

令和元年6月4日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11086

研究課題名(和文) 初期子宮体癌に対する新たな妊孕性温存療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for young women with early stage of uterine endometrial cancer to preserve their fertility

研究代表者

香山 晋輔 (KOYAMA, SHINSUKE)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30528005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我が国における子宮体癌の罹患率は上昇傾向にある。40歳未満の若年者の締める割合は5.5%である。子宮体癌治療の標準治療は子宮摘出である一方で、近年の晩産化にともない初期子宮体癌における妊孕性温存の需要が上昇している。正常子宮内膜を温存しながら子宮局所でがん細胞に再標的化することができるような若年性の初期子宮体癌に対する新たな妊孕性温存療法が求められている。我々は過去にセンダイウイルスの外殻を用いたHVJ-Eベクターを用いて高効率に一過性にマウス子宮に遺伝子導入する方法を開発した。本研究では、これを初期子宮体癌の妊孕性温存療法に最適化する事を目的とし検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト子宮は経腔的に直接的なアプローチができる臓器であるにもかかわらず、現在子宮に対するdrug delivery system (DDS)としては子宮内避妊器具であるレボノルゲストレル徐放型子宮内避妊システムおよびプロゲステロン腔坐剤しかない。動物モデルにおける子宮に対する遺伝子導入方法ですら、遺伝子導入効率を検討されたものはあまりない。HVJ-Eベクターは子宮に高効率に遺伝子導入できる事が確認されている。HVJ-Eベクターそのものの抗腫瘍効果だけでなく、高濃度のプロゲステロンや抗がん剤をHVJ-Eベクターにより送達する事により、より短期間に効果的な治療方法が提案できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Diagnosis of uterine endometrial cancer have increased worldwide in recent years. The standard initial treatment for endometrial cancer is hysterectomy, bilateral salpingo-oophorectomy, and assessment of retroperitoneal lymph nodes. It has been reported that approximately 5.5% of women with endometrial cancer are younger than 40 years of age in Japan. Young women with endometrial cancer often show a history of ovary dysfunction, anovulation, primary sterility (have never been pregnant), and they have a strong desire to preserve fertility. It is necessary to develop a new treatment, which can be administrated to the uterine locally and can re-target cancer cells to save normal cells for fertility preservation. In the current study, we developed a local uterine gene delivery system using HVJ-E vector. In this study we tried to optimize HVJ-E vector to treat young women with early stage of uterine endometrial cancer to preserve their fertility.

研究分野：産婦人科

キーワード：生殖医学 妊孕性温存 初期子宮体癌

1. 研究開始当初の背景

日本における子宮体癌は近年増加傾向にあり、2011年の報告では、40歳未満の若年者の占める割合は5.5%である[国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」より]。子宮と卵巣の外科的摘出手術およびステージングにより術後補助化学療法が標準治療である。近年の晩産化にともない、若年性の初期子宮体癌の妊孕性温存の需要が増加している。

妊孕性温存療法として、MPA(酢酸メドロキシプロゲステロン)による黄体ホルモン療法(MPA療法)が一般的である。基本的には子宮筋層への浸潤を認めない類内膜腺癌(G1)が適応である。治療効果の報告はばらつきがあるものの、一様に奏功率は高いが(66-76%)再発率も高い(48-70%)[Gallos ID et al., Am J Obstet Gynecol. 2012;207:266. e261-212. Ohyagi-Hara C et al., Arch Gynecol Obstet. 2015 Jan;291(1):151-7.]。再発を回避するためにはMPA療法に奏功後、早期に妊娠する事が唯一の方法である。しかしながら、MPA療法中に治療効果判定のために物理的に子宮内膜搔爬を繰り返すために、子宮内膜が菲薄化しなかなか妊娠に至らない[Elizur S et al., Fertil Steril. 2007;88:1562-1567.]。

