

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16802

研究課題名(和文)子宮頸癌のCBR1増加による上皮間葉転換抑制作用を介した新たな分子標的薬の開発

研究課題名(英文) Development of a novel molecular target drug mediated the inhibitory effect on epithelial mesenchymal transition by using CBR1 in uterine cervical cancer

研究代表者

梶邑 匠彌 (KAJIMURA, Takuya)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20780779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでにcarbonyl reductase 1(CBR1)は、子宮頸癌において抗腫瘍効果を持ち、それは上皮間葉転換を介してもたらされることを報告した。そこで実際にこれを、実臨床で応用するために、CBR1の発現を生体内で増加させる薬剤を見出そうとところみた。卵巣癌ではクロフィブレートによって実際にCBR1の発現をin vitroでもin vivoでも誘導した報告があり、子宮頸癌でもこれを試みた。CBR1をin vitroでは誘導できなかった。腫瘍病変を移植したモデルマウスにクロフィブレートを投与し、治療効果をみたが、腫瘍の抑制効果は見出せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CBR1と悪性腫瘍との関連については、CBR1が腫瘍の浸潤能、遊走能を抑制することが報告されている。当教室でもCBR1が子宮頸癌、子宮体癌において悪性の形質を抑制することを見出している。しかしながら、腫瘍の悪性形質を抑制するCBR1をどのように実際の治療と結びつけるかについての研究は、ほとんど報告されていない。核酸や蛋白質を直接生体に導入するのではなく、クロフィブレートという既存の製薬を利用して新たな治療法の開発を行うことは、極めて独創的で臨床応用に直結するものである。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that Carbonyl reductase1 has the anti-tumor effect though the suppression of the epithelial mesenchymal transition. Then, we tried to make the expression of CBR1 increase in practice in cervical cancer. We have interested in Clofibrate, which can induce the CBR1 expression and reduce the tumor growth in vivo in ovarian cancer. Actually, we treated cervical cancer cell-lines with clofibrate, but it could not induce the CBR1 expression in vitro. Then, we established the xenograft model by using nude mice (Bulb/c). The mice were injected with tumor cell-line; SKG11 and SiHa. All mice had the tumor oriented from SKG11, but some mice did not had tumor of SiHa. There was no significant gap of the anti-tumor effect between the group treated with Clofibrate and the control group.

研究分野：産婦人科学

キーワード：クロフィブレート 子宮頸癌 CBR1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

子宮頸部扁平上皮癌 I、II 期の原発巣の組織において CBR1 の発現を免疫組織染色で検討したところ、CBR1 発現が低下している症例では骨盤リンパ節転移が有意に多く、予後不良である事を報告した(村上 明弘 扁平上皮癌の予後判定方法 特許 4967128、Murakami et al. Cancer Lett, 2011)。さらに CBR1 の発現低下は無進行生存では進行期を凌駕する独立 予後因子であり、全生存は進行期と同等の独立予後因子であることが明らかとなった(Murakami et al. Cancer Lett, 2012)。我々は、CBR1 が子宮頸癌において、その悪性度を低下させ得る中心的役割を持ったタンパク質と考え、子宮頸癌細胞株において CBR1 発現がその悪性度に与える影響について細胞の機能解析を行った。

In vitro では CBR1 の発現抑制株では有意に細胞増殖能と浸潤能が亢進し、また CBR1 過剰発現株においては、その増殖能や浸潤能は抑制される傾向を見出した。さらに in vivo でも、CBR1 の発現抑制株を移植したマウス軍では腫瘍増殖能が有意に亢進し、CBR1 過剰発現株を移植した群では腫瘍増殖能が抑制される傾向にあることを確認した。子宮頸癌細胞株における CBR1 の発現変化が上皮・間葉マーカーに及ぼす影響を検討したところ、CBR1 発現抑制株では、上皮系マーカーである Keratin18 の発現抑制と間葉系マーカーである fibronectin、vimentin、N-cadherin の発現亢進を認め、逆に過剰発現株では、これらのマーカーの発現が低下していることを確認した。さらにマイクロアレイにて EMT 関連遺伝子の変化を解析したところ CBR1 の減弱により間葉マーカーの発現亢進と上皮マーカーの発現減弱を認めた。つまり CBR1 の発現低下が予後不良となる分子機構として CBR1 の発現低下によって E-cadherin の発現低下とともに上皮マーカーの発現抑制、間葉系マーカーの発現上昇が起き、上皮間葉転換(EMT) が誘導される結果であることを確認した。また最近 E-cadherin の過剰発現により、抗癌剤の感受性が増加することが報告されている。このように CBR1 による MET の誘導は癌の悪性度を低下させ、さらには抗癌剤感受性を増加させる新たな分子標的薬治療の開発につながる可能性がある。

