

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 30日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592138

研究課題名（和文）PTEN 遺伝子改変マウスを用いた子宮内膜癌の新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of mice model for inquiry into therapeutic targets: an anticancer effect of dienogest on endometrial neoplasm

研究代表者

坂口 勲（SAKAGUCHI ISAO）

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40448527

研究成果の概要（和文）：

子宮内膜癌の治療において、酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)は分化型類内膜腺癌に対する治療効果が認められることから、子宮温存による妊孕能維持が可能であることが示されている。さらに、MPA以外の黄体ホルモン製剤を含む新規治療薬が治療法の候補として挙げられているが、*in vivo*においてこれらの薬剤の効果を判定するシステムがないのが現状である。今回、本科学研究費にて開発した子宮内膜癌モデルマウスを用いた薬剤効果判定システムの有用性について検討を行い、MPAに代わる黄体ホルモン製剤としてジエノゲストに着目し、子宮内膜癌におけるその抗腫瘍効果を検討した。*Pten*失活子宮内膜癌モデルマウスにおいて、MPAと同等なジエノゲストの抗腫瘍効果が示された。この結果は、当施設で開発したモデルマウスの薬剤効果判定システムとしての有用性を示すものである。また、*Pten*不活化状態で発症する子宮内膜癌の新規治療薬としてジエノゲストが有用である可能性が示唆され、ヒトへの臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Hormonal therapy for type I (endometrioid) endometrial cancer is employed as a conservative treatment among young nulligravida women. However the success rate of therapy with hormonal agents is not very high, and these agents often have serious adverse effects. Thus, new agents with a higher efficacy and fewer side effects would be highly desirable. Dienogest is a synthetic progestational steroid that is used for the treatment of endometriosis, but its anticancer activity remains unknown. We investigated the anticancer effect of dienogest on endometrial neoplasm by using mice based on conditional *PTEN* deletion within the endometrium, a genetic model of endometrial cancer. Medroxyprogesterone acetate (MPA) and dienogest were administered subcutaneously for 1week to evaluate the antitumor effect against complex atypical hyperplasia (CAH) and endometrial cancer which developed in mice. Without progestins treatment, 5 of 6 mice developed endometrial neoplasms (atypical hyperplasia or adenocarcinoma). On the other hands, 7 of 8 mice treated with MPA and 5 of 6 mice treated with dienogest showed no signs of CAH or endometrial cancer. Dienogest showed potent anticancer activity, as well

as MPA, against endometrial neoplasms in mice. We conclude that dienogest may be a useful therapeutic agent for endometrial neoplasms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011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：子宮内膜癌・PTEN 遺伝子・黄体ホルモン・遺伝子改変マウス・

Cre-loxP システム

1. 研究開始当初の背景

本邦の子宮内膜癌は、欧米諸国に比較し過去においては頻度の低い癌であったが、この20年間で急激な増加傾向を示してきている。子宮内膜癌全体の増加に伴い、挙児を希望する若年者の治療機会が多くなってきている。現在、このような若年者で、筋層浸潤のない、高分化型類内膜腺癌の症例に対し、高用量黄体ホルモン（酢酸メドロキシプロゲステロン：MPA）療法の効果が示されているが、血栓症や体重増加等のMPAの副作用の点から、新たな治療薬の登場が待たれている。しかし、MPA以外には子宮内膜癌に対する妊孕能温存治療は存在しないのが現状である。子宮内膜癌の発癌においては、エストロゲンと Pten 遺伝子の関与が考えられているが、その発癌機構は十分に解明されておらず、その結果、有効な子宮内膜癌の治療効果判定システムが存在しない。そこで、われわれは子宮内膜癌モデルマウスを作成し、子宮内膜癌の発癌への Pten

遺伝子とエストロゲンの関与を検討するとともに、そのマウスを用いることで、新規治療薬の効果判定システムへと発展させることができると考えた。

2. 研究の目的

子宮内膜に発生する類内膜腺癌にはエストロゲンと癌抑制遺伝子である Pten の不活化の関与が指摘されているが、両者の関連性については明らかにされていない部分が多い。今回、この関連性を調べるために、Cre-loxP system を用いた Pten 遺伝子改変マウスを用いて検討を行なった。加えて、このマウスに抗腫瘍効果が示されている MPA を投与することにより、このマウスを用いた薬剤効果判定システムの有用性について検討を行った。さらに、MPA に代わる黄体ホルモン製剤としてジェノゲストに着目し、子宮内膜癌におけるその抗腫瘍効果を検討した。