そこで、子宮局所を標的として選択的にがん細胞死を誘導する事ができれば、若年性初期子宮体癌の効果的な妊孕性温存療法になりえるのではないかと考えるに至った。

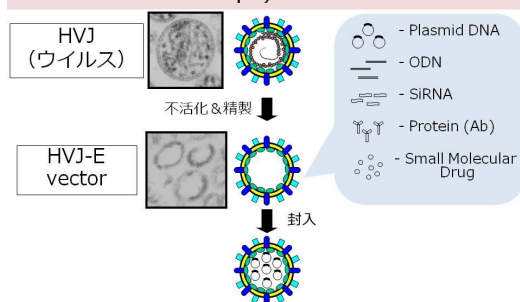
子宮はDrug Delivery System (DDS)のよい標的臓器であるにもかかわらず生体内遺伝子導入ですら一般的でない。子宮を標的としたDDSの報告は長年なかったが、ここ数年、生体分解性高分子を用いたナノ粒子による子宮に対するDDSに関する論文がいくつか報告された。しかしながら、ほとんどがDDSそのものの動態を観察されているのにとどまり、薬剤等の送達効率を確認したものがない。

子宮腔内は経腔的に直接的にアプローチできる臓器である。現在日常的に行われている体外受精・胚移植術における胚移植カテーテルを用いて、超音波ガイド下に直接カテーテルを子宮腔内に挿入し、液量を制限する事により子宮腔内局所のみ直接的に薬剤を送達する事ができる。

ところが、これまではDDSだけでなく、子宮を標的とした生体内遺伝子導入方法の報告もあまりなかった。Charnock-Jonesら[Hum. Reprod. 1997;12:17-20.]とBagotら

[Gene Ther. 2000;7:1378-1384.]によるcationic liposomeを用いた方法があるものの、遺伝子導入効率を検討した報告はなかった。自験例ではcationic liposomeによる遺伝子導入では十分な導入効率を得る事ができず、それに比べHemagglutinating Virus of Japan (別名: センダイウイルス) Envelope (HVJ-E) ベクター(図1)を用いた方法ではcationic liposomeによる方法より120倍以上高い導入効率を得る事ができた(図2)。現在までに、生体内子宮において同等の遺伝子

図1: HVJ-E (Hemagglutinating Virus of Japan ; Sendai virus-envelope) vector

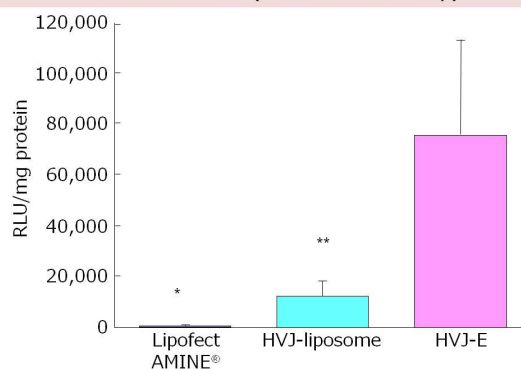


導入効率を証明した報告はない。

我々は、不妊症と妊娠中の病態の物質的基盤を検討するために、HVJ-Eベクターを用いて、妊娠を阻害する事なく、着床期および妊娠中期から後期に標的遺伝子を一過性に子宮局所に高効率に遺伝子導入する方法の開発に成功し[Mol Ther. 2002;6(2):219-26. Mol. Hum. Reprod. 2003;9:603-9, J Reprod Immunol, 2006, 70:59-69]、この方法を用いて、妊娠に係る病態の物質的基盤についての検討を行ってきた[Biochem. Biophys Res Commun. 2004, 321:

886-892. FEBS Lett. 2006, 580: 2717-2722. Horm Metab Res 2006;38:619-24]。我々は既に、HVJ-Eベクターを子宮内膜に対して遺伝子導入を可能にするために子宮に対して最適化をする事に成功した。本研究ではこれを新たな初期子宮体癌の妊孕性温存治療のために用いる事ができるかを検討する。

図2: 遺伝子導入効率 (Luciferase assay)



2. 研究の目的

子宮局所に対して高効率に遺伝子導入を可能としたHVJ-Eは、近年HVJ-Eそのものに以下の3つの経路による抗腫瘍効果がある事が明らかとなった。

- (1) HVJの膜融合による刺激によりカルシウムシグナルの増強による癌細胞死
- (2) 不活化したHVJのRNA断片による細胞質内RNA受容体retinoic acid-inducible

gene I (RIG-I) および mitochondrial antiviral signaling (MAVS)による認識を介して癌細胞選択的に細胞死の誘導

