. miRNAs, cancer, and stem cell division. Cell 122, 6-7 (2005).

19 Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat. Rev. Cancer 6, 259-269 (2006).

20 Yanaihara, N. et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell 9, 189-198 (2006).

21 Zhang, J.-g., Guo, J.-F., Liu, D.-L., Liu, Q. & Wang, J.-J. MicroRNA-101 Exerts Tumor-Suppressive Functions in Non-small Cell Lung Cancer through Directly Targeting Enhancer of Zeste Homolog 2. J. Thorac. Oncol. 6, 671-678 (2011).

22 Volinia, S. et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 2257-2261 (2006).

23 Jiang, F. et al. MiR-125b promotes proliferation and migration of type II endometrial carcinoma cells through targeting TP53INP1 tumor suppressor in vitro and in vivo. BMC Cancer 11, 425 (2011).

24 Dong, P. et al. MicroRNA-194 inhibits epithelial to mesenchymal transition of endometrial cancer cells by targeting oncogene BMI-1. Mol. Cancer 10, 99 (2011).

25 Dong, P. et al. Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. Oncogene 32, 3286-95 (2012).

26 Dong, P., Kaneuchi, M., Watari, H., Sudo, S. & Sakuragi, N. MicroRNA-106b modulates epithelial-mesenchymal transition by targeting TWIST1 in invasive endometrial cancer cell lines. Mol. Carcinog. 53, 349-59 (2013).

27 Hiroki, E. et al. MicroRNA-34b functions as a potential tumor suppressor in endometrial serous adenocarcinoma. Int. J. Cancer 131, 395-404 (2012).

28 Hiroki, E. et al. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. Cancer Sci. 101, 241-249 (2010).

29 Ren, G. et al. Polycomb protein EZH2 regulates tumor invasion via the transcriptional repression of the metastasis suppressor RKIP in breast and prostate cancer. Cancer Res. 72, 3091-3104 (2012).

30 Strillacci, A. et al. Loss of miR-101 expression promotes Wnt/beta-catenin

signalling pathway activation and malignancy in colon cancer cells. J. Pathol. 229, 379-389 (2013).

31 Cho, H. M. et al. microRNA-101 inhibits lung cancer invasion through the regulation of enhancer of zeste homolog 2. Exp. Ther. Med. 2, 963-967 (2011).

32 Semaan, A. et al. MicroRNA-101 Inhibits Growth of Epithelial Ovarian Cancer by Relieving Chromatin-Mediated Transcriptional Repression of p21(waf1/cip1). Pharm. Res. 28, 3079-3090 (2011).

33 He, X. P. et al. Downregulation of miR-101 in gastric cancer correlates with cyclooxygenase-2 overexpression and tumor growth. FEBS J. 279, 4201-4212 (2012).

34 Loughlin, D. T. & Artlett, C. M. Modification of collagen by 3-deoxyglucosone alters wound healing through differential regulation of p38 MAP kinase. PLoS One 6, e18676 (2011).

35 Wang, R., Song, Y., Xu, X., Wu, Q. & Liu, C. The expression of Nek7, FoxM1, and Plk1 in gallbladder cancer and their relationships to clinicopathologic features and survival. Clin. Transl. Oncol. 15, 626-632 (2013).

36 Bonome, T. et al. Expression profiling of serous low malignant potential, low-grade, and high-grade tumors of the ovary. Cancer Res. 65, 10602-10612 (2005).

37 Karaulanov, E. E., Bottcher, R. T. & Niehrs, C. A role for fibronectin-leucine-rich transmembrane cell-surface proteins in homotypic cell adhesion. Embo Rep. 7, 283-290 (2006).

38 Yan, J., Gumireddy, K., Li, A. & Huang, Q. Regulation of mesenchymal phenotype by MicroRNAs in cancer. Curr. Cancer Drug Targets 13, 930-934 (2013).

39 Zhong, X., Coukos, G. & Zhang, L. miRNAs in human cancer. Methods Mol. Biol. 822, 295-306 (2012).

40 Sachdeva, M. et al. MicroRNA-101-mediated Akt activation and estrogen-independent growth. Oncogene 30, 822-831 (2011).

41 Lee, K. H. et al. MicroRNA-330 acts as tumor suppressor and induces apoptosis of prostate cancer cells through E2F1-mediated suppression of Akt phosphorylation. Oncogene 28, 3360-3370 (2009).

42 Chen, S., Wang, H., Ng, W. L., Curran, W. J. & Wang, Y. Radiosensitizing effects of ectopic miR-101 on non-small-cell lung cancer cells depend on the endogenous miR-101 level. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 81, 1524-1529 (2011).