我々は細胞内の CBR1 発現を増加させることが期待できる薬剤として、クロフィプレート製剤に注目している。クロフィプレートは、脂質異常症に対する薬剤で、日常診療でも頻繁に用いられている。近年、クロフィプレート製剤が転写因子であるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR ) を活性化し、細胞増殖の抑制やアポトーシスの誘導、及び細胞分化を促進することによる癌抑制効果を担うことが報告された。またクロフィプレートの投与により卵巣癌細胞株において CBR1 発現が増加することも報告された(Yokoyama et al. Int Mol Cancer Ther, 2007)。子宮頸癌細胞株においてクロフィプレート投与により癌細胞の CBR1 発現を増加させ、さらに MET を誘導することができれば、癌細胞の増殖抑制や浸潤能の低下、抗癌剤への感受性を向上させることができ、子宮頸癌における新たな分子標的治療の開発に繋がる可能性が期待できる。

## 2. 研究の目的

*in vivo* で、クロフィプレート製剤の投与により、CBR1 の発現を増加させうるかを確認する。また、実際の生体内において、クロフィプレートは CBR1 を発現させ、MET を誘導し、抗腫瘍効果をもたらさうか、を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) *in vitro* でクロフィプレート投与により、子宮頸癌細胞の機能にどのような影響を及

ばすかを検討する。

(A) CBR1 の発現変化の検討

クロフィブレードを添加した培養液中で、子宮頸癌細胞株 SiHa、または SKGII を 25cm<sup>2</sup> フラスコで培養する。クロフィブレード投与開始から 1 日、2 日、3 日、4 日、及び 5 日目に細胞を培養する。添加するクロフィブレードの濃度は、0.50mM、及び 1.00mM の濃度で検討する。CBR1 の発現については各フラスコから回収した細胞より抽出した total RNA を RT-PCR に供し、各群における CBR1 の発現量を評価する。

(B) 細胞の機能解析

細胞増殖能を、直接細胞数測定法と MTT assay により確認する。

細胞の機能として、浸潤能・転移能の変化を評価する。

浸潤能の評価; 培養開始後 21 時間後にマトリゲルを重層したチャンバーにおいて浸潤した細胞、あるいはマトリゲルを重層していないコントロールチャンバーを遊走した細胞をギムザ染色し、細胞数を評価し、細胞浸潤能を評価する。

次に MMP-2、MMP-9 の細胞外分泌の程度を Gelatin zymography により検討する。

Wound healing assay; 単層培養した細胞のディッシュの底に傷を作り、20 時間後同じ場所の修復程度を測定し、水平方向の細胞移動能を評価する。

(2) *in vivo* で子宮頸癌細胞株をヌードマウス移植し、腫瘍形成能に対するクロフィブレードの影響を評価する。

*In vivo* において、子宮頸癌細胞株 SiHa、または SKGII をヌードマウスの皮下に移植する。移植を施したマウスに 300 mg/kg クロフィブレード /PBS を連日マウスに腹腔内注射により投与した。(尚、子宮頸癌細胞株 SiHa、及び SKGII はヌードマウスにおいて腫瘍を形成することは準備実験ですでに確認済みである。)局所の腫瘍形成能の評価法として移植腫瘍の形成状態(腫瘍塊の体積)を評価する。腫瘍測定は 3 週間毎に行う。腫瘍体積は以下の算出法を用いて算出する。

(腫瘍体積) = 0.52 × (短径)<sup>2</sup> × (長径) (Suminami et al. Int Cancer Research, 2001)

