



Title	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
Author(s)	井平, 圭
Description	配架番号 : 2277
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12536号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12536
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65886
Type	doctoral thesis
File Information	Kei_Ihira.pdf



学 位 論 文

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)

2017年3月

北 海 道 大 学

井 平 圭

学 位 論 文

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)

2017年3月

北 海 道 大 学

井 平 圭

目 次

発表論文目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	1 1 頁
実験方法	1 2 頁
実験結果	1 7 頁
考察	3 4 頁
総括および結論	4 0 頁
謝辞	4 1 頁
引用文献	4 2 頁

発 表 論 文 目 録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

Peixin Dong, Kei Ihira, Ying Xiong

Reactivation of epigenetically silenced miR-124 reverses the epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits invasion in endometrial cancer cells via the direct repression of IQGAP1 expression

Oncotarget, 7 • 20260–20270, (2016)

緒言

1. 子宮体癌の臨床的背景

1-1. 本邦における子宮体癌の現状

子宮体癌 (Endometrial cancer) は、わが国を含む工業先進諸国で発症数が急増しており¹、国立がん研究センターがん情報サービスの地域がん登録全国推計による罹患データによれば、日本における 2012 年の罹患数は 13606 である²。罹患数の増加の背景にはライフスタイルの変化（食生活の欧米化、妊娠・出産回数の減少）、肥満の増加、高齢化などのリスク因子の増加があると考えられている。

子宮体癌では、癌の進展の早い段階から不正性器出血が症状として認められ、早期に診断される割合が高く、子宮体癌全体の 5 年生存率は約 80% と他の婦人科癌と比較して予後良好である。しかし、進行期別にみると他の婦人科癌と比べて予後が良いということはない。予後を規定するものとして重要なのは進行期であるが、病理組織学的予後因子として、脈管侵襲、組織分化度、リンパ節転移、漿膜浸潤、組織型などが挙げられる。特に組織型により臨床経過や予後は大きく異なる。例えば、すべての進行期を含む類内膜腺癌全体の 5 年生存率が 83.2% であるのに対し、漿液性腺癌ではわずか 52.6% にとどまる³。

子宮体癌の治療は、子宮摘出、両側付属器切除、骨盤内および傍大動脈リンパ節郭清を行う手術療法が基本であるが、進行期、脈管侵襲、組織型などの予後因子の有無により、補助療法として、ホルモン療法、抗癌剤治療、放射線治療などが選択される³。しかしリンパ節などに転移、再発をきたした場合にこれらの効果は限定的であり、進行・再発例や予後不良の組織型に対する新たな治療戦略の確立が求められている³。

1-2. 子宮体癌の分類、診断および治療

子宮体癌は子宮内膜に発生する上皮性悪性腫瘍であるが、組織学的に子宮内膜増殖症を伴うものと萎縮内膜を背景とするものがあることが知られていた。1983 年に Bokhman らは、その臨床経過、疫学、組織学的な観察をもとにして、子宮体癌を二つのタイプに分類することを提唱した⁴。一つは、閉経前あるいは閉経直後の女性に多く、エストロゲン単独の持続的な刺激や肥満に関連し、異型

増殖した子宮内膜から発生するタイプである¹。不正性器出血などの症状を呈しやすいためから早期に診断されることが多い。手術での完全切除が可能な症例が多く予後は良好であり、タイプ I 子宮体癌（以下タイプ I 体癌と表記）と呼ばれる。タイプ I 体癌は子宮体癌全体の約 80%を占めており、高分化型／中分化型（Grade1-2）類内膜腺癌が大部分である。もう一方は、エストロゲン非依存性で、萎縮した子宮内膜から de novo に発生すると考えられているもので、タイプ II 子宮体癌（以下タイプ II 体癌と表記）と呼ばれる。タイプ I 体癌よりも高齢の女性に発生することが多い^{5, 6}。診断時には深い筋層浸潤やリンパ節転移を有する進行例が多く、また同じ進行期であっても早期に転移を来し、治療抵抗性を示すなど予後不良である。タイプ II 体癌には漿液性腺癌、明細胞腺癌、低分化型（Grade3）類内膜腺癌が含まれ、全体の約 20%を占める^{5, 6}。

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、傍大動脈リンパ節郭清の治療的意義を Lancet (2010) に報告した⁷。そこで明らかとなった独立予後因子は、1) 手術方法（骨盤＋傍大動脈リンパ節郭清 vs. 骨盤リンパ節郭清、2) 組織型（タイプ I 体癌 vs. タイプ II 体癌）、3) リンパ節転移（なし vs. あり）、4) 術後補助療法（化学療法 vs. 放射線療法）であった。タイプ II 体癌は骨盤＋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った。子宮体癌の治療成績を向上させるためには、子宮体癌の悪性進展機構について分子生物学的に研究し、新しい診断法および治療法の探索を行うことが必須である。

2. 子宮体癌の発生・悪性進展に関する研究-現状と課題

2-1. 子宮体癌における遺伝子異常および TP53 遺伝子変異の意義

タイプ I 体癌では、PTEN, KRAS, PIK3CA などの変異が多く、タイプ II 体癌では TP53 や HER2 の変異が多い^{8, 9}。タイプ II 体癌の多くを占める漿液性腺癌では TP53 の変異が 90%以上に認められる。TP53 の遺伝子変異は、null 変異と missense 変異に分けられる。さらに missense 変異は trans-dominance 効果のないもの（recessive 変異）と trans-dominance 効果を有するもの（dominant-negative 変異）に分けられ、後者には本来の TP53 遺伝子の機能とは関わりがない機能を獲得する gain-of-function 効果を示すものがあり¹⁰、癌の悪性進展との関わりで注目されている。Dominant-negative 変異 p53 タンパクは amyloid 様

の凝集塊を形成し、正常 p53 タンパクの立体構造を変化させてその機能を阻害するという prion のような挙動をすることが観察されている¹⁰。これを oncomorphic 変異と呼ぶことを提唱している研究者もいる¹¹。漿液性腺癌では dominant-negative TP53 変異が多く、このことが漿液性腺癌の予後を極めて不良なものにしていると考えられる^{12, 13}。多くの分子生物学的研究の成果によって、タイプ I 体癌とタイプ II 体癌では存在する遺伝子変異や分子変異が異なることが明らかにされてきた。一方でこれらの変異の一部はタイプ I 体癌とタイプ II 体癌でオーバーラップしており、また予後良好とされるタイプ I 体癌でも早期にリンパ節転移を来し、予後不良な経過を辿る症例が存在することなどから、古典的なタイプ分けのみでは臨床経過や予後の差異を考える上で不十分であることが指摘され、TCGA (The Cancer Genome Atlas) Project のデータなどに基づいてさらなる研究が続けられている^{14, 15}。

2-2. 子宮体癌における上皮間葉転換の意義

上皮間葉転換 (epithelial to mesenchymal transition : EMT) は、1980 年代はじめに Elizabeth Hay らによって提唱され¹⁶、上皮細胞が細胞極性や細胞間の接着を失い、遊走能および浸潤能を得ることで、間葉系の形質を獲得するプロセスである。EMT は、個体形成と創傷治癒の過程に観察され、また癌細胞が転移を生じるメカニズムの一つであると考えられている¹⁷。

癌の転移様式には、主に血行性転移、リンパ行性転移、播種性転移の三つがある。癌細胞の転移は、1) 原発巣での増殖、2) 原発巣からの癌細胞の離脱、血管やリンパ管への浸潤、3) 脈管内での移動、4) 転移臓器の血管内皮への接着、5) 転移臓器への浸潤、6) 転移臓器内での増殖、などの過程から構成されており、EMT は間質への浸潤および脈管侵襲に関与する¹⁶ (図 1)。

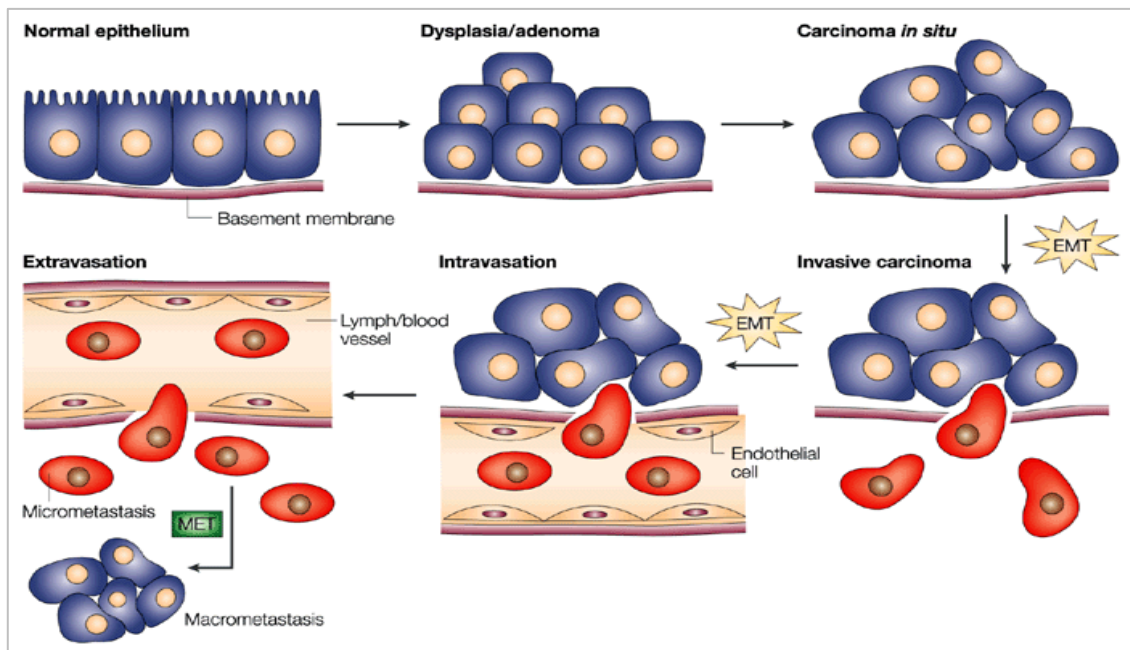


図 1. 癌浸潤転移と EMT （文献 16 より）

EMT が誘導されると、上皮細胞は周囲細胞との細胞接着を失い、上皮細胞の形態が間葉系の紡錘状に細長く変化する。また、E-cadherin や ZO-1 などの上皮系マーカーの発現が低下し、N-cadherin や Vimentin などの間葉系マーカーの発現が亢進し、細胞の運動能が亢進すると報告されている¹⁸。癌の転移において、癌細胞は細胞間の接着を解除し、遊走性を獲得することで、浸潤と転移能が亢進し悪性度を高めている可能性がある¹⁸。

幹細胞は自己複製能と多分化能を有する細胞である¹⁹。近年、腫瘍組織にも幹細胞、すなわち癌幹細胞 (cancer stem cell : CSC) あるいは癌幹細胞様細胞 (cancer stem cell-like cell : CSC-Ls) が存在するという説が提唱されており、急性骨髄性白血病をはじめ、乳癌や肺癌ならびに子宮体癌などでもその存在が報告された^{20,21}。EMT は、癌細胞の運動と浸潤能だけではなく、自己複製能や薬剤抵抗性といった癌幹細胞様の形質の獲得に関わることが指摘されている²²。

EMT を誘導する分子機構についても多くの研究が行われ、腫瘍間質から放出された EGF, TGF- β などの増殖因子が、それぞれの特異的受容体やシグナル伝達を介し、最終的に ZEB, Twist, Snail, Slug といった特異的転写因子を活性化し EMT を誘導すると考えられている^{23,24}。われわれの研究グループでは、癌遺伝子 BMI-1, ZEB1, Twist また *TP53* 変異が、EMT を誘導し、子宮体癌細胞の浸潤を促進するという子宮体癌浸潤・転移の新しい分子機構を明らかにした²⁵⁻²⁷。

2-3. EMT における IQGAP1 遺伝子の役割

代表的な上皮系マーカーである E-cadherin の喪失は、子宮体癌において腫瘍の分化度や浸潤の深さに相関するとされ、独立した予後不良因子であることが報告されている^{28, 29}。E-cadherin は細胞内の裏打ちタンパクである β -catenin, α -catenin と複合体を形成し強固な接着を形成している^{30, 31}。E-cadherin による細胞間接着を負に制御する機構において key 分子となっているタンパクに IQGAP1 (IQ-domain GTPase-activating protein 1) がある。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作用して、多彩な分子機能を有することが知られている^{30, 31}。

IQGAP1 は、子宮体癌以外の多くの固形癌で過剰発現していることが報告され、いずれも予後不良と相関している³²。この oncogenic な機能は主に、E-cadherin による細胞間接着に作用することで EMT を誘導することによるとされ、IQGAP1 が腫瘍細胞の遊走、浸潤、増殖などに強く関与することが明らかになっている³²。しかし、子宮体癌においては IQGAP1 の発現および役割について不明な点が多く、十分に解明されていない。

2-4. 子宮体癌における microRNA 研究

2-4-1. 癌における epigenetics

癌を含む様々な疾患とゲノムの関係においては、genetic な遺伝子情報だけでなく、epigenetic な遺伝子情報が強く関与すること明らかになり、epigenetics の研究が世界中で盛んに行われている^{33, 34}。Epigenetics に関わるものには、DNA のメチル化、DNA に巻き付くタンパク質であるヒストンの修飾および non-coding RNA によるものが知られ、これらの epigenetic な機構の異常により、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化が生じ、発癌に至ることが報告されている³⁴。

2-4-2. 癌と DNA のメチル化異常

原核生物から真核生物まで、ゲノム DNA (CpG 配列) のシトシン塩基はしばしばメチル化修飾を受けることで染色体構造が閉じ、転写因子との結合が阻害され遺伝子の発現が抑制される³⁴。異常なメチル化が癌抑制遺伝子プロモーターに生じ、その遺伝子発現が抑制されることが、癌の発生にとって重要である³⁵。

多くの研究により，子宮体癌においても高メチル化される頻度が高い癌抑制遺伝子として *PTEN* や *p16* などが報告されている³⁵。

2-4-3. miRNA の生合成

タンパク質コード遺伝子の配列は，ヒトゲノム全体のわずか 2% に過ぎないことが分かっている³⁶。次世代シーケンサなどの解析によって，ヒトゲノム配列の約 90% が転写され，その大部分が non-coding RNA であることが明らかになり³⁶，その生物学的役割に注目が集まっている。

Non-coding RNA の一つである microRNA (miRNA) は，20 塩基程の一本鎖 RNA であるが，細胞の発生，分化，増殖，運動さらに apoptosis まであらゆる生命現象に深く関与していることが明らかにされており，EMT も例外ではない³⁷。核内で転写された Pri-miRNA は，Drosha による切断を受け Pre-miRNA となる。キャリアタンパクにより核外に放出された Pre-miRNA は，Dicer によるスプライシングを受け二本鎖 miRNA となり，RISC に取り込まれ一本鎖 miRNA となる³⁸ (図 2)。

