

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 5 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010-2012

課題番号：22591849

研究課題名（和文）肥満が子宮体癌の発症・進展に関与する新たな分子機構の解明

研究課題名（英文）Investigation for the molecular mechanism of the association between obesity and endometrial cancer

研究代表者

八幡 哲郎 (YAHATA TETSURO)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90293232

研究成果の概要（和文）：子宮体癌患者の血清 adipocytokine 値を測定することにより子宮体癌患者においては leptin が上昇し adiponectin が低下していることがわかり、leptin および leptin/adiponectin 比は子宮体癌発症の危険因子となっていた。子宮体癌細胞においては leptin の下流遺伝子である CyclinD1 の発現が上昇しており、その上昇は JAK/STAT pathway を介していることがわかった。さらに estrogen は leptin の細胞増殖を相加的に促進し estrogen と leptin の相互作用が示された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated the presence of elevated leptin and leptin/adiponectin (L/A) ratios in Japanese postmenopausal endometrial cancer patients. The leptin and L/A ratios were associated with an increased risk of endometrial cancer development after the normalization of the BMI, suggesting that the leptin and L/A ratio is a predictor of endometrial cancer risk, independent of obesity. Elevated Cyclin D1 expression was observed after leptin treatment for endometrial cancer cells and JAK/STAT pathway was mainly associated for the expression of CyclinD1. Estrogen and leptin stimulated endometrial cancer cell proliferation in a coordinated manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
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：子宮体癌, Leptin, 肥満

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は欧米において最も頻度の高い婦人科悪性腫瘍である。本邦では子宮体癌は増加傾向を示し、今後欧米と同様に婦人科癌の

なかで最も頻度が高くなると予想されている。子宮体癌発症の危険因子として、肥満、糖尿病、エストロゲンの分泌異常などがあげられるが、なかでも肥満との関連性は疫学的調査

からも明らかとなっている。最近発表された 1,222,630 名の女性を対象としたイギリスでの大規模疫学的調査では、調査を行った 17 の悪性腫瘍のうち、10 の悪性腫瘍で肥満との関連性が認められ、肥満で発症が増加する悪性腫瘍は、子宮体癌、食道癌（腺癌）、大腸直腸癌（閉経前女性）、腎細胞癌、白血病、乳癌（閉経後女性）、多発骨髄腫、膵臓癌、非ホジキンリンパ腫、卵巣癌であった。この中でも、子宮体癌は肥満者における相対危険率が 2.89 と、肥満との関連性が最も高い癌であることが示された。先進国において肥満の頻度は増加しており、男性の 24%、女性の 27% が肥満であるといわれ、心筋梗塞や脳梗塞のような致死性疾患との関連性から社会的問題となっている。日本では、肥満（BMI:30 以上）の頻度はまだ 3% と欧米諸国と比較すると低いものの、その頻度は上昇しつつあり、今後肥満と関連する悪性腫瘍の発症の頻度は増加する予想されている。肥満の増加に伴い子宮体癌の発生頻度も増加することが予想され、子宮体癌の発症・進展に関与する分子機構の解明は、発症予防や新規治療法の開発の観点から今後ますます重要性を増すものと思われる。肥満が悪性腫瘍とどうかかわっているかに関するこれまでの研究では、insulin と insulin-like growth factor を介した系、sex steroid を介した系が関与していると報告されている。最近になり、脂肪細胞から分泌されるポリペプチドホルモンである adipokine を介した系が肥満と悪性腫瘍を link する分子機構のひとつとして認識され始め、乳癌や大腸癌においてその分子機構の研究が進められている。肥満と子宮体癌に関する研究では、Insulin や estrogen に関する研究が進められてきた。脂肪組織における estrogen 合成酵素 (aromatase) による estrogen の産生は肥満と子宮体癌発症に関する主要なリスク因子であると考えられ、insulin は aromatase の発現を誘導するなど相互に関連する可能性が示されている。最近になり子宮体癌患者における adipokine 値の異常に関する報告がみられるようになってきているが、いまだ報告数は少なくその分子機構についての研究はまだほとんど進んでいない。肥満が子宮体癌発症・進展に関与する分子機構には、あるひとつの系のみが関与していることは考えにくく、複数の系が存在しそれぞれの相互作用を介している可能性が高く、新たな分子機構の解明や、既知の系との cross talk や相互作用の検討は病態解明のための重要性が非常に高いと思われる。これまでに 50 種類を超える adipokine が存在することが知られている。その中でも leptin と adiponectin は最も良く研究されている adipokine である。我々がこれまで行ってきた検討により、子宮体癌患者において