- (3) HVJ-E の膜融合タンパクが樹状細胞やマクロファージを刺激して抗腫瘍免疫の活性化これらにより腫瘍細胞の特性の解明につながり、新たながん治療の戦略として、melanoma および前立腺癌では、すでに臨床研究が行われている
[Kaneda Y et al., (2013) Oncoimmunology. 1;2(4):e23566. Matsushima-Miyagi T et al. (2012) Clin Cancer Res. 18(22):6271-83. Nomura M et al. (2014) Cancer Res. 74(4):1056-66. Nishikawa T et al. (2014) Mol Ther. 22(12):2046-55. Takehara Y et al. (2013) Clin Immunol. 149(1):1-10.]

本研究では、HVJ-E ベクターを胚移植用カテーテルを用いて直接子宮腔内に局所投与する戦略のもと、HVJ-E ベクターを初期子宮体癌の妊孕性温存療法として最適化する事を目的とした。

3. 研究の方法

若年性初期子宮体癌の新たな妊孕性温存療法として、胚移植カテーテルを用いて子宮局所に超音波ガイド下に HVJ-E を子宮腔内に直接投与し、子宮局所において選択的に癌細胞死を誘導する戦略の下、HVJ-E のヒト子宮体癌細胞に対する抗腫瘍効果を in-vitro および in-vivo の系で検討を行った。

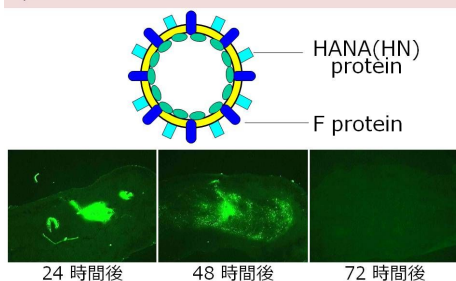
in-vitro の系において、HVJ-E のヒト子宮体癌細胞に対する抗腫瘍効果の経路の検討を行い、in-vitro の系として皮下 xenograft における検討を経て、最終的に子宮へ同所移植した系において HVJ-E のヒト子宮体癌細胞の抗腫瘍効果を検討した。

すべての動物実験は本学医学系研究科倫理委員会の承認を得て、医学部附属動物実験施設にて行った。組み替え DNA 実験についても、大阪大学大学院医学系研究科の承認を得た上ですべてこの基準に従って行った。

4. 研究成果

HVJ-E はセンドライウイルスの膜表面にある F タンパクおよび HN タンパクにより、細胞と強い膜融合がおこる。マウス子宮腔内に HVJ-E を投与すると 24 時間後は子宮内膜上皮細胞に局限してその局在が認められ、その後 48 時間後に、発現はやや減弱するものの間質細胞にまで広がり、72 時間後には発現が消失する (図 3)。そのため長期にわたる HVJ-E の影響のリスクを軽減できると考えられる。さらに HVJ-E が正常子宮内膜に影響を与えない事を既に確認しており、子宮体癌に対する抗腫瘍効果を証明できれば時空間的制御方法による狭義の DDS の概念に基づいた、初期子宮体癌の妊孕性温存療法として臨床応用が期待できると考えた。

図 3 :
マウス子宮腔内投与後の HVJ-E の膜融合タンパクの局在 (抗 F タンパク-FITC)



In-vitro における検討

4 種類のヒト子宮体癌細胞株を用いて in-vitro における検討を行った。

Ishikawa, HEC-1A, HEC-6, HEC-108 細胞に、 10^5 multiplicity of infection (MOI) の HVJ-E を添加し顕微鏡下で観察した (図 4)。すべての細胞株において細胞融合が認められた。特に Ishikawa および HEC-6 細胞で強い細胞融合が認められた (図 4 : 黄色矢印)。

次に 3 種類の濃度 (10 , 10^2 , 10^5 MOI) の HVJ-E を 4 種類のヒト子宮体癌細胞株にそれぞれ添加し、添加 48 時間後に MTT assay を行った (図 5)。コントロールとして PBS を同量添加したものをを用いた。HEC-1A および HEC-108 細胞において濃度依存的に細胞増殖が抑制される事が確認された。

