

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 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22390310
 研究課題名（和文） 子宮内膜癌に対する分子標的療法—新たに同定したサイクリン A 阻害剤の基礎的検討
 研究課題名（英文） The molecular targeted therapy for endometrial cancer; the basic analysis of novel cyclinA inhibitor
 研究代表者
 塩沢 丹里（SHIOZAWA TANRI）
 信州大学・医学部・教授
 研究者番号：20235493

研究成果の概要（和文）：

約 1 万種の低分子化合物ライブラリーからスクリーニングし、サイクリン A 発現阻害活性を有する 5 種の化合物（化合物 A～E）を見出した。各種培養癌細胞株において、これらのうち特に化合物 C が最も強い細胞増殖抑制効果、抗癌剤との相乗効果を示した。さらにこの化合物 C はマウスへの腹腔内投与により、皮下移植腫瘍の増大を著明に抑制した。この結果はこの化合物 C が子宮内膜癌に対する有望なリード化合物であることを示すものである。

研究成果の概要（英文）：

We found 5 kinds of compound (the compound A ~ E), which had inhibitory activity of cyclinA expression, from a compound's library including approximately 10,000 kinds of small molecular compound. Of these 5 compounds, the compound C most strongly inhibited the growth of several cancer cells and indicated synergistic effects to cisplatin and paclitaxel. This compound C inhibited the growth of xenograft of HEC1B cell in nude mice. These results suggested that this is a promising compound for novel cyclin A targeted anti-cancer therapy of endometrial carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：婦人科腫瘍学

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、サイクリン、抗癌剤感受性、分子標的、MAPK

1. 研究開始当初の背景

近年わが国において子宮内膜癌の患者は著明に増加しており、例えば最近 20 年で患者数は約 5 倍となっている。癌が子宮に局限している早期癌の場合には手術で良好な治療成績が期待できるが、内膜癌患者数自体の急増により、手術不能な進行癌患者が増加し

ている。このような場合には手術と化学療法および放射線療法が施行されているが予後は不良である。このため、進行癌や再発癌に対する新たな治療戦略としての分子標的療法の開発が強く待たれている。

内膜癌に対する分子標的療法を開発するためには、子宮内膜癌の増殖機序を理解する

ことが必要である。我々は子宮内膜癌の増殖機序を解明するために、正常内膜および内膜癌におけるサイクリンをはじめとした各種の細胞周期調節因子の発現を調べたところ、これらの因子が内膜癌では過剰発現されており、特にサイクリン A の発現は独立した予後不良因子であることを見出した (Cancer 1996; 77: 321, Cancer 1996; 78: 1248, Cancer 1997; 80: 2250, Hum Pathol 2003; 34: 471)。加えて、抗癌剤を使用した後に再発や転移を呈した症例はサイクリン A が強陽性であることを明らかにした。

これらの結果から、我々は、サイクリン A は本来の機能として細胞増殖を刺激するのみならず、抗癌剤感受性などにも影響を及ぼしているのではないかと考え、これを検証した。まず子宮内膜癌細胞 HHUA にサイクリン A 発現ベクターを導入してサイクリン A 強発現 HHUA 株を樹立し、この細胞の増殖能、抗癌剤に対する感受性を検討したところ、サイクリン A 導入細胞は増殖能が亢進し、内膜癌治療の Key drug であるシスプラチン (CDDP) とアドリアマイシンに対する感受性が低下していた。加えてこの作用を *in vivo* にて検討するために、サイクリン A 導入 HHUA 細胞とコントロール細胞をヌードマウスに皮下注した。皮下注 30 日目のサイクリン A 導入 HHUA 細胞の腫瘍体積はコントロールの 1.3 倍で、有意に造腫瘍能の亢進が観察された。さらに CDDP (4mg/kg/wk1、腹腔注) 3 回投与後の腫瘍体積増加率はサイクリン A 導入細胞ではコントロール細胞と比較して 1.6 倍となっており、マウスモデルにおいてもサイクリン A 導入により CDDP 感受性が低下した。次にこのサイクリン A による CDDP 耐性獲得の分子機序について CDDP によるアポトーシスを検討したところ、サイクリン A 導入 HHUA 細胞ではコントロール細胞と比較して CDDP によるアポトーシスが低下していること、またこれはサイクリン A 導入による PI3 kinase-Akt 経路の活性化とそれに伴うアポトーシス促進因子 Bad の不活化によることを明らかにした。我々はこのサイクリン A 導入による Akt 活性化の分子機序を明らかにするために、サイクリン A 導入によって変化する遺伝子群を Microarray 解析した結果、periplakin に注目した。Periplakin は細胞内では Akt のシグナルの安定化に関与するといわれている (J Cell Sci 2002; 115: 3957)。我々は Akt 蛋白が periplakin と結合しており、siRNA を用いて periplakin の発現を抑制すると、Akt 活性が低下することを明らかにした。さらにこれが、サイクリン A によって活性化された転写因子 SP1 が periplakin の転写を促進していることを証明した (J Cell Mol Med. 2009 Jul 6)。これらの結果はサイクリン A 抑制が内膜