3. 研究の方法

①子宮内膜癌発癌への Pten 遺伝子とエ

ストロゲンの関与について

Pten 遺伝子の exon 4, 5 の両端に loxP を組み込んだ Pten^{flox/flox} マウスにおいて、Cre-loxP system によって子宮内膜のみに Pten の発現を欠失させ、エストロゲン曝露の有無による形態学的変化を検討した。すなわち、10 週生日に開腹し両側卵巣を摘出した Pten^{flox/flox} マウス 8 匹において、子宮内腔に Cre 発現アデノウイルスベクター(ade-Cre)の注入を行った群(A 群)、空ベクター(AxCw)を注入した群(コントロール群: B 群)と、子宮内腔への ade-Cre の注入に加え、17 β -estradiol(E₂) 持続皮下投与 (10 μ g/kg per day) した群(C 群)を作成し、2 週間後に子宮を摘出し 3 群間で組織学的検討を行った。

②モデルマウスの薬剤効果判定システムの有用性について

先述したマウスにおいて、2 週間の腫瘍形成期間に続き、MPA 持続皮下投与 (12mg/kg per day) を行う群(A 群: n=8)、ジエノゲスト持続皮下投与 (0.7mg/kg per day) を行う群(B 群: n=6)、そして非投与群(n=6)を設定し、1 週間後に子宮を摘出し 3 群における子宮内膜を組織学的に比較検討した。

4. 研究成果

①子宮内膜癌発癌への Pten 遺伝子とエストロゲンの関与について

子宮の平均重量は A 群で 15.3 \pm 0.8mg、B 群で 15.7 \pm 0.8mg、C 群で 95.3 \pm 1.5mg であった。組織学的検討では、A 群の 8 匹中 7 匹(87.5%)において、萎縮した子宮内膜を背景にヒトでみられる子宮内膜異型増殖症から高分化型類内膜腺癌

に一致する所見が観察された。一方、B、C 群に腫瘍の形成は認められず、B 群では萎縮した子宮内膜が、C 群では異型のない腺管の増生のみがみられ、A 群に有意に腫瘍形成が認められた($P < 0.001$)。去勢し E₂ の非存在下のマウスにおいて、Pten 遺伝子の不活化のみで腫瘍形成が確認されたことより、Pten 不活化後の癌化の過程において E₂ の関連は低い可能性が示唆された。本マウスではエストロゲンの減衰に伴い高率にヒトの高分化型類内膜腺癌に類似した癌種の形成が認められ、ヒト子宮内膜癌を模倣するモデルマウスと考えられた。

②モデルマウスの薬剤効果判定システムの有用性について

子宮の平均重量は A 群が 14.9 \pm 2.1mg、B 群が 15.9 \pm 2.4mg、そして非投与群が 15.6 \pm 1.5mg であり、3 群間に有意な差はみられなかった。組織学的検討において、非投与群では異型のない小型の腺管と密な内膜間質を有する子宮内膜を背景として、5 匹にヒト複雑型子宮内膜異型増殖症に一致する腺管の増生が認められ、一部に筋層浸潤や脈管侵襲を伴わないヒト高分化型類内膜腺癌に一致する所見が確認された。一方、黄体ホルモンを投与した A 群と B 群では、いずれの内膜においても腺上皮細胞の空胞化と間質の浮腫状変化がみられ、各群 1 匹ずつに非投与群に比較し限局した範囲で癌種の遺残が観察された。この結果から、われわれが作成した Pten 失活子宮内膜癌モデルマウスにおいて、MPA の抗腫瘍効果が示され、本モデルマウスの薬剤効果判定システムとしての有用性が示唆された。さらに、ジエノゲストにおいて

も MPA と同等な抗腫瘍効果が示された。この結果は、*Pten* 不活化状態で発症する子宮内膜癌の新規治療薬としてジエノゲストが有用である可能性を示唆するものであり、ヒトへの臨床応用が期待される。

