

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10718

研究課題名(和文) 子宮平滑筋肉腫における新規分子標的RSF-1の機能解析

研究課題名(英文) Function analysis of new molecular target RSF-1 for uterine leiomyosarcoma

研究代表者

石川 雅子 (Ishikawa, Masako)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：50467718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：子宮平滑筋肉腫、子宮体癌に対し、がん遺伝子RSF-1が分子標的治療の標的候補となるか検討した。子宮悪性腫瘍におけるRSF-1タンパク質発現と臨床病理学的因子との関連、予後について検討したところ、RSF-1過剰発現は無増悪生存率また全生存率の間に相関を認めなかった。しかし、機能解析からRSF-1ノックダウン細胞株はコントロールと比較し、有意に増殖能、浸潤能が減少することがわかった。以上の結果から、RSF-1は腫瘍の増殖能、浸潤能を有意に増加し腫瘍増殖、転移に関連すると考えられた。これより、治療標的となる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether oncogene RSF-1 would have the ability as molecular target therapy for uterine leiomyosarcoma and uterine carcinoma. We examined the association between expression of RSF-1 protein and clinicopathological factor for patients with malignant uterine tumor. There was no correlation between overexpression of RSF-1 protein and patient's progression free survival and overall survival. We also demonstrated that there was correlation between RSF-1 and ability of growth and invasion in uterine malignant tumors. So, we considered that RSF-1 would influence the ability of tumor growth and tumor metastasis. We considered it might be possible that RSF-1 would be the target of treatment for uterine malignant diseases.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：RSF-1 子宮悪性腫瘍 分子標的治療

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における子宮平滑筋肉腫 (Leiomyosarcoma:LMS 以下 LMS とする) は比較的稀だが極めて予後不良の疾患で既存の抗がん剤では全く効果がない。

治療成績向上のためには、LMS の分子生物学的特徴を解明し、その特徴にターゲットを絞った創薬が必要と考えられる。われわれはこれまで新規癌遺伝子 *RSF-1*、*Notch3*、*NAC1* において遺伝子導入した細胞を用いた機能解析にて癌遺伝子としての機能がある事、また siRNA や gamma-secretase inhibitor を用いた発現制御解析で *in vitro*、*in vivo* の両面で分子標的となりうる事を報告しており、LMS について *RSF-1* タンパク質発現が上昇していることを発見した。

### 2. 研究の目的

乳癌、卵巣癌では癌遺伝子としての *RSF-1* の機能が報告されたが、LMS における臨床病理学的意義は不明であった。今回、LMS における新規癌遺伝子 *RSF-1* の発現と臨床病理学因子、予後との関連について検討し、バイオマーカーとなり得るかも視野に入れ検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1)子宮悪性腫瘍と *RSF-1* 発現について

当初 LMS のみでの検討を試みたが症例数が少ないため、子宮悪性腫瘍全般を対象とした。101 例の子宮悪性腫瘍症例において *RSF-1* タンパク質発現レベルを免疫染色法で検討し、臨床病理学的因子との関連について検討した。また予後との関連についても検討した。使用した子宮悪性腫瘍組織は倫理委員会承認のもと、患者の同意は取得されている。

#### (2)*RSF-1* の機能解析について

子宮体癌細胞株の中で *RSF-1* 発現を認める HHUA を使用し、機能解析を行った。

siRNA を用い *RSF-1* ノックダウンを行い、growth assay, migration assay, invasion assay で増殖能、遊走能、浸潤能について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1)子宮悪性腫瘍と *RSF-1* 発現について

*RSF-1* タンパク質発現の検討：今回の検討で子宮悪性腫瘍において *RSF-1* タンパク質強発現は 25.7% (26/101) に認められた。ただし、特殊組織型 (clear cell carcinoma) や子宮頸部腺癌においては発現が低下していることもわかった【図 1】。