癌に対する新規の分子標的治療となりうる可能性を示す。我々はまずサイクリン A の発現機序を検討するために、近年内因性の転写調節因子として重要視されている microRNA に注目した。サイクリン A mRNA の 3' 端領域の塩基配列の相同性のコンピュータ解析により microRNA である miR219 を選定し、miR219 を HHUA 細胞に導入したところ、サイクリン A mRNA の発現低下が認められ、microRNA のサイクリン A 発現抑制法としての可能性が示唆された。さらに我々は新規サイクリン A 抑制剤の開発を試みた。サイクリン A プロモーターを reporter plasmid への組み込み (pGL4/CCA2/Neo) これを cyclin A 高発現内膜癌 Ishikawa 細胞へ導入し、安定発現細胞株 (ILCA 細胞) 樹立した。この細胞を用いて約 1 万種の低分子化合物薬剤ライブラリーをスクリーニングした結果、サイクリン A 発現阻害活性を有する 5 種の化合物 (化合物 A~E) を新規に同定した。これらの化合物は子宮内膜癌に対する全く新しい分子標的薬として非常に大きな可能性を有することが判明した。

2. 研究の目的

① **新規に同定した化合物の機能解析と臨床応用に向けた検討**: 我々はこれまでに 1 万種の化合物ライブラリーをスクリーニングすることにより、サイクリン A 抑制機能を有する 5 種類の低分子化合物の同定に成功しているが、最終的に、これらの化合物が臨床応用可能であるか、さらに検討する必要がある。そのために、培養細胞を用いて、これら 5 種の化合物の抗腫瘍能と抗癌剤感受性に対する作用を検討し、最も有効な化合物を選出する。

② **臨床応用に向けた検討、マウスでの化合物の効果**: 選出された化合物が実際に生体内でも有効であるかどうかを確認するため、その抗腫瘍効果をヌードマウスを用いて検討する。また化合物投与経路についてや、毒性についても包括的に検討し、子宮内膜癌治療薬としての臨床応用の可能性を検討する。

3. 研究の方法

① **培養細胞における化合物 A~E の抗増殖効果**: 内膜癌細胞株 5 種 (Ishikawa, HHUA, HEC1A, HEC1B, KLE)、卵巣癌細胞株 5 種 (A2780, OVCAR3, SKOV3, ES2, RMG1)、子宮頸癌細胞株 1 種 (CaSki)、乳癌細胞株 2 種 (MCF7, T47D) に各化合物を 10^{-7} M の低濃度で添加し、72 時間後の細胞生存を WST-1 assay で検討した。

② **培養細胞における化合物 A~E の各種抗癌剤との併用効果**: ①と同じ細胞株に各化合物

を $10^{-7}M$ の低濃度で添加、さらに cisplatin (CDDP) $10^{-6}M$, paclitaxel (PTX) $10^{-7}M$, HDAC 阻害剤 SAHA $10^{-7}M$ の低濃度で添加し、72 時間後の細胞生存を WST-1 assay で検討した。

