

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861463

研究課題名(和文)新規選択的エストロゲン受容体モジュレーターによる子宮筋腫治療薬開発

研究課題名(英文) Investigate the Inhibitory Effect of the Selective Estrogen Receptor Modulators on Uterine Leiomyomas

研究代表者

李 賓 (LI, Bin)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・研究支援者

研究者番号：20566814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規選択的エストロゲン受容体モジュレーター(SERM)による新しい子宮筋腫治療の開発を目的として研究を遂行してきた。ラット子宮筋腫細胞株でMTS assayを用いた新規SERM(SS1020、SS5020)の細胞増殖抑制効果を検討した結果、SS5020のみで抑制効果が確認された。よって、SS5020のみを用いてin vivoの検討を行った。免疫不全マウスであるNOGマウスを用いてヒト子宮筋腫モデルマウスを作成し、SS5020を8週間経口投与し、1週毎に移植片のサイズを測定した。結果、SS5020は子宮筋腫に対し抑制効果がみられるものの、その効果はそれほど強いものではない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：SS5020, a new benzopyran antiestrogen, has anti-breast cancer potential in rats and mice model. In this study, we investigated the inhibitory effect of SS5020 on uterine leiomyomas.

In vitro study, SS5020 inhibited ELT-3 cell proliferation. In vivo study, human leiomyoma tumor tissues were collected from female Japanese patients at the time of hysterectomy and implanted into immunodeficient mouse. Mice were administered orally with SS5020. The results showed that SS5020 administration inhibited the enlargement of the tumor, caused the inhibitory effect of cellular proliferation and ER, PR expression levels. Furthermore, SS5020 increased TUNEL positive cells. However, the expression levels of smooth muscle actin (SMA) and collagen components exhibited no significant changed. These experimental findings showed that SS5020 inhibited uterine leiomyoma cells proliferation. However, the inhibitory effect was not as strong as to affect the expression levels of SMA and collagen components.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮筋腫 SERM ELT-3細胞 ヒト子宮筋腫モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮筋腫は生殖年齢女性の約70%に認められる非常に頻度の高い疾患であり、良性疾患であるにもかかわらず多くの女性のQOLを著しく障害する¹。標準治療としては、子宮摘出といった外科的治療が行われ、子宮全摘の約33%は筋腫が原因で行われている。もっとも低侵襲な治療としては薬物治療が考えられ、エストロゲンによる子宮筋腫細胞増殖抑制機構を抑制するGnRH agonistの全身投与が治療に使用されているが、骨粗鬆症や卵巣機能欠落症状などの重篤な副作用が危惧され長期投与できない。

(2) 選択的エストロゲン受容体モジュレーター(SERM)は臓器特異的にエストロゲン受容体に対して促進的に作用したり抑制的に作用し、特定の臓器を標的としてエストロゲンシグナルを調整することで治療効果を発揮することが期待できる。子宮筋腫治療薬としては、子宮筋腫におけるエストロゲン依存的な細胞増殖シグナルを選択的に抑制し、その他の乳腺・骨・子宮内膜等の臓器でのエストロゲンシグナルに悪影響をおよぼさないような「子宮筋腫特異的SERM」が理想である。臨床応用されている代表的SERMとしては、乳がん治療に用いられるタモキシフェン(TAM)、骨粗鬆症薬のラロキシフェン(RLX)である。TAM・RLXともにin vitroの実験系ではエストロゲンによる子宮筋腫細胞増殖抑制機構を抑制することが報告されている。すでにヒト子宮筋腫に対するいくつかの臨床研究が行われているが、十分な抑制効果はえられておらず、現在臨床で使用可能なSERMについては子宮筋腫治療に関しては無効とするのがコンセンサスとなっており、子宮筋腫治療には使用されていないのが現状である。また、TAMについては子宮内膜増殖作用からの子宮体癌発症が危惧され、子宮筋腫治療への応用は現実的ではない。

(3) これに対し新規SERMであるSS1020、SS5020はニューヨーク州立大学の澁谷らにより乳がん治療の抗エストロゲン薬開発のなかで新たに合成された薬剤である^{2,3}。今回の検討では、澁谷らとの共同研究としてこれらの薬剤の提供を受けて行う。去勢ラットを用いた子宮に対するエストロゲン作用の検討では、TAM・RLXがある程度の子宮重量増加作用を持つものに対して、SS1020、SS5020はエストロゲン作用を全く示さなかった。TAM・RLXのヒト子宮筋腫治療において十分な薬効を発揮できない理由として、代謝産物が作用するために効果が不安定であること、子宮に対する抗エストロゲン作用とエストロゲン作用が併存していることが考えられる。このように、SS1020、SS5020は生体内においてTAM・RLXと比較してより強力な抗エストロゲン作用を発揮すると考えられ、さらに子宮に対するエストロゲン作用を持たないことから、子宮筋腫治療剤としての応用が期待される。

