

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10726

研究課題名(和文) エストロゲン関連受容体を標的とする新たな子宮体癌内分泌療法の開発

研究課題名(英文) Estrogen-related receptor alpha as a potential target for endometrial cancer

研究代表者

森 泰輔 (Mori, Taisuke)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00569824

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)：ERR α は子宮体癌における予後不良因子であり、VEGFを介して血管新生を制御することが明らかになった。ERR α 抑制下では、M期細胞周期停止を引き起こしカスパーゼ依存性アポトーシスを誘導させた。また細胞増殖にも関与することが示唆された。以上より、ERR α は新たな子宮体癌治療ターゲットとなりうる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The elevated levels of ERR α was associated with advanced clinical stages and serous histological type. ERR α demonstrated negative prognostic significance. Knockdown of ERR α suppressed angiogenesis via VEGF, inhibited cell proliferation and induced cell cycle arrest at the mitotic phase and caspase-3 dependent apoptosis. A significant reduction of tumor growth and angiogenesis was observed in xenografts with ERR α knockdown. We propose that ERR α can serve as a novel target for molecular therapy of endometrial cancer.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮体癌 ホルモン依存性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

近年、子宮体癌の罹患率は増加している。子宮体癌の危険因子とされる肥満、糖尿病、食事の欧米化、晩婚化、出産回数の低下に加え、高齢化などの社会的背景を考慮すると今後さらにその罹患率は増加すると予測される。

子宮体癌の腫瘍学的特徴で最も重要な点はホルモン依存性であり、その増殖や発癌にエストロゲンが深く関与する。エストロゲンと結合したエストロゲン受容体(ER)はプロモーター上のエストロゲン応答(ERE)配列を認識することで、増殖や発癌に関与するさまざまな遺伝子の転写を制御する。乳癌ではエストロゲン受容体拮抗剤やエストロゲン生合成酵素阻害剤が著効し広く用いられているのに対し、子宮体癌における内分泌療法は未だ確立されておらず、より詳細なエストロゲン伝達機序の解明が求められている。リガンド未知のオーファン核内受容体として発見されたエストロゲン関連受容体(ERRE)はERと非常に類似した構造を有するがEREやhalf site ERE(ERRE)を認識し、ERのEREを介した作用に対して促進/抑制的に働くことでエストロゲン応答を制御することが報告されている。

ERREはこれまでに、*ERRE1*、*ERRE2*の3種のサブタイプが発見され、それぞれに特徴的な発現様式をとる。研究代表者らはこれまでに子宮体癌においてERREがERを介するエストロゲン応答を抑制することを見出した(Watanabe et al., JCEM 2006)。さらに子宮頸癌ではERREがエストロゲン非依存性に血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の転写や発現を制御することを示した(Mori T, et al, IJGC, 2011)。また近年ERREは子宮体癌において予後不良因子であることを明らかにし、ERREをターゲットとした治療が新たな内分泌療法となりうる可能性について示している(Yamamoto T, et al., IJGC, 2012、平成23-24年度若手研究B)。さらにERREの代表的共役因子とされるPGC-1が子宮内膜症性卵巣嚢胞においてアロマターゼを制御し局所エストロゲン生合成に重要な役割を果たしていることを明らかにした(Suganuma I, et al., JCEM, 2014、平成25-26年度若手研究B)。このように研究代表者らはERREがホルモン依存性子宮関連疾患における増殖や進展に深く関与することを見出し、世界に先駆けて報告してきた。

子宮体癌では、放射線感受性が低いと考えられることや抗がん剤の標準治療の確立が進んでいない点から外科手術が第一選択とされている。特に子宮外病変を伴うIII/IV期の進行例や再発症例の予後は不良であり、新たな治療薬を模索することは重要なテーマとなっている。

2. 研究の目的

本研究では子宮体癌におけるERREの意義

を明確にし、これを介した系を標的とする新たな内分泌療法の臨床応用を実現させることが大いに期待できる。

3. 研究の方法

子宮体癌の増殖進展にERREが果たしている役割について以下のテーマにしたがって明らかにした。

1) ERREの発現様式と臨床病理学因子との関係

ERRE抗体を用いた免疫染色法により上記について明らかにする。

2) ERREを介する細胞増殖メカニズムの解明
siRNAを用いたERREの細胞増殖抑制効果について検証する。細胞運動能や接着能、浸潤能、血管新生能についても検討する。