図 4:

ヒト子宮体癌細胞株における HVJ-E の添加による影響

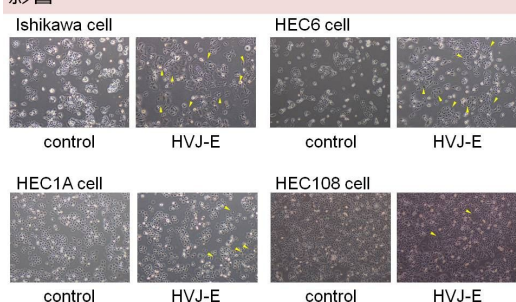
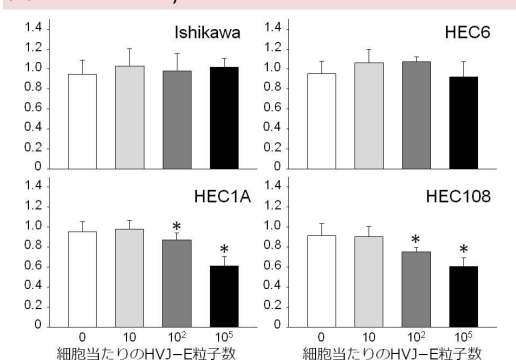


図 5: MTT assay



In-vivo における検討

子宮体癌のマウスにおける自然発症モデルは安定したモデルを確立する事が困難である。さらにマウス子宮体癌の細胞株がないため、ヒト子宮体癌細胞株を用いる事とした。免疫不全マウス背部に Ishikawa, HEC-1A,

HEC-6, HEC-108 細胞を移植し、その後背部腫瘍に直接的に HVJ-E を投与し、HVJ-E のヒト子宮体癌細胞に対する抗腫瘍効果について検討を行った。In-vitro で有意差を認めた HEC-1A および HEC-108 細胞では、コントロール群と比較して、HVJ-E 投与群では有意な腫瘍サイズの縮小が認められた。

子宮同所移植モデルの作成

本研究では子宮局所に直接投与する事によりがん細胞に選択的に作用し、正常子宮内膜を温存する事が目的であるために、同所移植モデルの作成を試みた。まず、Luciferase を恒常的に発現したヒト子宮体癌細胞株を作成した。卵巣摘出した免疫不全マウスに対して麻酔下に細胞を matrigel とともに子宮の卵管側から 30G 針を用いて子宮腔内に導入し、その後の腫瘍の生着について検討を行った。In-vivo imaging を用いて検討したが、非襲侵的に評価する事は困難であり、開腹の状態でない in-vivo imaging での評価は困難である事が明らかとなった。組織学的な検討により腫瘍の生着を確認した。HVJ-E の投与が複数回行った方がよい事が明らかとなったため、襲侵を低くするために開腹処置なく投与できるようなモデルの確立が必要である。マウス子宮はヒトと異なり完全双角子宮であるために経腔投与が困難である。今後、子宮腔内に留置カテーテルを挿入するようなどけ非襲侵にアプローチが可能となるようなモデルの構築が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 33 件) 全て査読有り。