尚、摘出した腫瘍組織中の MET 関連因子(上皮マーカー: E-cadherin、Keratin18、間葉マーカー: fibronectin、vimentin、N-cadherin、MET 関連転写因子: Snail、Slug、ZEB1)の発現を、蛋白質は Western-blot 法、mRNA は RT-PCR または real time PCR で確認する。

#### 4. 研究成果

(1) クロフィブレードの細胞増殖に対する影響

子宮頸癌細胞株 SiHa、及び SKGII を培養し、250 μM、500 μM、及び 1000μM のクロフィブレード製剤であるクロフィブリン酸を 4 日間添加し、細胞増殖を評価した。MTT による増殖評価では、濃度依存性に細胞増殖能が抑制される傾向にはあったが、有意差は認めなかった。(図 1)

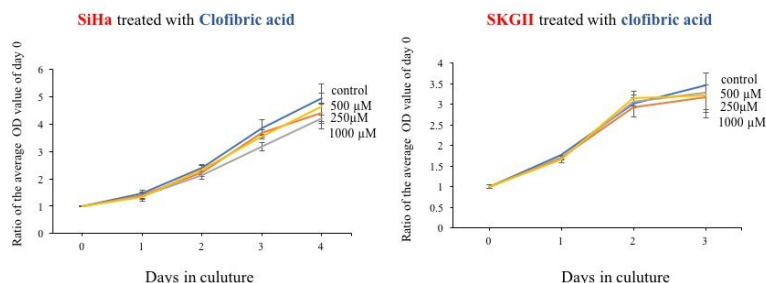


図 1. クロフィブレード処理細胞の増殖能

## (2) クロフィブレートにおける CBR1 発現に対する影響

クロフィブレート添加における、*in vitro* での CBR1 の発現変化を message 及びタンパク質で評価した。評価方法はそれぞれ RT-PCR 及び western blot 法を用いた。またクロフィブレート製剤としてクロフィブリン酸を 100  $\mu\text{M}$  及び 500 $\mu\text{M}$  の濃度で 24 時間または 48 時間加えたが、CBR1 message の発現量には双方の細胞株で変化を認めなかった。(図 2)また Western blot 法によるタンパク量の評価でも双方の細胞株ともに有意な変化は認めなかった。(図 3)

Expression levels of *CBR1* mRNA of cells treatment with **Clofibric acid**

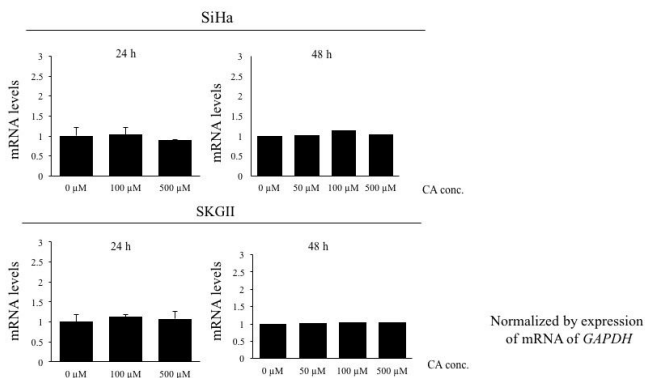


図 2. CBR1 mRNAの発現

Expression of CBR1 in cells treated with **Clofibric acid**

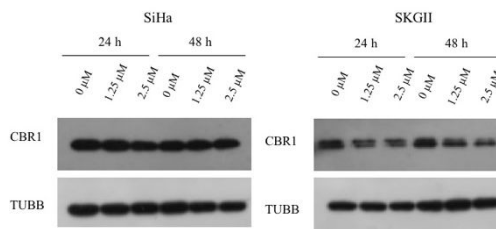


図 3 CBR1 タンパクの発現

## (3) 細胞機能にクロフィブレートが与える影響

浸潤能及び遊走能にクロフィブレートが影響を及ぼすかを、マトリゲルを用いた浸潤アッセイ、また、スクラッチによる wound healing assay 法で評価した。クロフィブレートを投与した群では、対照群に比較するとやや、浸潤細胞が減少する傾向にあり、また細胞遊走の距離も減少傾向にはあったが、有意な差を両群に認めなかった。

