

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592522

研究課題名(和文) 遺伝子と内分泌の異常から分類する子宮内膜癌の新規カテゴリーと治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel categorization and a therapeutic strategy based on genetic and endocrine abnormality

研究代表者

田代 浩徳 (TASHIRO, Hironori)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70304996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：臨床研究として、子宮内膜(内膜)癌における高プロラクチン(PRL)血症例ではエストロゲン受容体(ER)- の発現が高く、PTEN変異が少ないことが示された。また、早期内膜癌/前癌病変の若年症例に酢酸メドロキシプロゲステロン療法(MPA)施行症例の検討で、非奏効にインスリン抵抗性(IR)の関与がみられたが、メトホルミン併用により奏功が得られた。高PRL血症例では、MPA後のカベルゴリン継続が再燃予防に有効であった。基礎研究として、PRLによる内膜癌細胞株のER- 発現と増殖能亢進が確認された。また、内膜癌マウスを用いて、副作用の少ないジエノゲストがMPAと同等の治療効果を有することが示された

研究成果の概要(英文)：Our clinical study showed that endometrial cancer (EC) with hyperprolactinemia had higher expression of estrogen receptor (ER)- and less PTEN mutation. High dose of medroxyprogesterone acetate (MPA) did not sufficiently effect for EC or precancerous lesion with insulin resistance (IR), but that with metformin showed more effective outcome. Continuity of cabergoline after MPA was effective for a prevention of recurrence. Our basic research showed that prolactin (PRL) promoted higher expression of ER- and cell proliferation of EC cells. Endometrial cancer mouse model proved that dienogest had almost same effect comparing with MPA which had more side effects.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：癌 子宮内膜癌 内分泌学的異常 遺伝子異常 癌治療

1. 研究開始当初の背景

本邦において、子宮内膜癌の漸増がみられている。歴史的背景として、更年期障害に対し、欧米でエストロゲン単独補充療法がかつてよく行われた頃、エストロゲンの投薬により比較的予後良好の類内膜腺癌が多発したことから、この組織型の子宮内膜癌はエストロゲン依存性癌として認知されるようになった。これに対し、悪性度の高い漿液性腺癌は高齢者に多く、エストロゲン非依存性癌として区別されてきた。一方、分子生物学的には、類内膜腺癌は、DNA ミスマッチ修復機構の破綻による遺伝子変異の蓄積を伴うという特徴が知られ、PTEN を中心に、K-ras、CTNNB1 (-catenin)、ARID1A などさまざま遺伝子変異を単独もしくは複合して有しているがわかっていた。これは p53 の変異を単独でみることが多い漿液性腺癌と大きく異なっていた。この分子生物学的特徴とともに、エストロゲン依存性の類内膜腺癌とエストロゲン非依存性の漿液性腺癌を代表とする2つのタイプに区分され、この分類が臨床的取扱いに盛んに用いられてきた。しかし、子宮内膜癌では、必ずしもエストロゲンが高値でない場合が多くみられ、インスリン抵抗性や高プロラクチン (PRL) 血症などのエストロゲン以外の内分泌異常を伴う症例が多く経験されるようになり、エストロゲン依存性を基軸とする2つの区分が子宮内膜癌の臨床像を十分に反映しない状況となってきた。さらには、子宮内膜特異的 PTEN 遺伝子改変マウスを用いた研究で、エストロゲン投与が子宮内膜の類内膜腺癌の進展には影響しない可能性がわれわれの研究で示された。

2. 研究の目的

本研究においては、加療を行った子宮内膜癌症例の臨床的背景と通常の血液検査で測定可能なエストロゲン、インスリンや PRL などの血清値をもとに内分泌学的プロファイルを統合的に解析していく。また、遺伝子異常として最も頻度の高い PTEN 遺伝子変異を有する癌細胞は、野性型 PTEN 遺伝子産物である Pten タンパクに対する抗体を用いた免疫組織化学で陰性となることをわれわれの保有する子宮内膜特異的 PTEN 遺伝子改変マウスならびにヒト子宮内膜癌症例において、既に確認している。内分泌学的に検討された子宮内膜癌症例の摘出標本を、抗 Pten 抗体を用いた免疫組織化学により解析し、内分泌学的異常と Pten 失活との関連を調べる。こうした手法を用いることで、一般診療においても検索可能な新規子宮内膜癌カテゴリーを策定するための基盤とすることを第一の目的とする。また、基礎的な実験として、*in vitro* において、内分泌学的プロファイルで得られたデータをもとに、異常を有するホルモン存在下での細胞レベルの変化を解析し、ホルモン異常による直接的関与の可能性を検証する。さらには、子宮内膜特異的 PTEN