③肥満 (obob) マウスとの交配による子宮内膜癌への肥満の関与について

肥満マウスである obob ヘテロマウス (ホモ:不妊) と *Pten* ヘテロマウス (ホモ:致死) との交配を行っているが、不妊傾向がみられ、目的とする obob/*Pten* ヘテロマウスが得られなかった。本年になり、漸く2匹のマウスが得られ、子宮内膜の初期の癌種形成が確認されている。今後、obob/*Pten* ヘテロのマウス数を増やし解析を行うことで、肥満と子宮内膜癌の発癌機構との関連を引き続き検討していく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Fumitaka Saito, Hironori Tashiro, Hideyuki Ohtake, Takashi Ohba, Akira Suzuki, and Hidetaka Katabuchi. Mutual contribution of *Pten* and estrogen to endometrial carcinogenesis in a *Pten*^{loxP/loxP} mouse model. International Journal of Gynecol Cancer. 21: 1343-1349, 2011. 査読 有
2. 齋藤文誉, 田代浩徳, 松尾勇児, 坂口 勲, 宮原 陽, 本田律生, 片渕秀隆. 若年発症子宮内位膜癌の病態におけるプロラクチンの臨床的意義. 日本婦人科腫瘍学会雑誌 29:

697-703, 2011. 査読 有

3. Nagase S, Katabuchi H, Hiura M, Sakuragi N, Aoki Y, Kigawa J, Saito T, Hachisuga T, Ito K, Uno T, Katsumata S, Susumu N, Emoto M, Kobayashi H, Metoki H, Konishi I, Ochiai K, Mikami M, Sugiyama T, Mukai M, Sagae S, Hoshiai H, Aoki D, Ohmiri M, Yoshikawa H, Iwasaka T, Udagawa Y, Yaegashi N. Evidenced-based guideline for treatment of uterine body neoplasm in Japan: Japan Society of Gynecologic Oncology. International Journal of Clinical Oncology 15: 531-542, 2010. 査読 有
4. Suh DH, Kim JW, Aziz MF, Devi UK, Ngan HY, Nam JH, Kim SC, Kato T, Ryu HS, Fujii S, Lee YS, Kim JH, Kim YT, Wang KL, Lee TS, Ushijima K, Shin SG, Chia YN, Wilailak S, Park SY, Katabuchi H, Kamura T, Kang SB. Asian society of gynecologic oncology workshop 2010. Journal of Gynecologic Oncology 21: 137-150, 2010. 査読 有
5. 片渕秀隆, 坂口 勲, 田代浩徳. 子宮肉腫の妊孕能温存治療. 産婦人科の実際 58: 365-373, 2009. 査読 無

[学会発表] (計 9 件)

1. Fumitaka Saito, Hironori Tashiro, Yo Miyahara, Takashi Ohba, and Hidetaka Katabuchi. Development of mice model for inquiry into therapeutic targets: an anticancer effect of dienogest on endometrial neoplasm

- 13th IGCS Biennial Meeting (October 23-26, 2010: Czech Republic)
2. Fumitaka Saito, Hironori Tashiro, Hideyuki Ohtake, Takashi Ohba, and Hidetaka Katabuchi
A mutual contribution of estrogen and *PTEN* mutations to endometrial carcinogenesis
100th AACR Annual Meeting (April 18-22, 2009, USA)
3. 齋藤文誉, 田代浩徳, 大竹秀幸, 大場 隆, 片渕秀隆
子宮内膜癌の治療薬としてのジェノゲストの有用性: *Pten* 遺伝子改変子宮内膜癌モデルマウスによる検討
第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会 (平成 22 年 4 月 15 日、東京都)
4. 齋藤文誉, 田代浩徳, 大竹秀幸, 大場 隆, 片渕秀隆
PTEN 遺伝子改変モデルマウスを用いた子宮内膜癌に対する治療薬物効果判定システムの開発
第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会 (平成 21 年 4 月 2~5 日、京都市)
5. 齋藤文誉, 田代浩徳, 大竹秀幸, 大場 隆, 片渕秀隆
高プロラクチン血症が若年発症の子宮内膜癌におよぼす影響
第 46 回日本婦人科腫瘍学会 (平成 21 年 7 月 10~12 日、新潟市)

[図書] (計 1 件)

1. 片渕秀隆, 本原研一, 田代浩徳
画像診断、病理診断
日本臨床 67: 79-86, 2009
6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂口 勲 (SAKAGUTI ISAO)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40448527
(H22~H23)

角田 みか (TSUNODA MIKA)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 30433006
(H21)

(2) 研究分担者

片渕 秀隆 (KATABUCHI HIDETAKA)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 90224451

田代 浩徳 (TASHIRO HIRONORI)
熊本大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 70304996

齋藤 文誉 (SAITO FUMITAKA)
熊本大学・医学部附属病院・診療助手
研究者番号: 20555742