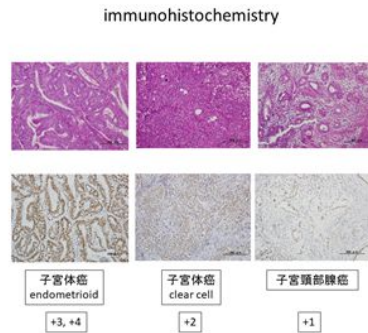


図 1 : 子宮体癌特殊組織型 (clear cell carcinoma) や子宮頸部腺癌において *RSF-1* の発現低下を認めた。

*RSF-1* 強発現と臨床病理学的因子との関連：*RSF-1* 強発現は臨床進行期、期の早期症例と正に相関する傾向を認めた。

*RSF-1* 強発現と予後：子宮悪性腫瘍自体の予後が良いことから、有意な結果は認めなかったが、*RSF-1* の強発現は無増悪生存率の上昇と相関する傾向にあった。

#### (2)*RSF-1* の機能解析について

子宮体癌細胞株を用いた検討

細胞株を用いた検討では、類内膜癌細胞株 4 株中 1 株 (HHUA) に *RSF-1* タンパク質発現を認めた。HHUA に対し、siRNA を用いたノックダウン実験を行った。

Soft agar assay では control siRNA に比べ *Rsf-1* siRNA でノックダウンしたものが有意にコロニー形成の減少を認めた ( $P=0.001$ )【図 2】

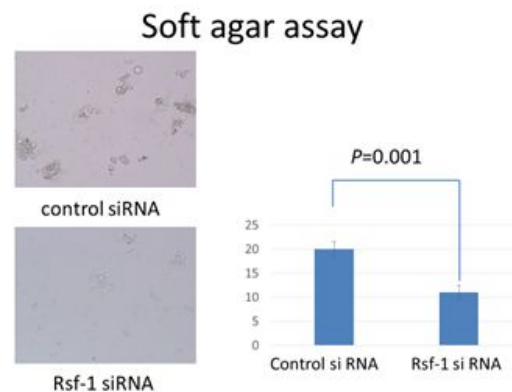


図 2 : Soft agar assay

control siRNA に比べ、*Rsf-1* siRNA でノックダウンしたものが有意にコロニー形成の減少を認めた ( $P=0.001$ )

Migration assay では Rsf-1 si RNA でノックダウンしたものが有意に遊走能の低下を認めた(P=0.001)【図3】。

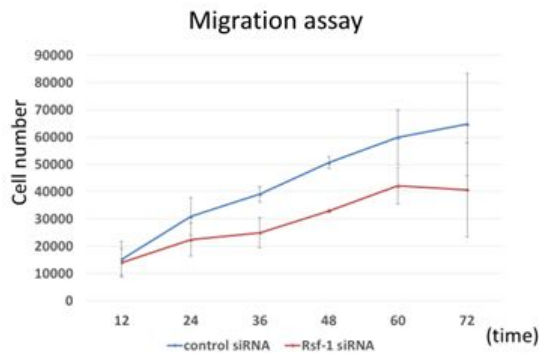


図3 : Migration assay

control si RNA に比べ、Rsf-1 si RNA でノックダウンしたものが有意に遊走能の低下を認めた。

Invasion assay では Rsf-1 si RNA でノックダウンしたものが有意に浸潤能の低下を認めた(P=0.021)【図4】。

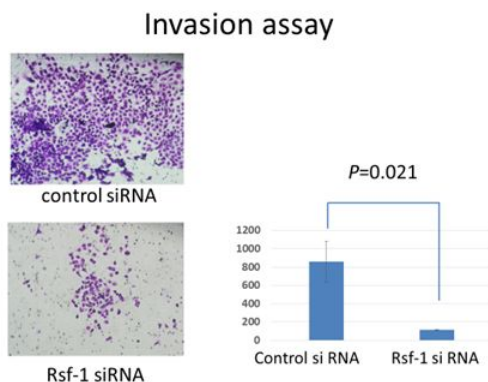


図4 : Invasion assay

Rsf-1 si RNA でノックダウンしたものが有意に浸潤能の低下を認めた(P=0.021)

以上の結果から、子宮悪性腫瘍におけるRSF-1タンパク質発現の頻度、臨床病理学的因子との関連について明らかな相関は認めなかったが、機能解析において癌遺伝子RSF-1は腫瘍の増殖能、浸潤能を優位に増加し腫瘍増殖、転移関連すると考えられた。これより、今後子宮体癌ではいまだ認められていない分子治療標的となる可能性があると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19件)