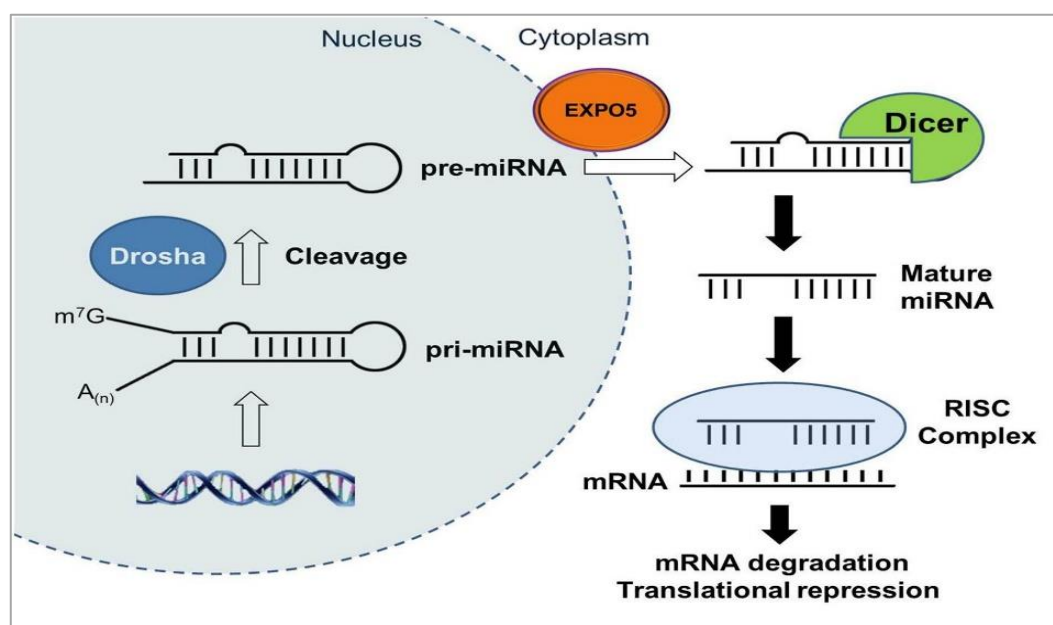


図 2. microRNA の生合成と mRNA の制御 (文献 38 より)

2-4-4. miRNA による遺伝子発現制御の機構

miRNA の機能は，転写後レベルで遺伝子発現を負に調節することである。一本鎖 miRNA は標的遺伝子 mRNA の 3' -UTR に相補的に結合し，mRNA を分解あるいはタンパクへの翻訳を抑制する³⁷⁻³⁹ (図 2)。miRNA が標的とする mRNA に結合する際，配列全体にわたる完全相補性は必要なく，miRNA の 5' 末端から数えて

2 番から 8 番までの塩基の配列（seed 配列と呼ばれる）が標的 mRNA と相補的であることが重要と言われている³⁷⁻³⁹。このため、一つの miRNA は複数の mRNA の発現を制御し、逆に一つの mRNA が複数の miRNA によって制御されることもある。ヒトの全遺伝子産物の 60%以上が、miRNA によって発現制御されると推定されている³⁷⁻³⁹。

2-4-5. miRNA の臨床への応用

近年になり、miRNA が血中においてエクソソーム中に内在し、比較的安定して存在することが明らかとなり、疾患バイオマーカーとしての有用性が注目されている³⁷⁻³⁹。miRNA を制御することで、疾患に関連する複数の遺伝子を同時に調節できると考えられている。また、抗体製剤と異なり、化学合成による大量生産が可能であり、miRNA を用いた治療薬の研究開発は今後も発展すると予測される。しかし、標的細胞へ miRNA を到達させる方法や、miRNA が複数のタンパク発現を制御することによる off-target 効果など、解決すべき問題点も多い³⁷⁻³⁹。

2-4-6. 子宮体癌に関わる miRNA の異常

癌の発生および進展と miRNA の関係はすでに確立されており、多くの miRNA が tumor suppressor あるいは oncogene として機能することが報告されている^{40, 41}。われわれの研究では、miR-130b などの miRNA の発現低下が、子宮体癌患者の予後不良に関係していた^{27, 42}（図 3）。

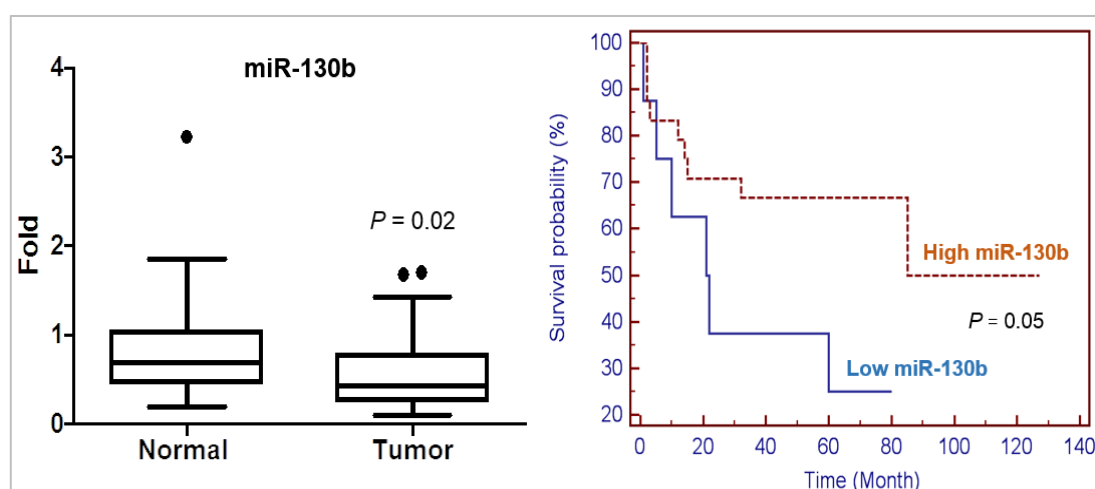


図 3. miR-130b の発現低下は子宮体癌患者の予後不良と相関する
（文献 27 より）

さらに、EMT を制御する分子機構において大きな役割を担う miRNA が多数存在する。われわれは、複数の癌抑制 miRNA (miR-101, miR-106b, miR-130b, miR-194 など) が、子宮体癌細胞内の伝達経路に広く影響を与え、ZEB1, BMI-1 などの EMT を誘導する遺伝子発現を減少させ、子宮体癌細胞の増殖、浸潤および癌幹細胞形質誘導を抑制することを報告した⁴² (図 4)。

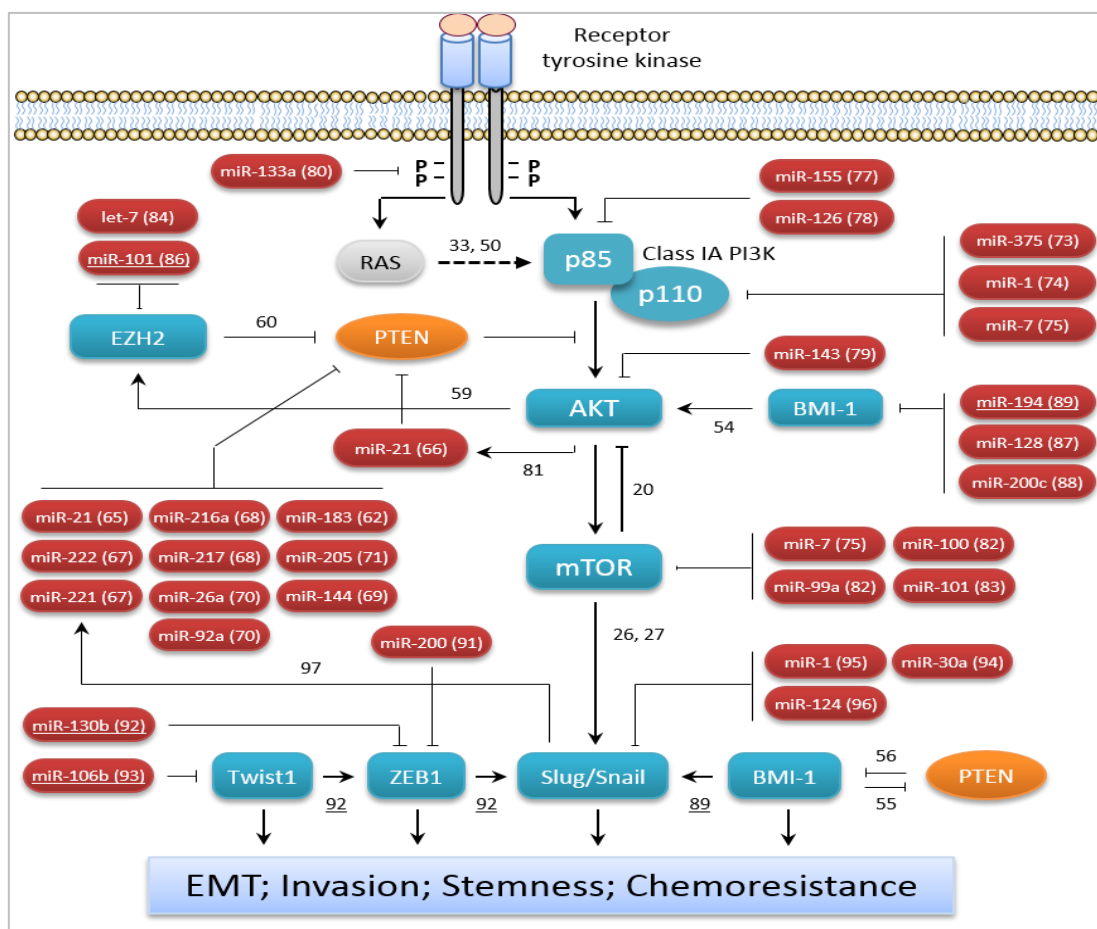


図 4. 子宮体癌における EMT と癌幹細胞形質の制御に関わる miRNA のネットワーク (文献 42 より)

TP53 変異は多くの miRNA の変化をもたらす。悪性度の高い子宮体癌細胞株を用いた解析では、*TP53* 変異により少なくとも 23 個の miRNA の発現低下が生じることが示された²⁷。その一つである miR-130b は、EMT 誘導遺伝子である ZEB1 を標的とする miRNA である。miR-130b を子宮体癌細胞に発現させることで、*TP53* 変異に起因する EMT 形質を元に戻す mesenchymal to epithelial transition (MET) 現象が認められた²⁷。

miRNA による子宮体癌 EMT の制御について検討した報告は多く、われわれの研究グループ以外からも、miR-200 と子宮体癌細胞の浸潤能および抗癌剤感受性⁴³、複数の miRNA の相互作用による EMT および癌幹細胞形質の維持⁴⁴、miR-34b と癌抑制機能⁴⁵、miR-23a と SMAD3 を介した子宮体癌 EMT の制御⁴⁶などが報告されており、今後は研究成果が臨床応用へ橋渡しされることが期待される。

2-4-7. 子宮体癌における miR-124 研究

miR-124 は、乳癌⁴⁷、大腸癌⁴⁸、膵癌⁴⁹など様々な癌で発現低下し、癌細胞の増殖能、浸潤能、転移能および抗癌剤耐性の抑制に寄与することが示され、その標的として、SNAI2⁵⁰、PIM1⁵¹、SOX9⁵²などが同定されている。

最近になって、子宮体癌においても miR-124 の発現が低下していることが明らかにになり、miR-124 が癌遺伝子 STAT3 に直接結合して、その発現を抑制することが報告された⁵³。また、miRNA は epigenetic な発現制御を受けるが、実際に癌で高メチル化により発現が低下している miRNA として、miR-34⁴⁵や miR-124⁵³が報告されている。このように、miR-124 は複数の癌で tumor suppressor として研究対象となっており、子宮体癌においてもその働きが報告されているが、miR-124 と EMT 制御についての詳細な報告はなく、また子宮体癌における miR-124 発現低下のメカニズムも解明されていない。

3. 本研究の概要

子宮体癌細胞株を用いて、子宮体癌 EMT における IQGAP1 の役割を明らかにすることで、子宮体癌の新たな治療戦略の確立に貢献できると考え、本研究を行った。子宮体癌細胞株における IQGAP1 の発現を検討し、次いで、高悪性度子宮体癌細胞株で有意に発現が抑制されている miRNA の解析を行い、miR-124 を同定した。IQGAP1 発現制御における miR-124 の役割を検討し、さらにその epigenetic な抑制機構を検討した。

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.

BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
CSC	Cancer stem cell
CSC-LCs	Cancer stem cell-like cells
EC	Endometrial cancer
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FIGO	International Federation of Gynecologic Oncology
HER2	Human epidermal growth factor receptor type 2
HI	Highly invasive subpopulations of HEC-50 cells
IQGAP1	IQ-domain GTPase-activating protein 1
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
miRNA	microRNA
MET	Mesenchymal to epithelial transition
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIM1	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10
RPPA	Reverse-phase Proteomic Arrays
siRNA	small interfering RNA
SOX9	SRY-Box 9
STAT3	Signal transducer and activator of transcription
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TGF	Transforming Growth Factor
TSA	Trichostatin A
UTR	untranslated region
ZEB	Zinc finger E-Box binding

実験方法

1. 細胞培養

ヒト子宮体部類内膜腺癌由来細胞株である HEC-1 (タイプ I 体癌: G2 類内膜腺癌由来) と HEC-50 (タイプ II 体癌: G3 類内膜腺癌由来) は JCRB 細胞バンク (大阪) より購入し, DMEM/F12 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, 米国) に 10% 牛胎児血清を添加し培養した. HEC-50 細胞由来の高浸潤能 HI 細胞は, Transwell system (8- μ m pore size, Matrigel-coated polycarbonate membrane BD Biosciences, Bedford, 米国) を用いて作成した²⁵. 具体的には, HEC-50 細胞を無血清の MEM で培養し, 上段のチャンバー内にいれ, 下のチャンバーには 15% 血清を含む MEM で満たし, 5%CO₂ 下, 37°C で 24 時間培養後に膜を通過し下段のチャンバーに接着した細胞群が HEC-50B-highly invasive (HI) である²⁶. ヒト子宮内膜由来不死化細胞株 EM は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 15% 牛胎児血清を添加し培養した.

2. Transient transfection

miR-124 を過剰発現させるために, miR-124 mimic を用いた. また, miR-124 の発現を特異的にノックダウンするには, anti-miR-124 inhibitor を使用した. miR-124 mimic (あるいは anti-miR-124 inhibitor) と, その陰性対照である miRNA mimic negative control (あるいは miRNA inhibitor negative control) は Ambion (Texas, 米国) から購入した. IQGAP1 遺伝子の発現を選択的に抑制するには, IQGAP1 siRNA (IQ-Si), その陰性対照である negative control siRNA (Ambion, Texas, 米国) を用いた. これらの miRNA mimic, anti-miRNA inhibitor と siRNA を, Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, 米国) により, 子宮体癌細胞に導入した. IQGAP1 cDNA (IQGAP1 vector) を有する pEGFR-IQGAP1-WT vector と pEGFR empty control vector は名古屋大学分子薬理学教室の貝淵弘三教授のご厚意により譲り受け, Lipofectamine Plus reagent (Invitrogen, Carlsbad, 米国) を用いて導入した. Control vector と 3' -UTR sequence lacking human IQGAP1 cDNA vector は OriGene (Maryland, 米国) から購入した.