上記より、*in vitro* ではクロフィブレートでは CBR1 を発現誘導することはできなかった。また、クロフィブレートそのものによる細胞機能への影響や増殖能に対する変化は認めなかった。一方で、PPAR 代謝は複雑なシステムであり、その詳細は未だ不明な点が多く、腫瘍細胞以外の周囲環境を介しての CBR 1 代謝への変化の可能性も考えることから、*in vivo* での移植実験を行った。

## (4) 子宮頸癌移植マウスモデルにおけるクロフィブレートの影響

子宮頸癌細胞株 SKGII 及び SiHa を移植した nude mouse にクロフィブレート溶解液を腹腔内投与した。投与開始より 4 週間の観察で、マウスの死亡はなかった。また両群に体重増減の有意差は認めなかった。形成した腫瘍は SKGII については増殖し、全てのマウスで腫瘍を形成した。一方で、SiHa については増殖速度が遅く、個体によっては形成しないものもあり、評価不能であった。SKGII 細胞由来の形成腫瘍の体積を比較したが観察期間において両者に有意な差は認めなかった。(図 4,5)

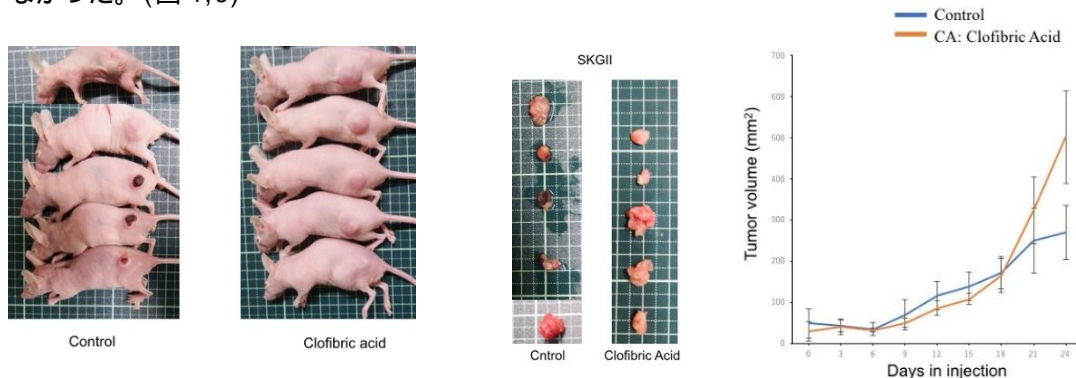


図 4、5 腫瘍形成能へのクロフィブレートの影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Y. Nishimoto, A. Murakami, S. Sato, T. Kajimura, K. Nakashima, K. Yakabe, K. Sueoka, N. Sugino	4. 巻 17
2. 論文標題 Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes tumor growth via epithelial mesenchymal transition in uterine cervical squamous cell carcinomas.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol.	6. 最初と最後の頁 173-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/rmb2.12086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kajimura Takuya, Sato Shun, Murakami Akihiro, Hayashi Okada Maki, Nakashima Kengo, Sueoka Kotaro, Sugino Norihiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Overexpression of carbonyl reductase 1 inhibits malignant behaviors and epithelial mesenchymal transition by suppressing TGF signaling in uterine leiomyosarcoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1503-1512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3892/ol.2019.10429	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 T. Kajimura
2. 発表標題 Over expression of Carbonyl reductase 1 induces MET by suppressing transforming growth factor
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Kajimura
2. 発表標題 Over expression of carbonyl reductase 1 (CBR1) induces mesenchymal to epithelial transiotion (MET) by suppressing transforming growth factor-beta (TGF ) signaling in uterine leiomyosarcoma cells
3. 学会等名 第60回日本婦人科腫瘍学会学術講演会・The 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶邑匠彌、爲久哲郎、岡田真希、竹谷俊明、末岡幸太郎、杉野法広
2. 発表標題 子宮平滑筋肉腫細胞株においてCBR1 過剰発現はTGF 経路を介しEMT を抑制する
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考