遺伝子改変マウスを用いて、治療効果判定の検証を行う。これらの研究を通して、将来の治療を視野に見据えた統合的なカテゴリー策定を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

臨床研究として、熊本大学医学部附属病院において、子宮内膜癌前癌状態である複雑型子宮内膜異型増殖症ならびに子宮内膜癌症例において、インフォームド・コンセントの上、肥満の評価、子宮内膜癌の家族発症がみられるリンチ症候群関連腫瘍の家族歴の聴取を行い、遺伝因子が濃厚な場合には遺伝カウンセリングチームと連携し対応を行った。また、子宮内膜生検組織で確認された症例に対し、治療前に、通常診療で検査可能な内分泌学的検査を施行した。異常がみられる場合には、代謝内分泌内科とも協調して、精査を行っていき、子宮内膜癌症例の内分泌学的プロファイルを策定した。治療は子宮内膜癌のガイドラインに従って行ったが、若年の早期子宮内膜癌 (筋層浸潤のない類内膜腺癌症例) もしくは複雑型子宮内膜異型増殖症の症例で、妊孕能温存を希望した場合には、十分なインフォームド・コンセントを得た上で、高用量黄体ホルモン療法を行った。その際、PRL リン抵抗性を示す症例にはメトホルミンを、高プロラクチン血症を有する症例では、ドーパミン作動薬カベルゴリンを追加し、奏功率を検討した。また、過去の症例も含めて検討し、妊娠率、再発率も併せて解析した。腫瘍組織の評価として、生検組織または手術摘出標本を用いて、病理診断が行われたパラフィンブロックより、病巣の認められる部位から薄切切片を作成し、抗 Pten (野性型) 抗体を用いて、免疫組織化学を行った。病巣が陰性である症例を PTEN 遺伝子変異陽性癌と判断して解析を行った。同様に、腫瘍組織における各種ホルモン受容体の免疫組織化学的検討も行った。

基礎研究においては、当初、子宮内膜特異的 PTEN 遺伝子改変マウスより、子宮内膜腺癌細胞ならびに子宮内膜間質細胞を抽出して、基礎研究に用いようとしたが、臨床研究により、高 PRL 血症が内分泌学的異常のひとつのカテゴリーとして特徴づけられたこと、そして、この PRL の作用がマウス子宮内膜ではヒトと異なることから、マウス細胞を用いずに、ヒトの子宮内膜癌細胞ならびにヒト不死化子宮内膜由来細胞を用いて研究を行うこととし、これらの培養細胞にホルモン添加を行い、細胞増殖能の検討を行った。また、黄体ホルモンは、エストロゲンに拮抗する以外に、Pten/PIP3K/Akt シグナル伝達系の下流の FOXO1 遺伝子に作用することが報告され、分子標的薬としての一環として、子宮内膜特異的 PTEN 遺伝子改変マウスを用いて、まだヒト子宮内膜癌には適応されていない新規黄体ホルモンであるディナゲストを用いて、治療効果判定を行った。

4. 研究成果

臨床研究) 2010年1月~2013年8月に熊本大学医学部附属病院で加療した子宮内膜癌181例を後方視的に解析し、高PRL血症(PRL > 15.0ng/ml)のみを有する群(高PRL群)、肥満(BMI > 25.0kg/m²)とインスリン抵抗性(HOMA-IR > 2.5)のみを有する群(肥満群)、リンチ症候群関連腫瘍の家族歴のみを有する群(遺伝関連群)の3群を抽出し比較検討した。また、3群で、PRL受容体(PRLR)、エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PR)、Ptenの発現を免疫組織化学的に評価検討した。その結果、病理組織学的検討では全例が類内膜腺癌G1あるいはG2であったが、3群間に病理学的な差異はみられなかった。免疫組織化学的検討では、全群にPRLR、ER、PRの発現が高率にみられた。また、血清PRL値: 15ng/mlを境に2群に分けると、15ng/ml以上の群で有意にER-の発現が高かった(84.6% vs 54.1%, P=0.04)。PgRやPRLRは高い傾向がみられたものの、有意差はみられなかった。一方、PTEN変異陽性は高PRL群で2/12例、肥満群で7/15例、遺伝関連群で7/11例に認められ、高PRL群でPTEN変異が有意に少なかった(p < 0.05)。本検討の結果から、高PRL血症を有する子宮内膜癌では、他の群と比較して分子生物学的には異なる発癌機構を有している可能性が示唆された。また、1994年~2014年に同施設で、高用量黄体ホルモンとして、酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)療法を施行した32例(23~43歳)を対象とし、経妊、月経不順、PCOS、肥満(BMI > 25.0kg/m²)、インスリン抵抗性(HOMA-R > 1.6)、および高PRL血症の有無を評価し、これらの中でMPA療法の奏効と再燃に関与した因子を検討した。MPA療法が奏効したのは22例(68.8%)であった。奏効・非奏効例の間でインスリン抵抗性以外の各因子が占める割合に有意差はみられなかったが、インスリン抵抗性はそれぞれ10例(45.5%)と9例(90.0%)にみられ、MPA療法の非奏効にインスリン抵抗性の関与が認められた(p < 0.05)。本研究開始後(2012年~)、インスリン抵抗性を有する3症例にメトホルミンが併用されたが、奏効がみられた10例中3例がこの併用症例であった。一方、MPA療法後に再燃したのは6例(27.3%)であった。再燃した6例としなかった16例において、高PRL血症はそれぞれ1例(16.7%)と11例(68.8%)にみられた(p < 0.05)。再燃がみられなかった高PRL血症の11例中8例にはMPA療法後にカベルコリンによる管理が継続されていた。以上から、インスリン抵抗性を有する症例ではMPA療法が奏効しにくい、メトホルミンを併用することでより高い効果の可能性が期待された。また、高PRL血症を有する症例では、MPA療法後にカベルコリンによる管理を継続することで良好な転帰が得られる可能性が示唆された。

基礎研究) 本研究の中の臨床研究において、これまで着目されてこなかったPRLによる子宮内膜癌への影響が明らかになった。従来から、PRLの作用が排卵障害による間接的な影響の可能性は知られているものの、腫瘍細胞への直接的な作用については十分な解析がされていないため、*invitro*の実験系で検証を行った。今回、HPV E6/E7-hTERTによって不死化したヒト子宮内膜腺細胞(EM-E6/E7/TERT: 島根大学 京 哲教授より供与)、Ishikawa細胞株、HHAU細胞株を用いて、培養液へPRL添加しMTSアッセイによる増殖能を検討したところ、全ての細胞株(EM-E6/E7/TERT 193%, Ishikawa 526.4%, HHAU 219.4%)で増殖能の亢進が確認された。特に、増殖能の亢進が顕著であったIshikawaでは、PRL添加により、免疫細胞化学、Real-time PCR、Western blottingにて、ERの発現亢進が確認された。これは、PRLによるERを介する細胞増殖作用を惹起している可能性を示唆するものである。さらに、PRLに添加により、PRLRの発現亢進も確認されており、現在、PRLRの下流因子(pJAK2/STAT5a/b, Pten/PI3K/Akt, MAPK)との関連を調べている(未発表)。

また、われわれは子宮内膜癌に最も多くみられるPTEN遺伝子変異をマウスに再現させた、子宮内膜癌モデルマウスとしての子宮内膜特異的PTEN遺伝子改変マウス(九州大学 鈴木 聡 教授より供与)を保有しており、同マウスを用いた分子標的薬剤の検証システム構築を行ってきている。近年、プロゲステロンはエストロゲン拮抗作用以外にも、Pten/PI3K/Aktの増殖シグナルを調節するFOXO1に対する直接作用が知られ、分子標的薬としても位置づけられる。本邦においては、子宮内膜癌の治療薬として、プロゲステロン製剤として、酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)のみしか臨床的に用いることができないが、この薬剤では、臨床的に体重増加や血栓などの副反応が多くみられる。これに対し、ジエノゲストは子宮内膜症に対して、近年、作られたプロゲステロン製剤である。MPAとジエノゲストによる治療効果の判定のために、子宮内膜特異的PTEN遺伝子改変マウスにこれらの薬剤ならびにプラセボを入れたポンプを装着し、持続投与を行った。その結果、ジエノゲストとMPA投与群では、子宮内膜特異的PTEN遺伝子改変マウスに子宮内膜異型増殖症ならびに子宮内膜癌の発生頻度に差がみられず、同等の効果をもっていることが明らかとなった(投稿中)。

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14件)

Sakaguchi I., Motohara T., Saito F., Takaishi K., Fukumatsu Y., Tohya T.,

Shibata S., Mimori H., Tashiro H., Katabuchi H. High-dose oral tegafur-uracil maintenance therapy in patients with uterine cervical cancer. *J Gynecol Oncol.* in press 査読有 Yamaguchi M., Tashiro H., Takaishi K., Honda R., Katabuchi H. A Giant Ovarian Tumor Causing Anasarca and Dyspnea Successfully Managed after Preoperative Drainage. *Gynecol Obstet Invest.* in press 査読有 doi:10.1159/000369389

Tashiro H., Katabuchi H. The relationship between estrogen and genes in the molecular pathogenesis of endometrial carcinoma. *Curr. Obstet. Gynecol. Rep.* 3, 9-17 (2014) 査読有 Yamaguchi M., Honda R., Uchino K., Tashiro H., Ohba T., Katabuchi H. Transvaginal methotrexate injection for the treatment of cesarean scar pregnancy: efficacy and subsequent fecundity. *J Minim Invasive Gynecol.* 21, 877-83 (2014) 査読有 doi:10.1016/j.jmig.2014.03.024

Matsuo Y., Tashiro H., Yanai H., Moriya T., Katabuchi H. Clinicopathological heterogeneity in ovarian clear cell adenocarcinoma: a study on individual therapy practice. *Med Mol Morphol.* (2014) 査読有 doi:10.1007/s00795-014-0090-z

齋藤文誉、田代浩徳、片淵秀隆 . 子宮頸部円錐切除術における留意点 . 産婦人科手術 Up to Date 産科と婦人科 81 (Suppl): 103-108 (2014)

田山親吾、田代浩徳、本原剛志、山口宗影、本原研一、大場 隆、片淵秀隆 . 正常大卵巣に局在し抗 NMDA 受容体脳炎を惹起した成熟嚢胞性奇形腫の 1 例 . 日本婦人科腫瘍学会雑誌 32: 257-262 (2014)

Yamaguchi M.*, Ohba T., Tashiro H., Yamada G., Katabuchi H. Human chorionic gonadotropin induces human macrophages to form intracytoplasmic vacuoles mimicking Hofbauer cells in human chorionic villi. *Cells Tissues Organs.* 197, 127-35 (2013) 査読有 doi: 10.1159/000342806.

Itoh F., Komohara Y.*, Takaishi K., Honda R., Tashiro H., Kyo S., Katabuchi H., Takeya M. Possible involvement of signal transducer and activator of transcription-3 in cell-cell interactions of peritoneal macrophages and endometrial stromal cells in human endometriosis. *Fertil Steril.* 99, 1705-1713 (2013) 査読有 doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.13

3

上村友美, 片岡志歩, 松岡ゆり子, 一法師幸恵, 鬼塚美穂, 松田貴恵子, 菊池 健, 田代浩徳, 高石清美, 宮原 陽, 片淵秀隆 . 婦人科がん領域における放射線療法による副作用の要因解析 皮膚障害に焦点をにおいて . 熊本母性衛生学会誌 16, 35-39 (2013)

岡村佳則, 山口宗影, 青木早織, 本田 律生, 本原研一, 田代浩徳, 大場 隆, 片淵秀隆 . 他施設での子宮全摘出・両側卵巣摘出術後の深部子宮内膜症から発生したと考えられた類内膜腺癌の 1 例 . 日エンドメトリーオシス会誌 33, 212-215 (2012)

田代浩徳, 佐々木瑠美, 本原剛志, 片淵秀隆 . 卵巣癌治療の標的分子の探索 マウスを用いた上皮性卵巣癌モデルシステム構築の意義 . 産婦の実際 61, 171-180 (2012)

田代浩徳, 片淵秀隆 . 絨毛性疾患の取扱い PSTT と ETT の取扱い . 臨婦産 66, 641-646 (2012)

齋藤文誉, 田代浩徳, 片淵秀隆 . 子宮体がん 漿液性腺癌、明細胞腺癌の治療 . 日臨 70, 438-441 (2012)

[学会発表](計 23 件)

Fumitaka Saito. Clinical implication of prolactin in endometrial carcinoma. The 15th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2014), November 12, 2014 (Melbourne, Australia)

Yashiro Motooka. Clinicopathological study of prognostic factors in uterine carcinosarcoma: a comparison with grade 3 endometrioid adenocarcinoma of the uterus. The 15th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2014), November 12, 2014 (Melbourne, Australia)

Fumiko Itoh. Interaction between peritoneal M2 macrophages and endometrial stromal cells in the development of endometriosis via Stat3 activation. 34th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Immunology. July 2-5, 2014 (New York, USA)

Yuko Imamura. Choriocarcinoma Coexisting with Epithelioid Trophoblastic Tumor. The 18th Taiwan-Japan-Korea Joint Conference for Gynecological Pathology. May 24, 2014 (Taipei, Taiwan)

Shingo Tayama. A subpopulation of EpCAM-positive cancer cells is

involved in chemoresistance and prevents platinum anticancer drug-induced apoptosis in epithelial ovarian cancer. 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会(東京国際フォーラム、東京都) 2014 年 4 月 18 日
Isao Sakaguchi. Frequency, clinical pattern and outcome of perioperative venous thromboembolism with gynecologic diseases. The 18th ESGO International Meeting, October 19-22, 2013 (Liverpool, UK)
Takeshi Motohara. Survival Impact of wide resection of the pelvic peritoneum in patients with ovarian cancer: Novel surgical strategies for the removal of ovarian cancer stem cells and their niche. 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会(ロイトン札幌他、札幌市) 2013 年 5 月 10 日
Hironori Tashiro. Controlled ovarian stimulation and ovarian cancer. The International Ovarian Conference 2013. March 3, 2013 (Taipei, Taiwan)
Fumitaka Saito. Development of mice model for inquiry into therapeutic targets: an anticancer effect of dienogest on endometrial neoplasm. 9th AACR-JCA Joint Conference : Breakthroughs in Basic and Translation Cancer Research February 21-25, 2013 (Hawaii, USA)
Takeshi Motohara. The tumor suppressor p53 trigger the expansion of ovarian stem-like tumor cells in an established mouse model of ovarian cancer. 第 71 回日本癌学会学術総会(ロイトン札幌他、札幌市) 2012 年 9 月 19 日
Junko Nakao. A case of squamous cell carcinoma arising in Bartholins cyst in a young woman with systemic lupus erythematosus. 2012 Conference of Asia Oceania Research Organization on Genital Infections and Neoplasia (AOGIN) July 13, 2012 (Hong Kong)

〔図書〕(計 2 件)

Saguchi I., Tashiro H., Katabuchi H. Management of uterine sarcoma. Current approaches to endometrial cancer, Future Medicine, Future Science Group, p126-139, 2014
Doi: 10.2217/fmeb2013.13.256
田代浩徳, 片淵秀隆. 「第 2 章 女性ホルモンとがん 2. ホルモン依存性がん 2. 子宮体がん, 3. 卵巣がん」, 「チームで学ぶ女性がん患者のためのホルモンマネジメント」篠原出版社, 発刊予定

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 浩徳 (TASHIRO, Hironori)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 70304996

(2) 研究分担者

本田 律生 (HONDA, Ritsuo)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 10301376

研究分担者

本原 剛志 (MOTOHARA, Takeshi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 10457591

研究分担者

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

研究分担者

宮原 陽 (MIYAHARA, Yo)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号: 40404355

研究分担者

片淵 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