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.
2. miRNA 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.
3. 上記の混合液を最終濃度が miRNA は 40 nM，siRNA は 10 nM 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.
4. 4 時間後に検鏡し，細胞毒性が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. 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, 米国) を使用して採取した. ディッシュからトリプシンで剥がした細胞に，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攪拌した. 4℃，12000g 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℃，12000g 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 RNase free H₂O で融解し全 RNA を抽出した.

miR-124 の qRT-PCR は NCode miRNA qRT-PCR analysis (Invitrogen, Carlsbad, 米国) を使用し行った. 全 RNA に含まれる microRNA に Poly A Polymerase によってポリアダニル化したのちに，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, 滋賀) 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-124-3p に対する specific forward primer (5'-TAAGGCACGCGGTGAATGCC-3') と reverse primer として universal qPCR primer を使用し，各 mRNA の primer は PrimerBank database (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) から得た. Applied Bio systems Takara SYBR Premix Ex Taq II (Takara, 滋賀) を用いて，7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, 米国)

にて 94℃で 15 分の反応の後, 95℃で 15 秒, 60℃で 25 秒, 72℃で 20 秒の反応サイクルを 40 回繰り返す, PCR 増幅を行った. miRNA また mRNA 発現量の解析は, RNU6 また GAPDH を内部標準として使用した.

以下に, 各 miRNA また mRNA の Primer 配列を示す (forward primer (F), reverse primer (R), Sequence: 5' → 3') :

RNU6	F: CGCTTCGGCAGCACATATAC R: AAAATATGGAACGCTTCACGA
IQGAP1	F: TTTGTACCTGTTCAAGCTAGGC R: CCACTGACAGTTCATTAGCCAAG
E-cadherin	F: CGAGAGCTACACGTTACGG R: GGGTGTGCGAGGGAAAAATAGG
ZO-1	F: CAACATACAGTGACGCTTCACA R: CACTATTGACGTTTCCCCACTC
Vimentin	F: GACGCCATCAACACCGAGTT R: CTTTGTGCTTGGTTAGCTGGT
N-cadherin	F: TCAGGCGTCTGTAGAGGCTT R: ATGCACATCCTTCGATAAGACTG
GAPDH	F: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT R: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

4. Cell migration, invasion and proliferation assay

細胞浸潤試験は, Transwell system (8- μ m pore size, Matrigel-coated polycarbonate membrane BD Biosciences, Bedford, 米国) を用いた. まず各細胞 5×10^4 個が入った無血清培地 500 μ l 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 750 μ l 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.

増殖能試験は Cell Counting Kit-8 (同仁堂, 大阪) を用いた. まず各細胞 5×10^3 個を 96-well のプレートに入れ, 5%CO₂ 下, 37℃で 24 時間培養後, IQGAP1

cDNA vector/IQGAP1 siRNA, miR-124 mimics/inhibitors, そしてそれぞれの control を導入し, 72 時間後に吸光度 (450nm) を測定した.

5. Western blotting analysis

M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce Biotechnology, Woburn, 米国) 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, 米国) を用いて抽出した. 全タンパクは 40 μ g, 核タンパクは 10 μ g を 10% SDS-PAGE で泳動し, ニトロセルロース膜に転写し, 下記に示す特異的な 1 次抗体 (IQGAP1, 2C5, Novus Biologicals, Littleton, 米国; E-cadherin, A01589, GenScript, Piscataway, 米国; N-cadherin, 610920, BD and GAPDH, sc-47724, Santa Cruz, Dallas, 米国) と室温で 1 時間インキュベーションした. 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, Dallas, 米国) と室温で 1 時間インキュベーションした. TBS-T で洗浄後, ECL Western blotting detection reagents を転写面にまんべんなくかけ, 室温で 1 分間反応させた. CCD camera-linked Cool Saver System を用いて化学発光を行った. 全タンパクの内部標準として GAPDH を使用した検出した.

6. Microarray analysis

miRNA microarray 解析には, 上記のように miR-124 mimic または miRNA mimic negative control をトランスフェクションした HEC-50 と HI 細胞から抽出した total RNA を用いた. Microarray に用いる total RNA の純度および品質は, RNA6000 Nano Gel System を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, 米国) で確認した. Total RNA (100 ng) を Agilent Complete Labeling and Hybridization Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, 米国) により, Cyanine3 (Cy3) でラベルした. そして, miRNA を含んだ Cy3 ラベル RNA を Superprint G3 Human 8x60k Microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, 米国) に添加後, 55°C にて 20 時間, hybridization を行った. スライドは洗浄し, 遠心分離を行った (3000 rpm, 室温). スキャナーで画像を取り込み, Feature Extraction Software (Agilent Technologies, Santa Clara, 米国) で, 蛍光強度を数値化した. 遺伝子発現解析は GeneSpring GX software (Agilent Technologies, Santa Clara, 米国) を用いた. 有意に発現が変動し

ているmiRNAを抽出した. HEC-50 と HI 細胞の各miRNAの発現比率をFold changeで示した.

7. 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 vector は, wild-type (Wt ; 14503) あるいは mutant (Mut ; 14504) miR-124 binding sites (875-882 bp and 1172-1178 bp from the start site of the 3' -UTR) を有する *IQGAP1* mRNA は, Addgene (Cambridge, MA, 米国) から購入した. 24-well 培養プレートで野生型または変異型リポーターvector を, miR-124 mimic, miRNA mimic negative control, anti-miR-124 inhibitor, anti-miRNA negative control 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°Cで培養したのちに, Dual-luciferase reporter assay system (Promega, Madison, 米国) を用いて, ルシフェラーゼ活性を測定した.

8. Drug treatment

5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA; 最終濃度 1.0 と 5.0 μ M ; Sigma-Aldrich, St. Louis, 米国) に 72 時間, あるいはTrichostatin A (TSA; 最終濃度 0.5 μ M ; Sigma-Aldrich, St. Louis, 米国) に 24 時間作用させた. Combination study は, 5-AZA (最終濃度 5 μ M) に 72 時間作用させ, 最後の 24 時間に TSA (最終濃度 0.5 μ M) を加えて作用させた. 培地は毎日交換し, その度に薬剤を加えた.

9. 統計学的解析

すべての実験は 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. IQGAP1 は子宮体癌細胞において EMT, 浸潤, 増殖を誘導する

子宮体癌における IQGAP1 の機能を検討するために以下の実験を行った。

1-1. 子宮体癌細胞株において IQGAP1 の発現は亢進している

まず, 子宮体癌細胞株における IQGAP1 の発現を qRT-PCR と Western Blot を用いて検討した. 子宮体癌細胞株として HEC-1, HEC-50, HEC-50-HI (HI) を用い, コントロールとして不死化子宮内膜細胞 (EM) を用いた.

HEC-1 はタイプ I 体癌 (G2 類内膜腺癌) であり, 中等度の分化度, 悪性度である. 一方, HEC-50 はタイプ II (G3 類内膜腺癌) の細胞株であり, 低分化で悪性度は比較的高い. その中でも特に高悪性度を示す細胞群 (Highly invasive subpopulations of HEC-50 cells : HI) を抽出できることが示されており⁴⁶, これを用いた.

IQGAP1 mRNA は EM に比較し, 3 つの子宮体癌細胞株すべてで有意に発現が亢進していることが qRT-PCR で示され (図 5A), そして, 細胞株の悪性度が高いほど, IQGAP1 タンパクの発現レベルが高い傾向にあることが Western Blot で示された (図 5B) .

以上の結果より, IQGAP1 は子宮体癌細胞株において発現が亢進しており, 悪性度を高める何らかの働き, つまり EMT や浸潤, 転移などに役割を担っている可能性があると考えた.

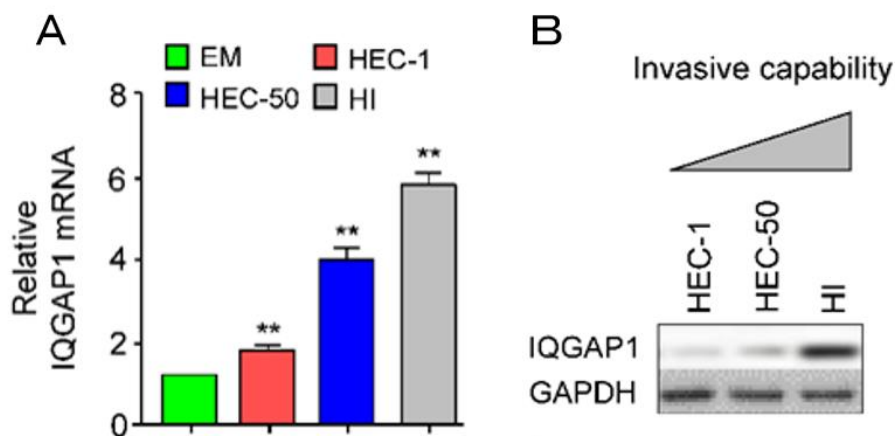


図 5. (A) 子宮体癌細胞株 (HEC-1, HEC-50, HI) およびコントロール細胞 (不死化子宮内膜細胞株 (EM)) における定量リアルタイム RT-PCR による IQGAP1 mRNA の発現量解析; (B) 子宮体癌細胞株における IQGAP1 タンパクの Western blot による解析. $**P < 0.01$

1-2. IQGAP1 は EMT 関連マーカーの発現を変化させる

IQGAP1 が EMT を誘導するという仮説を検証する目的で, EMT 関連の主マーカーである E-cadherin, N-cadherin の発現が IQGAP1 の発現により変化するかを Western Blot で検討した. 内在性コントロールとして GAPDH を用いた. 内因性の IQGAP1 発現が亢進している HI において, IQGAP1-siRNA (IQ-Si) を導入しノックダウンすると, control (Ctr-Si) と比較して, E-cadherin の発現が上昇し, N-cadherin は減少した (図 6A). 一方, 内因性 IQGAP1 レベルが比較的低い HEC-1 において, IQGAP1 を過剰発現させると (IQ-vec), E-cadherin は減少し, N-cadherin は上昇することが明らかになった (図 6B). 以上から, IQGAP1 の過剰発現が子宮体癌細胞における EMT の誘導に深く関与する可能性を示唆した.

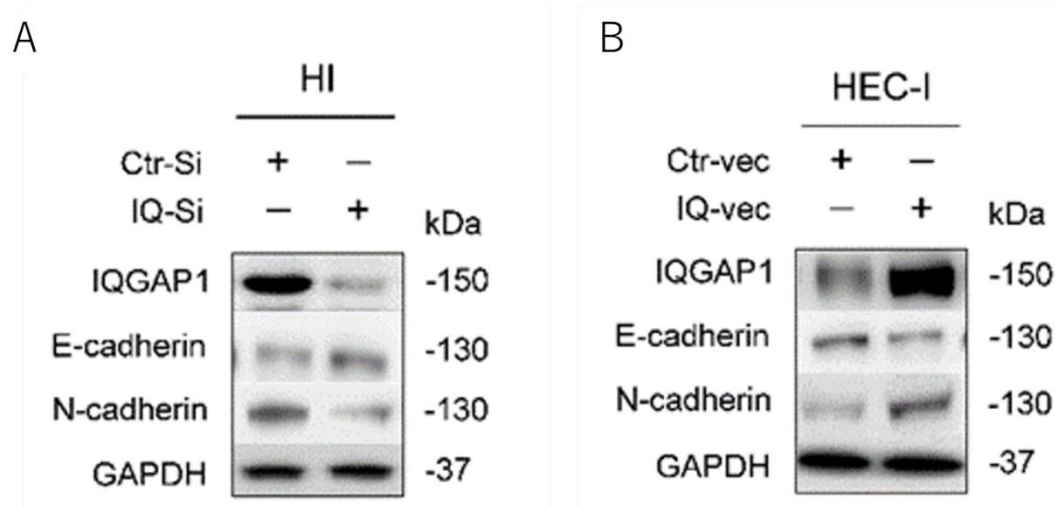


図 6. Western blot による E-cadherin, N-cadherin, IQGAP1 タンパクの発現解析 (A) Control siRNA (Ctr-Si), あるいは IQGAP1 siRNA (IQ-Si) を導入した HI 細胞 (IQGAP1 高発現株); (B) Control vector (Ctr-vec), あるいは IQGAP1 vector (IQ-vec) を導入した HEC-1 細胞 (IQGAP1 低発現株).

1-3. IQGAP1 は子宮体癌細胞の形態を変化させる

EMT が生じた細胞は形態にも変化があることは既知であり⁵⁵, IQGAP1 が EMT と正に相関するという仮説を補強するため, 細胞形態の変化を調べた. 内因性 IQGAP1 レベルの高い HI において IQGAP1 をノックダウンすると, 細胞はより上皮系の細胞形態をとり, 細胞間接着が増える (図 7A). 一方で, HI に比して内因性 IQGAP1 レベルが低い HEC-1 において, IQGAP1 を過剰発現させると, 間葉系の形態をとる細胞が増え, 細胞間接着が疎になる傾向が観察された (図 7B).

以上の結果より, IQGAP1 は子宮体癌細胞における EMT の誘導を促進することを見出した.

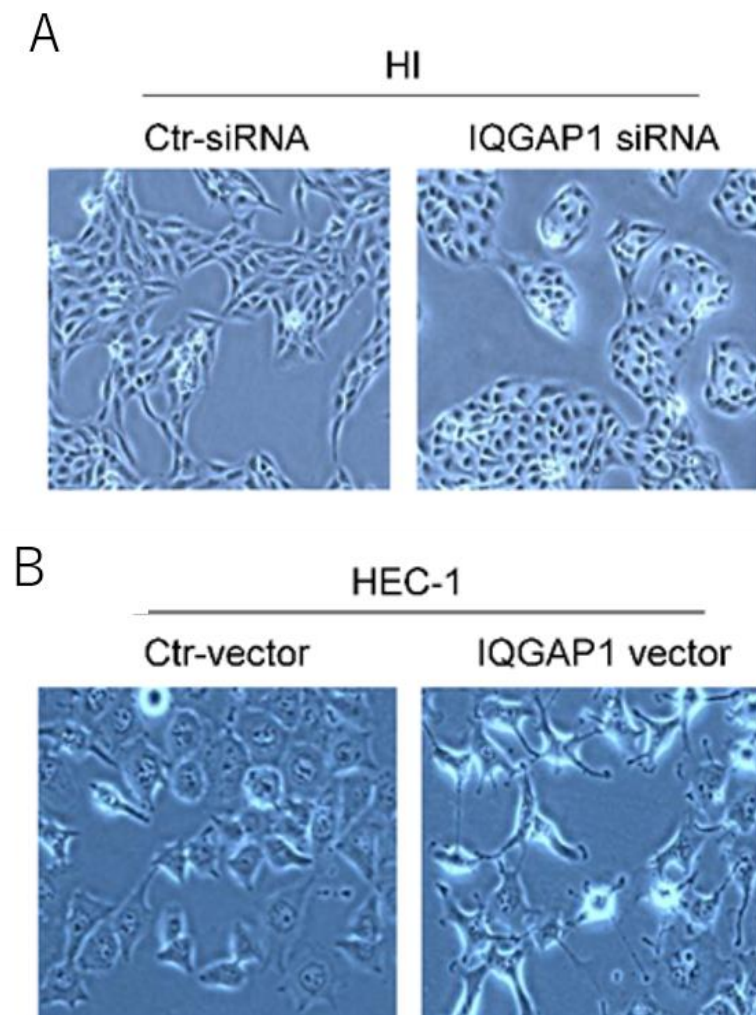


図 7. IQGAP1 発現の変化と細胞形態の変化 (偏光顕微鏡写真)

(A) Control siRNA (Ctr-Si), あるいは IQGAP1 siRNA (IQ-Si) を導入した HI 細胞 (IQGAP1 高発現株); (B) Control vector (Ctr-vec), あるいは IQGAP1 vector (IQ-vec) を導入した HEC-1 細胞 (IQGAP1 低発現株).

