

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791163
 研究課題名（和文） M期チェックポイント遺伝子 siRNA のアテロコラーゲン DDS による子宮体癌治療
 研究課題名（英文） Combinational antitumor effect of siRNA against M phase checkpoint gene and paclitaxel on growth of human endometrial cancer
 研究代表者
 矢野倉 恵(YANOKURA MEGUMI)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：20433732

研究成果の概要：

子宮体癌において*CHFR*または*Aurora-A*の過剰発現とタキサン製剤に対する感受性との関連を明らかとした。In vitroにおいて、*CHFR*または*Aurora-A*が過剰発現しているヒト子宮体癌細胞株は、発現していない細胞株に比し、タキサン製剤に対する感受性が低い事実を突き止めた。*CHFR*または*Aurora-A*の過剰発現細胞株に各遺伝子のsiRNAを導入し、遺伝子発現抑制前後の各種抗癌剤に対する感受性の変化を測定したところ、タキサン製剤に対する感受性が特異的に増強した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：アテロコラーゲン、子宮体癌

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は欧米では婦人科癌の中で最も発生頻度の高い癌である。本邦においても、その罹患数は生活様式の欧米化や環境変遷に伴い、1983年に約2500人であったものが2000年には約5000人と約20年間に倍増したと推定されている。

さらに、全子宮癌にしめる体癌の割合も

1983年の17.9%から2000年の42.2%にまで上昇し、今後もさらに増加すると予測されている。子宮体癌の治療において、化学療法は術後補助療法の主体であり、白金製剤（シスプラチン）やドキソルビシン、タキサン製剤などが使用されている。これまでに、これらの薬剤を使用した大規模な臨床研究が行われてきたが、既存の抗癌剤の組み合わせのみで

は十分な効果が期待できるレジメンが存在しないことが問題となっている。

さらに近年、低分化型腺癌など予後不良症例の増加により子宮体癌は、罹患数だけでなく死亡数も増加の一途をたどっており、予後の改善につながる新たな治療戦略の確立が求められている。

一方で、基礎的研究から様々な臓器の癌において細胞周期関連遺伝子の発現が、特定の抗癌剤の感受性に大きな影響を与えることが明らかとなってきた。大腸癌や卵巣癌において細胞周期チェックポイント遺伝子である *14-3-3sigma*, *FANCF* 遺伝子の不活化とアドリアマイシンやシスプラチンに対する感受性との相関が報告され(Suzuki H, et al. Cancer Res 60:4353-4357,2000 等)、臨床への応用が期待されている。微小管脱重合阻害剤であるタキサン製剤は、昨年、子宮体癌において保険適用となり、今後、使用拡大および治療効果が期待される薬剤であるが、最近、細胞周期 M 期チェックポイント遺伝子の発現がタキサン製剤の感受性に関与するとの報告がなされた(Satoh A, et al. Cancer Res. 63:8606-8613, 2003)。

2. 研究の目的

子宮体癌の術後補助療法として、白金製剤(シスプラチン)やタキサン製剤などが使用されているが、効果は十分ではなく、低分化型腺癌などの予後改善につながる新たな治療戦略の確立が求められている。

近年、癌において細胞周期関連遺伝子の発現が、特定の抗癌剤の感受性に大きな影響を与えることが明らかとなってきた。M 期チェックポイント遺伝子である *CHFR*(*check point with forkhead-associated and ring finger*)は、細胞に生じた mitotic stress を感知し、障害された DNA 修復のため細胞周期を G2 期で停止させる機能を有する。また、*Aurora-A* も M 期のチェックポイントとして、染色体分離に必須な役割を果たしているセリン/スレオニンキナーゼである。*CHFR* および *Aurora-A* はともに M 期特異的に発現する遺伝子であるため、微小管脱重合阻害剤として M 期に作用するタキサン製剤の抗腫瘍効果との関連が示唆されている。

今回我々は、子宮体癌治療としての *CHFR* や *Aurora-A* の siRNA を用いたアテロコラーゲン DDS(Drug Delivery System)による新たな抗癌剤併用療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 子宮体癌細胞に対する M 期チェックポイント遺伝子 siRNA の in vitro における効果

CHFR もしくは *Aurora-A* を過剰発現するヒト子宮体癌由来培養細胞に、それぞれの遺伝子に対する siRNA 単体をトランスフェクション試薬を用いて癌細胞に導入する。その際の、細胞周期の変化をフローサイトメトリーにて、細胞浸潤能の変化を in vitro migration assay にて測定する。