は血中の leptin 値の上昇および adiponectin 値の低下が認められた。特に leptin 値の上昇は正常群と比較すると 3 倍以上の高値を示していた。leptin は乳癌や食道癌細胞において細胞増殖作用や抗 apoptosis 作用を有することが報告されている。また最近、脳内において leptin と estrogen の STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) を介した cross talk が存在することが示された。また leptin が aromatase 遺伝子の発現を上昇させることも報告されており、estrogen との相互作用も指摘されている。そこで、本研究では leptin に注目し、子宮体癌発症・進展との関連性について、その分子生物学的な作用機序の解明および estrogen との cross talk や相互作用に関して検討し、肥満が子宮体癌の発症・進展に関与する新たな分子機構を明らかにすることを目的とし計画した。

2. 研究の目的

子宮体癌は肥満との関連性が最も高い悪性腫瘍であることが疫学的に示されているが、子宮体癌と肥満の関連性の詳細な分子機構については明らかになっていない部分が多い。子宮体癌の発症・進展には各種の遺伝子異常に加えて insulin (IGF-1) や estrogen といった non genetic な因子 (環境因子) の関与が示されているが、これらに加えて肥満に関連した modifier が存在する可能性が示唆されている。脂肪細胞から分泌される adipokine は肥満者において異常分泌を呈し、悪性腫瘍との関連性が報告されている。本研究は、adipokine のひとつである leptin に注目し、子宮体癌との関連性について estrogen との相互作用も含めて検討し、肥満が子宮体癌の発症・進展に関与する新たな分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) leptin は子宮体癌発症の独立した危険因子か？ 予後との関連性はあるのか？
治療前の子宮体癌患者より血液を採取し、血中 leptin、adipokine (adiponectin, TNF-alpha, HGF, IL-6)、estradiol 値、IGF-1 (insulin-like growth factor) を測定。leptin が子宮体癌発症の独立した危険因子になっているか？ 他の因子との相関関係はあるか？ 等の検討を行う。また、leptin や leptin 受容体の発現が子宮体癌の分化度や進行期、および予後との関連性があるかについて解析する。
- (2) 子宮体癌細胞や組織において leptin signaling は活性化されているのか？
 - ① 子宮体癌組織における leptin 受容体の発現に関する検討
 - 子宮体癌組織における leptin 受容体の発現

を定量的 RT-PCR および免疫染色にて解析する。

② STAT3 および活性化 STAT3 の発現解析 leptin の主要な signal 伝達物質である STAT3 の発現状態に関して、正常子宮内膜組織を control として体癌組織より抽出した RNA から定量的 RT-PCR により解析する。また、活性化 STAT3 の解析にはリン酸化 STAT3 抗体を使用し、体癌組織の免疫組織染色によりリン酸化 STAT3 の発現状態を検討する。

③ leptin 下流遺伝子の発現解析

leptin の下流遺伝子の発現に関して体癌組織の定量 RT-PCR により解析する。また体癌細胞株において pathway PCR array を使用して leptin 添加後の遺伝子発現を解析する。

(3) 子宮体癌における leptin の作用機序および estrogen との cross talk, 相互作用に関する検討

① leptin が子宮体癌細胞増殖および apoptosis に与える影響に関する検討 体癌細胞株を使用して leptin 添加時の細胞増殖および apoptosis に与える影響について検討する。

② leptin の分子細胞学的作用機序の解明 leptin 受容体は JAK/STAT, MAPK, PI3K pathway を介して下流遺伝子の発現調節を行っている。子宮体癌における leptin の作用発現の分子機構について kinase inhibitor 等を用いることにより検討する。

③ leptin と estrogen の cross talk および相互作用

leptin または estrogen による刺激後の STAT3 のリン酸化と細胞増殖や apoptosis との関連性について解析し、estrogen との cross talk が存在するか検討を行う。また、leptin が aromatase 遺伝子の発現を上昇させるかについて、細胞株および体癌組織において検討する。

4. 研究成果

(1) adipocytokine は子宮体癌発症の独立した危険因子か？

閉経後の子宮体癌患者 150 名を対象とし、治療前（手術前）に血液を採取し、血中 leptin と adiponectin を ELISA 法にて測定した。対照群として、悪性腫瘍の既往のない、年齢をマッチさせた健康女性 150 名より、同様に採血を行った。子宮体癌患者の body mass index (BMI) の平均値は 23.7 であり対照群の 22.0 より有意に高値であった。また高血圧、糖尿病の合併率も子宮体癌患者において有意に高率であった。血清の leptin 値は体癌患者においては平均 8.2ng/ml と対照群の 4.5ng/ml 比較して有意に高値であり、adiponectin は体癌患者の 6218 μ g/ml に対して、対照群では 8979 μ g/ml と有意に高値であ

った。両者の比をとった leptin/adiponectin (L/A ratio) は、体癌群で 2.05、対照群で 0.98 と体癌群で有意に高値であった。Leptin および L/A ratio は BMI や耐糖能の指標である HOMA-R、空腹時血糖値と有意な相関を示した。子宮体癌の発症リスクを、leptin、adiponectin、L/A ratio に対して解析したところ、その Odds ratio (OR) は L/A ratio が最も高く、最高三分位点以上の症例ではの最低三分位点の症例と比較して OR は 6.0 であった。OR は年齢、BMI、高血圧、糖尿病の有無で補正を行っても 5.5 と有意に高値であり、L/A ratio は肥満とは独立した危険因子となっていることが示された。