③マウス皮下移植腫瘍に対する抗腫瘍効果および毒性の評価：①②で最も有効であった化合物 C を用いた。マウス皮下に子宮内膜癌細胞株 HEC1B、1,000,000 細胞を皮下に移植し、径 5mm となったところから化合物 C の weekly 腹腔内投与を開始し、腫瘍増大を観察した。なお、投与経路に関しては、腹注以外に尾静脈からの静脈注射、経口投与なども検討した。毒性に関しては、体重変化や等から検討を行った。

4. 研究成果

①培養細胞における化合物 A~E の抗増殖効果：5 種の化合物のうち、化合物 C は $10^{-7}M$ と低濃度にもかかわらず、細胞株の増殖を最大 89%抑制した (ES2)。特に HEC1B, KLE, A2780, ES2 に対する効果が強かった。化合物 E も HEC1B に対しては化合物 C と同等の効果を示した。

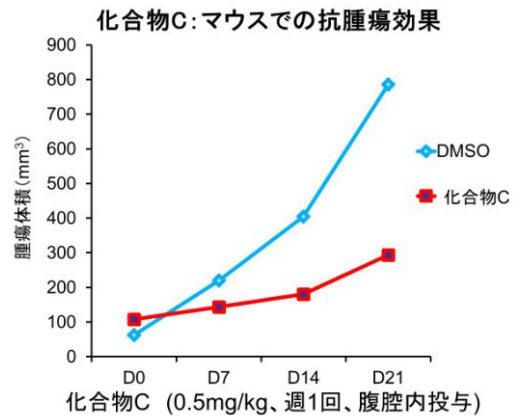
②培養細胞における化合物 A~E の各種抗癌剤との併用効果：5 種の化合物のうち、化合物 C が最も強い併用効果を示した。化合物 C と CDDP 併用では HEC1B, KLE, A2780, OVCAR3, ES2 で 50%以上の増殖抑制効果を示した。また化合物 C と PTX との併用では、HEC1B, KLE, OVCAR3, ES2, RMG1 で 50%以上の増殖抑制効果を示した。化合物 C と SAHA との併用でも、HEC1B, KLE, ES2 で 50%以上の増殖抑制効果を示した。他の化合物では 50%以上の増殖抑制効果は 1~2 種までの細胞種でしか確認できなかった。

以上の結果から、特に化合物 C に注目して以後の検討を行った。

③マウス皮下移植腫瘍に対する抗腫瘍効果および毒性の評価：まず、マウスへの化合物 C 投与における 50%致死量 (LD50) は 37.2mg/kg/wk であった。化合物 C 0.5mg/kg/wk、毎週腹腔内投与では control に比較して D-21 での腫瘍体積は 38%であり、著明な腫瘍増大抑制効果を示した。

また投与経路の検討では、尾静脈からの静脈内注入も検討中であるが、現在までのところ腹腔内投与が最も安定した結果を得られている。

以上より、化合物 C は単独でも腫瘍増大抑制効果を示し、他の抗癌剤との併用効果も期待される。



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 13 件)

1. Mitsuhashi Y, Horiuchi A, Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Shiozawa T. Prognostic significance of Notch signalling molecules and their involvement in the invasiveness of endometrial carcinoma cells. *Histopathology*. 2012; 60: 826-37. (査読あり) doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04158.x.
2. Fuseya C, Horiuchi A, Hayashi A, Suzuki A, Miyamoto T, Hayashi T, Shiozawa T. Involvement of pelvic inflammation-related mismatch repair abnormalities and microsatellite instability in the malignant transformation of ovarian endometriosis. *Hum Pathol*. 2012; 43: 1964-72. (査読あり) doi: 10.1016/j.humpath.2012.02.005.
3. 高津亜希子, 塩沢丹里 LEGH (lobular endocervical glandular hyperplasia)

