

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390432

研究課題名（和文） 子宮内膜癌化モデルを駆使した内膜癌化機構の解明と新たな分子標的の探索

研究課題名（英文） Identification of molecular mechanisms and the targets using in vitro carcinogenesis model of endometrial cancer.

研究代表者

京 哲 (KYO SATORU)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：50272969

研究成果の概要（和文）：本研究は我々がこれまでに正常子宮内膜上皮細胞より作製した不死化～癌化細胞を用いて内膜癌化の経路を解明し、新たな分子標的を探索することを目的とした。すでに不死化細胞を癌化させることが明らかとなっているK-ras変異導入による癌化の経路を明らかにすることを第一の目的とし、K-ras変異導入細胞ではNF- κ Bの転写活性化能が亢進していること、NF- κ BのDNA結合能が上昇していること、NF- κ B活性を阻害するI κ Bを強制発現すると浸潤能の低下、マウス腫瘍サイズの著明な減少など癌化のphenotypeの減弱が確認された。この結果より、子宮内膜癌のK-ras遺伝子下流ではNF- κ Bの活性化が起こっており、これが内膜癌化における重要な分子機構であること、K-ras遺伝子変異のある症例におけるNF- κ B阻害剤の分子標的治療薬としての有用性が示された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated the molecular targets of *KRAS* signals using tumorigenic cells with oncogenic *KRAS* mutation established from *TERT*-immortalized endometrial epithelial cells. We first confirmed that the Raf-Erk pathway, but not the PI3K-Akt pathway, was activated in *KRAS*-tumorigenic cells. However, the introduction of constitutively active *MEK* into immortalized cells to mimic Raf-Erk activation failed to obtain tumorigenic phenotypes, indicating the existence of other carcinogenic pathways triggered by *KRAS*. Recent evidence suggestive of linkage with *KRAS* signals prompted us to examine the involvement of NF- κ B in endometrial carcinogenesis. We found that the DNA binding activity of NF- κ B was markedly elevated in *KRAS*-tumorigenic cells compared to *TERT*-immortalized cells. Furthermore, the ability of NF- κ B to activate the target gene promoters significantly increased in *KRAS*-tumorigenic cells. Introduction of a mutant I κ B that is resistant to degradation and thereby enhances the inhibitory effect on NF- κ B largely abrogated the transformed phenotypes of *KRAS*-tumorigenic cells. Thus, oncogenic *KRAS* signals contributed to the tumorigenic phenotypes of endometrial cells by activating the transcription function of NF- κ B. These findings clearly show that NF- κ B activation is a novel target of oncogenic *KRAS* in endometrial carcinogenesis, implying the potential utility of NF- κ B inhibitors for endometrial cancer chemoprevention, especially with *KRAS* mutation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：子宮内膜癌、癌化モデル、分子標的

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌の発癌分子機構は、これまでの組織検体を用いた遺伝子解析の結果から、PTENなどの遺伝子異常が報告されている。しかしながら最も高率に異常が認められるPTEN遺伝子においても変異を認める症例は全体の30%前後であり、内膜癌化の分子機構は多くが謎に包まれている。またPTENの遺伝子変異がどのような経路を介して癌化に結びつくのかも明らかにはなっていない。PTEN以外にもK-ras, TGF-beta受容体などの遺伝子変異やマイクロサテライト不安定性、p53遺伝子変異、ERのメチル化異常などが報告されているが、これらが排他的に作用し、その総和が癌化を引き起こすのか、あるいは特定の経路上でこれらが共通のpathwayを形成しているのか、全くわかっていないのが現状である。

そもそも内膜癌の発癌機構解析が他の領域の癌より遅れをとっている原因の一つにin vitro癌化モデルが存在しなかったことが上げられる。すなわち、内膜癌の発生母体である正常内膜上皮の長期培養が非常に困難で、遺伝子導入実験や遺伝子抑制実験が事実上不可能であった背景が存在する。正常内膜上皮は極めてデリケートな細胞であり、試験管内培養では1-2週間で増殖を停止する。これまでも正常内膜上皮細胞に遺伝子導入を試みた報告はあるが、死にゆく細胞への遺伝子導入実験ゆえ、十分な成果を示せなかった。

これまで我々はヒト正常細胞が一定の培養期間後に増殖を停止するメカニズムとして染色体末端に存在するテロメアの短縮による細胞老化(replicative senescence)を詳細に解析してきた。その結果、多くの細胞が約30-50回の細胞分裂にてテロメアが限界までの短縮し、それによるDNAダメージシグナルの惹起が細胞周期を停止させ、細胞老化に導くことを明らかにしてきた。

