

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18222

研究課題名(和文)子宮頸癌における三酸化二砒素によるCBR1増加を介した新規分子標的治療の開発

研究課題名(英文)A novel therapeutic method for uterine cervical cancer by Arsenic trioxide via inducing Carbonyl reductase 1

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸癌において三酸化二砒素(ATO)を投与することで、子宮頸癌の増殖、浸潤を抑制する物質であるCarbonyl reductase 1 (CBR1)発現を誘導し、新たな治療法となりうるかを検証した。in vitroにおいて子宮頸癌細胞株にATOを添加したところ、CBR1発現の増加を認めた。また同様にATOの添加によって、子宮頸癌細胞の増殖能が抑制され、さらに遊走、浸潤能が抑制された。さらにNude miceに子宮頸癌細胞を皮下移植したモデルにATOを頸静脈投与すると腫瘍形成能が抑制された。さらに形成腫瘍内のCBR1が増加した。ATOは子宮頸癌の新規治療法として有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸癌治療として手術による病巣除去と白金系の抗癌剤投与が標準療法として確立され、またヒトパピローマウイルスに対する予防ワクチンの開発により子宮頸癌の発症率低下が期待されたが、未だに同疾患は若年女性の死因の上位を占めており再発症例の治療は困難であり、そうした症例に対する新たな治療法の開発が急務である。三酸化二砒素(ATO)は、白血病の治療薬としてすでに臨床現場では広く使われておりその安全性などの情報も知られている。すでに臨床上的使用条件の明らかな薬剤であるATOが使用できれば即座に臨床応用が可能であり、既存の抗癌剤に抵抗性の症例に対する新たな治療方法として非常に有望な手段となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Arsenic trioxide (ATO) is known as the inducer for Carbonyl reductase 1 (CBR1), which reduces the malignant behavior of uterine cervical cancer. However, it is still unclear if ATO can increase the CBR1 in uterine cervical cancer, and can have the therapeutic effect in uterine cervical cancer. We assessed how ATO affects in uterine cervical cancer via CBR1. ATO induced CBR1 expression and suppresses the abilities of proliferation and invasion in uterine cervical cancer cell lines (SiHa and SKG11). We established the cervical cancer model by using nude mice, which were transplanted cervical cancer cell-lines under the skin. After 5 mg/kg ATO was injected for 8 weeks, the tumorigenesis was significantly reduced. Also, the CBR1 expression level in the tumors was significantly lower than those in the control. These results suggested that ATO can be a novel therapeutic method of uterine cervical cancer.

研究分野：産婦人科

キーワード：三酸化二砒素 Carbonyl reductase 1 子宮頸癌

### 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、子宮頸癌において carbonyl reductase 1 (CBR1)の発現が低下している症例では有意に予後が不良である事を報告した。また子宮頸癌細胞株で CBR1 の発現を抑制させると E-cadherin の発現が減少し、上皮間葉転換(EMT)が誘導され癌の浸潤、増殖能が亢進する事、逆に CBR1 を過剰発現させた子宮頸癌細胞では E-cadherin の発現が増加し、EMT と逆の間葉上皮転換(MET)が誘導され、浸潤、増殖能が抑制される事を見出した(図 1)。さらに、nude mice を用いて子宮頸癌細胞の異種移植モデルを作成し CBR1 発現の腫瘍形成能に対する影響を評価したところ、CBR1 発現抑制株を移植した群では腫瘍形成能が大幅に亢進し、逆に過剰発現株を移植した群では腫瘍形成能が抑制された(図 2)。すなわち CBR1 を増加させることができれば癌の進展を抑制することができることを見出し、CBR1 発現の増加を誘導する物質を探求した。

三酸化二砒素 (ATO) は、毒性物質として古来より知られてきた物質であるが、その一方様々な病気の伝統的な治療薬としても用いられてきた。白血病細胞株を用いた実験で、ATO による CBR1 発現の増加誘導が報告されている。すなわち ATO は CBR1 の誘導物質である可能性があり、子宮頸癌においても ATO による CBR1 を誘導することができる可能性がある。