- は悪性腺腫の前駆病変か? 産婦人科
の実際 61 巻, 1539-1543 頁, 2012 年(査
読なし)
4. 塩沢丹里 子宮体癌の増殖制御と性ス
テロイドホルモン (特集 子宮体癌の生
物学的特性から診断・治療まで) 産科
と婦人科 79 巻, 209-217 頁, 2012 年(査
読なし)
 5. Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A,
Kikuchi N, Konishi I, Seki N, Shiozawa
T. Laser-captured
microdissection-microarray analysis
of the genes involved in endometrial
carcinogenesis: stepwise
up-regulation of lipocalin2
expression in normal and neoplastic
endometria and its functional
relevance. Hum Pathol. 2011; 42:
1265-74. (査読あり) doi:
10.1016/j.humpath.2010.07.027.
 6. Takatsu A, Shiozawa T, Miyamoto T,
Kurosawa K, Kashima H, Yamada T, Kaku
T, Mikami Y, Kiyokawa T, Tsuda H, Ishii
K, Togashi K, Koyama T, Fujinaga Y,
Kadoya M, Hashi A, Susumu N, Konishi
I. Preoperative differential
diagnosis of minimal deviation
adenocarcinoma and lobular
endocervical glandular hyperplasia of
the uterine cervix: a multicenter
study of clinicopathology and
magnetic resonance imaging findings.
Int J Gynecol Cancer. 2011; 21:
1287-96. (査読あり) doi:
10.1097/IGC.0b013e31821f746c.
 7. Miyamoto T, Asaka R, Suzuki A, Takatsu
A, Kashima H, Shiozawa T.
Immunohistochemical detection of a
specific receptor for lipocalin2
(solute carrier family 22 member 17,
SLC22A17) and its prognostic
significance in endometrial carcinoma.
Exp Mol Pathol. 2011; 91: 563-8.
(査読あり) doi:
10.1016/j.yexmp.2011.06.002.
 8. Miyamoto T, Ishii K, Asaka R, Suzuki
A, Takatsu A, Kashima H, Shiozawa T.
Immunohistochemical expression of
keratan sulfate: a possible
diagnostic marker for carcinomas of
the female genital tract. J Clin
Pathol. 2011; 64: 1058-63. (査読あり)
doi: 10.1136/jclinpath-2011-200231.
 9. 高津亜希子, 塩沢丹里 Peutz-Jeghers
症候群と子宮頸部腫瘍 (特集 婦人科に
おける遺伝性腫瘍の取扱いの実際)
(ア)産科と婦人科 78 巻, 1096-1100
頁, 2011 年 (査読なし)
 10. Suzuki A, Horiuchi A, Oka K, Miyamoto
T, Kashima H, Shiozawa T.
Immunohistochemical detection of
steroid receptor cofactors in ovarian
endometriosis: involvement of
down-regulated SRC-1 expression in
the limited growth activity of the
endometriotic epithelium. Virchows
Arch. 2010; 456: 433-41. (査読あり)
doi: 10.1007/s00428-010-0884-x.
 11. Fakhry H, Miyamoto T, Kashima H,
Suzuki A, Ke H, Konishi I, Shiozawa T.
Immunohistochemical detection of
histone deacetylases in endometrial
carcinoma: involvement of histone
deacetylase 2 in the proliferation of
endometrial carcinoma cells. Hum
Pathol. 2010; 41: 848-58. (査読あり)
doi: 10.1016/j.humpath.2009.11.012.
 12. Hayashi A, Horiuchi A, Kikuchi N,
Hayashi T, Fuseya C, Suzuki A, Konishi
I, Shiozawa T. Type-specific roles of
histone deacetylase (HDAC)
overexpression in ovarian carcinoma:
HDAC1 enhances cell proliferation and
HDAC3 stimulates cell migration with
downregulation of E-cadherin. Int J
Cancer. 2010; 127: 1332-46. (査読あ
り) doi: 10.1002/ijc.25151.
 13. Suzuki A, Horiuchi A, Ashida T,
Miyamoto T, Kashima H, Nikaido T,
Konishi I, Shiozawa T. Cyclin A2
confers cisplatin resistance to
endometrial carcinoma cells via
up-regulation of an Akt-binding
protein, periplakin. J Cell Mol Med.
2010; 14: 2305-17. (査読あり) doi:
10.1111/j.1582-4934.2009.00839.x.
- [学会発表] (計 26 件)
1. 塩沢丹里: 子宮頸部と嚢胞性病変の取り扱
い、子宮内膜癌の発生とエストロゲン. 平
成 24 年度山口県産婦人科医会研修会
2012 年 11 月 11 日 特別講演 山口
 2. Asaka R, Miyamoto T, Suzuki A, Ishikawa
K, Yamada Y, Kobara H, Shiozawa T:
Sirtuin1 (SIRT1), a longevity gene, is
over-expressed in endometrial carcinoma.
14th International Gynecologic Cancer
Society (IGCS) 2012 年 10 月 13 日~10
月 16 日 Oral Vancouver Canada
 3. Yamada Y, Miyamoto T, Asaka R, Ishikawa
K, Kobara H, Suzuki A, Shiozawa T: The
expression of lipocalin2 in ovarian
carcinoma and endometriosis. 14th
International Gynecologic Cancer