1-4. IQGAP1 は子宮体癌細胞の悪性形質に関与する

IQGAP1 が子宮体癌細胞の悪性形質（細胞の遊走能、浸潤能、増殖能）に関与しているかを明らかにする目的で以下の実験を行った。

内因性 IQGAP1 レベルが高く、悪性度の高い HI において IQGAP1-siRNA を導入して、IQGAP1 をノックダウンし (IQ-Si)、内因性 IQGAP1 レベルが低く HI に比較して悪性度の低い HEC-1 において IQGAP1-vector を導入し過剰発現させ (IQ-vec), *in vitro* で migration assay, invasion assay, proliferation assay を行った。

IQGAP1 のノックダウンは、遊走能、浸潤能、増殖能いずれも有意に減弱することが示され、一方 IQGAP1 の過剰発現は悪性度を有意に亢進することが示された (図 8A-C)。

以上の結果から、IQGAP1 は子宮体癌細胞の遊走、浸潤、増殖などの悪性形質に、正の相関を持つことが明らかになった。

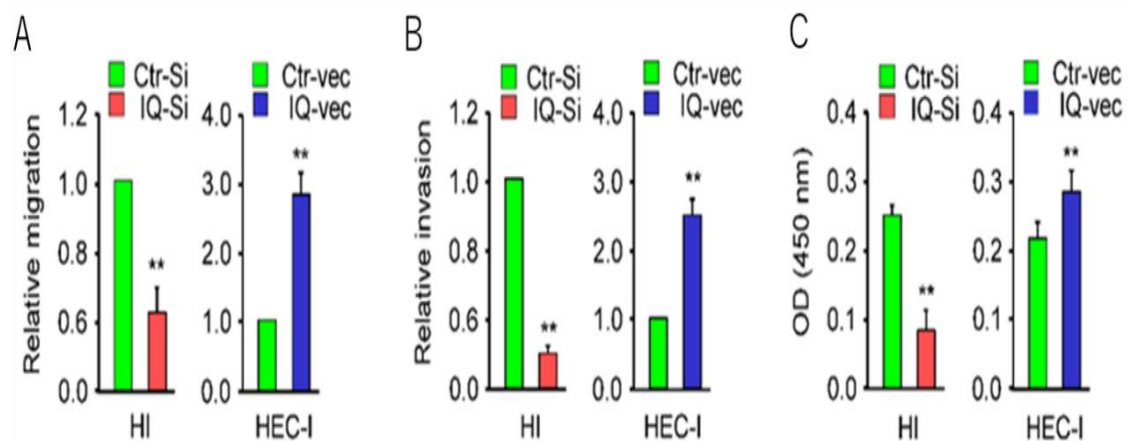


図 8. IQGAP1 の変化と子宮体癌細胞の悪性形質の変化。

(A) 遊走能, (B) 浸潤能, (C) 増殖能; Control siRNA (Ctr-Si) あるいは IQGAP1 siRNA (IQ-Si) を導入した HI 細胞 (IQGAP1 高発現株) および control vector (Ctr-vec) あるいは IQGAP1 vector (IQ-vec) を導入した HEC-1 細胞 (IQGAP1 低発現株). ** $P < 0.01$

1-5. IQGAP1 は cadherin 以外の EMT 関連マーカーにも作用する

IQGAP1 は cadherin 以外にも作用することが知られているため、E-cadherin や N-cadherin 以外の EMT 関連マーカーに関与するかを検討した。上皮系マーカー

一として ZO-1, CK-18 を用い, 間葉系マーカーとして Vimentin を用いた.

HI において, siRNA を用いて IQGAP1 をノックダウンする (IQ-Si) と, ZO-1 と CK-18 の mRNA レベルは有意に上昇し, Vimentin mRNA レベルは有意に減少した (図 9A). 一方 HEC-1 で IQGAP1 vector を導入する (IQ-vec) と, ZO-1 と CK-18 は有意に減少し, Vimentin は上昇するという正反対の結果を得た (図 9B).

ここまでの実験結果から, IQGAP1 は子宮体癌細胞において発現が亢進しており, EMT を誘導して細胞形態を変化させ, 遊走能, 浸潤能, 増殖能といった腫瘍の悪性度を高めることが明らかとなった.

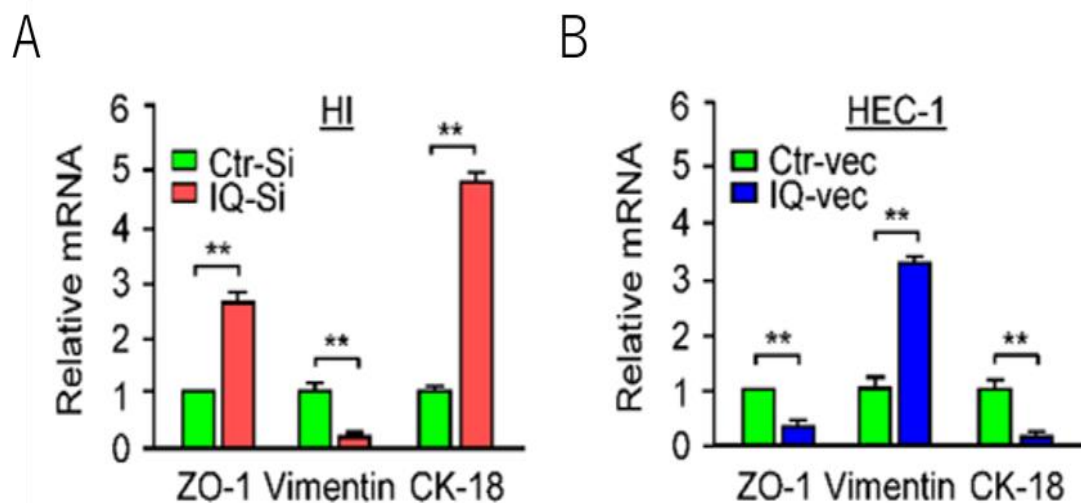


図 9. 定量 RT-PCR による ZO-1, Vimentin, CK-18 の発現解析.

(A) Control siRNA (Ctrl-Si), あるいは IQGAP1 siRNA (IQ-Si) を導入した HI 細胞 (IQGAP1 高発現株). (B) Control vector (Ctrl-vec), あるいは IQGAP1 vector (IQ-vec) を導入した HEC-1 細胞 (IQGAP1 低発現株). ** $P < 0.01$

2. miR-124 は IQGAP1 の発現を直接抑制し, 高悪性度子宮体癌細胞においては miR-124 の発現が抑制されている

IQGAP1 の発現を制御する分子機構を明らかにするために, 以下の実験を行った.

2-1. 高悪性度子宮体癌細胞株において発現が抑制されている miRNA は 29 個同

定された

Microarray 分析を用いて、HEC-50 と比較して、HI において有意に発現が低下している 29 個の miRNA (let-7b, let-7f, miR-10b, miR-15b, miR-23a, miR-24, miR-25, miR-27a, miR-29b, miR-30a-5p, miR-34a, miR-124, miR-127, miR-130b, miR-148a, miR-155, miR-191*, miR-194, miR-224, miR-362, miR-409-3p, miR-422b, miR-424, miR-453, miR-497, miR-518d, miR-518f*, miR-526a, miR-656) を同定した (図 10) .

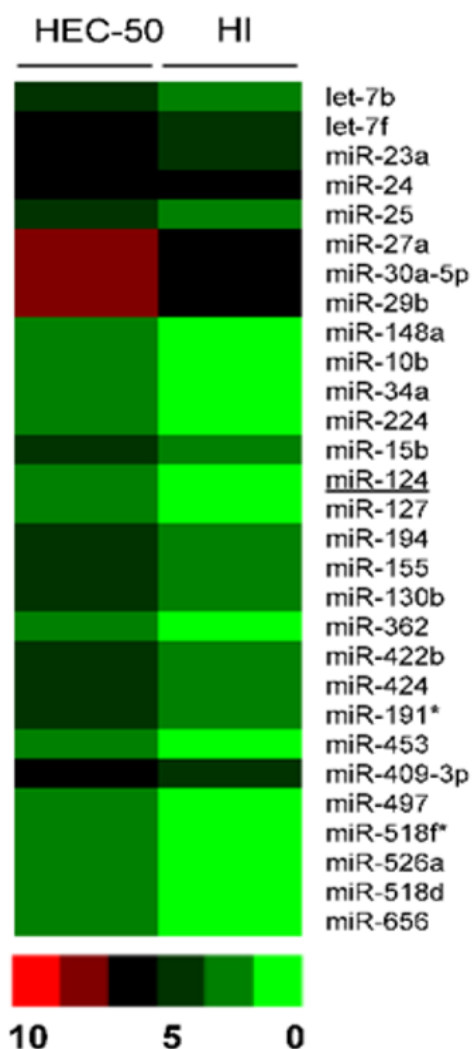


図 10.

高浸潤能細胞株である HEC-50-HI(HI) 細胞株における miRNA の発現プロファイル

2-2. miR-124 は IQGAP1 mRNA 3' -UTR に binding sites を有する

29 個の候補の中から、IQGAP1 と結合する候補 miRNA を絞り込む目的で、コンピュータ上のマイクロ RNA 予測アルゴリズムである Target Scan (http://www.targetscan.org/vert_71/) を用いて検索した。

予測された候補 miRNA の中で、肝細胞癌において PIK3CA⁴⁸ や STAT3⁴⁹ を標的

として tumor suppressor として報告されており，かつ近年子宮体癌において発現が低下していると報告⁵³された miR-124 に注目した．

miR-124 には下記のように IQGAP1 mRNA の 3' -UTR の中に，2 つの binding sites を有することが示された（図 11）．

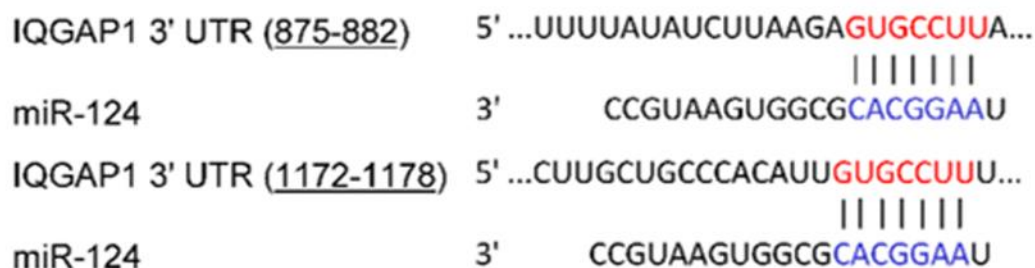


図 11. IQGAP1 3' -UTR における二つの miR-124 推定結合部位

2-3. IQGAP1 と miR-124 の発現は負に相関している

IQGAP1 と miR-124 の発現の関係を明らかにするために，まず子宮体癌細胞株における miR-124 の発現を qRT-PCR を用いて検討した．コントロールには不死化子宮内膜細胞（EM）を用い，3 つの子宮体癌細胞株（HEC-1，HEC-50，HI）を対象とした．

EM に比して，3 つの細胞株すべてで miR-124 の発現レベルは低下しており，発現の程度は細胞株間で差があることが明らかになった．高悪性度 HI で miR-124 の発現が最も低く，悪性度の低い HEC-1 では HI や HEC-50 よりも miR-124 の発現が高いことが明らかとなった（図 12）．悪性度が高いほど IQGAP1 の発現は高い傾向にある（図 5A および 5B）ことから，miR-124 の発現低下と IQGAP1 の発現亢進に関連がある可能性を示唆する結果となった．

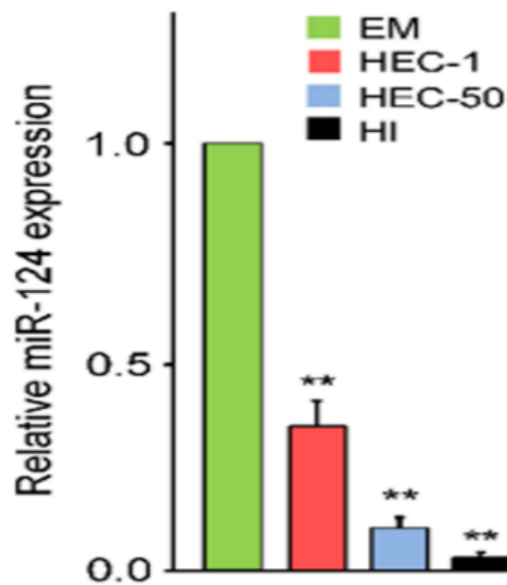


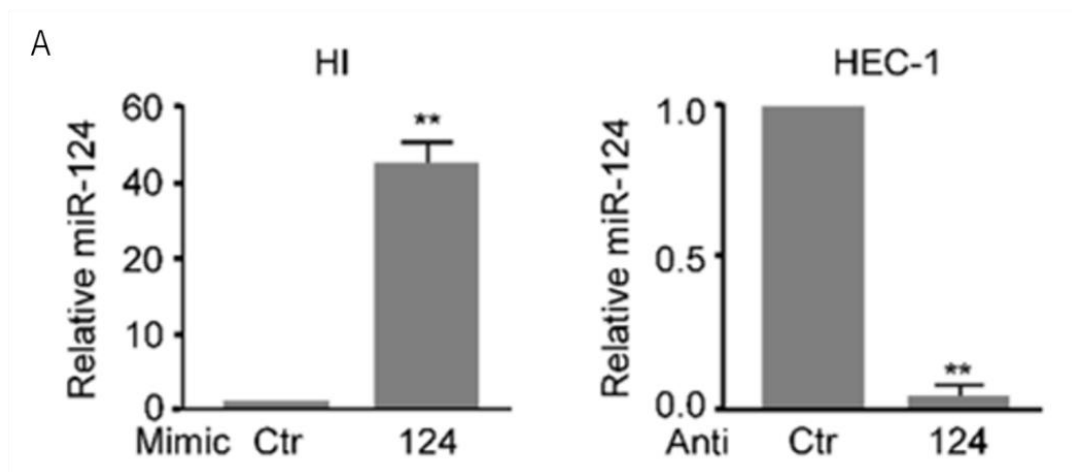
図 12. 正常子宮内膜由来不死化細胞株（EM）に対する各子宮体癌細胞株における miR-124 相対発現量の定量 PCR による解析. ** $P < 0.01$

2-4. miR-124 は IQGAP1 の発現を抑制する

IQGAP1 と miR-124 の関係を検討するために、以下の実験を行った。

まず, miR-124 mimic と anti-miR-124 inhibitor の有効性を確認した. (図 13A). 内因性 miR-124 レベルの低い HI で, miR-124 を過剰発現させると, IQGAP1 mRNA, タンパクレベルともに低下した. 一方内因性 miR-124 レベルの高い HEC-1 における miR-124 の抑制は, IQGAP1 mRNA 発現とタンパク発現をともに上昇させることが示された (図 13B および 13C) .