さらに多くの上皮細胞ではテロメア短縮によるsenescenceの前段階として、細胞分裂10回前後の若い時期にRB蛋白の活性化に起因するpremature senescenceという細胞分裂停止の機構が働くことを明らかにしてきた。子宮内膜上皮細胞もこの例に漏れず、培養早期でpremature senescenceに陥る。子宮内膜上皮細胞の培養が不可能な理由はこのpremature senescenceとreplicative senescenceの2つの障壁の存在による。

そこで我々はRB蛋白の活性化を防ぐ遺伝子操作(HPV E6/E7遺伝子の導入)とテロメアを伸張させる酵素テロメラーゼ(hTERT)の導入により、世界で初めて正常子宮内膜上皮細胞を不死化することに成功した(図1)(Kyo et al., Am. J. Pathol, 2003)。

この不死化細胞はステロイドホルモン受容体を発現し、エストロゲンによる増殖刺激とプロゲステロンによる増殖抑制というオリジナル細胞の性質を維持しており、またマトリゲル上では腺管類似構造を呈する(図2)。このように我々が樹立した子宮内膜上皮不死化細胞は機能的にも構造的にも正常子宮内膜上皮の性質をほぼ完全に保持したまま永久に継代培養が可能である。

一方、これらの子宮内膜上皮不死化細胞は軟寒天培地上でのコロニー形成能もなく、ヌードマウスでの造腫瘍能も持たない。したがって癌化形質は獲得していない。そこで我々はこの不死化細胞に内膜癌組織においても高頻度に変異が見られるK-ras遺伝子の変異型アレルの導入を試みた。その結果ヌードマウスでの造腫瘍性を獲得し、完全な癌形質を有する癌化細胞を作製することに成功した(図3)(Mizumoto et al., Oncogene 2006)。すなわち、正常内膜上皮細胞から特定のgenetic factorの導入により世界で初めて内膜癌細胞の作製に成功した。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、これらの一連の不死化～癌化細胞を用いて内膜癌化の経路を解明し、新たな分子標的を探索することを目的とした。具体的にはすでに不死化細胞を癌化させることが明らかとなっている K-ras 変異導入による癌化の経路を特に明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

K-ras 遺伝子変異の下流として conventional な経路である RAS-ERK 経路の関与について検討した。最近 Cell 誌(vol 129; 1065-1079, 2007)に K-ras 遺伝子と関連して NF- κ B の調節因子(不活化因子) IKB のリン酸化を司る IKB kinase (IKK)が遺伝子増幅などにより過剰発現していることが報告された。IKK の過剰発現は IKB をリン酸化し、このリン酸化により IKB は分解され、抑制がはずれて NF- κ B の活性化が起こる。

そこで、まず K-ras 遺伝子変異細胞を用いて、NF- κ B が活性化されているか否かを NF- κ B 結合配列をプローブとしたゲルシフト法、および NF- κ B responsive element を配した luciferase reporter による luciferase assay にて検討する。これらの活性変化はベクター導入した内膜不死化細胞との比較で検討する。以上より K-ras 遺伝子変異の下流に NF- κ B の経路が存在するか否かを明らかにした。

4. 研究成果

K-ras 変異導入細胞 (oncogenic-Kras allele 導入細胞)では vector コントロール細胞に比べ、NF- κ B の転写活性化能が亢進していること、NF- κ B の DNA 結合能が上昇していること、NF- κ B 活性を阻害する I κ B を強制発現すると浸潤能の低下、マウス腫瘍サイズの著明な減少など癌化の phenotype の減弱が確認された。

以上の結果より子宮内膜癌化、特に K-ras 遺伝子変異のある細胞では活性化 K-ras 遺伝子のシグナルとして下流で NF- κ B 経路が活性化され、これが癌化形質の獲得に重要な役割を演じていること、また K-ras 遺伝子変異のある症例では分子標的薬として NF- κ B 阻害剤が有用である可能性が示された。

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 28 件)

- ① Mizumoto Y, Kyo S, Kiyono T, Takakura M, Nakamura M, Maida Y, Mori N, Bono Y, Sakurai H and Inoue M., Activation of NF- κ B is a novel target of KRAS-induced endometrial

carcinogenesis.

Clin. Cancer Res. 17:1341-1350, 2011.

査読有

- ② Shimizu Y, Mita S, Takeuchi T, Notsu T, Mizuguchi K, Kyo S., Dianogest, a synthetic progestine, inhibits prostaglandin E2 production and aromatase expression by human endometrial epithelial cells in a steroid culture system.