- Society(IGCS) 2012年10月13日～10月16日 Poster Vancouver Canada
4. Shiozawa T : Preoperative Differential Diagnosis of Minimal Deviation Adenocarcinoma (MDA) and Lobular Endocervical Glandular Hyperplasia (LEGH) of the Uterine Cervix by Clininopathology and Magnetic Resonance Imaging (MRI) Findings. Asian Society of Gynecologic Oncology 2nd International Workshop in Gynecologic Oncology (ASGO) 2012年9月28日 招待講演 京都
 5. 浅香亮一、宮本 強、石川香織、山田 靖、小原久典、鈴木昭久、塩沢丹里 : 正常内膜および子宮内膜癌における Sirtuin1(SIRT1)の発現と機能の検討. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日～9月21日 ポスター 札幌
 6. 石川香織、宮本 強、鈴木昭久、山田 靖、浅香亮一、塩沢丹里 : 子宮内膜癌におけるポリコム遺伝子 mRNA 発現と臨床病理学的意義の検討. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日～9月21日 ポスター 札幌
 7. 鈴木昭久、宮本 強、小原久典、山田 靖、石川香織、浅香亮一、塩沢丹里 : 卵巣明細胞腺癌におけるレトロウイルス cDNA ライブラリーを用いた機能的スクリーニングの試み. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日～9月21日 ポスター 札幌
 8. 浅香亮一、宮本 強、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里 : 正常子宮内膜および子宮内膜癌における sirtuin1 発現の検討. 第64回日本産科婦人科学会学術講演会 2012年4月13日～4月15日 一般講演 神戸
 9. 塩沢丹里 : 子宮内膜癌の発生とエストロゲン. 岩手産科婦人科学会集談会 2012年1月21日 岩手
 10. Asaka R, Miyamoto T, Suzuki A, Takatsu A, Kashima H, Nakayama J, Shiozawa T : Immunohistochemical expression of Core2 β 1-6 N-acetylglucosaminyl transferase 1 in the endometrial carcinoma;a novel potential prognostic factor. Asian Society of Gynecologic Oncology 2011年11月3日～11月5日 Poster korea
 11. Takatsu A, Imanishi T, Tunoda H, Tanino S, Asaka R, Kashima H, Miyamoto T, Shiozawa T : Pre-operative diagnosis and the management of minimal deviation adenocarcinoma and lobular endocervical glandular hyperplasia of the uterine cervix:a multi-center, retrospective study. Asian Society of Gynecologic Oncology 2011年11月3日～11月5日 Poster korea
 12. Miyamoto T, Asaka R, Imanishi T, Kashima H, Shiozawa T : Lasr captured microdissection-microarray analysis of the genes innolved in endometrial carcinogenesis:stepwise up-regulation of lipocalin2 expression in normal and neoplastic endometria, and its functional relevance. Asian Society of Gynecologic Oncology 2011年11月3日～11月5日 Oral korea
 13. 浅香亮一、宮本 強、鈴木昭久、高津亜希子、鹿島大靖、中山 淳、塩沢丹里 : 子宮内膜癌の新規予後因子としての糖転移酵素 C2GnT1 発現. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月3日～10月5日 ポスター 名古屋
 14. 鈴木昭久、宮本 強、鹿島大靖、塩沢丹里 : 薬剤ライブラリーを用いたサイクリン A を標的とする新規抗腫瘍薬同定の試み. 第63回日本産科婦人科学会・総会・学術講演会 2011年8月29日～8月31日 ポスター 大阪
 15. 塩沢丹里 : 子宮体癌の発生とエストロゲン. 第7回子宮体癌治療に関するシンポジウム 2011年6月25日 要望講演 東京
 16. 塩沢丹里 : 子宮内膜癌の発生とエストロゲン. 福井県産婦人科医会第71回冬期臨床研究会 2011年2月20日 特別講演 福井
 17. 宮本 強、石井恵子、小原久典、浅香亮一、高津亜希子、鈴木昭久、鹿島大靖、中山 淳、塩沢丹里 : 子宮内膜腺上皮におけるケラタン硫酸および C2GnT1 発現とその診断への応用. 第49回日本臨床細胞学会秋期大会 2010年11月21日～11月22日 ワークショップ 神戸
 18. Fuseya C, Horiuchi A, Kikuchi N, Suzuki A, Takatsu A, Osada R, Shiozawa T : Involvement of mismatch repair (MMR) abnormality in the malignant transformation of ovarian endometriosis . International Gynecologic Cancer Society(IGCS 2010) 2010年10月23日～10月26日 poster Praha Česká republika
 19. Takatsu A, Fuseya C, Miyamoto T, Horiuchi A, Shiozawa T : Pre-operative diagnosis and the management of minimal deviation adenocarcinoma (MDA) and lobular endocervical glandular hyperplasia (LEGH) :a multi-center, retrospective study . International Gynecologic Cancer Society(IGCS 2010) 2010年10月23日～10月26日 poster Praha Česká

republika

20. Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Kikuchi N, Takatsu A, Konishi I, Seki N, Shiozawa T: Microarray analysis of the genes involved in endometrial carcinogenesis: up-regulation of lipocalin2 in neoplastic endometria, and its functional relevance. International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2010) 2010年10月23日～10月26日 Oral presentation Praha Česká republika
21. 三橋祐布子、堀内晶子、宮本 強、鈴木昭久、塩沢丹里: 子宮内膜癌発生における Notch シグナリングの関与の検討. 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月22日～9月24日 一般講演 大阪
22. 塩沢丹里: 子宮体癌の発生とエストロゲン. 第24回日本臨床細胞学会関東連合学術集会 2010年9月18日 教育講演 軽井沢
23. 布施谷千穂、堀内晶子、林 晶子、高津亜希子、鈴木昭久、塩沢丹里: 卵巣子宮内膜症の癌化におけるミスマッチ修復機構異常の関与. 第9回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 2010年9月10日 一般講演 大阪
24. 塩沢丹里: エストロゲンと子宮内膜癌 update. 第122回近畿産婦人科学会オープンングレクチャー 2010年6月19日 オープニングレクチャー 京都
25. 浅香亮一、鈴木昭久、塩沢丹里: 内膜癌におけるサイクリン AmRNA の3'非翻訳領域を介した調節. 第62回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2010年4月23日～4月25日 ポスター 東京
26. 三橋祐布子、堀内晶子、鈴木昭久、塩沢丹里: 子宮内膜癌における Notch シグナル関連タンパク発現の検討. 第62回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2010年4月23日～4月25日 ポスター 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA TANRI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号: 20235493

(2) 研究分担者

堀内 晶子 (HORIUCHI AKIKO)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号: 80334895

鈴木 昭久 (SUZUKI AKIHISA)

信州大学・医学部・助教

研究者番号: 10547095

高津 亜希子 (TAKATSU AKIKO)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 90447730

(3) 連携研究者 なし