

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591947
 研究課題名 (和文) 婦人科悪性腫瘍におけるリガンド非依存性エストロゲン受容体 (ER) 活性化機構の解明
 研究課題名 (英文) Ligand-independent activation of estrogen receptor pathway in gynecologic malignancies
 研究代表者 須藤 保 (TAMOTSU SUDO)
 神戸大学・医学研究科・医学研究員
 研究者番号：50397824

研究成果の概要 (和文)：本研究課題は「婦人科悪性腫瘍におけるリガンド非依存性エストロゲン受容体 (ER) 活性化機構を解明し、ER 経路を標的とした新たな治療薬の開発」である。平成 20 年度から 22 年度の 3 年間の研究により下記のような成果を得た。

(1) ER を器質とするリン酸化酵素 Pak1 (P21 activated kinase-1) 活性化が卵巣癌において予後不良に寄与していること、その阻害剤である PAK-18 の抗腫瘍効果について明らかにした。

(2) VAV1 蛋白は骨髄系の細胞から発見されたグアニンヌクレオチド交換蛋白 (GEFs) であるが、VAV1 の過剰発現により Pak1 が活性化することを明らかにした。次に卵巣癌患者の病理切片を免疫染色した結果、90 例中 33 例 (36.7%) の VAV1 陽性であった。特に比較的予後良好であると考えられている臨床進行期 I 期 II 期の患者群で検討したところ VAV1 陽性患者は全生存率、無病増悪生存率が有意に高かった。また VAV1-Pak1 経路の活性化により E-cadherin の発現低下が観察されたことから、VAV1 は上皮細胞としての特性を失い浸潤・転移しやすい間葉系細胞としての特徴を獲得する上皮間葉移行 (EMT) を介して発がん・悪性化に寄与することが考えられた。

研究成果の概要 (英文)：(1) PAK1, a major target of the small GTPases, growth factors and lipid signaling, regulates cell motility, hormone action, invasiveness, and survival, all of which are required for tumor development. We found phospho-PAK1 expression in 14% by immunohistochemical staining of ovarian cancer patients. Patients with phospho-PAK1 (+) in the tumor had poor survival compared with those with negative expression ($P=0.02$). Furthermore, PAK1 inhibition by PAK1 specific inhibitor (PAK18) greatly increased the sensitivity of phospho-PAK1 positive ovarian cancer cells to epirubicin.

(2) Vav1-positive tumors had a worse overall survival ($P=0.0392$) and progression free survival ($P=0.0298$) compared to Vav1-negative tumors in early-stage ovarian cancer patients. Significant down-regulation of E-cadherin was observed in SKOV-3-Vav1 versus control cells. Expression of VAV1 causally contributes to epithelial-mesenchymal transition and ovarian cancer progression through the suppression of E-cadherin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：エストロゲン、p21 activated kinase-1、VAV1

1. 研究開始当初の背景
性ホルモンであるエストロゲンが女性生殖器悪性腫瘍の発生に深く関与することが知られている。例えば子宮体癌 I 型とされる高中分化型類内膜腺癌は子宮内膜へのエストロゲンの過剰刺激がその発癌の要因とされ、卵巣癌においては ER の発現や局所のエストロゲンあるいはその合成酵素であるアロマターゼ活性が高いことが報告されている。また 1940 年代から欧米において流産予防として使用された合成エストロゲン製剤であるジエチルスチルベストロール (DES) を摂取した妊婦において、その女兒に高頻度に膣明細胞腺癌が発生したことが疫学的に明らかとなった。しかしエストロゲンによる発癌メカニズムについてはいまだ不明な点が多く、婦人科領域での抗エストロゲン製剤の臨床的有効性についても議論が分かれているのが現状である。研究代表者は膣明細胞腺癌、子宮体癌、卵巣癌 (漿液性、粘液性、明細胞、類内膜) 臨床検体を用いて、「野生型 ER α 」ならびに ER 経路の活性化を示す「リン酸化型 ER α 」の発現を免疫組織学的染色にて評価したところ、それらの発現レベルに一致しないもの (すなわち野生型が陰性または弱陽性にもかかわらずリン酸化型が陽性であるもの、あるいはその逆) があり、またエストロゲン非依存性とされる子宮体癌特殊型においてリン酸化 ER α 陽性例が存在することを見出している。また研究分担者は発生生物学の見地から、マウスを用いて臨界期に DES 投与を行ったところ、ヒトと同様に膣癌が発生したが、DES 投与は一過性のもので、しかもその後卵巣摘出により個体を低エストロゲン状態に置いたにもかかわらず、腫瘍組織での ER α AF1 領域のリン酸化が起こり、自己活性化ループが形成されていることを見出した。以上のことからエストロゲン非依存性と考