3) ERREが及ぼす細胞周期制御機構とアポトーシス誘導機序

細胞周期停止に関与する分子を同定し、アポトーシス誘導機序や細胞内増殖シグナル伝達機構を明らかにする。

4) in vitroモデルを用いた抗腫瘍効果の検討

マウスモデルへERRE抑制子宮体癌細胞株を移植し、その抗腫瘍効果について考察する。子宮体癌細胞株を皮下移植したヌードマウスに上記化合物を経口投与し抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

1) 子宮体癌におけるERRE発現と予後との関係について

倫理委員会の承認と患者の同意を得て、子宮体癌

53例の

ERRE

発現に

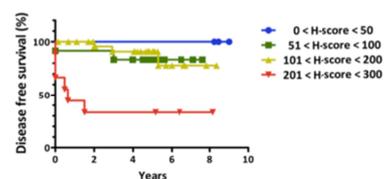
ついて

免疫染色

を用いて評

価した。

結果、ERREは臨床進行期の進行例により高発現しており(p<0.01)、類内膜腺癌に比し漿液性腺癌で強く認められた(p<0.01)。高発現しているtypeほどDisease free survivalは悪かった(図1)。



2) ERREを介する細胞増殖メカニズムの解明

子宮体癌細胞株5種にERREを一過性導入させVEGFプロモーター転写ルシフェラーゼ活性を測定したところ、ERRE過剰発現により

VEGF

プロモ

ーター活

性はそれ

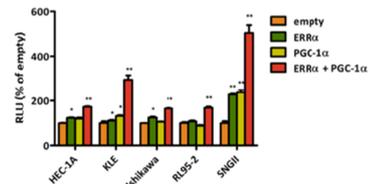
ぞれの細胞

株出有意

に上昇し

た。また

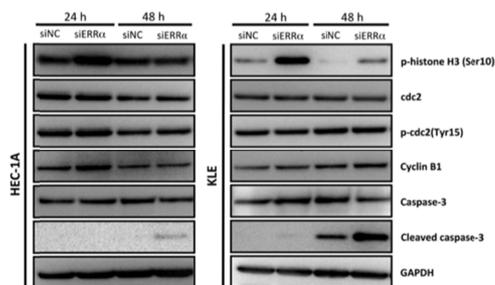
ERREをknockdownさせるとVEGF発現はリア



ルタイム PCR 法でも ELISA 法でも減少した。ERR 抑制下において、血管新生能は HUVEC proliferation assay および invasion assay でそれぞれ抑制された(図 2)。また、細胞増殖能は WST-8 assay で有意に抑制された。

3) ERR が及ぼす細胞周期制御機構とアポトーシス誘導機構

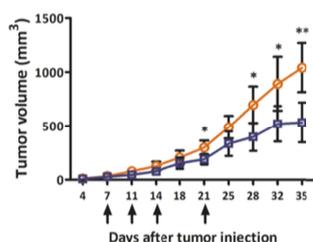
Flow cytometry 法を用いた細胞周期解析では G2-M 期細胞の増加を認めた。さらにウエスタンブロット法でヒストン H3 リン酸化の増強を認めたことから、ERR knockdown により M 期停止を引き起こすことが示唆された(図 3)。



また、flow cytometry 法で S0b-G1 解析を行った結果、ERR knockdown によるアポトーシス誘導を認めた。ウエスタンブロット法で cleaved Caspase-3 の有意な発現増強を認めたことからカスパーゼ依存性のアポトーシスが誘導されていることが証明された。

4) in vitro モデルを用いた抗腫瘍効果の検討

ERR knockdown による抗腫瘍効果をマウス異種移植モデル(HEC-1A 細胞株を移植)で検討した結果、ERRα 抑制下で有意な腫瘍の成長抑制効果(図 4)を認めた。さらに腫瘍切除後の検体を用いて免疫染色を行ったところ、TUNEL 法によりアポトーシス細胞の有意な増加を、CD31 染色で血管新生能の有意な抑制効果を認めた。