このことから、子宮体癌細胞において miR-124 は IQGAP1 の発現を負に制御していることが明らかになった。



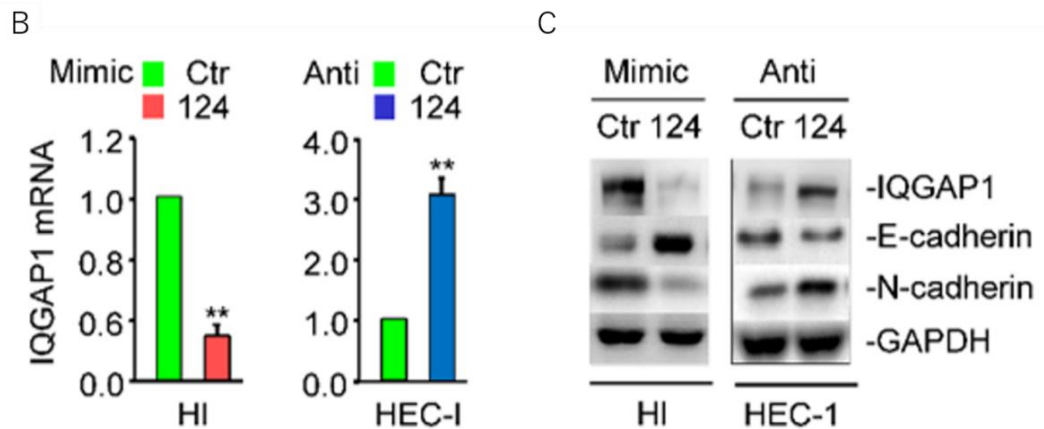


図 13. miR-124 mimic (Mimic 124) あるいはnegative control (Mimic Ctr) を導入した HI 細胞, miR-124 inhibitor (Anti 124) あるいはnegative control (Anti Ctr) を導入した HEC-1 細胞における (A) miR-124 の相対発現量, (B) IQGAP1 mRNA の相対発現量, (C) IQGAP1, E-cadherin, N-cadherin タンパク発現量. ** $P < 0.01$

2-5. miR-124 は IQGAP1 mRNA の 3' -UTR を直接の標的とする

これまでの実験結果から, miR-124 が IQGAP1 の発現を抑制することが明らかになったが, その作用が直接 IQGAP1 mRNA を標的にしたものか確認するために luciferase reporter assay を行った.

変異のない miR-124 binding sites を有する IQGAP1 mRNA 3' -UTR (Wt) において, レポーター活性は miR-124 mimic により減少し, anti-miR-124 inhibitor により上昇することが示された (図 14A). しかしながら, 点変異のある miR-124 binding sites を有する IQGAP1 mRNA 3' -UTR (Mut) のレポーター活性は, miR-124 の影響を受けなかった (図 14B).

このことから, IQGAP1 mRNA 3' -UTR には miR-124 が直接結合し, その発現を負に制御していることが明らかになった.

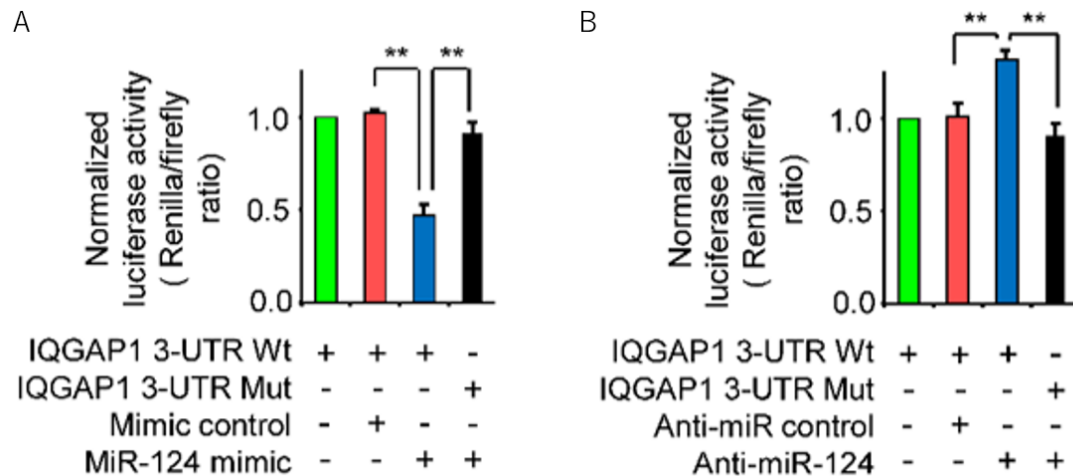


図 14. HI 細胞株 (A) および HEC-1 細胞株 (B) を用いた miR-124 と IQGAP1 mRNA の結合についての相対的ルシフェラーゼ活性を用いた検討

(A) : 野生型 IQGAP1 3' -UTR あるいは変異型 IQGAP1 3' -UTR を有するレポータープラスミドと miR-124 mimic あるいはその negative control を導入.

(B) : 野生型 IQGAP1 3' -UTR あるいは変異型 IQGAP1 3' -UTR を有するレポータープラスミドと miR-124 inhibitor あるいはその negative control を導入. ** $P < 0.01$

3. miR-124 は子宮体癌細胞において上皮としての形質を維持し, 細胞の遊走, 浸潤, 増殖を抑制する

子宮体癌細胞における miR-124 の生物学的機能を明らかにする目的で以下の実験を行った.

3-1. miR-124 は子宮体癌細胞の形態を変化させる

miR-124 が EMT を抑制するかどうかを明らかにするために, miR-124 を過剰発現させ, 細胞形態を評価した.

内因性 miR-124 レベルが非常に低い HI に, miR-124 mimic を導入すると細胞形態は上皮細胞の形態に変化し, 細胞接着の密度が上昇した (図 15A), 逆に miR-124 レベルが比較的高い HEC-1 で miR-124 をノックダウンすると, 細胞形態は紡錘型となった (図 15B). このことは, miR-124 が EMT を抑制する可能性があることを補強する結果であった.

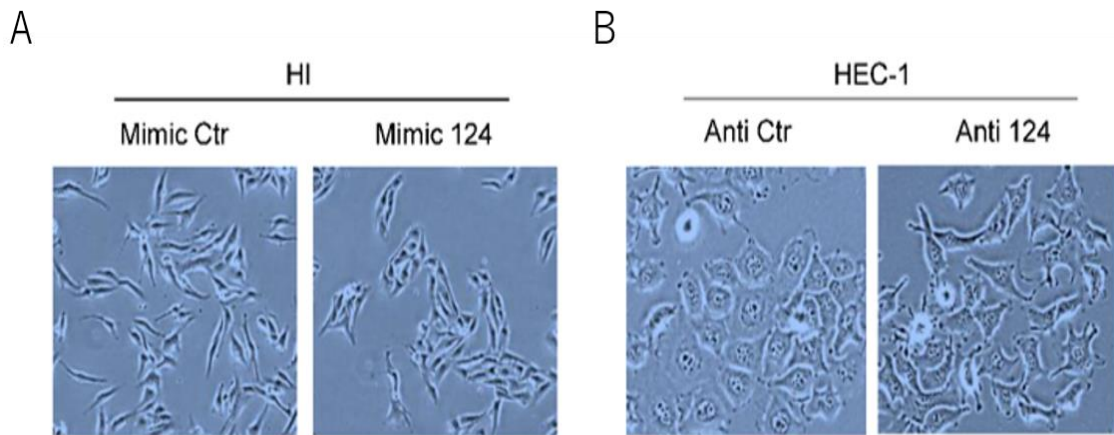


図 15. 子宮体癌細胞株の miR-124 発現の変化と細胞形態の変化（偏光顕微鏡写真）（A）miR-124 を過剰発現させた HI 細胞（miR-124 低発現株）では線維芽細胞様形態から上皮細胞様形態へ変化し、（B）miR-124 発現をノックダウンした HEC-1（miR-124 高発現株）ではより間葉系細胞様の形態が誘導された。

3-2. miR-124 は子宮体癌細胞の悪性形質を抑制する

miR-124 が子宮体癌細胞の浸潤や増殖などにおよぼす影響を明らかにするために、*in vitro* で種々の実験を行った。

内因性 miR-124 レベルが低く、悪性度の高い HI に miR-124 mimic (Mimic) を導入して過剰発現させ、内因性 miR-124 が高く、悪性度の低い HEC-1 では anti-miR-124 inhibitor (Anti) を導入し、ノックダウンした。

HI においては遊走，浸潤，増殖いずれも有意に抑制され，一方 HEC-1 ではこれらの悪性形質は有意に上昇した（図 16A-C）。

miR-124 は，子宮体癌細胞において tumor suppressor としての機能を有することが明らかになった。

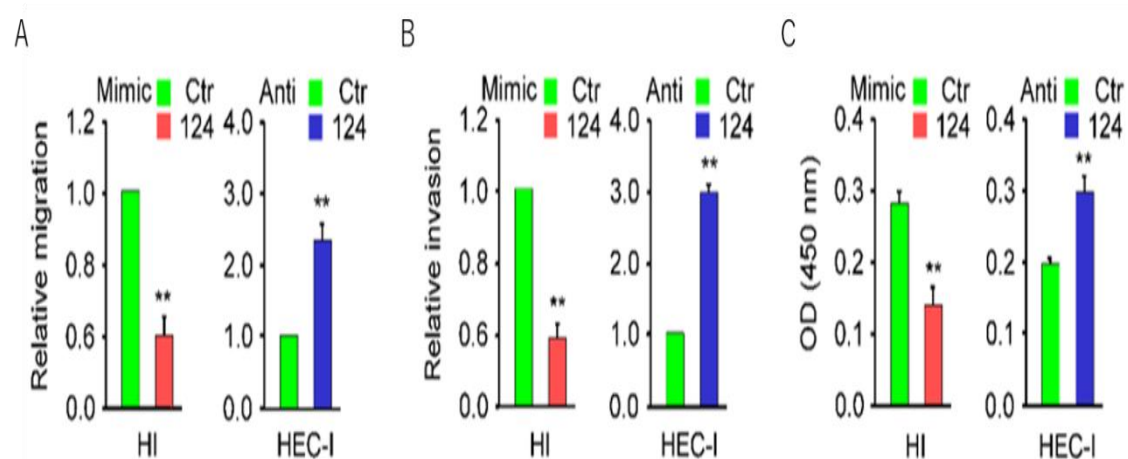


図 16. miR-124 発現の変化による子宮体癌細胞の悪性形質の変化

遊走能 (A), 浸潤能 (B), 増殖能 (C) の変化を, miR-124 を過剰発現させた HI 細胞, miR-124 をノックダウンした HEC-1 細胞を用いて検討. ** $P < 0.01$

3-3. miR-124 は EMT 関連マーカーの発現に影響する

子宮体癌細胞において, miR-124 が上皮系マーカーあるいは間葉系マーカーにどのような影響をおよぼすかを検討した.

内因性 miR-124 レベルの低い HI において, miR-124 mimic を導入し (Mimic) 過剰発現させると, E-cadherin, ZO-1, CK-18 などの上皮マーカーはいずれも上昇し, N-cadherin, Vimentin などの間葉系マーカーは減少する. 一方で, 内因性 miR-124 レベルの高い HEC-1 において, miR-124 をノックダウンすると (Anti), 上皮系マーカーは減少し, 間葉系マーカーは上昇することが確認された (図 13C (再掲), 図 17A および B) .

この結果は, miR-124 が EMT を抑制的に制御する可能性を示唆したこれまでの実験結果を支持するものであった.

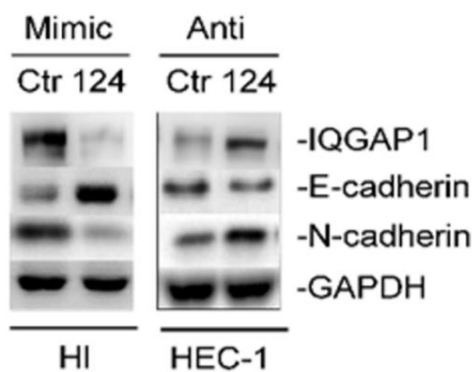


図 13C.

miR-124 を過剰発現させた HI 細胞, miR-124 をノックダウンした HEC-1 細胞における IQGAP1, E-cadherin, N-cadherin タンパク発現量の解析.

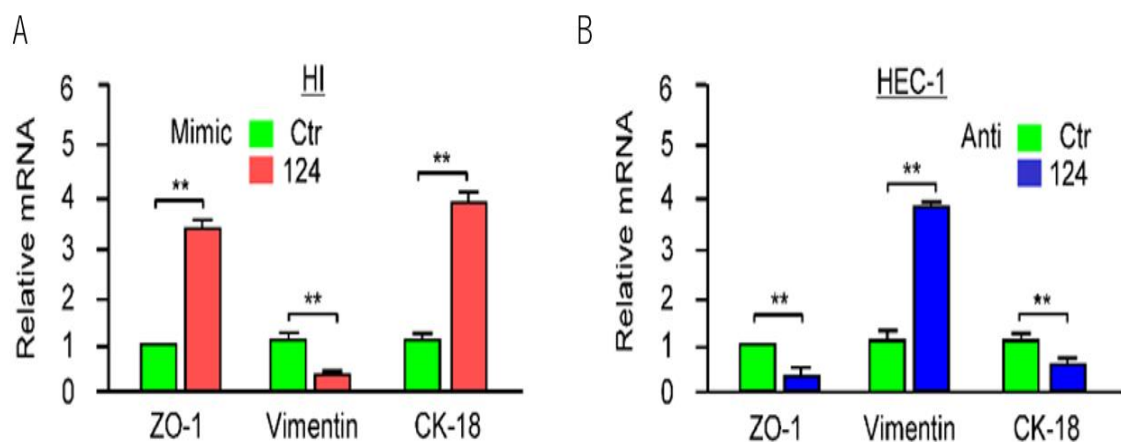


図 17. miR-124 発現の変化による上皮マーカー (ZO-1, CK-18) および間葉系マーカー (Vimentin) の相対発現量の定量 PCR による解析.

(A) miR-124 を過剰発現させた HI 細胞, (B) miR-124 をノックダウンした HEC-1 細胞 ** $P < 0.01$

3-4. miR-124 は IQGAP1 の発現を抑制することで, 子宮体癌細胞の悪性度を抑制する

miR-124 が子宮体癌細胞の遊走, 浸潤, 増殖といった形質を抑制するとき, IQGAP1 が関与しているのかを明らかにしようと試みた.

すでに示してきたように, miR-124 を過剰発現させた HI 細胞 (Mimic 124) では, 遊走能, 浸潤能, 増殖能いずれも有意に低下した.

次に miR-124 の影響を受けないように 3' -UTR が欠損した IQGAP1 cDNA を過剰発現させると, 悪性形質は部分的に復活することが明らかになった (図 18A-C の右端の bar) .