2. 研究の目的

本研究では子宮筋腫細胞増殖における抗エストロゲン薬であるSS1020、SS5020の子宮筋腫増殖抑制効果を明らかにすることを目的とし、以下の研究を行う。

(1) *In vitro*: 子宮筋腫細胞におけるSS1020、SS5020の増殖抑制効果検討。

(2) *In vivo*: ヒト子宮筋腫モデルマウスを用いたSS1020、SS5020の子宮筋腫増殖抑制効果検討。

3. 研究の方法

(1) *In vitro*: 細胞増殖抑制効果の比較検討のため、既存のSERMであるTAMを比較対象とした。細胞増殖抑制効果は、5,000細胞/wellで播種した細胞に各薬剤を添加し、24時間培養後にMTS assayにて評価した。各薬剤の添加濃度は、乳癌細胞株MCF-7細胞で行った澁谷らのIC50の結果を参考にを行った。よって、本研究ではTAMを100nM, 1μM, 5μM, SS1020を1μM, 5μM, 25μM, SS5020を5μM, 10μM, 50μMの用量で検討した。

(2) *In vivo*: 倫理委員会承認のもと子宮筋腫組織は東北大学産婦人科(八重樫)の研究協力により、東北大学病院にて摘出された子宮筋腫検体を使用した。免疫不全マウスであるNOGマウスは(財)実験動物中央研究所と共同研究のうえ購入した。

NOGマウスの皮下に移植2日前にエストロゲンもしくはエストロゲン+プロゲステロンの徐放性ペレットを埋め込んだ後、ヒト子宮筋腫手術検体より切除した子宮筋腫組織片を皮下に移植した。これをヒト子宮筋腫移植モデルマウスとした⁴。

移植翌日よりSS5020を3.2mgおよび10.7mg/kg/dayの用量で、8週間経口投与し、1週毎に移植片のサイズを測定した。さらに8週の投与期間終了後、移植片を摘出し、病理組織学的検討により筋腫に対する抑制効果を検討した。

4. 研究成果

(1) *In vitro*のMTS assayの結果では5,000細胞/wellの条件ではTAMの1μM以上、SS1020では抑制効果が確認されなかったが、SS5020の50μMで有意に細胞増殖が抑制された(図1)。

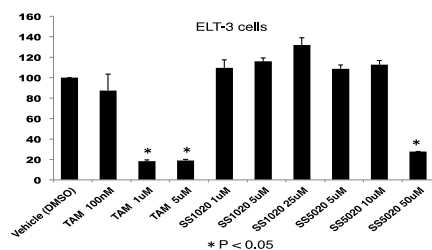


図1

(2) *In vivo* のヒト子宮筋腫移植モデルマウスに対する SS5020 投与の結果、全ての群において移植組織のサイズに変化は見られなかったが、移植片の病理組織学的検討では、SS5020 の 10.7mg/kg/day 投与群において、有意に細胞数を減少した。また、ER と PR の陽性細胞数も有意的に減少した。さらに、細胞増殖マーカーである Ki-67 の発現は、SS5020 投与群で有意に陽性細胞数が減少していた(図 2 A)。アポトーシス検出 TUNEL 染色では、SS5020 投与群で有意に陽性細胞率が増加していた(図 2 B)。

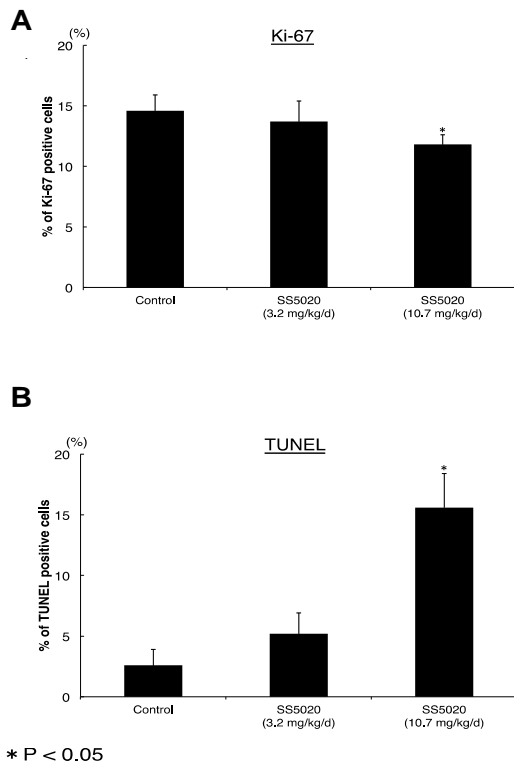


図 2

一方、smooth muscle actin (SMA) の発現面積とエラスチカマツソントリクローム染色に有意な変化はみられなかった。以上より、SS5020 は子宮筋腫に対し抑制効果がみられるものの、その効果はそれほど強いものではない可能性が示唆された。