1. Yamashita M, Kumasawa K, Nakamura H, Kimura T., (2018) Soluble FLT-1 rules placental destiny. *Biochem Biophys Res Commun.* 496:1243-1249. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.01.180.
2. Tanaka A, Nakamura H, Tabata Y, Fujimori Y, Kumasawa K, Kimura T. (2018) Effect of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogels on frozen-thawed human ovarian tissue in a xenograft model. *J Obstet Gynaecol Res.* 44: 1947-1955. DOI: 10.1111/jog.13726.
3. Nakamura H, Hosono T, Kumasawa K, Jones C. J. P. Aplin, J. D., Kimura, T. (2018) Vaginal bioelectrical impedance determines uterine receptivity in mice. *Hum Reprod.* 33: 2241-2248. DOI: 10.1093/humrep/dey313.
4. Shigeta N, Nakamura H, Kumasawa K, Imai K, Saito S, Sakaguchi S, Kimura T. (2018) Are naive T cells and class-switched memory (IgD(-) CD27(+)) B cells not essential for establishment and maintenance of pregnancy? Insights from a case of common variable immunodeficiency with pregnancy. *Med Hypotheses.* 121: 36-41. DOI: 10.1016/j.mehy.
5. Furuya K, Kumasawa K, Nakamura H, Nishimori K, Kimura T. (2018) Novel biomarker profiles in experimental aged maternal mice with hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Res.* 42(1): 29-39. DOI: 10.1038/s41440-018-0092-7.
6. Koyama S, Yoshino A, Okuno K, Naoi H, Watanabe M, Ozaki K, Shiki Y. (2016) Case of abdominal pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer treated with laparoscopic surgery. *Gynecol Minim Invasive Ther.* 5: 132-133. DOI: 10.1016/j.gmit.2015.04.006
7. Koyama S, Okuno K, Naoi H, Watanabe M, Ozaki K, Shiki, Y. (2016) Post-partum hypoglycemia and hypothermia as first manifestations of lymphocytic adenohypophysitis: A case report. *J Obstet Gynaecol Res.* 42: 467-470. DOI: 10.1111/jog.12930.

[学会発表](計 51 件)

1. 中村仁美. 金南孝. 正木秀武. 熊澤恵一. 平野賢一. 木村正. (2018) 脂質代謝と男性生殖 - 基礎検討からの提案 - (シンポジウム) 第63回日本生殖医学会.
2. 熊澤恵一. (2018) Preeclampsiaの診断と治療~日本発のエビデンス (シンポジウム) 第39回日本妊娠高血圧学会学術集会.
3. 熊澤恵一. (2018) FGRの新しい治療方法 (シンポジウム) 第6回 新胎児研究会.
4. Shiki Y, Kuroda M, Deguchi T, Shiraishi M, Kuritani K, Watanabe M, Koyama S. (2017) Breakdown of loop electrode of bipolar TCR due to unexpected contact with return-electrode in fibroid resection. 18th APAGE Annual Congress 2017.
5. Shiki, Y. Kuroda, M. Deguchi, T. Shiraishi, M. Kuritani, K. Watanabe, M. Koyama, S. (2017) Laparoscopic surgery using decomposable needle-shaft clamp in malignant cases; reduced port diameter instead of reduced port number. 18th APAGE Annual Congress 2017.
6. Shiki Y, Kuroda M, Deguchi T, Shiraishi M, Kuritani K, Watanabe M, Koyama S. (2017) Management of intraoperative hemorrhage in laparoscopic surgery. 18th APAGE Annual Congress 2017.

