

令和元年5月20日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05470

研究課題名(和文) 子宮選択的Pten変異による体癌自然発症マウスを用いた増悪因子と作用機序の解析

研究課題名(英文) Unveil aggravating factors and their molecular mechanisms in endometrial cancer using mouse model with uterine-specific Pten deletion

研究代表者

大黒 多希子(Daikoku, Takiko)

金沢大学・学際科学実験センター・教授

研究者番号：30767249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究従事者らはこれまで子宮部位特異的にPten遺伝子を欠損させることによって子宮体癌マウスモデルを確立してきた。本研究ではこれらのマウスモデルを使用し、子宮体癌(上皮)の発生には間質の作用によって左右されることを実験的に明らかにするとともに、間質のがん化もまた上皮の作用によって左右される可能性を示唆した。さらに子宮体癌発生・進行に関わるいくつかの因子を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた子宮がん発生への周辺組織の影響および卵巣ホルモンの子宮がん発生・進行への関与はこれまでの常識を覆す結果を含んでおり、学術的意義がある。また、本研究で新たに発見された子宮体癌発生・進行を促進する増悪因子は、子宮体癌の新たな治療ターゲットとなり、新規治療薬の開発につながると考えられ、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Using our new endometrial cancer mouse models, we found that the Pten in uterine stroma represses malignant transformation of Pten null uterine epithelium. We further demonstrated that Pten in uterine epithelium is essential to repress uterine stromal sarcoma in mouse model. We also found some aggravating factors for endometrial cancer initiation and progression in this study.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：マウスモデル 子宮体癌 子宮がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

本研究従事者らはこれまでヒト子宮体癌患者の約 80%には罹患組織における *PTEN* 遺伝子 (Phosphatase and Tensin homolog) の体細胞変異が認められ、子宮上皮における *PTEN* 欠損がヒト子宮体癌の発症に寄与していることに注目して、組織特異的に遺伝子を欠損させることを可能とした Cre-loxP システムを用いて新たな子宮体癌マウスモデルの作製を行い、子宮上皮と間質の両方で *Pten* 遺伝子が欠損しており、子宮体癌を自然発症する *Pten-PRcre* マウスと、子宮上皮でのみ *Pten* 遺伝子が欠損しており、子宮体癌前駆組織である過形成のみを自然発症する *Pten-LTFcre* マウスの 2 種類の動物モデルの作製に成功した。

## 2. 研究の目的

上記の背景のもと本研究では、*Pten-PRcre* マウスと *Pten-LTFcre* マウスの 2 種類のマウスを分析することによって、子宮内膜の過形成から子宮体部の類内膜腺癌の発症過程を包括的かつ経時的に解析し、子宮体癌発症と進展に対する誘発及び危険因子の作用を明らかとするとともに、新たな子宮体癌の発症誘導因子を同定することを目的として計画された。

## 3. 研究の方法

これまでの検討で、子宮上皮と間質の両方で *Pten* 遺伝子が欠損している *Pten-PRcre* マウスは子宮体癌を自然発症するが、一方で子宮上皮でのみ *Pten* 遺伝子が欠損している *Pten-LTFcre* マウスは子宮体癌前駆組織である過形成のみを自然発症するという結果を得ている。したがって、本研究では *Pten-PRcre* マウスと *Pten-LTFcre* マウスの子宮のタンパク質発現を免疫染色によって、遺伝子発現をマイクロアレイによって比較し、子宮体癌が発生および進行に関与する新規分子を明らかとする。

また、これまで子宮体癌の発症に関与する因子として卵巣ホルモンが報告されている。したがって、本研究では卵巣ホルモンであるエストロゲンもしくはプロゲステロンが子宮体癌の発生および進展に関与しているのか、関与しているのであればその分子機構はどのようになっているかを明らかとするために、*Pten-PRcre* マウスと *Pten-LTFcre* マウスの卵巣を除去したのち、エストロゲンもしくはプロゲステロンを長期投与し、子宮体癌の発生および進展について明らかにする。さらに、タンパク質発現を免疫染色によって、遺伝子発現をマイクロアレイによって比較し、子宮体癌発生および進行に関与する新規分子を明らかとする。