1. **Ishikawa M**, Nakayama K, Nakamura K, Ono R, Sanuki K, Yamashita H, Ishibashi T, Minamoto T, Iida K, Razia S, Ishikawa N, Kyo S. Affinity-purified DNA-based mutation profiles of endometriosis-related ovarian neoplasms in Japanese patients. **Oncotarget**. 22;9(19): 14754-63. 2018
2. Nakamura K, Nakayama K, Minamoto T, Ishibashi T, Ohnishi K, Yamashita H, Ono R, Sasamori H, Razia S, Hossain MM, Kamrunnahar S, **Ishikawa M**, Ishikawa N, Kyo S. Lynch Syndrome-Related Clear Cell Carcinoma of the Cervix: A Case Report. **Int J Mol Sci**. 19(4). pii: E979. 2018
3. Nakamura K, Nakayama K, **Ishikawa M**, Katagiri A, Katagiri H, Ishibashi T, Sato E, Kyo S. GnRH agonist pre-treatment for microwave endometrial ablation in women with less than 1 centimetre myometrial thickness. **J Obstet Gynaecol**.21: 1-3. 2018
4. Nakamura K, Nakayama K, Ishikawa N, **Ishikawa M**, Sultana R, Kiyono T, Kyo S. Reconstitution of high-grade serous ovarian carcinoma from primary fallopian tube secretory epithelial cells. **Oncotarget** 9(16):12609-19.2017
5. Yamashita H, Nakayama K, **Ishikawa M**, Nakamura K, Ishibashi T, Sanuki K, Ono R, Sasamori H, Minamoto T, Iida K, Sultana R, Ishikawa N, Kyo S. Microsatellite instability is a biomarker for immune checkpoint inhibitors in endometrial cancer. **Oncotarget** 9(5): 5652-64. 2017
6. Nakamura K, Nakayama K, Minamoto T, Ishibashi T, Sanuki K, Yamashita H, Ono R, Sasamori H, Komatsu-Fujii T, **Ishikawa M**, Kyo S. High preoperative Glasgow prognostic score is a negative prognostic factor for patients with endometrial carcinoma. **Mol Clin Oncol**. 8(3): 429-33. 2018
7. Minamoto T, Nakayama K, Nakamura K, Katagiri H, Sultana R, Ishibashi T, **Ishikawa M**, Yamashita H, Sanuki K, Iida K, Nakayama S, Otsuki Y, Ishikawa N, Kyo S. Loss of beclin 1 expression in ovarian cancer: A potential biomarker for predicting unfavorable outcomes. **Oncol Lett**. 15(1): 1170-6. 2018
8. Razia S, Nakayama K, Tsukao M, Nakamura K, **Ishikawa M**, Ishibashi T, Ishikawa N, Sanuki K, Yamashita H, Ono R, Hossain MM, Minamoto T, Kyo S. Metastasis of breast cancer to an endometrial polyp, the cervix and a leiomyoma: A case report and review of the literature. **Oncol Lett**. 14(4): 4585-92. 2017
9. Nakayama K, Rahman M, Rahman MT, Nakamura K, Sato E, Katagiri H, Ishibashi T, **Ishikawa M**, Iida K, Razia S, Ishikawa N,