図1. CBR1発現変化による EMT関連因子の発現変化

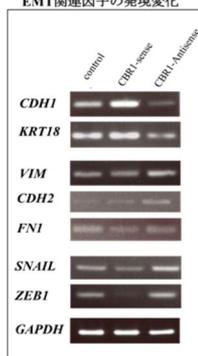
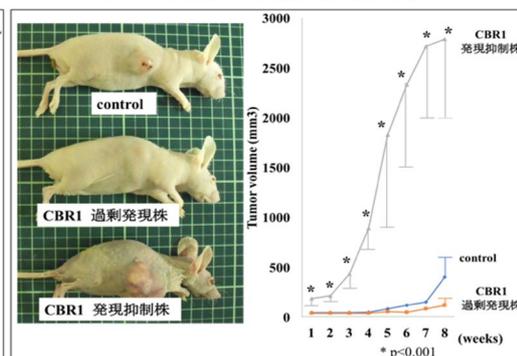


図2. CBR1発現変化による腫瘍形成能に与える影響



### 2. 研究の目的

本研究では ATO 投与により CBR1 が増加し、MET の誘導を介した癌細胞の腫瘍増殖能、浸潤能、及び腫瘍形成能を抑制しうるかを *in vitro* 及び *in vivo* で検討することとした。

### 3. 研究の方法

#### 1. 子宮頸癌細胞の機能に対する ATO の影響を *in vitro* で検討する。

子宮頸癌細胞株 SiHa 及び SKGII を用いて細胞培養を行う。培養開始より 24 時間後より培養液を ATO 添加培養液(SiHa; 0, 2.5, 5.0, or 10 μM, SKGII; 0, 1.2, 2.5, 5.0 μM)に交換して培養し(24h or 48h)、CBR1 の発現変化を検討する。その上で細胞の機能 (形態変化、増殖能、浸潤能)、MET 関連因子の発現変化について解析する。増殖能は MTT assay、浸潤能は invasion assay で、発現解析は Western blot で検討する。

#### 2. 腫瘍移植モデルマウスの腫瘍形成能に対する ATO の影響を評価する。

子宮頸癌細胞株(SiHa or SKGII  $1.0 \times 10^7$  cells)を、ヌードマウス(balb/c) 皮下に移植し、腫瘍モデルマウスを構築する。移植後 1 週間で腫瘍形成を確認したのち、5 mg/kg の ATO を尾静脈注射投与し、腫瘍形成能への影響を検討する。計測は 2 日毎に行う。腫瘍を摘出し、組織中の CBR1 発現、また MET 関連因子の発現を解析する。

### 4. 研究成果

#### 1. ATO は子宮頸癌細胞中の CBR1 発現を促進する。

宮頸癌細胞株 SiHa、または SKGII をそれぞれ 1 日間培養したのち、ATO を添加した培養液中 (0, 2.5, or 5  $\mu$ M) で 24h または 48h 培養し、それぞれ細胞を回収して抽出液を Western blot に供し CBR1 の発現を検証した。双方の細胞で濃度依存性、時間依存性に CBR1 の発現が増加した(図 3)。一方で同様に回収細胞から得た抽出液から合成した cDNA を real time PCR に供したが、messenger RN A レベルでの CBR1 の発現変化は認めなかった(図 4)。