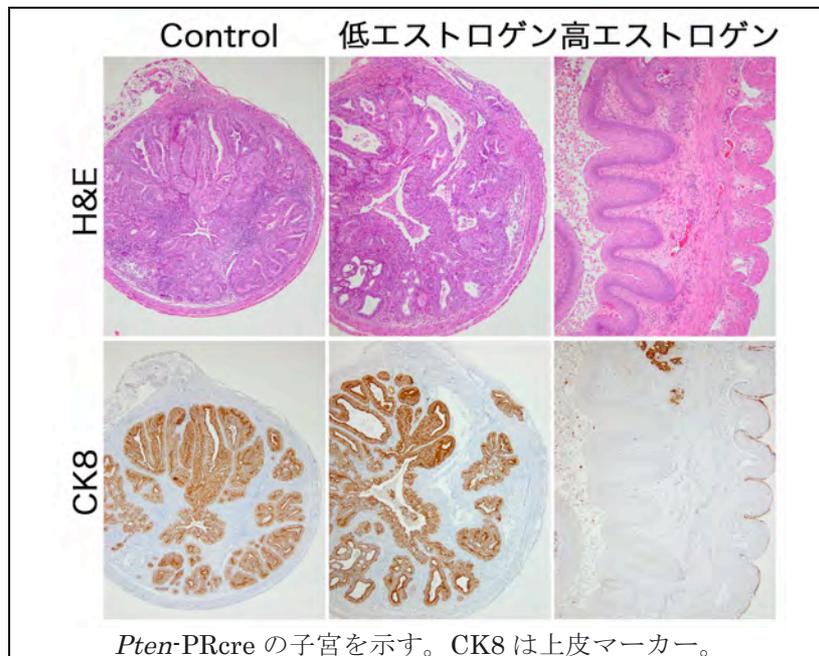
## 4. 研究成果

(1) 上皮の癌化はその周辺組織である間質の作用によって左右される。

*Pten-PRcre* では、子宮上皮と間質の両方で *Pten* 遺伝子が欠損しており、遺伝子欠損時から 20 日で過形成が、30 日で子宮体癌が 100%のマウスで発生するが、*Pten-LTFcre* では *Pten* 遺伝子欠損時から 120 日が経過しても過形成しか発生しないことから、間質に注目してさらなる解析を行った。その結果、*Pten-LTFcre* の子宮間質では野生型と比べて発現が増加した *Pten* が TGF $\beta$  シグナリングを誘導し、上皮細胞のアポトーシスを促進して、その癌化を抑制していることを見出した (Liang, Daikoku et al. PLoS Genet 2018)。この結果は、これまで実験的に証明されたことはない、上皮の癌化はその周辺組織である間質の作用によって左右されることを明確に示している。