- Kyo S. Nucleus accumbens-1/GADD45GIP1 axis mediates cisplatin resistance through cellular senescence in ovarian cancer. **Oncol Lett.** 13(6): 4713-9. 2017
10. Nakayama K, Tsukao M, **Ishikawa M**, Ishibashi T, Nakamura K, Sanuki K, Yamashita H, Ono R, Minamoto T, Kyo S. Total laparoscopic hysterectomy for large uterine cervical myoma. **Mol Clin Oncol.** 6(5): 655-60. 2017
  11. Nakamura K, Nakayama K, Nagaoka R, Nishisako K, **Ishikawa M**, Katagiri H, Ishibashi T, Sato E, Amano C, Kyo S. The diagnostic utility of PAX8 immunostaining of malignant peritoneal mesothelioma presenting as serous ovarian carcinoma: A single-center report of two cases. **Oncol Lett.** 3(1): 263-6. 2017
  12. Nakamura K, Nakayama K, **Ishikawa M**, Ishikawa N, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Sato E, Iida K, Sultana R, Kyo S. Letrozole as second-line hormonal treatment for recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma: A case report and review of the literature. **Oncol Lett.** 12(5): 3856-60. 2016
  13. Nakamura K, Nakayama K, **Ishikawa M**, Ishikawa N, Nagase M, Katagiri H, Ishibashi T, Sato E, Iida K, Sultana R, Kyo S. Utility of ovarian biopsy in pancreatic metastasis of high-grade serous ovarian carcinoma: A case report. **Mol Clin Oncol.** 5(1): 41-3. 2016.
  14. **Ishikawa M**, Nakayama K, Ishibashi T, Sato E, Nakamura K, Katagiri H, Kyo S. Case series of cerebral infarction with Trousseau's syndrome associated with malignant gynecological tumors. **Mol Clin Oncol.** 5(1): 138-142. 2016.
  15. Nakamura K, Nakayama K, Ishibashi T, Ishikawa N, **Ishikawa M**, Katagiri H, Minamoto T, Sato E, Sanuki K, Yamashita H, Iida K, Sultana R, Kyo S. KRAS/BRAF Analysis in Ovarian Low-Grade Serous Carcinoma Having Synchronous All Pathological Precursor Regions. **Int J Mol Sci.** 26;17(5). E625. 2016
  16. Nakamura K, Nakayama K, **Ishikawa M**, Katagiri H, Minamoto T, Ishibashi T, Ishikawa N, Sato E, Sanuki K, Yamashita H, Komatsu-Fujii T, Kyo S. High pretreatment plasma D-dimer levels are related to shorter overall survival in endometrial carcinoma. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** 201: 89-93. 2016
  17. Katagiri H, Nakayama K, Razia S, Nakamura K, Sato E, Ishibashi T, **Ishikawa M**, Iida K, Ishikawa N, Otsuki Y, Nakayama S, Kyo S. Loss of autophagy-related protein Beclin 1 may define poor prognosis in ovarian clear cell carcinomas. **Int J Oncol.** 47(6): 2037-44. 2015
  18. Kyo S, Mizumoto Y, Takakura M, Nakamura M, Sato E, Katagiri H, **Ishikawa M**, Nakayama K, Fujiwara H. Nerve-sparing abdominal radical trachelectomy: a novel concept to preserve uterine branches of pelvic nerves. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** 193:5-9. 2015
  19. Nakamura K, Nakayama K, **Ishikawa M**, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Sato E, Asakawa Y, Kyo S. Efficacy of multiple microwave endometrial ablation technique for menorrhagia resulting from adenomyosis. **J Obstet Gynaecol Res.** 41: 1769-72. 2015.
- 〔学会発表〕(計 3 件)
1. **石川雅子**、中山健太郎、小野瑠璃子、佐貫薫、山下瞳、中村康平、石橋朋佳、皆本敏子、スルタナラジア、飯田幸司、京哲 卵巣癌・子宮内膜癌 同時発症症例における遺伝子変異の検討 日本産科婦人科学会学術講演会 2017
  2. **石川雅子**、中山健太郎、佐貫薫、山下瞳、佐藤絵美、中村康平、片桐浩、片桐敦子、スルタナラジア、飯田幸司、皆本敏子、京哲 Liquid microdissection で抽出した DNA を用いた 卵巣類内膜癌・明細胞癌の発癌機構についての検討 日本産科婦人科学会学術講演会 2016
  3. **石川雅子**、中山健太郎、佐藤絵美、中村康平、原友美、片桐浩、石橋朋佳、飯田幸司、石原とも子、折出亜希、金崎春彦、京哲 両側卵管切除後3年で High-grade 漿液性腺癌を発症した 1 例 日本産科婦人科学会学術講演会 2015
- 〔図書〕(計 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 件)
- 名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：
- 取得状況 (計 件)
- 名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：
- 〔その他〕  
 ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石川雅子 (Masako Ishikawa)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：50467718

(2)研究分担者

中山健太郎 (Kentaro Nakayama )

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：70346401

京 哲 (Satoru Kyo)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50272969

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )