

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592500

研究課題名(和文)化学療法抵抗性子宮内膜癌へのKeap1遺伝子導入治療

研究課題名(英文)Development of Keap1 gene therapy for chemo-resistance endometrial cancer.

## 研究代表者

吉永 浩介 (YOSHINAGA, Kousuke)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：40343058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Keap1またはNrf2の遺伝子変異は癌の化学・放射線療法抵抗性獲得に寄与していることが指摘されている。本研究課題において、子宮内膜癌でのKeap1およびNrf2遺伝子変異と放射線療法抵抗性獲得への関わり明らかにするとともに、Keap1遺伝子ベクター作製に成功した。さらに、子宮内膜癌において細胞増殖、進展、浸潤のキギとなるマイクロRNA(マイクロRNA-34b)を同定した。本研究課題は、Keap1遺伝子治療法の開発に向けた創薬基盤を構築に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mutation of Keap1 and Nrf2 genes has been implicated in chemo- and radiation-resistance in multiple types of cancer. In this study, we uncovered involvement of the gene mutation in chemo-resistance endometrial cancer and established the human Keap1 expression vector. Moreover, microRNA-34b was also revealed to play a key role in proliferation, invasion and progression of cancer. Those results would promote to develop the Keap1 genetherapy for chemo-resistance endometrial cancer.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜癌 化学療法抵抗性 Keap1遺伝子 Nrf2遺伝子 遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は子宮頸癌に次ぎ、2番目に多い婦人科腫瘍である。手術全摘出が可能な早期子宮内膜癌症例は5年生存率が90%以上と予後が良好だが、一方で進行した症例は化学療法や放射線療法治療が施行される。子宮内膜癌における化学療法の奏効率は化学療法抵抗性を高頻度に示す悪性腫瘍である。

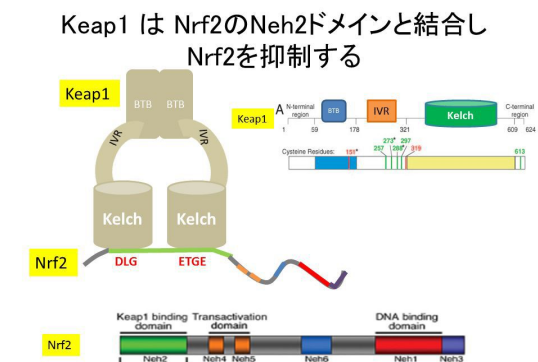
Keap1 および Nrf2 は酸化ストレス応答システムの中核に位置する分子であり、癌の化学・放射線療法抵抗性に関与することが示されている。Keap1 は通常、細胞質内に局在し、酸化ストレス応答酵素群の転写因子の Nrf2 と結合し、Nrf2 の分解を促進する。癌における Keap1 または Nrf2 の遺伝子変異は両者の相互作用を妨げ、Nrf2 が分解されなくなり、酸化ストレス応答酵素群の転写・翻訳が亢進され、化学・放射線療法治療抵抗性をもたらすと考えられている。我々は子宮内膜癌症例において初めて Keap1 遺伝子および Nrf2 遺伝子変異を発見した。105 症例中、Keap1 遺伝子変異が9例、Nrf2 遺伝子変異が3例あることを確認した。Keap1 遺伝子の exon 4 および exon 5 において single nucleotide polymorphism を高頻度に認めた。Keap1-Nrf2 の相互作用を妨げる遺伝子変異の有無、Keap1 の SNP について子宮内膜癌の生存率との関連も統計学的に解析した。Keap1-Nrf2 遺伝子変異の有無は無病生存率に有意な関連がなかったが、Keap1 遺伝子の exon 4 の single nucleotide polymorphism (1413C/G) は化学・放射線療法を受けた症例群において無病生存と統計学的に有意な相関があった。この exon 4 は Kelch ドメインに翻訳され、Nrf2 の DLG ドメ

イン、EDGE ドメイン(seven consecutive arginine; 7R-ETGE: RRRRRRRRLQLDEETGEFLPIQ)と結合し Nrf2 を抑制する極めて重要な部位である。

これらの研究から、Keap1-Nrf2 は子宮内膜癌の抗癌剤耐性化に寄与すると考えられる。

## 2. 研究の目的

変異 Keap1 を有する子宮内膜癌に正常 Keap1 遺伝子を導入することで、抗癌剤感受性を高めることができると考えられる。そこで、本研究では、化学療法耐性化の克服への新たな治療戦略の一つとし



て、正常 Keap1 遺伝子治療法を開発するための創薬基盤を構築した。

## 3. 研究の方法

子宮内膜癌での Keap1 遺伝子変異の検出  
ヒトKeap1 の遺伝子変異の検出は、下記論文に示す: Wong TF, Yoshinaga K, Monma Y, Ito K, Niikura H, Nagase S, Yamamoto M, Yaegashi N. Association of Keap1 and Nrf2 Genetic Mutations and Polymorphisms With Endometrioid Endometrial Adenocarcinoma Survival.

Keap1 の SNP を有する子宮内膜癌細胞株樹立

遺伝子変異を有する検体の凍結検体（子宮内膜癌手術時に、子宮が人体より摘出され 20 分以内に液体窒素内に保存し、当日中に -80 度のディープフリーザーに保管）を使用した。

・癌組織は DMEM に浸し、1mm 間隔で刻まれ、周期的な混合を備えた 37°C で 90 分間 DMEM の中のコラゲナーゼで培養。

・癌組織をピペット吸引操作にて機械的に分離し、2 ml の新鮮な DMEM の中で再度撹拌した。

・内膜間質組織から子宮内膜癌細胞を単離するために、8 ml の試験管にて 5 分間放置し上澄みを採取した。

・最後に採取した細胞を 1% ペニシリン/ストレプトマイシン(シグマ)、10% ウシ胎仔血清、1 mM のナトリウム・ピルビン酸塩、2 mM の L-グルタミンを含む培養液において培養した

#### Keap1 発現ベクターの作製

ヒト Keap1 を運搬するプラスミドベクターおよびアデノウイルスベクターを作製するにあたり、癌細胞から RNA を抽出した後、cDNA ライブラリーを作製した。このライブラリーから特異的プライマーを用いてヒト Keap1 cDNA を増幅した。その後、cDNA の DNA 配列を決定し、野生型ヒト Keap1 cDNA であることを確認した。この cDNA を pcDNA3.1 プラスミドベクターにサブクローニングした。

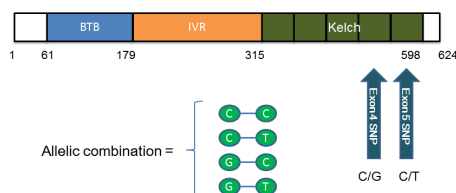
#### 4. 研究成果

Keap1 または Nrf2 の遺伝子変異は両

者の相互作用を妨げ、酸化ストレス応答遺伝子の発現は亢進する。これらの変異から生じるシグナル伝達の異常は癌の化学・放射線療法抵抗性獲得に寄与していることが指摘されている。

本研究課題において、子宮内膜癌での Keap1 および Nrf2 遺伝子変異を発見するとともに、化学・放射線療法抵抗性獲得に関わる Keap1 遺伝子の single nucleotide polymorphism 変異を同定した。さらに、パイロット的に Keap1 遺伝子のメチル化の可能性を示した。また、子宮内膜癌細胞株において Keap1 遺伝子のメチル化が亢進していることを確認したが、これまでの成果に矛盾無い結果であった。

#### Keap1のSNPの結果



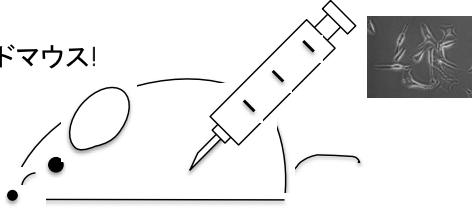
手術摘出した凍結子宮内膜癌検体（変異 Keap1 有する症例）から細胞株を樹立することを試みたが、凍結検体からの生存癌細胞を単離することは困難であることが判明した。よって、Keap1 遺伝子による抗癌剤感受性の亢進を *in vivo* および *in vitro* において明らかにするためには、ヒト Keap1 遺伝子を安定的に強制発現する既存子宮体内膜癌細胞株の作製が必要であることが判明した。

Keap1 遺伝子の *in vivo* での薬剤耐性化への関与を明らかにするために、担癌

マウスモデル（子宮内膜癌細胞 xenograft model）および移植用ヒト Keap1 高発現子宮内膜癌細胞株の作製を試みた。その結果、ヒト Keap1 発現ベクターの作製に成功した。しかしながら、Keap1 を安定的に発現する子宮内膜癌細胞株を作製することは困難であることが判明した。

子宮内膜癌細胞 xenograft model  
(empty vs human Keap1 expression)

ヌードマウス!



そこで、子宮内膜癌において細胞増殖、進展、浸潤のカギとなるマイクロ RNA の網羅的スクリーニングを行った。MIR-34b を候補遺伝子とするまで絞り込んだ（知的財産に関わるため、結果を示さず）。

現在、薬剤耐性との関連性、Nrf2-Keap1 経路との関連性について検討中である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

MiR-34b correlates tumor growth and invasion in uterine serous carcinoma.

Suzuki F, Nagase S, Watanabe Y, Sato I, Utsunomiya H, Kaiho M, Tokunaga H, Niikura H, Takano T, Sasano H, Yaegashi N.

62<sup>nd</sup> Annual Meeting of SRI (Society of Reproductive Investigation).

2015.3.26.

San Francisco, USA

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉永 浩介 (YOSHINAGA, Kousuke)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：40343058

##### (2) 研究分担者

永瀬 智 (NAGASE, Satoru)  
山形大学・医学部・教授  
研究者番号：00292326

高野 忠夫 (TAKANO, Tadao)  
東北大学・病院・特任教授  
研究者番号：40282058