また、siRNA 単独での抗腫瘍効果を in vitro 感受性試験である CD-DST 法にて解析する。目的遺伝子に対する siRNA はその配列により、in vitro と in vivo で効果に差が見られる可能性があるため、数種類の候補配列の siRNA を用いて検討を行う。また、全ての実験において GL2 siRNA をネガティブコントロールとして比較検討する。CD-DST 法は培養細胞と臨床検体を同一の系で測定できるという特徴を有し、既に婦人科腫瘍における有用性が示されており (Kawaguchi M, Banno K, et al. Anticancer Res. 2005.)、本解析には最適の抗癌剤感受性試験と考えている。

(2) M 期チェックポイント遺伝子 siRNA とタキサン製剤の子宮体癌細胞に対する併用効果の検討

CHFR もしくは *Aurora-A* を過剰発現し、タキサン製剤に対し抵抗性を示すヒト子宮体癌由来培養細胞に、それぞれの遺伝子に対する siRNA 単体をトランスフェクション試薬を用いて細胞に導入する。siRNA 導入による子宮体癌細胞のタキサン製剤に対する感受性の変化を CD-DST 法により解析し、遺伝子特異的な発現抑制によるタキサン製剤との併用効果を確認する。また、シスプラチンやドキソルビシンに代表されるタキサン製剤以外の各種抗癌剤に対する感受性の変化を同様に CD-DST 法により解析することで、*CHFR* または *Aurora-A* の発現抑制による抗癌剤感受性の変化が、タキサン製剤に対し特異的なものかを検討する。

(3) siRNA/アテロコラーゲン複合体の子宮体癌細胞への最適デリバリー条件の検討

siRNA の in vivo における癌治療への応用のためには、培養癌細胞への siRNA の導入方法と、動物個体への siRNA の導入方法をできるだけ一致させ検討することが必須である。培養プレートに siRNA/アテロコラーゲン複合体を塗布し、その上に子宮体癌細胞を播種して培養する。予め GL3 ベクターを子細胞に組み込み、ルシフェラーゼを強制発現する子宮体癌細胞を調整しておく。上記の方法で GL3 siRNA を導入し、ルシフェラーゼ量を測定することで siRNA の導入効果を測定する。この際、siRNA 量・アテロコラーゲン量・両者の比を変え、最も効果的な導入条件を検討する。また、ルシフェラーゼ量を経時

的に測定することにより、siRNA の効果持続時間も検討する。

さらに、*in vitro* における CHFR または Aurora-A siRNA/アテロコラーゲン複合体とタキサン製剤との併用効果を CD-DST 法にて測定し、siRNA 単体とタキサン製剤との併用時に得られた結果と比較検討する。

同様に、本解析を同意の得られた子宮体癌手術検体を用いて実施し、子宮体癌由来培養細胞株で得られた実験結果が、実際のヒト腫瘍組織においても起こりうるか検討することで、M 期チェックポイント遺伝子 siRNA/アテロコラーゲン複合体の臨床応用への可能性を追求する。

(4) *In vivo* の M 期チェックポイント遺伝子 siRNA/アテロコラーゲン複合体のデリバリー効果およびタキサン製剤との併用効果の検討

タキサン製剤抵抗性のヒト子宮体癌由来培養細胞をヌードマウスの皮下に注射し、腫瘍を形成させる。*in vitro* 実験で得られた至適条件をもとに siRNA/アテロコラーゲン複合体を調整し、形成された腫瘍に直接投与する。まず、蛍光標識付きのコントロール siRNA を使用し、投与後、経時的に腫瘍を摘出し観察することで、*in vivo* における腫瘍内への siRNA の到達性および効果持続時間を検討する。

さらに、CHFR または Aurora-A siRNA/アテロコラーゲン複合体をマウスに形成した腫瘍に直接投与し、タキサン製剤を腹腔内投与にて併用する。その際の抗腫瘍効果を腫瘍サイズの経時変化を指標として測定することにより、M 期チェックポイント遺伝子 siRNA/アテロコラーゲン複合体とタキサン製剤との併用効果を検討する。

(5) M 期チェックポイント遺伝子 siRNA/アテロコラーゲン複合体の経静脈的全身投与によるマウス正常組織への影響の解析

siRNA は特異性が高く、インターフェロン応答をほとんど起こさないとされている。また、アテロコラーゲンも極めて抗原性の低い物質であり、高い生体への親和性が推測されているが、癌治療として臨床応用するためには、予期せぬ副作用を招くことのないようさらに慎重な検討が必要である。

CHFR または Aurora-A siRNA/アテロコラーゲン複合体をヌードマウスの尾静脈から投与し、全身性にデリバリーさせる。子宮、卵巣をはじめとする各種臓器を摘出し、インターフェロンや炎症性サイトカインなどの非特異反応が起きていないかについて、各種抗体をもちいた免疫組織化学的手法により確認し、臨床応用へ向けたさらなる安全性を検討する。