以上より、子宮体癌において ERR は予後不良因子であり、VEGF を介して血管新生を制御し、M 期細胞周期停止やアポトーシス誘導や細胞増殖に関与することを明らかにした。本研究内容は下記業績#7 にまとめ公表した。また本研究成果は、日本産科婦人科学会高得点演題に選出、京都府立医科大学学友会賞蓮賞を受賞した。

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 22 件)

1. Takekuma M, Shimokawa M, Nishio S, Omi H, Tabata T, Takei Y, Nasu K, Takahashi Y, Toyota S, Ichikawa Y, Arakawa A, Ito F, Tsubamoto H, Mori T, Hirashima Y, Ito K. Phase II study of adjuvant chemotherapy with paclitaxel and nedaplatin for uterine cervical cancer with lymph node metastasis. *Cancer Sci.* 2018; 109: 1602-1608. doi: 10.1111/cas.13577.

2. Tarumi Y, Mori T, Matsushima H, Kokabu T, Tsuchiya H, Kitawaki J. Long-term survival with bevacizumab in heavily pretreated and platinum-resistant mucinous ovarian cancer: A case report. 査読有 *J Obstet Gynaecol Res.* 2018; 44: 347-351. doi: 10.1111/jog.13496.

3. Hirakawa T, Mmaguchi T, Itani Y, Kasamatsu Y, Murase S, Sakurada S, Naano H, Takehara K, Tsuruta T, Arakawa A, Kawano K, Tsubamoto H, Ushikawa T, Mori T, Iwai K, Saito M, Morisawa H, Saito F, Yoshida K, Kaneuchi M, Sato H, Ito K, Nasu K. Current status of tertiary debulking surgery and prognosis after secondary debulking surgery for recurrent Mullerian epithelial cancer in Japan: a retrospective analysis of 164 patients (KCOG-G1402). 査読有 *World J Surg Oncol* 2017; 15: 132. doi: 10.1186/s12957-017-1200-x.

4. Tanaka Y, Mori T, Ito F, Koshiba A, Takaoka O, Kataoka H, Maeda E, Okimura H, Mori T, Kitawaki J. Exacerbation of endometriosis due to regulatory T-cell dysfunction. 査読有 *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102: 3206-3217. doi: 10.1210/jc.2017-00052.

5. Kanomata N, Matsuura S, Nomura T, Kurebayashi J, Mori T, Kitawaki J, Moriya T. Preparation of a novel antiserum to aromatase with high affinity and specificity: Its clinicopathological significance on breast cancer tissue. 査読有 *PLoS One.* 2017; 12:e0177439. doi: 10.1371/journal.pone.0177439

6. Amano A, Kondo Y, Noda Y, Ohta M, Kawanishi N, Machida S, Mitsuhashi K, Senmaru T, Fukui M, Takaoka O, Mori T, Kitawaki J, Ono M, Saibara T, Obayashi H,