43 Sparmann, A. & van Lohuizen, M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. Nat. Rev. Cancer 6, 846-856 (2006).

44 Crea, F. et al. EZH2 inhibition: targeting the crossroad of tumor invasion and

angiogenesis. Cancer Metastasis Rev. 31, 753-761 (2012).

45 Chase, A. & Cross, N. C. Aberrations of EZH2 in cancer. Clin. Cancer Res. 17, 2613-2618 (2011).

46 Alimova, I. et al. Inhibition of EZH2 suppresses self-renewal and induces radiation sensitivity in atypical rhabdoid teratoid tumor cells. Neuro. Oncol. 15, 149-160 (2013).

47 Moore, H. M. et al. EZH2 inhibition decreases p38 signaling and suppresses breast cancer motility and metastasis. Breast Cancer Res. Treat. 138, 741-752 (2013).

48 van Vlerken, L. E. et al. EZH2 is required for breast and pancreatic cancer stem cell maintenance and can be used as a functional cancer stem cell reporter. Stem Cells Transl. Med . 2, 43-52 (2013).

49 Bachmann, I. M. et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. J. Clin. Oncol. 24, 268-273 (2006).

50 Zhou, J. et al. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) and focal adhesion kinase (FAK) in high grade endometrial carcinoma. Gynecol. Oncol. 128, 344-348 (2013).

51 Eskander, R. N. et al. Inhibition of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is associated with decreased tumor cell proliferation, migration, and invasion in endometrial cancer cell lines. Int. J. Gynecol. Cancer 23, 997-1005 (2013).

52 Cao, P. et al. MicroRNA-101 negatively regulates Ezh2 and its expression is modulated by androgen receptor and HIF-1alpha/HIF-1beta. Mol. Cancer 9, 108 (2010).

53 Quinn, B. A. et al. Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer. Expert Opin. Investig. Drugs 20, 1397-1411 (2011).

54 Akgul, C. Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. Cell. Mol. Life Sci. 66, 1326-1336 (2009).

55 Bolesta, E. et al. Inhibition of Mcl-1 promotes senescence in cancer cells: implications for preventing tumor growth and chemotherapy resistance. Mol. Cell. Biol. 32, 1879-1892 (2012).

56 Gao, J. et al. MiR-26a inhibits proliferation and migration of breast cancer through repression of MCL-1. PLoS One 8, e65138 (2013).

57 Singh, S., Bora-Singhal, N., Kroeger, J., Laklai, H. & Chellappan, S. P. betaArrestin-1 and Mcl-1 modulate self-renewal growth of cancer stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. PLoS One 8, e55982 (2013).

58 Wertz, I. E. et al. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by

MCL1 and FBW7. Nature 471, 110-114 (2011).

59 Hirata, H. et al. Function of UDP-glucuronosyltransferase 2B17 (UGT2B17) is involved in endometrial cancer. Carcinogenesis 31, 1620-1626 (2010).

60 Eferl, R. & Wagner, E. F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. Nat. Rev. Cancer 3, 859-868 (2003).

61 Li, T. et al. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. Nat. Immunol . 11, 799-805 (2010).

62 Fialka, I. et al. The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. J. Cell Biol. 132, 1115-1132 (1996).

63 Fujimoto, J., Hori, M., Ichigo, S., Morishita, S. & Tamaya, T. Clinical implication of fos and jun expressions and protein kinase activity in endometrial cancers. Eur. J. Gynaecol. Oncol. 16, 138-146 (1995).

64 Bamberger, A. M., Milde-Langosch, K., Rossing, E., Goemann, C. & Loning, T. Expression pattern of the AP-1 family in endometrial cancer: correlations with cell cycle regulators. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 127, 545-550 (2001).

65 Shi, R. et al. Down-regulation of c-fos by shRNA sensitizes adriamycin-resistant MCF-7/ADR cells to chemotherapeutic agents via P-glycoprotein inhibition and apoptosis augmentation. J. Cell. Biochem. 114, 1890-1900 (2013).

66 Teng, C. S. Protooncogenes as mediators of apoptosis. Int. Rev. Cytol. 197, 137-202 (2000).

67 Su, H. et al. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. Cancer Res. 69, 1135-1142 (2009).

68 Li, S. et al. MicroRNA-101 Regulates Expression of the v-fos FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog (FOS) Oncogene in Human Hepatocellular Carcinoma. Hepatology 49, 1194-1202 (2009).