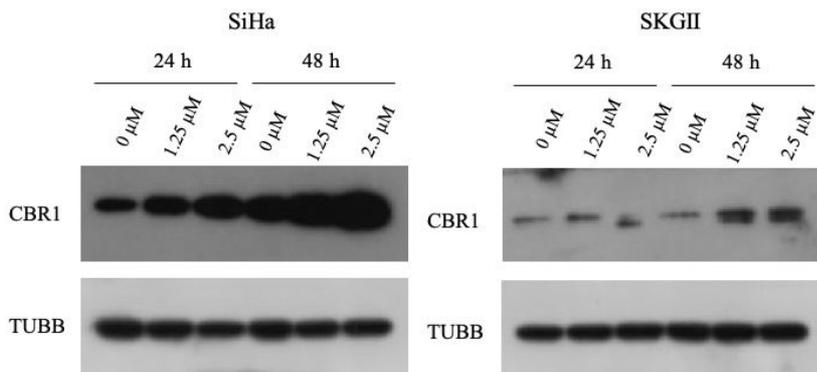


図 3. ATO の子宮頸癌細胞における CBR1 発現誘導

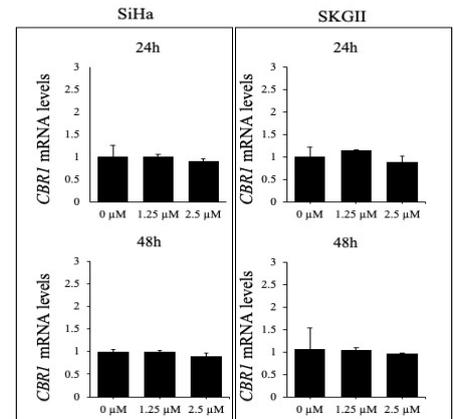


図 4. ATO 添加による CBR1 mRNA 変化

2. ATO は子宮頸癌細胞の増殖を抑制する。

上記子宮頸癌細胞を 96 well plate に播種し、24 時間ごとに MTT 試薬を加えて吸光度(540 nm)で細胞増殖能の変化を検討した。ATO 濃度は 0, 0.31, 0.63, 1.3, 2.5 or 5  $\mu$ M とした。双方の細胞株において ATO 添加群では有意に増殖能が抑制された。特に SKGII では 2.5  $\mu$ M 以上の ATO 添加で細胞の減少を認めた(図 5)。

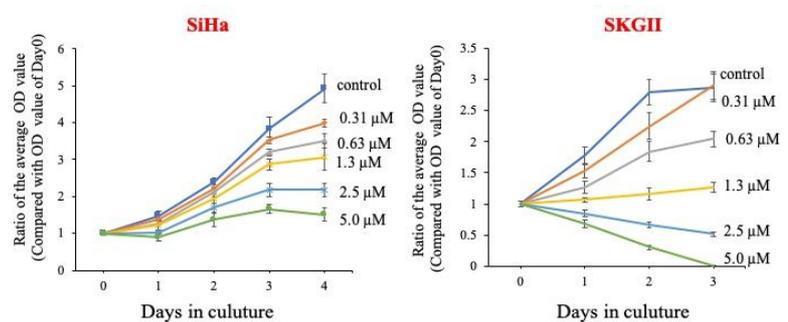


図 5. MTT assay

3. ATO は細胞遊走能を抑制する。

頸癌細胞株 SiHa 及び SKGII を 12well plate に培養し、十分に培養したのち、それぞれの well にスクラッチを施した。その後、ATO を添加した培養液に交換した上で培養を 24h 行い、施した創傷治癒の度合いを観察した(図 6)。ATO 添加群ではどちらの細胞株においても有意に細胞移動が遅く、創傷治癒効果が低くなった。このことから ATO によって細胞の遊走が抑制されたことが示唆された。