- Ishigami A. Abnormal lipid/lipoprotein metabolism and high plasma testosterone levels in male but not female aromatase-knockout mice. 査読有 Arch Biochem Biophys. 2017; 622: 47-58. doi: 10.1016/j.abb.2017.03.007
7. Waratani M, Mori T, Ito F, Tanaka Y, Koshiba A, Takahata A, Kitawaki J. Increased ipsilateral uterine artery vascular resistance in women with ovarian endometrioma. 査読有 J Obstet Gynaecol Res. 2017; 43: 736-743. doi: 10.1111/jog.13266
8. Matsuo S, Matuda KI, Takanami K, Mori T, Tanaka M, Kawata M, Kitawaki J. Decrease in neuronal group spine density in the post partum period in the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in rat. 査読有 Neurosci Lett. 2017; 641: 21-25. doi: 10.1016/j.neulet.2017.01.040
9. Tsukasaki N, Mori T, Yasukawa S, Konishi E, Kokabu, Kitawaki J. Primary osteosarcoma of the uterine corpus: A case report. 査読有 J Obstet Gynaecol Res. 2016; 42: 1604-1608. doi: 10.1111/jog.13079
10. Koshiba A, Mori T, Ito F, Tanaka Y, Takaoka O, Takahata A, Kitawaki J. Enlarged uterine corpus volume in women with endometriosis: Assessment using three-dimensional reconstruction of pelvic magnetic resonance images. 査読有 J Obstet Gynaecol Res. 2017; 43: 157-163. doi: 10.1111/jog.13153.
11. Aoyama K, Matsushima H, Sawada M, Mori T, Yasukawa S, Kitawaki J. Apocrine adenocarcinoma of the vulva: A case report and review of the literature. 査読有 Case Rep Obstet Gynecol 2016; 2016: 1712404. doi: 10.1155/2016/1712404
12. Tanaka Y, Mori T, Ito F, Koshiba A, Kusuki I, Kitawaki J. Effects of low-dose combined drospirenone-ethinylestradiol on perimenstrual symptoms experienced by women with endometriosis. 査読有 Int J Gynaecol Obstet. 2016; 135: 135-139. doi: 10.1016/j.ijgo.2016.05.004.
13. Matsushima H, Mori T, Ito F, Yamamoto T, Akiyama M, Kokabu T, Yoriki K, Umemura S, Akashi K, Kitawaki J. Anti-tumor effect of estrogen-related receptor alpha knockdown on uterine endometrial cancer. 査読有 Oncotarget. 2016; 7(23): 34131-34148 doi: 10.18632/oncotarget.9151.
14. Ito F, Mori T, Takaoka O, Tanaka Y, Koshiba A, Tatsumi H, Iwasa K, Kitawaki J. Effects of drospirenone on adhesion molecule expression and monocyte adherence in human endothelial cells. 査読有 Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2016; 201: 113-117. doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.03.044
15. Tarumi Y, Mori T, Kusuki I, Ito F, Kitawaki J. endometrioid adenocarcinoma arising from deep infiltrating endometriosis involving the bladder: A case report and review of the literature. 査読有 Gynecol Oncol Rep 2015; 13: 68-70. doi: 10.1016/j.gore.2015.07.003.
16. Ohta M, Fujinami A, Kobayashi N, Amano A, Ishigami A, Tokuda H, Suzuki N, Ito F, Mori T, Sawada M, Iwasa K, Kitawaki J, Ohnishi K, Tsujiwawa M, Obayashi H. Two chalcones, 40hydroxyderricin and xanthoangelol, stimulates GLUT4-dependent glucose uptake through the LKB/AMP-activated protein kinase signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. 査読有 Nutr Res. 2015; 35: 618-625. doi: 10.1016/j.nutres.2015.05.010
17. Yamamoto T, Mori T, Sawada M, Matsushima H, Ito F, Akiyama M, Kitawaki J. Loss of AF-6/afadin induces cell invasion, suppresses the formation of glandular structures and might be a predictive marker of resistance to chemotherapy in endometrial cancer. 査読有 2015; 12:15:275. doi: 10.1186/s12885-015-1286-x
18. Mori T, Ito F, Matsushima H, Takaoka O, Koshiba A, Kusuki I, Kitawaki J. Dienogest reduces HSD17b1 expression and activity in endometriosis. 査読有 2015; 225: 69-76. doi: 10.1530/JOE-15-0052
19. Mori T, Ito F, Matsushima H, Takaoka O, Tanaka Y, Koshiba A, Kusuki I, Kitawaki J. G protein-coupled estrogen receptor 1 agonist G-1 induces cell cycle arrest in the mitotic phase, leading to apoptosis in endometriosis. 査読有 2015; 103: 1228-1235. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.01.026.
20. 黒星晴夫、岩破一博、伊藤文武、森 泰輔、安尾忠浩、福本 環、北脇 城、淋菌による骨盤内炎症性疾患の1例、日本性感染症

学会誌、2016; 27: 151-154.