(2) 子宮体癌細胞や組織において leptin signaling は活性化されているのか？

① 子宮体癌組織における leptin および leptin 受容体の発現に関する検討

子宮体癌患者における脂肪組織および子宮体癌組織における leptin および leptin 受容体の発現を定量的 RT-PCR により解析を行った。脂肪組織においては両者の発現は臨床進行期や腫瘍分化度との関連はみられなかったが、子宮体癌組織においては leptin および leptin 受容体ともに進行例や腫瘍分化度の低い症例において有意に発現が高くなっていた。

② leptin 下流遺伝子の発現解析

leptin の下流遺伝子の発現に関して体癌組織の定量 RT-PCR により解析する。また体癌細胞株において pathway PCR array を使用して leptin 添加後の遺伝子発現を解析した。CyclinD1、Myc、VEGF、BCL1、Survivirin といった leptin の下流遺伝子のうち CyclinD1 遺伝子の発現が癌組織において有意に高く、同遺伝子が leptin により細胞増殖に関与している可能性が示唆された。

(3) 子宮体癌における leptin の作用機序および estrogen との cross talk, 相互作用に関する検討

leptin の子宮体癌細胞内での作用機序の解明を目的として子宮体癌細胞株に各種 kinase inhibitor を投与して leptin 添加後の細胞増殖にどのような影響が出るかを検討した。JAK/STAT inhibitor (AG490)、MAPK inhibitor (PD98509)、PI3K inhibitor (LY294002) を添加して MTS assay により解析を行ったところ、AG490 を添加すると leptin 添加後の細胞増殖が有意に抑制されることがわかった。さらに Western blot を行うことにより leptin 添加により STAT3 のリン酸化が生じていることが判明し、leptin は JAK/STAT pathway を介して子宮体癌細胞の増殖に関与していることがわかった。

さらに pathway PCR を用いて下流遺伝子の確認を行ったところ、leptin 添加により CyclinD1 や MYC といった細胞増殖に関わる遺伝子が増幅されていることが判明した。さ

らに STAT3 siRNA を用いて leptin 添加後の CyclinD1 の発現抑制を検討した結果、STAT3 を抑制することにより CyclinD1 の発現が抑制され、leptin が STAT3 を介して CyclinD1 の発現に関与していることが証明され、estrogen との相互作用に関する検討では、estrogen receptor を発現する子宮体癌細胞株 (ECC1) に leptin と estrogen を添加したところ細胞増殖は相加的に促進され、STAT3 阻害薬によりその効果が減弱することが確認され、estrogen と leptin の相互作用が示された。

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 5 件)

1. 八幡哲郎、女性のライフサイクルと肥満、日本女性医学会誌、19 巻、2011、96-101. 査読なし

2. 八幡哲郎、ウェルエイジングのために-中高年女性の QOL とヘルスケア-女性のライフサイクルと肥満対策—、産婦人科治療、103 巻、2011、77-84. 査読なし

3. 八幡哲郎、がん診療サポートガイド「子宮体癌」、治療、93 巻、2011、1129-1131. 査読なし

4. 八幡哲郎、子宮体癌トピックス：肥満と子宮体癌、日本産科婦人科学会雑誌、62 巻 2010、236-241. 査読なし

5. Ashizawa N., Yahata T., et.al. Gynecologic Oncology, Serum leptin-adiponectin ratio and endometrial cancer risk in postmenopausal female subjects. Gynecologic Oncology. 2010;119: 65-9. 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

1. 芦澤直浩、八幡哲郎、血清レプチン/アディポネクチン比と子宮体癌発症リスク、第 50 回日本婦人科腫瘍学会 (ミニシンポジウム)、2011 年 11 月 26 日、北海道札幌市

2. 八幡哲郎、子宮体癌とアディポサイトカイン、第 59 回北日本産科婦人科学会学術講演会 (招請講演)、2011 年 9 月 25 日、秋田県秋田市

3. 芦澤直浩、八幡哲郎、子宮体癌発症と耐糖能異常およびレプチンの関連性についての検討、第 25 回日本更年期医学会学術集会、2010 年 10 月 3 日、鹿児島県鹿児島市

4. 八幡哲郎、女性のライフサイクルと肥満、第 25 回日本更年期医学会学術集会、2010 年 10 月 3 日、鹿児島県鹿児島市

5. 八幡哲郎、子宮体癌トピックス：肥満と子宮体癌、第 62 回日本産科婦人科学会学術集会、2010 年 4 月 24 日、神奈川県横浜市

6. 研究組織

(1)研究代表者

八幡哲郎 (YAHATA YETSURO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：90293232

(2)研究分担者

全錦華 (QUAN JINHUA)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：10452070

(3)連携研究者 なし

研究者番号：