Steroids, 76:60-67, 2011. 査読有

- ③ Kyo S, Sakaguchi J, Kiyono T, Shimizu Y, Maida Y, Mizumoto Y, Mori N, Nakamura M, Takakura M, Miyake M, Sakamoto M and Inoue M., Forkhead transcription factor FOXO1 is a direct target of progestin to inhibit endometrial epithelial cell growth.

Clin. Cancer Res. 17: 525-537, 2011.

査読有

- ④ Wong CW, Hou PS, Tseng SF, Chien CL, Wu KJ, Chen HF, Ho HN, Kyo S and Teng SC., KLF4 contributes to maintenance of telomerase activity in stem cells.

Stem Cells 28: 1510-1517, 2010. 査読有

- ⑤ Kojima T, Watanabe Y, Hashimoto Y, Kuroda S, Yamasaki Y, Yano S, Ouchi M, Tazawa H, Uno F, Kagawa S, Kyo S, Mizuguchi H, Urata Y, Tanaka N and Fujiwara T., In vivo biological purging for lymph node metastasis of human colorectal cancer by telomerase-specific incolytic virotherapy.

Ann. Surg. 251; 1079-1086, 2010. 査読有

- ⑥ Mori N, Kyo S, Nakamura M, Hashimoto M, Maida Y, Mizumoto Y, Takakura M, Ohno S, Kiyono T and Inoue M. , Expression of HER-2 impacts patient survival and paclitaxel sensitivity in endometrial cancer. *Br. J. Cancer*, 103:889-898, 2010. 査読有
- ⑦ Nakamura M, Kyo S, Zhang B, Zhang X, Mizumoto Y, Takakura M, Maida Y, Mori N, Hashimoto M, Ohno S and Inoue M. , Prognostic impact of CD133 expression as a tumor initiating marker in endometrial cancer. *Hum. Pathol.* 41:1516-1529, 2010. 査読有
- ⑧ Watanabe Y, Kojima T, Kagawa S, Uno F, Hashimoto Y, Kyo S, Mizuguchi H, Tanaka N, Kawamura H, Ichimaru D, Urata Y, Fujiwara T. , A novel translational approach for human Malignant pleural mesothelioma: heparanase-assisted dual virotherapy. *Oncogene*, 29: 1145-1154, 2010. 査読有
- ⑨ Shimizu Y, Takeuchi T, Mita S, Nost T, Mizoguchi K and Kyo S. , Kruppel-like factor 4 mediates anti-proliferative effects of progesterone with G0/G1 arrest in huma endometrial epithelia cells. *J. Endocr. Invest.* 33:745-750, 2010. 査読有
- ⑩ Dohi A, Ohno S, Ohno Y, Kyo S, Soma G, Sugiyama H and Inoue M. , WT1 expression correlates with angiogenesis in endometrial cancer tissues. *Anti cancer Res.* 30:3187-3192, 2010. 査読有
- ⑪ Takakura M, Nakamura M, Kyo S, Hashimoto M, Mori N, Ikoma T, Mizumoto Y, Fujiwara T, Urata Y and Inoue M. , Intraperitoneal administration of telomerase-specific oncolytic adenovirus sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin and affects survival in a xenograft model with peritoneal dissemination *Cancer Gene Ther.* 17: 11-19, 2010. 査読有
- ⑫ Ohno S, Kyo S, Myojo S, Dohi S, Ishizaki J, Miyamoto K, Morita S and Sakamoto J. , Wilms' Tumor 1 (WT1) Peptide Immunotherapy for Gynecological Malignancy *Anti cancer Res.* 29:4779-4784, 2009. 査読有
- ⑬ Kojima T, Hashimoto Y, Watanabe Y, Kagawa S, Uno F, Kuroda S, Tazawa H, Kyo S, Mizuguchi H, Urata Y, Tanaka N and Fujiwara T. , A simple biological imaging system for detecting viable human circulating tumor cells. *J. Clin. Invest.* 119: 3172-3181, 2009. 査読有
- ⑭ Kyo S, Mizumoto Y, Takakura M, Hashimoto M, Mori N, Ikoma T, Nakamura M, Inoue M, Experience and efficacy of a bipolar vessel sealing system for radical abdominal hysterectomy. *Int J Gynecol Cancer.* 19:1658-1661, 2009. 査読有

- ⑮ Dohi S, Ohno S, Ohno Y, Soma G, Kyo S, Inoue M., Correlation between WT1 Expression and Cell Proliferation in Endometrial Cancer. *Anticancer Res.* 29:4887-4891, 2009. 査読有
- ⑯ Mai W, Kawakami K, Shakoori A, Kyo S, Miyashita K, Yokoi K, Jin M, Shimasaki T, Motoo Y and Minomoto T., Deregulated glycogen synthase kinase-3 β sustains gastrointestinal cancer Cells survival by modulating human telomerase reverse transcriptase and telomerase *Clin. Cancer Res.* 15:6810-6819, 2009. 査読有
- ⑰ Shimizu Y, Takeuchi T, Mizuguchi K, Kiyono T, Inoue M and Kyo S, Dienogest, a synthetic progestin, inhibits the proliferation of immortalized human endometrial epithelial cells with suppression of cyclin D1 gene expression *Mol. Hum. Reprod.* 15:693-701, 2009. 査読有
- ⑱ Ikoma T, Kyo S, Maida Y, Ozaki S, Takakura M, Nakao S and Inoue M. Bone marrow-derived cells from male donors can compose endometrial glands in female transplant recipients. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 201: 608.e1-8, 2009. 査読有
- ⑲ Straat K, Liu C, Rahbar A, Zhu Q, Liu L, Wolmer-Solberg N, Lou F, Liu Z, Shen J, Jia J, Kyo S, Björkholm M, Sjöberg J, Söderberg-Nauclér C, Xu D., Activation of telomerase by human cytomegalovirus. *J Natl Cancer Inst.* 101:488-497, 2009. 査読有
- ⑳ Kurihara Y, Watanabe Y, Onimatsu H, Kojima T, Shirota T, Hatori M, Liu D, Kyo S, Mizuguchi H, Urata Y, Shintani S, Fujiwara T., Telomerase-Specific Virotheranostics for Human Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res.* 15:2335-2343, 2009. 査読有
- ㉑ Nakamura M, Bodily J, Beglin M, Kyo S, Inoue M and Laimins L., Hypoxia-specific stabilization of HIF-1 $\cdot\cdot$ by human papillomaviruses. *Virology* 387; 442-448, 2009. 査読有
- ㉒ Yoshie M, Miyajima E, Kyo S and Tamura K., Stathmin, a microtubule regulatory protein is associated with hypoxia-inducible factor-1 α levels in human endometrial and endothelial cells. *Endocrinology*, 150; 2413-2418, 2009. 査読有
- ㉓ Ohno S, Dohi S, Ohno Y, Kyo S, Sugiyama H, Suzuki N and Inoue M., Immunohistochemical detection of WT1 protein in endometrial cancer. *Anti Cancer Res.*, 29: 1691-1695, 2009. 査読有
- ㉔ Maida Y, Kyo S, Sakaguchi J, Mizumoto Y, Hashimoto M, Mori M, Ikoma T, Nakamura M, Takakura M, Urata Y, Fujiwara T, and Inoue M., Diagnostic potential and limitation of imaging cancer cell in cytological sample using telomerase-specific replicative adenovirus.

Int. J. Oncol. 34:1549-1556, 2009. 査読有

25 Akutagawa O, Nishi H, Kyo S, Terauchi F, Yamazawa K, Higuma C, Inoue M, Isaka K., Early growth response-1 mediates down-regulation of telomerase in cervical cancer.

Cancer Sci, 99:1401-1406, 2008. 査読有

26 Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A., Novel Cardiac Precursor-Like Cells from Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Cells.

Stem Cells. 26:1695-1704, 2008. 査読有

27 Kyo S, Takakura M, Fujiwara T and Inoue M., Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers.

Cancer Sci. 9: 1528-1538, 2008. 査読有

28 Hashimoto M, Kyo S, Hua X, Tahara H, Nakajima M, Takakura M, Saskaguchi J, Maida Y, Nakamura M, Ikoma T, Mori N, Mizumoto Y and Inoue M., Role of menin in the regulation of telomerase activity in normal and cancer cells.

Int. J. Oncol. 33:333-340, 2008. 査読有

[学会発表] (計2件)

① Yasunari Mizumoto, Satoru Kyo, Masahiro Takakura, Mitsuhiro Nakamura, Manabu Hashimoto, Noriko Mori, Tomomi Ikoma, Masaki Inoue., Oncogenic KRAS transforms endometrial cells through NFkB activation independently of IkBa degradation or p65-IkBa dissociation., 第68回日本癌学会, 2009年10月1日, パシフィコ横浜(神奈川県)

② 水本泰成 京哲 高倉正博 中村充宏 森紀子 生駒友美 井上正樹, 子宮内膜癌において変異型KRASの下流でNFkBが活性化され、癌形質獲得に寄与する, 第60回日本産科婦人科学会学術講演会, 2008年4月12日, パシフィコ横浜(神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

京 哲 (KYO SATORU)
金沢大学・医学系・講師
研究者番号：50272969

(2) 研究分担者

水本 泰成 (MIZUMOTO YASUNARI)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：00420331