21. 大谷真弘、黒星晴夫、松島 洋、辰巳弘、森 泰輔、岩破一博、北脇 城、絨毛癌診断スコアと FIGO2000staging and risk factor scoring system で診断が異なった難治性絨毛性疾患の 1 例、産科と婦人科、2016; 83: 1098-1102

22. 山本 櫻、黒星晴夫、安川 覚、片岡恒、澤田守男、辰巳 弘、森 泰輔、岩破一博、北脇 城、後腹膜原発と診断した巨大平滑筋腫の 1 例、産科と婦人科、2016; 83: 1353-1357

〔学会発表〕(計 33 件)
(特別講演)

1. 森 泰輔、子宮内膜症についての最近の話題、平成 29 年度京都臨床細胞学会ならびに第 30 回生活習慣病予防健診細胞診従事者研修会、京都、2017/2/5

2. 森 泰輔、子宮体がんと女性ホルモンのおはなし、平成 28 年度女性の健康週間府民公開講座、京都、2017/3/5

3. 森 泰輔、子宮がん検診 ちゃんと受けてますか? 平成 29 年度女性の健康週間府民公開講座、京都、2018/3/4

(シンポジウム)

4. Mori T、 Peroxisome-proliferator activated receptor gamma coactivator-1a enhances local estrogen biosynthesis by stimulating aromatase activity in endometriosis. SEUD Singapore, 2017/4/5

5. 森 泰輔、エストロゲン生合成経路からみた子宮内膜症の病態解明と新たな治療戦略 第 90 回日本内分泌学会シンポジウム、京都、2017/4/21

(一般演題)

6. Tanaka Y, Mori T, Akiyama K, et al. Exacerbation of endometriosis by dysfunction of regulatory T cells in mouse and human. 68th Annual Congress of JSOG, Tokyo, 2016/4/22

7. Akashi K, Mori T, Matsushima H, et al. Clinical outcome of atypical squamous cells of undetermined significance; an institutional experience. 68th Annual Congress of JSOG, Tokyo, 2016/4/22

8. Koshiba A, Mori T, Ito F, et al. Enlarged uterine corpus volume in women with endometriosis: assessment using three-dimensional reconstruction of pelvic magnetic resonance images. 68th

Annual Congress of JSOG, Tokyo, 2016/4/22

9. Waratani M, Mori T, Ito F, et al. Increased uterine artery vasculature resistance on the endometrioma side in women with endometriosis. 68th Annual Congress of JSOG, Tokyo, 2016/4/22

10. Matsuo S, Mori T, Ito F, et al. Perinatal effect of hormonal change on neuronal morphology and expression of estrogen receptor alpha in the amygdala of female Wistar rats. 68th Annual Congress of JSOG, Tokyo, 2016/4/22

11. Matsushima H, Mori T, Ito F, et al. Estrogen-related receptor alpha promotes angiogenesis and proliferation in uterine endometrial cancer. 68th Annual Congress of JSOG, Tokyo, 2016/4/22

12. 川俣まり、森 泰輔、黒星晴夫他、ペバシズマブ併用維持療法により長期生存しえた他剤抵抗性再発卵巣癌の 1 例、第 134 回近畿産婦人科学会、京都、2016/6/4

13. 垂水洋輔、森 泰輔、笹本香織他、ペバシズマブ維持療法により長期生存しえた化学療法抵抗性再発卵巣癌の 1 例、第 58 回日本婦人科腫瘍学会、米子、2016/7/9

14. 笹本香織、森 泰輔、松島 洋他、当科におけるプラチナ製剤抵抗性/不応性再発卵巣癌の予後因子、第 58 回日本婦人科腫瘍学会、米子、2016/7/9

15. Waratani M, Mori T, Ito F, et al. The mechanism of reduced ovarian reserve in women with ovarian endometriomas. 5th Asian Conference on endometriosis.