(3) 子宮筋腫の増大にはプロゲステロンが重要であることが知られている。よって、エストロゲンに加えプロゲステロンを加えた改良型移植モデルマウスを作成し、それに対する SS5020 の抑制効果を同様に検討した。

全ての群において移植組織のサイズは増大するが、SS5020 を 10.7mg/kg/day で投与した群では筋腫の増大を有意に減弱させた。移植片の病理組織学的検討では、SS5020 の 10.7mg/kg/day 投与群で、細胞数が有意的に減少した。また、Ki-67 の発現は SS5020 投与群で有意な変化は確認できなかった(図 3

A)。TUNEL 染色では、SS5020 投与群で陽性細胞率の有意な増加が確認された(図 3 B)。

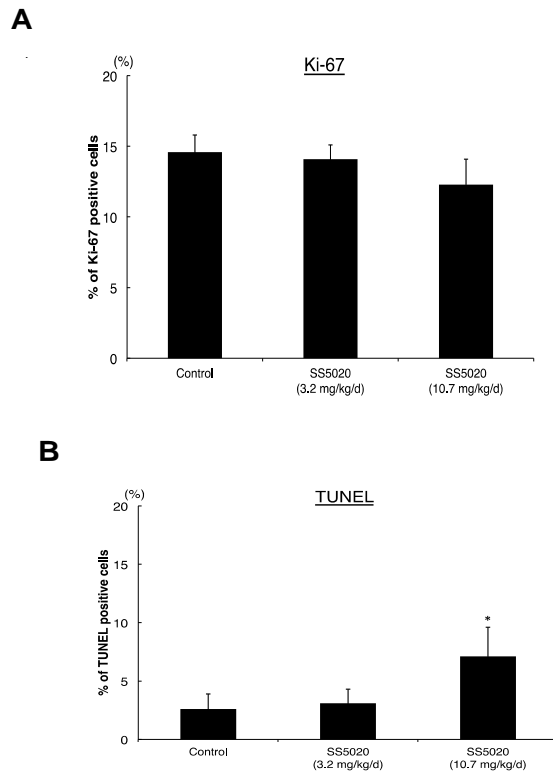


図 3

以上より、SS5020 は SERM としての作用以外に、プロゲステロンシグナルにも作用することで、子宮筋腫増大抑制効果が期待できることが示唆された。

<引用文献>

- Walker CL, Stewart EA. Science. 2005 10;308(5728):1589-92.
 Laxmi YR, Liu X, Suzuki N, Kim SY, Okamoto K, Kim HJ, Zhang G, Chen JJ, Okamoto Y, Shibutani S. Int J Cancer. 2010;127(7):1718-26.
 Suzuki N, Liu X, Laxmi YR, Okamoto K, Kim HJ, Zhang G, Chen JJ, Okamoto Y, Shibutani S. Int J Cancer. 2011;128(4):974-82.
 Tsuiji K, Takeda T, Li B, Kondo A, Ito M, Yaegashi N. Tohoku J Exp Med. 2010 222(1):55-61.

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 2 件)

発表者名: Bin Li, Takashi Takeda, Kenji Tsuiji, Mari Tadakawa, Akiko Kondo, and

Nobuo Yaegashi

発表標題：Improvement of bioavailability and apoptosis potential of curcumin in combination with

epigallocatechin-3-gallate in leiomyosarcoma cells

学会名：the Society for Reproductive Investigation's 62nd Annual Scientific Meeting

発表年月日：2015年3月26日

発表場所：San Francisco (USA)

発表者名：Bin Li, Takashi Takeda, Kenji Tsuji, and Nobuo Yaegashi

発表標題：Investigate the Inhibitory Effect of SS5020-A Selective Estrogen Receptor Modulator on Uterine Leiomyomas

学会名：the Society for Reproductive Investigation's 63rd Annual Scientific Meeting

発表年月日：2016年3月19日

発表場所：Montreal, QC, Canada

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 賓 (LI, Bin)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・研究支援者

研究者番号：20566814