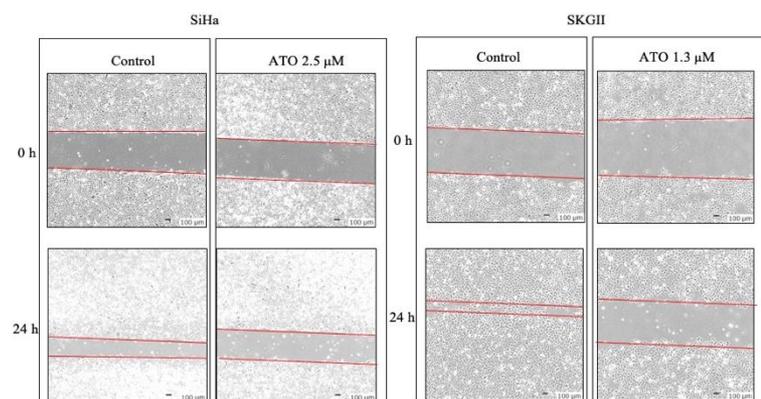


図 6. Wound healing assay

4. ATO は子宮頸癌細胞の浸潤能を抑制する。

BioCoat Matrigel Invasion Chambers (Corning 社 US)を用いて浸潤能の評価を行なった。子宮頸癌細胞株 SiHa を上記チャンパー内で ATO を添加した血清なしの培地中に播種した。チャンパー下層には ATO を添加し、さらに 10% ウシ血清も添加した培地を入れ、24 時間後に浸潤細胞を評価した。Matrigel を貼付していないコントロールチャンパー内を通過した細胞は ATO 添加群で有意に少なかった。このことから、ATO は子宮頸癌細胞の遊走能を有意に抑制することが示唆された。また、Matrigel を貼付したチャンパーでも ATO 添加群では移動細胞(浸潤細胞)数は有意に減少していた(図 7)。Matrigel を貼付したチャンパーを移動した細胞数を、コントロールチャンパーを通過した細胞で補正し、浸潤能を評価したところ、ATO 添加群で有意に細胞の浸潤能が低下していた。以上より、ATO は子宮頸癌細胞の浸潤能を抑制する可能性が示唆された。

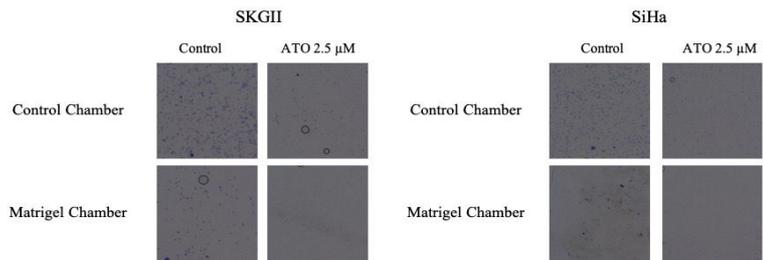


図 7. Matrigel チャンパーを用いた Invasion assay

#### 5. ATO は子宮頸癌細胞による腫瘍形成能を抑制する。

ヌードマウス (bulb/C) (雌、4 週齢 n=8) の背部に、子宮頸癌細胞株 SiHa または SKGII を  $1.0 \times 10^7$  cells を皮下注射した (PBS 100 $\mu$ M に溶解)。2 種類の細胞株のどちらも 1 週間ののちに肉眼的に腫瘍を形成しているのが確認できた。腫瘍の形成を確認したのち、ATO (5 mg/kg) を 29G 注射針を用いて 2 日毎に尾静脈投与し、マウス背部に隆起した腫瘍の大きさ (短径、長径) を測定した。また同時にマウス体重も測定を行なった。投与期間中、尾静脈投与そのものによる死亡個体は認めなかった。また投与群と対照群間で、体重の有意差は認めなかった。SKGII は腫瘍形成が早く 3 週間の投与期間でマウスを処理した。ATO 投与群では対照群と比較して、腫瘍形成が有意に抑制された。ATO 投与群では腫瘍退縮はしなかったが、腫瘍形成は大幅に抑制されていた(図 8A)。また SiHa は SKGII に比較して、腫瘍形成の速度が遅かったため、成長の有意さを確認するまでに 7 週間の投与期間を有した。投与期間中、両群間でそれぞれ 2 匹の死亡例を認めた。一方で ATO 投与そのものによる死亡を示唆する所見はなかった。SKGII 同様、SiHa においても対照群に比べて ATO 投与群では腫瘍形成は有意に抑制された(図 8B)。また処理後に各個体に形成した腫瘍を摘出し、重量を測定し、両群を比較したところ、ATO 投与群で有意に腫瘍重量が軽かった(図 9)。このことより、ATO 投与はマウス個体の生存に大きな有害事象を与えず、子宮頸癌腫瘍の形成を抑制し、ATO の