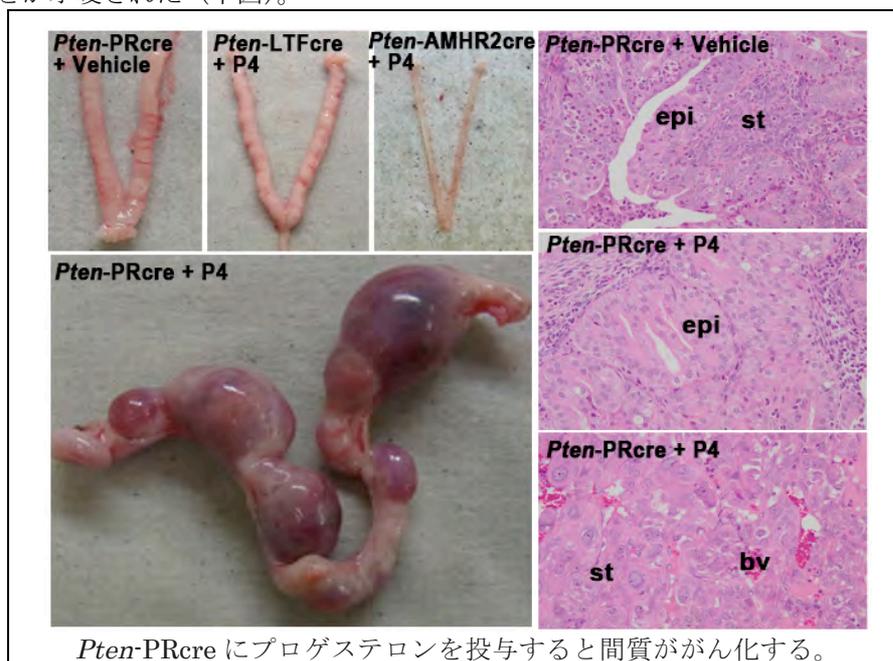
(2) エストロゲンは濃度によって子宮体癌進展への影響が異なる

*Pten-PRcre* および *Pten-LTFcre* マウスの卵巣を過形成が生じた時点で除去し、血中濃度が生理的エストロゲン濃度のうち低濃度となるように長期暴露した場合、子宮体癌の子宮筋層への浸潤能が高まることが明らかとなった。一方で、血中濃度が生理的エストロゲン濃度のうち高濃度となるように長期暴露した場合、子宮体癌細胞が扁平上皮化することが明らかとなった。いずれの濃度でも、野生型マウスの子宮の細胞の形態変化や細胞増殖の変化は認められなかった。以上のことから、エストロゲンの血中濃度が比較的低い場合は子宮体癌の進展を促すが、比較的高い場合は異方向分化し子宮体癌の進展を抑制する可能性が示唆された (下図)。



(3) プロゲステロンは子宮体癌の進展を抑制するが間質のがん化を促進する

*Pten-PRcre* および *Pten-LTFcre* マウスの卵巣を過形成が生じた時点で除去し、プロゲステロン (P4) を 30 日連続投与する実験を行った結果、P4 は確かに上皮の癌化を抑制することを明らかとした。一方で *Pten-PRcre* の間質は悪性化し、100%のマウスで子宮肉腫が発生することを見出した。しかしながら、*Pten-LTFcre* に同様の操作を行っても子宮肉腫は発生しなかった。以上のことから、間質のがん化つまり肉腫の発生にもまた上皮・間質細胞間の相互応答が影響することが示唆された (下図)。



(4) 遺伝子 X は子宮体癌の進行を促進する

現在、それぞれの実験で作成した遺伝子プロファイルから得られた遺伝子の発現と機能についてさらなる解析を行っている。このプロファイルから得られた遺伝子 X は、野生型マウスに比べて *Pten-PRcre* マウスに発生した子宮体癌に顕著発現していることを明らかとしている。さらに、マウス子宮体癌組織から株化した子宮体癌細胞にこの遺伝子 X を過剰発現した場合は、マウスでの癌形成が促進し、shRNA でノックダウンした場合はマウスでの癌形成が抑制された。以上のことから遺伝子 X が子宮体癌の進行を促進していることを明らかとした。現在、その下流分子について検討を行っている。

以上で示したように、本研究では、我々が確立した子宮体癌マウスモデルを用いて、子宮体癌の発生および進行に関わるいくつかの因子を明らかにするとともに、その分子機構の一部を明ら