られていた悪性腫瘍でも ER 経路が活性化しているのではないかと考え今回の研究の着想となった。

2. 研究の目的

婦人科悪性腫瘍におけるリガンド非依存性エストロゲン受容体 (ER) 活性化機構を解明し、ER 経路を標的とした新たな治療薬の開発を目標とする。

3. 研究の方法

[卵巣癌における Pak1]

(1) 正常卵巣上皮不死化細胞 HOSE ならびに卵巣癌細胞株 TYK-nu、RMUG-S、HTOA、SKOV-3 を用いて活性化型であるリン酸化 Pak1 (以下 p-Pak1) 発現解析をウエスタンブロッティング法にて行った。(2) 上記卵巣癌細胞株を用いて Pak1 阻害剤ある Pak18 単剤ならびに paclitaxel、cisplatin、epirubicin、SN-38 との併用効果を MTT assay にて検討した。

(3) 患者の同意が得られた臨床検体 73 例について免疫組織学的化学染色法により p-Pak1 発現を評価し、臨床病理学的因子との関連を検討した。

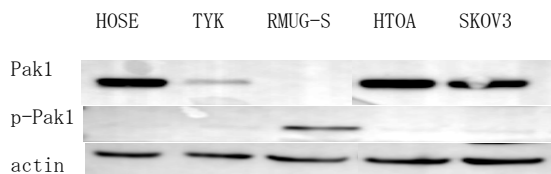
[卵巣癌における VAV1]

(1) 患者の同意が得られた臨床検体 93 例について免疫組織学的化学染色法 (IHC) により VAV1 発現を評価し、臨床病理学的因子との関連を検討した。(2) VAV1 発現陰性で卵巣癌細胞株である SKOV-3 細胞に VAV1 恒常性発現株 (VAV1-SKOV3) を樹立し、その下流分子である Pak1 の活性ならびに上皮細胞のマーカーである E-cadherin の発現をウエスタンブロッティング法にて解析した。

4. 研究成果

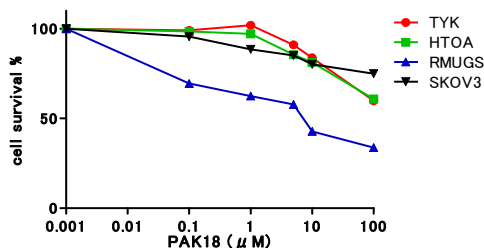
[卵巣癌における Pak1]

(1) 細胞株において p-Pak1 強発現は 5 例中 1 例であった (図 1)。

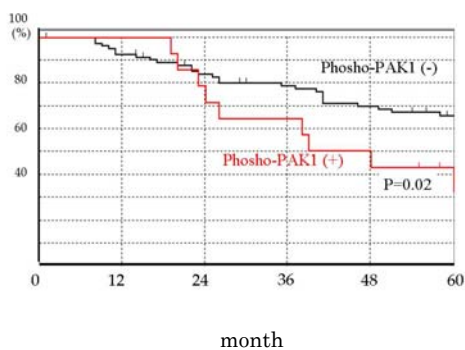


(図1) 各種卵巣細胞株における Pak1、活性化 Pak1 (p-Pak1) の発現

2) Pak18 単独投与では p-Pak1 陽性である RMUG-S のみ増殖抑制効果は見られた (図2)。



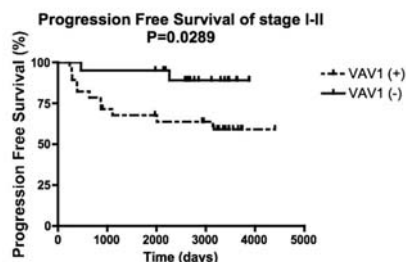
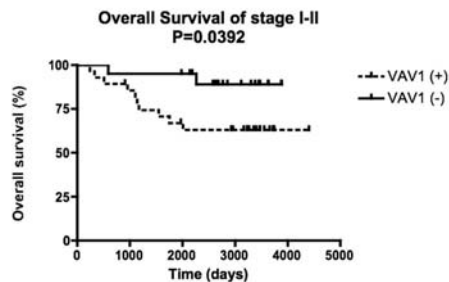
(図2) Pak1 阻害剤 Pak18 による増殖抑制効果。p-Pak1 陽性である RMUG-S 細胞が Pak1 阻害剤の効果が高い。また PTX、CDDP、SN-38 併用効果を認めなかったが epirubicin 併用効果は p-Pak1 発現株においてのみ認めた。3) 検体 73 例中 8 例 (11%) に Pak1 活性を認め、全生存期間 (OS) において有意に予後不良であった ($p=0.02$ 図3)。



(図3) Phospho-PAK1 陽性例は陰性例と比較し予後不良である ($p=0.02$)。

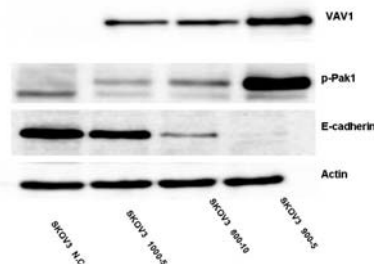
[卵巣癌における VAV1]

(1) 卵巣癌進行期 I-II 期といった比較的早期症例において VAV1 陽性例が OS ならびに無増悪生存期間 (PFS) とともに有意に予後不良であった ($P=0.0392$, $P=0.0298$ 図4)。



(図4) 進行期 I-II 期の早期卵巣癌症例において VAV1 陽性例は陰性例と比較し予後不良である。

(2) VAV1-SKOV3 株において Pak1 の活性化とともに E-cadherin の発現が低下しており VAV1-Pak1 の経路を通じて EMT が惹起されていることが示唆された (図5)。



(図5) VAV1-SKOV3 の3つのクローンは VAV1 の発現量に応じて活性化 Pak1 (p-Pak1) の増加ならびに E-cadherin の低下が観察された。

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7件)

① Tsuda H, Ito K, Yaegashi N, Hirasawa A, Sudo T, Kita T, Terai Y, Kigawa J,

Sugiyama T, Aoki D. Relationship between ABCF2 expression and response to chemotherapy or prognosis in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 Jul;20(5):794-7

② Kusanagi Y, Kojima A, Mikami Y, Kiyokawa T, Sudo T, Yamaguchi S, Nishimura R. Absence of High-Risk Human Papillomavirus (HPV) Detection in Endocervical Adenocarcinoma with Gastric Morphology and Phenotype. *American Journal of Pathology*. 2010 Sep 9.

③ Hashimoto H, Sudo T, Maruta H, Nishimura R. The direct PAK1 inhibitor, TAT-PAK18, blocks preferentially the growth of human ovarian cancer cell lines in which PAK1 is abnormally activated by autophosphorylation at Thr 423. *Drug Discov Ther*. 2010 4(1):1-4.

④ Miyagawa S, Katsu Y, Ohta Y, Sudo T, Lubahn DB, Iguchi T. Estrogen receptor ESR1 is indispensable for the induction of persistent vaginal change by neonatal 5alpha-dihydrotestosterone exposure in mice. *Biol Reprod*. 2010 Mar;82(3):497-503

⑤ Nakayama S, Torikoshi Y, Takahashi T, Yoshida T, Sudo T, Matsushima T, Kawasaki Y, Katayama A, Gohda K, Hortobagyi GN, Noguchi S, Sakai T, Ishihara H, Ueno NT. Prediction of paclitaxel sensitivity by CDK1 and CDK2 activity in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2009 11(1):R12

⑥ Katsu Y, Braun EL, Guillette LJ Jr, Iguchi T. From reptilian phylogenomics to reptilian genomes: analyses of c-Jun and DJ-1 proto-oncogenes. *Cytogenet Genome Res*. 2009 127(2-4):79-93.

⑦ Hashimoto H, Sudo T, Mikami Y, Otani M, Takano M, Tsuda H, Itamochi H, Katabuchi H, Ito M, Nishimura R. Germ cell specific protein VASA is over-expressed in epithelial ovarian cancer and disrupts DNA damage-induced G2 checkpoint. *Gynecol Oncol*. 2008 Nov;111(2):312-9

[学会発表] (計 5 件)

(1) 上皮性卵巣癌における Pak1 活性化と特異的阻害剤 Pak18 の臨床応用の可能性 第 61 回日本産婦人科学会 平成 21 年 4 月

(2) 上皮性卵巣癌における Pak1 活性化と特異的阻害剤 Pak18 の臨床応用の可能性 第 68 回日本癌学会 平成 21 年 10 月

(3) HPV ゲノムのメチル化状態による子宮頸部上皮内病変の進展予測 第 68 回日本癌学会 平成 21 年 10 月

(4) 上皮性卵巣癌における Pak1 活性化と特異的阻害剤 Pak18 の臨床応用の可能性 第 47 回日本癌治療学会 平成 21 年 10 月

(5) HPV ゲノムのメチル化状態による子宮頸部上皮内病変の進展予測 第 61 回日本産婦人科学会 平成 22 年 4 月

[図書] (計 1 件)

Iguchi T, Miyagawa S, Sudo T, Woodruff T, Janssen S.J., Guillette L.J.Jr., and Giudice L.C. Modern genetics of reproductive biology. In: *Environmental Impacts on Reproductive Health and Fertility* Cambridge University Press 2010

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 保 (TAMOTSU SUDO)

神戸大学・医学系研究科・医学研究員

研究者番号：50397824

(2) 研究分担者

井口 泰泉 (TAISEN IGUCHI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構

(共通施設)・岡崎統合バイオサイエンス

センター・教授

研究者番号：90128588

(3) 連携研究者