4. 研究成果

(1) 子宮体癌において、Aurora-A の過剰発現は予後不良な G3 腺癌や特殊組織型に高頻度に認められることから、今回我々は、Aurora A siRNA によるタキサン製剤の抗腫瘍効果の増強を *in vivo* にて検討した。

Aurora A を過剰発現し、タキサン製剤に対し抵抗性を示す子宮体癌細胞株 (HEC-1B) を BALB/cヌードマウスの皮下に注射し、腫瘍を形成させた。このマウスに対し、siRNA とパクリタキセル (5mg/kg) を1日おきに投与し腫瘍体積の変化を経時的に測定した (作成群
コントロール siRNA Aurora A siRNA
パクリタキセル コントロール siRNA+パクリタキセル Aurora A siRNA+パクリタキセル)。

薬剤投与後8日目において、Aurora A siRNA+パクリタキセル群は、コントロール siRNA+パクリタキセル群を含む他の群に比し、有意に腫瘍体積の増加を抑制した ($p < 0.05$)。また、腫瘍を摘出し、細胞増殖能を測定するため Ki-67 で、アポトーシスを測定するため TUNEL でそれぞれ免疫染色を行ったところ、Aurora A siRNA+パクリタキセル群は、他の群に比し Ki-67 の染色性が低下しており、細胞増殖能が低下していることが明らかとなった。また、TUNEL の染色性が他の群に比し有意に増加しており ($p < 0.05$)、腫瘍増殖の低下はアポトーシスによるものと考えられた。

以上のことから、Aurora A の発現を特異的に抑制することによって、子宮体癌のタキサン製剤に対する感受性の増強の可能性が示唆された。

(2) CHFR や Aurora-A は、正常組織ではほとんど発現が認められず、癌部でのみ発現の亢進が認められるため、siRNA 導入による正常組織への影響は少ないと考えられる。また、CHFR や Aurora-A は細胞周期チェックポイント分子であり、この細胞周期制御の破綻は癌細胞の基本的性質とも言える。よって子宮体癌のみならず、他臓器癌でも同様の異常が起こっていると予測され、本研究の成果は他臓器癌へのさらなる応用が期待される。さらに、本研究により siRNA のアテロコラーゲンによる癌細胞への効果的なデリバリー法が確立されれば、将来的に抗癌剤としての siRNA の利用を検討するにあたり、非常に有益と考えられる。

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 4 件)

Banno K, Yanokura M, Susumu N, Aoki D. Epigenetic DNA hypermethylation of cancer-related genes in carcinogenesis of endometrial cancer. In: Maruo T, Mardon H, Stewart C, eds. Translational Research in Uterine Biology, Amsterdam: ELSEVIER, 2008: 191-200. 査読有

Banno K*, Yanokura M*, Kawaguchi M, Kuwabara Y, Akiyoshi J, Kobayashi Y, Iwata T, Hirasawa A, Fujii T, Susumu N, Tsukazaki K, Aoki D. Epigenetic inactivation of the *CHFR* gene in cervical cancer contributes to sensitivity to taxanes. Int J of Oncol 2007; 31: 713-720. 査読有

Yamagami W, Banno K, Kawaguchi M, Yanokura M, Kuwabara Y, Hirao N, Susumu N, Tsukazaki K, Aoki D. Use of the collagen gel droplet embedded drug sensitivity test to determine drug sensitivity against ovarian mature cystic teratoma with malignant transformation to adenocarcinoma; A case report. Chemotherapy 2007; 53: 137-141. 査読有

Yanokura M*, Banno K*, Kawaguchi M, Hirao N, Hirasawa A, Susumu N, Tsukazaki K, Aoki D. Relationship of aberrant DNA hypermethylation of *CHFR* with sensitivity to taxanes in endometrial

cancer. Oncology Reports 2007; 17: 41-48. 査読有

*Contributed equally

[学会発表](計 2 件)

矢野倉 恵,
Expression of a mitotic kinase, Aurora A, affects taxane sensitivity in endometrial cancer, 20th AOCOG, 2007年9月24日、東京

矢野倉 恵,
子宮頸癌における M 期チェックポイント遺伝子 *CHFR* の異常メチル化の分子指標としての可能性、第 59 回日本産科婦人科学会学術集会、2007年4月16日、京都

6 . 研究組織

(1)研究代表者
矢野倉 恵(YANOKURA MEGUMI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 20433732

(2)研究分担者

(3)連携研究者