この結果は、miR-124 による子宮体癌細胞の悪性形質の抑制が、主に IQGAP1 を抑制することで生じている可能性を示唆するものであった。

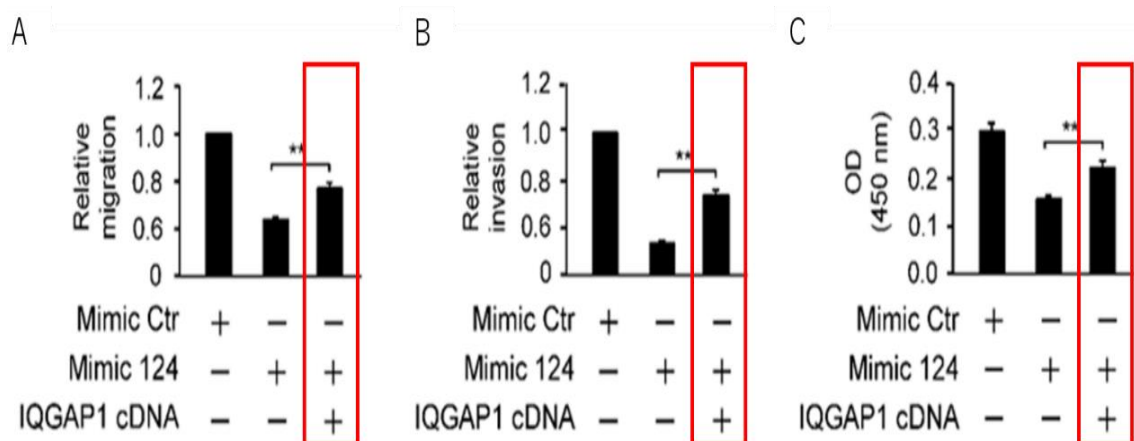


図 18. 高浸潤能 HI 細胞に 3' -UTR 領域欠損 IQGAP1 cDNA vector と miR-124 mimic を導入した場合の遊走能 (A), 浸潤能 (B), 増殖能 (C) の変化.

** $P < 0.01$.

4. miR-124 は子宮体癌細胞において epigenetic に抑制されている

miR-124 の発現が epigenetic な制御を受けるのかを検討する目的で以下の実験を行った。

4-1. DNA メチル化阻害薬の 5-AZA は miR-124 レベルを上げる

これまでの結果から、子宮体癌細胞株では miR-124 が抑制されていることが明らかになったが、これが DNA メチル化やヒストン修飾などの epigenetic な機構によるかを明らかにしたいと考えた。

子宮体癌における tumor suppressor である miR-34b は、HI と HEC-1 細胞株に 5-AZA (DNA メチル化阻害薬) を作用させるとアップレギュレーションすることから、DNA メチル化により抑制されていることがすでに示されている⁴⁵。そこで 5-AZA と、TSA (ヒストン脱アセチル化阻害薬) を用いて miR-124 の発現の度合いを検討し、コントロールとして DNA メチル化により制御される miR-34b を用いた。

HI, HEC-1 双方において miR-124 の発現は、5-AZA 単独、あるいは 5-AZA と

TSA の併用で有意に上昇し、5-AZA に用量依存性の傾向も見られたが、TSA 単独では有意な変化を認めなかった（図 19）。

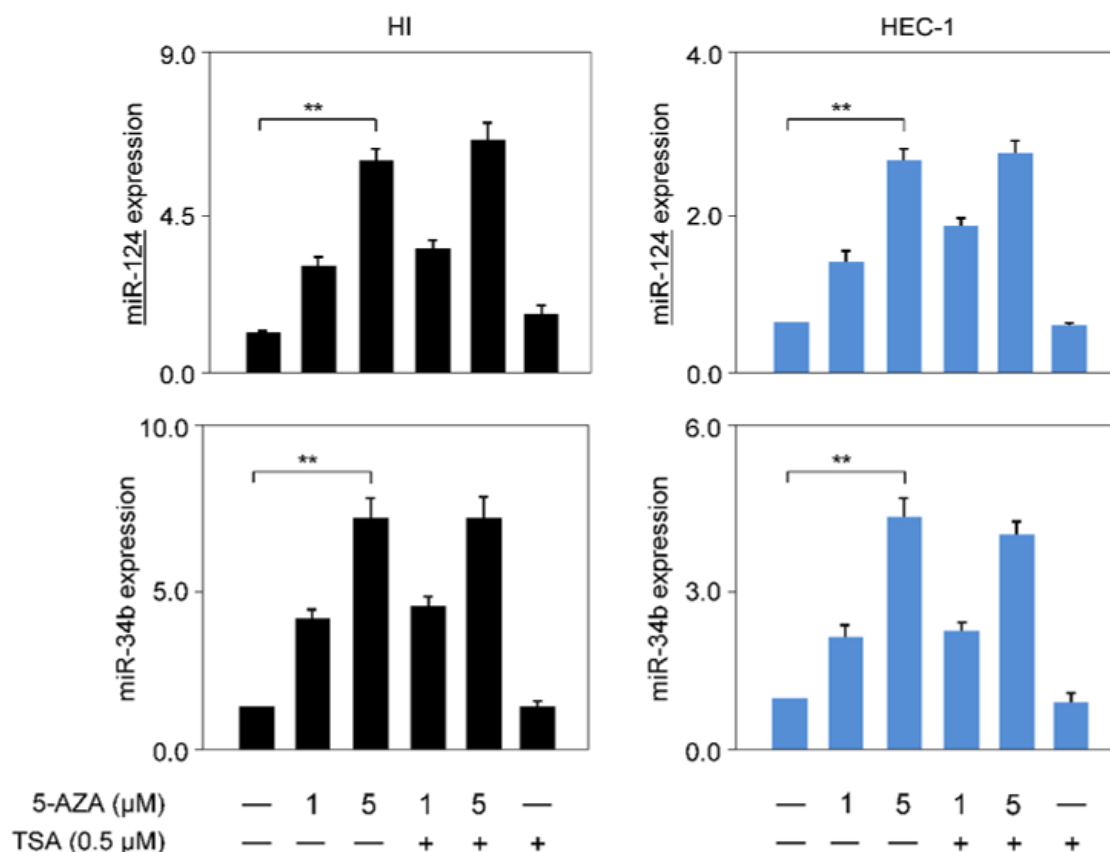


図 19. HI 細胞株および HEC-1 細胞株における miR-124 および miR-34b の発現に及ぼす 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA) と Trichostatin A (TSA) の効果

4-2. 5-AZA は IQGAP1 タンパクレベルを減少させる

続いて HI, HEC-1 における 5-AZA の IQGAP1 タンパク発現に対する影響を検討した。いずれの細胞株においても、5-AZA は IQGAP1 タンパクレベルを減少させたが、これは 5-AZA が miR-124 レベルを上昇させること（図 19）と矛盾しない結果であった（図 20）。

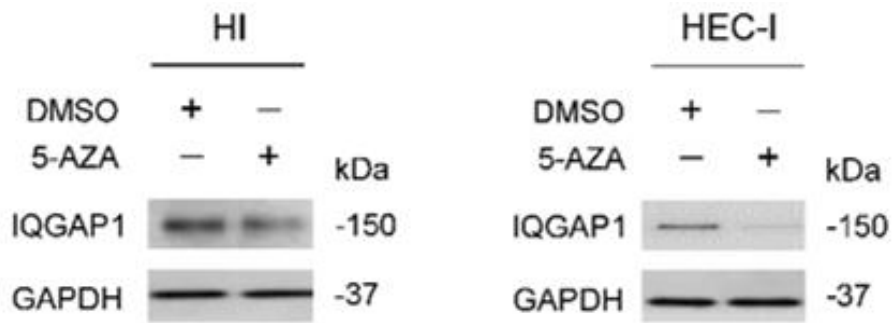


図 20. HI 細胞株および HEC-1 細胞株における IQGAP1 タンパク発現量に及ぼす 5-AZA の効果

4-3. 5-AZA は子宮体癌細胞の悪性形質を減弱させる

DNA メチル化阻害薬の 5-AZA が子宮体癌細胞の悪性形質におよぼす影響を検討した。5-AZA を投与すると HI, HEC-1 双方で腫瘍細胞の浸潤, 増殖を抑制することが明らかになった (図 21)。

子宮体癌細胞株において, miR-124 の発現を抑制している機構に, ヒストン脱アセチル化阻害薬の TSA は影響せず, 5-AZA の影響を強く受ける (図 19) ことから, miR-124 の発現抑制には, ヒストン修飾より DNA メチル化が主に関わっている可能性が示唆される結果となった。

以上から, 子宮体癌細胞においては, DNA メチル化の異常により miR-124 の発現が抑制されることで, IQGAP1 の過剰発現を招き, EMT が誘導されることを示唆する結果となった。

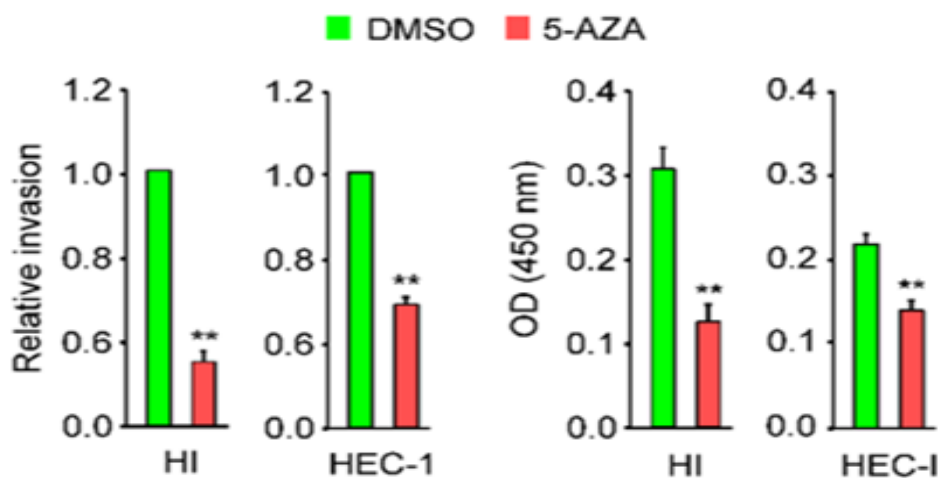


図 21. HI 細胞株および HEC-1 細胞株の浸潤能, 増殖能に及ぼす 5-AZA の効果

5. 子宮体癌において miR-124 の発現低下は予後不良と関連する可能性がある

miR-124 の発現低下が子宮体癌の臨床的成績に影響するかどうかを検討するために The Cancer Genome Atlas : TCGA のデータを SurvMicro web tool を用いて検討した。これは TCGA 内のデータを基に microRNA レベルによりリスクスコアを与え、Low risk 群と High risk 群に層別化し予後を比較する手法である⁵⁶。

TCGA 内の子宮体癌 309 症例について上記のように 2 群に分け、Kaplan-Meier の生存曲線を作成すると、統計学的な有意差はないものの High risk 群で予後不良である傾向を認めた (図 22A)。また High risk 群で miR-124 の発現レベルが有意に低いことが明らかになった (図 22B)。

以上から、子宮体癌症例において miR-124 の発現レベル低下は予後不良と相関する可能性があることが明らかとなった。

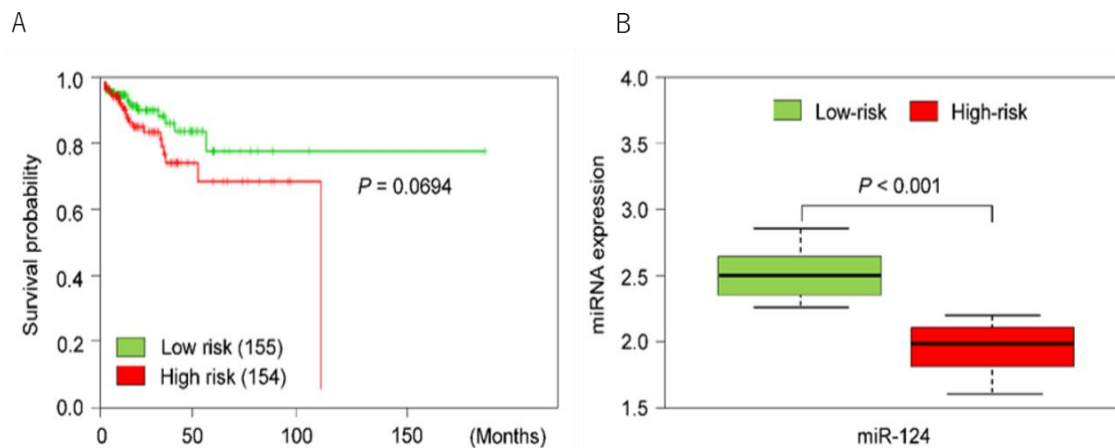


図 22. TCGA データベースの子宮体癌 309 例について、SurvMicro データベースを用いた生存解析で予後良好群 (low risk) 及び予後不良群 (high risk) に分けて Kaplan-Meier 生存曲線を作成し (A), その 2 群における miR124 発現量を比較した (B). 予後不良群では miR-124 発現量が有意に低下していた。

考察

1. miR-124/IQGAP1 シグナル経路と子宮体癌の EMT

本研究により、多くの癌腫で発現が亢進しており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、EMT の誘導や癌細胞の悪性形質の獲得に深く関与していることが明らかになった。子宮体癌細胞では、miR-124 が tumor suppressor として機能し、IQGAP1 の発現を抑制的に制御することを初めて明らかにした。さらに、miR-124 の発現が DNA メチル化異常により抑制されることを明らかにした。miR-124/IQGAP1 分子経路は EMT の誘導に強く関与し、子宮体癌の転移に重要な役割を果たしていると考えられた。miR-124 または IQGAP1 を標的とすることで、新たな子宮体癌の治療法の開発に役立つことが期待される。

2. 子宮体癌 EMT における IQGAP1 の役割

2-1. 子宮体癌における IQGAP1 の過剰発現

多くの研究により、大腸癌⁵⁷、卵巣癌⁵⁸、膵臓癌⁵⁹、非小細胞肺癌⁶⁰などの固形癌において、IQGAP1 の発現が亢進していることが判明し、IQGAP1 の高発現は、癌の発生、進展、治療抵抗性および患者の予後不良に深く関与していることが報告されている。しかしながら、子宮体癌における IQGAP1 の発現についての報告はこれまでなかった。本研究では、低浸潤能の子宮体癌細胞株に比べ、高浸潤能の子宮体癌細胞株の方が、IQGAP1 を高発現していることを初めて発見した。今後さらなる解析を行い、子宮体癌進展における IQGAP1 発現の臨床的意義と予後との関連性について評価を行う予定である。

2-2. IQGAP1 による子宮体癌細胞悪性形質の増強

本研究では、IQGAP1 に対する gain-of-function および loss-of-function experiments を行った結果、IQGAP1 の発現亢進により、子宮体癌細胞の運動能、浸潤能、増殖能が増強することが明らかとなった。また、IQGAP1 siRNA あるいは miR-124 を導入することにより、IQGAP1 の発現を低下させることで、これらの悪性形質を抑制できることを明らかにした。

一方、EMT の誘導は、浸潤・転移能だけではなく、薬剤耐性の獲得、癌幹細胞の発生にも大きく寄与していることが明らかにされている³²。例えば、最新の卵巣癌における研究によると、CD24 陰性、OCT4 陽性、SOX2 陽性の癌幹細胞様細胞 (cancer stem cell-like cells : CSC-LCs) では IQGAP1 の発現は減少しているが、CSC-LCs が悪性度の高い細胞に分化するときに IQGAP1 の発現が亢進しているため、IQGAP1 は卵巣癌の転移に重要な役割を担っていると報告された⁶¹。