かとした。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Terakawa J, Serna VA, Taketo MM, Daikoku T, Suarez AAA, Kurita T. Ovarian-innsufficiency and CYNNB1 mutations drive malignant transformation of endometrial hyperplasia with altered PTEN/PI3K activities. PNAS. accepted. 査読有
2. Ichinose W, Cherepanov SM, Shabalova AA, Yokoyama S, Yuhi T, Yamaguchi H, Watanabe A, Yamamoto Y, Okamoto H, Horike S, Terakawa J, Daikoku T, Watanabe M, Mano N, Higashida H, Shuto S. Development of highly potent analogue and a long-acting analogue of oxytocin for the treatment of social impairment-like behaviors. J Med Chem. 62(7):3297-3310, 2019. 査読有
3. Liang X\*, Daikoku T\*, Terakawa J, Ogawa Y, Joshi AR, Ellenson LH, Sun X, Dey SK. The uterine epithelial loss of Pten is inefficient to induce endometrial cancer with intact stromal Pten. PLoS Genet. Vol. 24., e1007630, 2018. \*co-first author 査読有
4. Fujiwara T, Nakata R, Ono M, Mieda M, Ando H, Daikoku T, Fujiwara H. Time restriction of food intake during the circadian cycle is a possible regulator of reproductive function in postadolescent female rats. Curr Dev Nutr. 3(4):nzy093, 2018. 査読有
5. Fujiwara H, Matsumoto H, Sato Y, Horie A, Ono M, Nakamura M, Mizumoto Y, Kagami K, Fujiwara T, Hattori A, Maida Y, Daikoku T, Imakawa K, Araki Y. Factors regulating human extravillous trophoblast invasion: Chemokine-peptidase and CD9-integrin systems. Curr Pharm Biotechnol. 19(19):764-770, 2018. 査読有
6. Hsu AH, Lum MA, Shim KS, Frederick PJ, Morrison CD, Chen B, Lele SM, Sheinin YM, Daikoku T, Dey SK, Leone G, Black AR, Black JD. Crosstalk between PKC and PI3K/AKT signaling is tumor suppressive in the endometrium. Cell Rep. Vol. 24., P655-669, 2018. 査読有
7. 大黒多希子 「遺伝子改変マウスを用いた子宮疾患の解析」金沢大学十全医学会雑誌 Vol. 127., pp110-111, 2018. 査読無
8. Obata T, Nakamura M, Mizumoto Y, Iizuka T, Ono M, Terakawa J, Daikoku T, Fujiwara H. Dual expression of immunoreactive estrogen receptor and p53 is a potential predictor of regional lymph node metastasis and postoperative recurrence in endometrial endometrioid carcinoma. PLoS One. Vol. 12., e0188641, 2017. 査読有
9. Sumita K, Lo YH, Takeuchi K, Senda M, Kofuji S, Ikeda Y, Terakawa J, Sasaki M, Yoshino H, Majd N, Zheng Y, Kahoud ER, Yokota T, Emerling BM, Asara JM, Ishida T, Locasale JW, Daikoku T, Anastasiou D, Senda T, Sasaki AT. The lipid kinase PI5P4K is an intracellular GTP sensor for metabolism and tumorigenesis. Molecular Cell. Vol. 61., pp187-198, 2016. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. 大黒多希子  
第 58 回日本組織細胞科学会 総会・学術総会 シンポジウム④ 2017.9.24 愛媛大学 (愛媛県松山市)  
「マウスモデルを用いた子宮疾患の解析」
2. 大黒多希子  
第 53 回北陸生殖医学会学術講演会 イムニングセミナー 2017.6.11 金沢大学 (石川県金沢市)  
「マウスモデルからみる子宮疾患」
3. 大黒多希子

第 62 回日本病理学会秋季特別総会 シンポジウム 3 2016.11.11 ニューグランドホテル  
(石川県金沢市)  
「マウスモデルを用いた子宮疾患の解析」

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：卵巣癌の検出方法及び卵巣癌治療剤  
発明者：藤原浩、水本泰成、松岡歩、大黒多希子  
権利者：金沢大学  
種類：特許願  
番号：特願 2019-078850  
出願年：2019  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：藤原浩  
ローマ字氏名：FUJIWARA, Hiroshi  
所属研究機関名：金沢大学  
部局名：医学系  
職名：教授  
研究者番号 (8 桁)：30252456

研究分担者氏名：寺川純平  
ローマ字氏名：TERAKAWA, Jumpei  
所属研究機関名：金沢大学  
部局名：学際科学実験センター  
職名：助教  
研究者番号 (8 桁)：90777731

研究分担者氏名：高倉正博  
ローマ字氏名：TAKAKURA, Masahiro  
所属研究機関名：金沢医科大学  
部局名：医学部  
職名：准教授  
研究者番号 (8 桁)：20313661

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：堀家慎一  
ローマ字氏名：HORIKE, Shinichi

研究協力者氏名：飯塚崇  
ローマ字氏名：IIZUKA, Takashi

研究協力者氏名：松岡歩  
ローマ字氏名：MATSUOKA, Ayumi

研究協力者氏名：小幡武司  
ローマ字氏名：OBATA, Takeshi