7. Shiki Y, Kuroda M, Deguchi T, Shiraiishi M, Kuritani K, Watanabe M, Koyama S. (2017) Strategy for laparoscopic hysterectomy with extensive intraabdominal adhesion due to previous cesarean section. 18th APAGE Annual Congress 2017.
8. Shiki Y, Kuroda M, Deguchi T, Shiraiishi M, Kuritani K, Watanabe M, Koyama S. (2017) Venous anastomosis on proximal side of deep uterine vein: unmasking difficulty inherent in manipulating posterior leaf of VUL. 18th APAGE Annual Congress 2017.
9. Kumasawa K, Nakamura H, Kimura T. (2016) A novel of biomarker profiles in experimental aged maternal mouse with pregnancy induced hypertension. 19th Congress of the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies (シンポジウム) (FAOPS 2016).
10. Tanaka M, Matsuzaki S, Matsumoto Y, Kakigano A, Kumasawa K, Koyama S, Endo M, Kimura T. (2016) Cervical varix complicated by placenta previa: a case presentation and literature review. 第68回日本産科婦人科学会.
11. Okada A, Matsuzaki S, Matsumoto Y, Kakigano A, Kumasawa K, Koyama S, Endo M, Kimura T. (2016) Rule out the adherent placenta: evaluation with magnetic resonance imaging. 第68回日本産科婦人科学会.
12. Yamada M, Kakigano A, Takiuchi T, Matsumoto Y, Matsuzaki S, Kumasawa K, Koyama S, Endo M, Kimura T. (2016) Successful pregnancy in a woman complicated Stage 4 extracranial arteriovenous malformation with Amputated one leg. 第68回日本産科婦人科学会.
13. Ito Y, Kakigano A, Takiuchi T, Matsumoto Y, Matsuzaki S, Kumasawa K, Koyama S, Endo M, Kimura T. (2016) Pregnancy-related cystic ovarian tumor-A case report. 第68回日本産科婦人科学会.
14. Sawada M, Kakigano A, Matsumoto Y, Takata T, Matsuzaki S, Kumasawa K, Koyama S, Endo M, Kimura T. (2016) Obstetric outcome after laparoscopic removal of rudimentary horn. 第68回日本産科婦人科学会.
15. Suzuki Y, Matsuzaki S, Matsumoto Y, Kakigano A, Takiuchi T, Kumasawa K, Koyama S, Endo M, Kimura T. (2016) Perioperative complications after uterine compression sutures. 第68回日本産科婦人科学会.
16. 小川美祈. 辻江智子. 出口朋実. 渡邊佑子. 行岡慶介. 池田佳代. 香山晋輔. 塩路光徳. 藤谷真弓. 蒲池圭一. 徳平 厚. 脇本昭憲. (2016) 産褥出血後に発症した卵巣静脈血栓症の一例. 第52回日本周産期・新生児医学会.
17. 小川美祈. 藤谷真弓. 出口朋実. 渡邊佑子. 行岡慶介. 香山晋輔. 塩路光徳. 辻江智子. 脇本昭憲. (2016) 第56回日本産科婦人科内視鏡学会.
18. 塩路光徳. 鶴長香南子. 小川美祈. 渡邊佑子. 出口朋実. 行岡慶介. 香山晋輔. 藤谷真弓. 高橋佳世子. 辻江智子. 脇本昭憲. 山本善光. 足立和繁. (2016) 地域周産期母子医療センターよりハイポリウムセンターへの腹腔鏡下手術 研修: エクセルシートを用いたTLHにおける手術時間短縮と手技向上の試み. 第56回日本産科婦人科内視鏡学会.
19. 辻江智子. 小川美祈. 行岡慶介. 香山晋輔. 塩路光徳. 藤谷真弓. 徳平 厚. 脇本昭憲. (2016) 腹腔鏡下付属器摘除術後に尿路感染、脱水症のため再入院となった独居高齢者の一例. 第56回日本産科婦人科内視鏡学会.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称:「Vagina evaluation device and uterus evaluation devices」

発明者: Hitomi Nakamura, Tadashi Kimura, Takayoshi Hosono

権利者: Osaka University

種類: 特許

番号: 特許願 16/250,564 (15/129,783 の分割) 号

出願年: 2019 年

国内外の別: 国際

名称:「Vagina evaluation device and uterus evaluation devices」

発明者: Hitomi Nakamura, Tadashi Kimura, Takayoshi Hosono

権利者: Osaka University

種類: 特許

番号: 特許願 15/129,783 号

出願年: 2016 年

国内外の別: 国際

取得状況(計1件)

名称：「膣評価装置及び子宮評価装置」
発明者：中村仁美 木村正 細野剛良
権利者：大阪大学
種類：特許
番号：特許第 06414713 号
取得年：2018 年
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中村 仁美
ローマ字氏名： Nakamura, Hitomi
所属研究機関名：大阪大学
部局名：医学系研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：80467571

研究分担者氏名：木村 正
ローマ字氏名： KIMURA, Tadashi
所属研究機関名：大阪大学
部局名：医学系研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：90240845

研究分担者氏名：熊澤 恵一
ローマ字氏名： KUMASAWA, Keiichi
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：講師
研究者番号（8桁）：90444546

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：小泉 花織
ローマ字氏名： KOIZUMI, Kaori
大阪大学大学院医学系研究科 産婦人科

研究協力者氏名：金田 安史
ローマ字氏名： KANEDA, Yasufumi
大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療学

研究協力者氏名：西川 智之
ローマ字氏名： NISAHIKAWA, Tomoyuki
大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。