今後、子宮体癌、特に転移しやすく抗癌剤治療に抵抗性を示すタイプ II 体癌において、IQGAP1 が癌幹細胞の特徴である薬剤耐性や自己複製能にどのような影響を与えるかについて、さらに検討を進める予定である。

2-3. IQGAP1 による子宮体癌細胞 EMT の誘導

IQGAP1 は、Rac1 や Cdc42 などの標的タンパクであり、細胞骨格、特にアクチンフィラメントと微小管を制御し、細胞内シグナル伝達に多彩な機能を有すると考えられている^{62, 63}。IQGAP1 は E-cadherin のプロモーター部位に直接に結合し、E-cadherin の発現を抑制することで、癌転移に大きな役割を果たしていると考えられている^{62, 63}。食道扁平上皮癌における報告では、RNA 干渉法を用いて IQGAP1 の発現を抑制すると、癌細胞の増殖能、運動能、浸潤能、さらには転移能力が著明に低下することが *in vitro* で示され、また腫瘍の縮小効果があることが *in vivo* で確認された⁶⁴。

本研究では、子宮体癌細胞においても、IQGAP1 が E-cadherin の発現を抑制すると同時に、間葉系マーカーである N-cadherin, Vimentin の発現を上昇させ、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、これまで報告されていた、E-cadherin の発現低下が子宮体癌の予後不良因子である⁶⁵ 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 な役割を初めて明らかにするものである。

3. 子宮体癌における miR-124 の抗癌効果およびその発現制御

われわれは、子宮体癌細胞株を用いて、EMT を抑制的に関与する miRNA として miR-124 を同定し、その癌抑制機能について検証を行った。miR-124 は、乳癌、大腸癌、膵臓癌など複数の癌種に共通して発現が低下していることが知られている⁴⁷⁻⁴⁹。したがって miR-124 は、癌の発生や進展と強く関連していると推定され、実際に、miR-124 の標的遺伝子として、UHRF1⁶⁶、STAT3⁶⁷ など複数の癌遺伝

子が報告されている。miR-124 を様々な癌細胞に導入し、さらにマウスに移植した結果、腫瘍の増殖と転移が顕著に抑制されることが報告されている^{67, 68}。

本研究は *in vitro* のみの検討であり、miR-124 を標的することで、子宮体癌において実際に抗癌効果を示すかどうか *in vivo* で検討する必要がある。新しい核酸医薬として、子宮体癌治療における miR-124 の治療応用の可能性について検討するのは重要な課題である。

最近の報告では、野生型 p53 は miR-124 の発現を増加することで、B 細胞性リンパ腫の進展を抑えることが報告されている⁶⁸。変異型 p53 タンパク質が、どのように miR-124 などの癌抑制 miRNAs の発現に影響するのか、また、これらの miRNA を介して、子宮体癌 EMT や転移を制御しているのかどうかを確認することは、今後の検討課題である。

DNA メチル化阻害薬が、過剰なメチル化により発現が抑制された癌抑制遺伝子を、再活性化することで抗腫瘍効果を示すことが知られており、骨髄異型性症候群に対して DNA メチル基転移酵素阻害薬である Azacitidine などが臨床応用されている⁶⁹。本研究より、miR-124 発現低下と DNA メチル化異常の関連が明らかとなり、複数の標的遺伝子を持つ miR-124 の活性化により、子宮体癌細胞の悪性形質を制御できる可能性が示された。一方、DNA メチル化阻害薬である Zebularine は、5-AZA と比較して安定性が高く低毒性であることが知られている。われわれの最近の研究により、Zebularine の処理によって子宮頸癌細胞の増殖が抑制されるが、正常細胞には細胞毒性を示さないことが明らかにされた⁷⁰。今後、子宮体癌治療における DNA メチル化阻害薬の臨床応用の可能性も視野に入れて、研究を継続したいと考えている。

4. 癌の molecular classification および molecular staging

古典的には癌は発生臓器別に分類され、発生臓器を構成する上皮細胞との形態的類似性に基づいて高分化度から低分化度までの分化度分類が行われている。細胞の脱分化は癌を特徴づける現象の一つであり、発生する上皮細胞の特徴が異なっても癌の組織学的形態が類似することがしばしば認められる。子宮頸部、子宮体部、卵管、卵巢、腹膜には漿液性腺癌が発生する。これらの病理組織学的に類似した形態を取る悪性腫瘍は、分子生物学的特徴も類似しており、タイプ II 体癌である漿液性腺癌は 90% に *TP53* 変異が認められ、卵巢の漿液性腺癌の中で high grade serous carcinoma とされるものの 94% に *TP53* 変異が認められる。

しかし、臨床的には抗癌剤感受性に差が認められ、婦人科癌で頻用される Paclitaxel-Carboplatin の併用化学療法（TC 療法）は、卵巣漿液性腺癌に高い奏効率（84%）⁷¹を示すが、子宮体癌の漿液性腺癌では中程度の奏効率（50%）⁷²である。このように形態的には類似していても癌の悪性度に関連する phenotype は異なっているため、一つの biomarker を用いて他癌腫への薬剤臨床応用は難しいことが示されている。すでに述べたように、miR-124 は子宮体癌だけでなく、他の固形癌でも発現が低下しており、いずれも tumor suppressor としての機能が報告されている⁴⁷⁻⁴⁹。今後これら複数の癌腫で共通する遺伝子や miRNA の変異を解析し、癌腫間での相同性あるいは差異を理解することが、新しい治療法を確立するために重要と考えられる。

2006 年から米国で開始された大型癌プロジェクトである TCGA (The Cancer Genome Atlas) では、25 以上の異なるタイプの腫瘍から、10000 検体以上についての遺伝子変異、コピー数、遺伝子発現、DNA メチル化、microRNA、RPPA (reverse-phase proteomic arrays)、臨床データから、癌特異的な分子異常を発見し、そのデータを一般に公開している⁷³。子宮体癌についても TCGA データを用いて類型分類が試みられ、POLE ultramutated, microsatellite instability hypermutated, copy-number low, copy-number high の 4 カテゴリーが提唱されている⁷⁴。また、子宮体癌特異的な分子機構の profile を明らかにし、治療対象となり得る分子機構を同定する目的で、子宮体癌特異的に発現している遺伝子 (Differentially expressed genes) と miRNA (Differentially expressed miRNAs) を、TCGA データと、複数の予測アルゴリズムを用いて解析し、新しい「転写因子 - miRNA - 遺伝子ネットワーク」が作成され報告されている⁷⁵。この領域の研究は急速に展開しており、TCGA などのメタ解析を、われわれの研究に積極的に取り入れる必要があると考える。

癌の進行期は、治療成績を治療方法間あるいは施設間で比較するために、癌を癌の拡がりと予後との関係に基づいて分類されたものである。婦人科癌の進行期は癌の局所の拡がりとリンパ節転移の有無を中心とした臨床的あるいは手術・病理学的予後因子で決定される。子宮体癌の FIGO (International Federation of Gynecologic Oncology) 国際進行期は 1988 年に、それまでの術前に決定される臨床的分類から手術・病理組織学結果に基づいて術後に決定される手術分類に変更された。この変更によって、より正確な予後診断に基づいて術後補助療法の個別化が可能になった。しかし、癌の予後は癌の拡がりだけでは

なく、癌の悪性度にも規定される。これまでの研究で、個々の癌の分子的特徴は悪性度、治療への反応性、予後と密接に関わっていることが明らかにされているが、現在の FIGO 進行期分類や TNM 分類にはこれらの成果が反映されていない。近い将来にはこのような分子的特徴に基づいた進行期/予後分類が行われるようになり、発生臓器別の治療選択ではなく、個々の症例が有する分子学的特徴により、最も適した治療法を選択することが可能になると予測される。

5. miR-124/IQGAP1 シグナル経路研究の子宮体癌診療への応用

5-1. miR-124 のバイオマーカーとしての応用

近年、miRNA がバイオマーカーとして有用であるとの報告が増え、世界中の研究者から注目を集めている。miRNA の発現パターンは、臓器によって大きく異なり、多くの疾患とも関わっていることが知られている。また、血液、尿、唾液など生体からの採取が容易な体液中でエクソソーム内に安定して存在していることも、miRNA がバイオマーカーとして適している理由である⁷⁶。

本研究において、再発高リスクの子宮体癌患者群で miR-124 の発現量が顕著に低下していることが明らかになった。したがって、miR-124 は高リスクの子宮体癌に対して、有用なマーカーとなり得る可能性が示唆された。今後 miR-124 を単独で、もしくは他の miRNA を組み合わせ、癌関連 miRNA の発現量を評価することで、子宮体癌の悪性度の判断、予後予測などを可能にすることを期待している。

5-2. IQGAP1 を標的とする子宮体癌診断・治療法の可能性

特異的に IQGAP1 と結合するペプチドによって、IQGAP1-ERK1/2 間の相互関係を遮断すると、RAS や RAF 経路の造腫瘍能が抑制されることが報告されている⁷⁷。われわれは、IQGAP1 が高悪性度子宮体癌細胞において、EMT を促進し悪性形質を高める機能を有するという分子生物学的検討結果を初めて示した。さらに IQGAP1 を抑制的に制御する tumor suppressor として、miR-124 を同定した。

miR-124 を回復させることで IQGAP1 を抑制できる可能性を示したが、その薬剤を標的とする IQGAP1 にどのように届けるか、また、IQGAP1 は正常組織にも発現しているため、IQGAP1 の抑制が他臓器にどのような影響を与えるかを検討することは必須である。これらの問題を解明し、予後不良である高悪性度子宮体癌の新しい治療法の開発に貢献していきたい。

今後は、臨床検体における IQGAP1 の発現を、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ターゲットとなる可能性について、引き続いて研究を進めていきたいと考えている。

総括と結論

本研究全体より以下に示す主な 5 項目の新知見が得られた.

高悪性度子宮体癌細胞株において：

1. IQGAP1 の発現は亢進している.
2. IQGAP1 は EMT を誘導し，細胞遊走能，浸潤能，増殖能を亢進する.
3. miR-124 は DNA 過剰メチル化により発現抑制される.
4. miR-124 は遊走能，浸潤能，増殖能を抑制する.
5. miR-124 は IQGAP1 の発現を直接抑制する.

本研究により，miR-124 は IQGAP1 を直接制御することによって子宮体癌細胞の EMT を抑制し，細胞増殖，浸潤などの悪性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．また miR-124 の発現低下は子宮体癌患者の予後不良と相関する可能性があることから，バイオマーカーとしての役割も期待できる．さらに epigenetic に制御された miR-124 の発現を回復させ，IQGAP1 の発現を抑制することは，子宮体癌の新しい治療法になる可能性があると考えられた．

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，論文作成などご指導いただきました総合女性医療システム学講座特任助教 董培新先生に深くお礼申し上げます。

引用文献

1. Burke, W.M., Orr, J., Leita, M., Salom, E., Gehrig, P., Olawaiye, A.B., Brewer, M., Boruta, D., Villella, J., Herzog, T. & Abu Shahin, F. Endometrial cancer: a review and current management strategies: part I. *Gynecol Oncol.* **134**, 385-392 (2014) .
2. Honda, T., Urabe, R., Kurita, T., Kagami, S., Kawagoe, T., Toki, N., Matsuura, Y. & Hachisuga T. Trends in the demographic and clinicopathological characteristics in Japanese patients with endometrial cancer, 1990-2010. *Int J Womens Health.* **4**, 207-212 (2012).
3. Morice, P., Leary, A., Creutzberg, C., Abu-Rustum, N. & Darai, E. Endometrial cancer. *Lancet.* **387**, 1094-108 (2016) .
4. Bokhman, J.V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology* **15**, 10-17 (1983) .
5. Sherman, M. E., Bur, M. E. & Kurman, R. J. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Human pathology* **26**, 1268-1274 (1995) .
6. Banno, K., Yanokura, M., Iida, M., Masuda, K. & Aoki, D. Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: involvement of genetics and epigenetics. *J Obstet Gynaecol Res* **40**, 1957-1967 (2014) .
7. Todo, Y., Kato, H., Kaneuchi, M., Watari, H., Takeda, M. & Sakuragi, N. Survival effect of para-aortic lymphadenectomy in endometrial cancer (SEPAL study): a retrospective cohort analysis. *Lancet.* **375**, 1165-1172 (2010) .
8. Lacey, JV, J. r., Mutter, G. L., Ronnett, B. M., Ioffe, O. B., Duggan, M. A., Rush, B. B., Glass, A. G., Richesson, D. A, Chatterjee, N., Langholz, B. & Sherman, M. E. PTEN expression in endometrial biopsies as a marker of progression to endometrial carcinoma. *Cancer research* **68**, 6014-6020 (2008) .
9. Yeramian, A., Moreno-Bueno, G., Dolcet, X., Catus, L., Abal, M., Colas, E., Reventos, J., Palacios, J., Prat, J. & Matias-Guiu, X. Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression. *Oncogene* **32**, 403-413 (2013) .
10. Ano Bom, A.P., Rangel, L.P., Costa, D.C., de Oliveira, G.A., Sanches, D., Braga, C.A., Gava, L.M., Ramos, C.H., Cepeda,

- A.O., Stumbo, A.C., De Moura Callo, C.V., Cordeiro, Y., Silva, J.L. Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: implications for cancer. *J Biol Chem.* **33**, 28152-28162 (2012).
11. Brachova, P., Muetting, S.R., Carlson, M.J., Goodheart, M.J., Button, A.M., Mott, S.L., Dai, D., Thiel, K.W., Devor, E.J. & Leslie, K.K. TP53 oncomorphic mutations predict resistance to platinum- and taxane-based standard chemotherapy in patients diagnosed with advanced serous ovarian carcinoma. *Int J Oncol.* **46**, 607-618 (2015) .
 12. Sakuragi, N., Hirai, A., Tada, M., Yamada, H., Yamamoto, R., Fujimoto, S. & Moriuchi, T. Dominant-negative mutation of p53 tumor suppressor gene in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* **83**, 485-490 (2001) .
 13. Sakuragi, N., Watari, H., Ebina, Y., Yamamoto, R., Steiner, E., Koelbl, H., Yano, M., Tada, M. & Moriuchi, T. Functional analysis of p53 gene and the prognostic impact of dominant-negative p53 mutation in endometrial cancer. *Int J Cancer.* **116**, 514-519 (2005) .
 14. Talhouk, A., McConechy, M.K., Leung, S., Li-Chang, H.H., Kwon, J.S., Melnyk, N., Yang, W., Senz, J., Boyd, N., Karnezis, A.N., Huntsman, D.G., Gilks, C.B. & McAlpine, J.N. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer.* **113**, 299-310 (2015) .
 15. Roque, D.R., Makowski, L., Chen, T.H., Rashid, N., Hayes, D.N. & Bae-Jump, V. Association between differential gene expression and body mass index among endometrial cancers from The Cancer Genome Atlas Project. *Gynecol Oncol.* **142**, 317-322 (2016) .
 16. Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* **2**, 442-454 (2002) .
 17. Steeg, P.S. Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer.* **16**, 201-218 (2016) .
 18. Greenburg, G. & Hay, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol.* **95**, 333-339 (1982) .
 19. Nguyen, L.V., Vanner, R., Dirks, P. & Eaves, C. J. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer.* **12**, 133-143 (2012) .
 20. Magee, J. A., Piskounova, E., Morrison, S. J. Cancer stem cells : impact, heterogeneity, and uncertainly. *Cancer Cell.* **3**, 283-296 (2012).
 21. Kyo, S. & Kato, K. Endometrial Cancer Stem Cell as a Potential Therapeutic Target. *Semin Reprod Med.* **33**, 341-349 (2015) .
 22. Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y.,

- Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J. & Weinberg, R. A. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. **133**, 704-715 (2008) .
23. Kang, Y. & Massague, J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* **118**, 277-279 (2004) .
 24. Campo, L., Zhang, C. & Breuer, E. K. EMT-Inducing Molecular Factors in Gynecological Cancers. *BioMed research international* **2015**, 420891-420899 (2015) .
 25. Dong, P., Konno, Y., Watari, H., Hosaka, M., Noguchi, M. & Sakuragi, N. The impact of microRNA-mediated PI3K/AKT signaling on epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness in endometrial cancer. *J Transl Med*. **12**, 231-239 (2014) .
 26. Dong, P., Kaneuchi, M., Watari, H., Hamada, J., Sudo, S., Ju, J. & Sakuragi, N. MicroRNA-194 inhibits epithelial to mesenchymal transition of endometrial cancer cells by targeting oncogene BMI-1. *Mol Cancer*. **10**, 99-108 (2011) .
 27. Dong, P., Karaayvaz, M., Jia, N., Kaneuchi, M., Hamada, J., Watari, H., Sudo, S., Ju, J. & Sakuragi, N. Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene*. **32**, 3286-3295 (2013) .
 28. Tanaka, Y., Terai, Y., Kawaguchi, H., Fujiwara, S., Yoo, S., Tsunetoh, S., Takai, M., Kanemura, M., Tanabe, A. & Ohmichi, M. Prognostic impact of EMT (epithelial-mesenchymal-transition) -related protein expression in endometrial cancer. *Cancer Biol Ther* **14**, 13-19 (2013) .
 29. Sakuragi, N., Nishiya, M., Ikeda, K., Ohkouch, T., Furth, E. E., Hareyama, H., Satoh, C. & Fujimoto, S. Decreased E-cadherin expression in endometrial carcinoma is associated with tumor dedifferentiation and deep myometrial invasion. *Gynecologic oncology* **53**, 183-189 (1994) .
 30. Fukata, M., Kuroda, S., Nakagawa, M., Kawajiri, A., Itoh, N., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., Fujisawa, H., Kikuchi, A. & Kaibuchi, K. Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *J Biol Chem* **274**, 26044-26050 (1999) .
 31. Mateer, S. C., McDaniel, A. E., Nicolas, V., Habermacher, G. M., Lin, M. J., Cromer, D. A., King, M. E. & Bloom, G. S. The mechanism for regulation of the F-actin binding activity of IQGAP1 by calcium/calmodulin. *J Biol Chem* **277**, 12324-12333 (2002) .

32. Hedman, A. C. , Smith, J.M. & Sacks, D.B. The biology of IQGAP proteins: beyond the cytoskeleton. *EMBO Rep.* **16**, 427–446 (2015) .
33. Ohtani-Fujita, N. , Fujita, T. , Aoike, A. , Osifchin, N.E. , Robbins, P.D. & Sakai, T. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene.* **8**, 1063–1067 (1993) .
34. Jones, P.A. & Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* **3**, 415–428 (2002) .
35. Tao, Meng Hua., Freudenheim, Jo L. DNA methylation in endometrial cancer. *Epigenetics.* **5**, 491–498 (2014).
36. Taft, R. J., Pang, K, C., Mercer, T. R., Dinger, M., Mattick, J. S. Non-coding RNA :regulators of disease. *J Pathol.* **2**, 126–139 (2010)
37. Ma, C. , Liu, Y. & He, L. MicroRNAs – powerful repression comes from small RNAs. *Sci China C Life Sci .* **52**, 323–330 (2009) .
38. Jung, H.J. & Suh, Y. Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Front Genet.* **5**, 472–480, (2015) .
39. Zaravinos, A. The Regulatory Role of MicroRNAs in EMT and Cancer. *J Oncol* **2015**, 865816–865822 (2015) .
40. Jansson, M. D. & Lund, A. H. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol* **6**, 590–610 (2012) .
41. Lin, S. & Gregory, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews. Cancer* **15**, 321–333 (2015) .
42. Dong, P. , Kaneuchi, M. , Konno, Y. , Watari, H. , Sudo, S. & Sakuragi, N. Emerging therapeutic biomarkers in endometrial cancer. *Biomed Res Int.* **2013**, 130362–130372 (2013) .
43. Cochrane, D.R. , Spoelstra, N.S. , Howe, E.N. , Nordeen, S.K. & Richer, J.K. MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Ther.* **8**, 1055–1066 (2009) .
44. Castilla, M. Á. , Moreno-Bueno, G. , Romero-Pérez, L. , Van, De, Vijver, K. , Biscuola, M. , López-García, M. Á. , Prat, J. , Matías-Guiu, X. , Cano, A. , Oliva, E. , Palacios, J. Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma. *J Pathol.* **223**, 72–80 (2011) .
45. Hiroki, E. , Suzuki, F. , Akahira, J. , Nagase, S. , Ito, K. , Sugawara, J. , Miki, Y. , Suzuki, T. , Sasano, H. , Yaegashi, N. MicroRNA-34b functions as a potential tumor suppressor in endometrial serous adenocarcinoma.

- Int J Cancer*. **131**, 395–404 (2012) .
46. Liu, P., Wang, C., Ma, C., Wu, Q., Zhang, W. & Lao, G. MicroRNA-23a regulates epithelial-to-mesenchymal transition in endometrial endometrioid adenocarcinoma by targeting SMAD3. *Cancer Cell Int*. **16**, 67–77 (2016) .
 47. Wang, Y., Chen, L., Wu, Z., Wang, M., Jin, F., Wang, N., Hu, X., Liu, Z., Zhang C.Y., Zen, K., Chen, J., Liang, H., Zhang, Y. & Chen, X. miR-124-3p functions as a tumor suppressor in breast cancer by targeting CBL. *BMC Cancer*. **16**, 826–835 (2016) .
 48. Taniguchi, K., Sugito, N., Kumazaki, M., Shinohara, H., Yamada, N., Nakagawa, Y., Ito, Y., Otsuki, Y., Uno, B., Uchiyama, K. & Akao, Y. MicroRNA-124 inhibits cancer cell growth through PTB1/PKM1/PKM2 feedback cascade in colorectal cancer. *Cancer Lett*. **363**, 17–27 (2015).
 49. Wang, P., Chen, L., Zhang, J., Chen, H., Fan, J., Wang, K., Luo, J., Chen, Z., Meng, Z. & Liu, L. Methylation-mediated silencing of the miR-124 genes facilitates pancreatic cancer progression and metastasis by targeting Rac1. *Oncogene*. **33**, 514–524 (2014) .
 50. Du, S., Li, H., Sun, X., Li, D., Yang, Y., Tao, Z., Li Q. & Liu, K. MicroRNA-124 inhibits cell proliferation and migration by regulating SNAI2 in breast cancer. *Oncol Rep*. **36**, 3259–3266 (2016) .
 51. Deng, D., Wang, L., Chen, Y., Li, B., Xue, L., Shao, N., Wang, Q., Xia, X., Yang, Y. & Zhi, F. MicroRNA-124-3p regulates cell proliferation, invasion, apoptosis, and bioenergetics by targeting PIM1 in astrocytoma. *Cancer Sci*. **107**, 899–907 (2016) .
 52. Wang, X., Liu, Y., Liu, X., Yang, J., Teng, G., Zhang, L. & Zhou, C. MiR-124 inhibits cell proliferation, migration and invasion by directly targeting SOX9 in lung adenocarcinoma. *Oncol Rep*. **35**, 3115–3121 (2016) .
 53. Li, Y., Zhang, Z., Liu, X., Huang, T., He, W., Shen, Y., Liu, X., Hong, K. & Cao, Q. miR-124 functions as a tumor suppressor in the endometrial carcinoma cell line HEC-1B partly by suppressing STAT3. *Mol Cell Biochem*. **388**, 219–231 (2014) .
 54. Suzuki, H., Maruyama, R., Yamamoto, E. & Kai, M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Mol Oncol*. **6**, 567–578 (2012) .
 55. Yao, X., Ireland, S.K., Pham, T., Temple, B., Chen, R., Raj, M.H. & Biliran, H. TLE1 promotes EMT in A549 lung cancer cells through suppression of E-cadherin. *Biochem Biophys Res Commun*. **455**, 277–284

(2014) .

56. Aguirre-Gamboa, R. & Trevino, V. SurvMicro: assessment of miRNA-based prognostic signatures for cancer clinical outcomes by multivariate survival analysis. *Bioinformatics* **30**, 1630–1632, (2014) .
57. Hayashi, H. , Nabeshima. , K, Aoki, M. , Hamasaki, M. , Enatsu, S. , Yamauchi, Y. , Yamashita, Y. & Iwasaki, H. Overexpression of IQGAP1 in advanced colorectal cancer correlates with poor prognosis-critical role in tumor invasion. *Int J Cancer* **126**, 2563–2574 (2010) .
58. Dong, P. , Nabeshima, K. , Nishimura, N. , Kawakami, T. , Hachisuga, T. , Kawarabayashi, T & Iwasaki H. Overexpression and diffuse expression pattern of IQGAP1 at invasion fronts are independent prognostic parameters in ovarian carcinomas. *Cancer letters* **243**, 120–127 (2006) .
59. Wang, X.X. , Li, X.Z. , Zhai, L.Q. , Liu, Z.R. , Chen, X.J. & Pei, Y. Overexpression of IQGAP1 in human pancreatic cancer. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* **12**, 540–545 (2013) .
60. Zhao, H. , Xie, C. , Lin, X. , Zhao, Y. , Han, Y. , Fan, C. , Zhang, X. , Du, J. , Han, Y. , Han, Q. , Wu, G. & Wang. E. Coexpression of IQ-domain GTPase-activating protein 1 (IQGAP1) and Dishevelled (Dvl) is correlated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *PLoS one* **9**, 113713–113720 (2014) .
61. Huang, L. , Xu, S. , Hu, D. , Lu, W. , Xie, X. , Cheng, X. IQGAP1 Is Involved in Enhanced Aggressive Behavior of Epithelial Ovarian Cancer Stem Cell-Like Cells During Differentiation. *Int J Gynecol Cancer*. **4**, 559–565 (2015).
62. Noritake, J. , Watanabe, T. , Sato, K. , Wang, S. & Kaibuchi, K. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *Journal of cell science* **118**, 2085–2092 (2005) .
63. Kuroda, S. , Fukata, M. , Nakagawa, M. , Fujii, K. , Nakamura, T. , Ookubo, T. , Izawa, I. , Nagase, T. , Nomura, N. , Tani, H. , Shoji, I. , Matsuura, Y. , Yonehara, S. & Kaibuchi, K. Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin- mediated cell-cell adhesion. *Science*. **281**, 832–835 (1998) .
64. Wang, X.X. , Wang, K. , Li, X.Z. , Zhai, L.Q. , Qu, C.X. , Zhao, Y. , Liu, Z.R. , Wang, H.Z. , An, Q.J. , Jing, L.W. & Wang, X.H. Targeted knockdown of IQGAP1 inhibits the progression of esophageal squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *PLoS One*. **9**, 96501–96511 (2014) .
65. Sakuragi, N. , Nishiya, M. , Ikeda, K. , Ohkouch, T. , Furth, E. E. , Hareyama,

- H., Satoh, C. & Fujimoto, S. Decreased E-cadherin expression in endometrial carcinoma is associated with tumor dedifferentiation and deep myometrial invasion. *Gynecologic oncology* **53**, 183-189 (1994) .
66. Wang, X., Wu, Q., Xu, B., Wang, P., Fan, W., Cai, Y., Gu, X. & Meng, F. MiR-124 exerts tumor suppressive functions on the cell proliferation, motility and angiogenesis of bladder cancer by fine-tuning UHRF1. *FEBS J.* **282**, 4376-4388 (2015) .
67. Cheng, Y., Li, Y., Nian, Y., Liu, D., Dai, F. & Zhang, J. STAT3 is involved in miR-124-mediated suppressive effects on esophageal cancer cells.. *BMC Cancer.* **15**, 306-314 (2015) .
68. Jeong, D., Kim, J., Nam, J., Sun, H., Lee, Y.H., Lee, T.J., Aguiar, R.C. & Kim, S.W. MicroRNA-124 links p53 to the NF- κ B pathway in B-cell lymphomas. *Leukemia.* **29**, 1868-1874 (2015) .
69. Gotze, K., Platzbecker, U., Giagounidis, A., Haase, D., Lubbert, M., Aul, C., Ganser, A., Germing, U., Hofmann, W. K. Azacitidine for treatment of patients with myelodysplastic syndromes (MDS): practical recommendations of the German MDS Study Group. *Ann Hematol.* **9**, 841-850 (2010).
70. Dong, P., Xiong, Y., Watari, H., Hanley, S.J., Konno, Y., Ihira, K., Suzuki, F., Yamada, T., Kudo, M., Yue, J. & Sakuragi, N. Suppression of iASPP-dependent aggressiveness in cervical cancer through reversal of methylation silencing of microRNA-124. *Sci Rep.* **6**, 35480-35491 (2016) .
71. Kumar, S., Mahdi, H., Bryant, C., Shah, J.P., Garg, G. & Munkarah, A. Clinical trials and progress with paclitaxel in ovarian cancer. *Int J Womens Health.* **2**, 411-427 (2010) .
72. Zagouri, F., Bozas, G., Kafantari, E., Tsiatas, M., Nikitas, N., Dimopoulos, M.A. & Papadimitriou, C.A. Endometrial cancer: what is new in adjuvant and molecularly targeted therapy? *Obstet Gynecol Int.* **2010**, 749579-749588 (2010) .
73. Kandoth, C., Schultz, N., Cherniack, A.D., Akbani, R., Liu, Y., Shen, H., Robertson, A.G., Pashtan, I., Shen, R., Benz, C.C., Yau, C., Laird, P.W., Ding, L., Zhang, W., Mills, G.B., Kucherlapati, R., Mardis, E.R. & Levine, D.A. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature.* **497**, 67-73 (2013) .
74. Tomczak, K., Czerwinska, P., Winznerowicz, M. The Cancer Genome Atlas (TCGA) : an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol.* **19**, 68-

- 77, (2015).
75. Sun, H., Yan, L., Tu, R., Zhang, Y., Ma, L., Tang, W., Li, L., Chen, W., Zhan, C., Zang, R. Expression Profiles of Endometrial Carcinoma by Integrative Analysis of TCGA Data. *Gynecol Obstet Invest.* **1**, (2016).
 76. Ferracin, M., Veronese, A., Negrini, M. Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn.* **3**, 297–308 (2010).
 77. Jameson, K.L., Mazur, P.K., Zehnder, A.M., Zhang, J., Zarnegar, B., Sage, J., Khavari, P.A. IQGAP1 scaffold-kinase interaction blockade selectively targets RAS-MAP kinase-driven tumors. *Nat Med.* **19**, 626–630 (2013) .