16. Koshiba A, Mori T, Ito F, et al. Enlarged uterine corpus volume in women with endometriosis: assessment using three-dimensional reconstruction of pelvic resonance images. 5th Asian Conference on endometriosis, 2016/9/22

17. Mori T, Ito F, Koshiba A, et al. G protein-coupled estrogen receptor 1 agonist G-1 induces cell cycle arrest in the mitotic phase, leading to apoptosis in endometriosis. Osaka, 2016/9/22

18. 森 泰輔、山本 櫻、川俣まり他、難治性尖圭コンジローマと併存した梅毒の 1 例、第 12 回鴨和感染フォーラム、京都、2016/10/29

19. 伊藤文武、森 泰輔、辰巳 弘他、CEE に含まれる equilin は NF-κB 活性化経路を介

して動脈硬化リスクとなる、第 31 回日本女性医学会学術集会、京都、2016/11/5

20. 森 泰輔、山本 櫻、川俣まり他、難治性尖圭コンジローマに対する治療を契機に発見された II 期梅毒の 1 例、第 31 回日本女性医学会学術集会、京都、2016/11/5

21. 森 泰輔、難治性コンジローマを契機に発見された梅毒の 1 例、京都・金沢 STI エキスパートミーティング、京都、2016/11/1

22. 田中祐輝子、森 泰輔、沖村浩之他、子宮内膜症における制御性 T 細胞の機能障害、第 31 回日本生殖免疫学会、神戸、2016/12/2

23. Yamamoto T, Mori T, Sawada M, et al. Loss of AF-6/afadin induces cell invasion and suppresses the formation of glandular structures in endometrial cancer, 67th Annual Congress of JSOG, Yokohama, 2015/4/10

24. Akiyama M, Mori T, Sawada M, et al. Three-combined treatment, a novel HDAC inhibitor OBP-801/YM753, paclitaxel and 5-fluorouracil synergistically induces G2-cell cycle arrest in human ovarian cancer SKOV-3 cells. 67th Annual Congress of JSOG, Yokohama, 2015/4/10

25. 小芝明美、森 泰輔、伊藤文武他、子宮内膜症女性における子宮体部容積の増大骨盤 MRI の 3D 再構成による計測、第 67 回日本産科婦人科学会、横浜、2015/4/12

26. 高岡 宰、森 泰輔、田中祐輝子他、ジエノゲストは子宮内膜症においてアロマターゼと 17 β デヒドロゲナーゼ I 方を阻害することによりエストロゲン活性を低下させる、第 67 回日本産科婦人科学会、横浜、2015/4/12

27. Koshiba A, Mori T, Ito F, et al. Enlarged uterine corpus volume in women with endometriosis: assessment through three-dimensional reconstruction of pelvic magnetic resonance images. IFFS/JSRM International Meeting 2015, Yokohama, 2015/4/26

28. Mori T, Ito F, Matsushima H, et al. G protein-coupled estrogen receptor 1 agonist G-1 induces cell cycle arrest in the mitotic phase, leading to apoptosis in endometriosis. 1st Congress of SEUD, Paris. 2015/5/10

29. 森 泰輔、新しい子宮内膜症治療を求めてー内分泌的アプローチ、第 23 回鴨和腫瘍

カンファレンス、京都、2015/7/5

30. 垂水洋輔、森 泰輔、澤田守男他、膀胱に進展した DIE の悪性転化と考えられた腺癌の 1 例、第 57 回日本婦人科腫瘍学会、盛岡、2015/8/9

31. 塚崎菜奈美、森 泰輔、澤田守男他、子宮原発と考えられた骨肉腫の 1 例、第 7 回関西婦人科腫瘍・病理懇話会、京都、2015/11/7

32. 松島 洋、森 泰輔、山本拓郎他、エストロゲン関連受容体は子宮体癌の新たな治療ターゲットとして有望である、東京、2015/12/3

33. 森 泰輔、寄木香織、古株哲也他、胃癌術後 10 年目に再発した子宮頸部孤立性再発を来した 1 例、大阪、2016/5/27

〔図書〕(計 2 件)

1. 森 泰輔、液状化検体細胞診について、産婦人科の進歩、2016; 68: 372-373.

2. 森 泰輔、思春期子宮内膜症についての最近の話題、産婦人科の進歩、2017; 2017; 69: 338-342

〔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

森 泰輔 (MORI TAISUKE)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：00569824