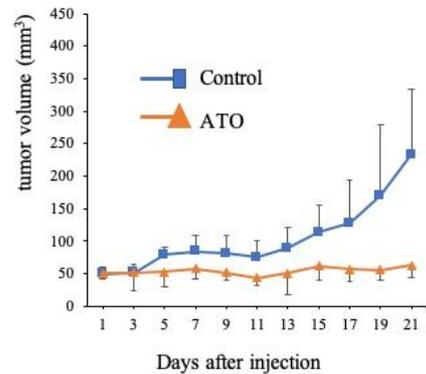


図 8 A. 腫瘍増殖 SKGII

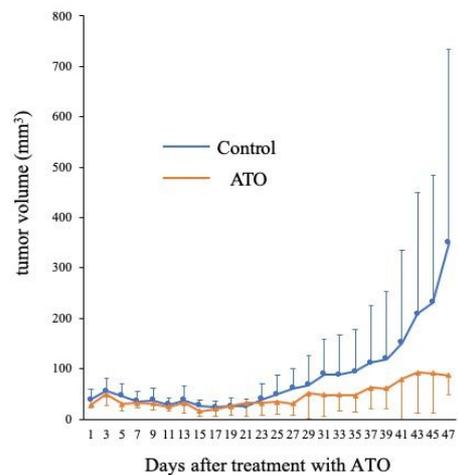


図 8B. 腫瘍増殖 SiHa

抗腫瘍作用を有することが示唆された。

6. ATO 投与によって移植腫瘍中の CBR1 発現は増加する。

上記で摘出した腫瘍を破碎し、Lysis buffer に溶解し、Western blot に供して、CBR1 発現の変化を評価した。ATO 投与群では対照群と比較して CBR1 を示すバンドの密度が有意に高かった(図 10)。このことから、ATO 投与によって移植腫瘍の CBR1 発現が増加することが示唆された。

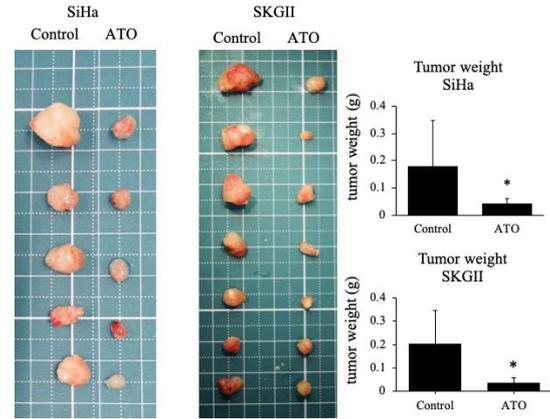


図 9. 摘出腫瘍とその重量

【結論】

ATO は子宮頸癌細胞の増殖を in vitro でも in vivo でも有意に抑制し、子宮頸癌に対する抗腫瘍効果を持つことが示唆された。さらに ATO 投与によって CBR1 の発現がタンパクレベルで増加した。これまで我々は

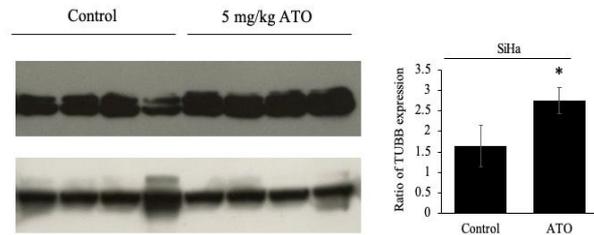


図 10. 摘出腫瘍における CBR1 発現

CBR1 の子宮頸癌に対する抗腫瘍効果を報告してきたが、ATO は CBR1 発現誘導を介して子宮頸癌に対する抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆された。一方でこれまでの研究においては ATO における CBR1 の制御機構がまだ明らかになっていない。今後の研究課題として CBR1 発現抑制株や阻害剤を用いた実験を行いこれらの機序を解明する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------