

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24年 6月 8日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791525

研究課題名（和文）子宮内膜癌における HDAC の発現と機能解析

研究課題名（英文）The expression of HDAC and its function in endometrial cancer

研究代表者

鈴木 昭久 (SUZUKI AKIHISA)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：10547095

研究成果の概要（和文）：

ヒストン脱アセチル化酵素（HDACs）は様々な悪性腫瘍で発現亢進が報告されているが、子宮内膜癌での発現に関しては不明であった。我々は子宮内膜癌において HDAC1、HDAC2 および HDAC3 発現亢進を明らかにした。更に、HDAC2 が高グレードの癌でより発現が亢進しており、患者の予後不良と相関することを見出した。HDAC 阻害剤である Trichostatin A、Apicidine、SAHA は内膜癌細胞株で増殖抑制作用を認めたが、p21 の発現増加、サイクリン A の発現増加によることが明らかとなった。更に、サイクリン A のサイレンシングは HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果を増強することが示された。以上の結果から、子宮内膜癌において HDAC2 が増殖能と高侵襲性に関与し、HDAC 阻害剤が有望な抗がん剤であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Overexpression of histone deacetylases (HDACs) has been reported in various human malignancies, however, the expression of HDACs in endometrial tissue has not been fully understood. We examined the expression of HDAC1, HDAC2, and HDAC3 in normal and malignant endometrial tissues, and found that both HDACs were significantly up-regulated in endometrial cancer. In addition, the expression of HDAC2 was significantly increased in higher grade carcinomas and was correlated positively with the poor patient prognosis. The treatment of two HDAC inhibitors [Trichostatin A (TSA), Apicidine (AP), and SAHA] decreased the cellular proliferation of all endometrial carcinoma cell lines examined via the up-regulation of p21 and down-regulations of cyclin A. Furthermore, the silencing of cyclin A conferred the anti-tumor activity of HDAC inhibitor. Therefore, increased HDAC2 expression is involved in the proliferation and aggressive behaviors of endometrial carcinoma, suggesting the possibility of HDAC inhibitor being a promising anti-cancer drug for 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	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：産婦人科

科研費の分科・細目：外科学系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜癌・HDAC・発現解析・予後解析

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は近年著明に増加しており、新たな治療法の開発が待たれている。ヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetyltransferase, HDAC) は核蛋白であり、ヒストンの脱アセチル化を通して種々の遺伝子の転写を調節する重要な酵素である。最近、HDACs は癌細胞において p21 などの癌抑制遺伝子の不活化をもたらし、一方、HDAC 阻害剤は p21 を誘導し、癌細胞のアポトーシスを誘導することが報告され、新しい分子標的治療薬として注目を集めている。しかし、子宮内膜癌における HDAC 発現、およびその分子機能においては明らかとなっていない。

2. 研究の目的

今回の研究で我々は正常子宮内膜および子宮内膜癌におけるクラス I HDAC の発現の有無を検討し、臨床パラメータとの相関を検討し、また、HDAC 阻害剤が子宮内膜癌細胞の機能 (増殖能、浸潤能) 抑制に関与するか明らかにすることを目的とした。また、新規 HDAC 阻害剤の子宮内膜癌に対する抗腫瘍効果の検討および HDAC サブタイプの機能を更に明らかにするとともに、臨床応用

の可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 免疫染色

患者の同意を得て採取した、手術摘出標本のホルマリン固定パラフィン包埋切片に HDAC1-3 に対する抗体を用いて免疫組織学的に検討し、正常子宮内膜 (増殖期、分泌期)、子宮内膜増殖症 (異型を伴わないものと伴うもの)、子宮内膜癌の組織型に特徴的な発現様式の検索、組織 grade による発現の差異、同一腫瘍組織内におけるこれらの局在の差異、および原発巣と転移巣での発現の差異の有無を検討する。

(2) HDAC 機能解析

子宮内膜癌細胞株および培養子宮内膜腺上皮細胞における HDACs 発現を real-time PCR および Western blot 法で、また HDACs 発現の細胞内局在を蛍光抗体染色で検討する。

HDAC inhibitor である TSA, SHA, および Apicidin を子宮内膜癌細胞株 (Ishikawa, Hec1A, Hec1B, KLE, HHUA, RL95-2) に添加し、細胞増殖能および細胞周期の変化およびアポトーシス誘導を WST-1 assay, cell cycle analysis, Apostrand assay にて検討する。さらに子宮内膜癌細胞の浸潤能を invasion

assayにて、また運動能を scratch assayにて評価する。

(3)サイクリンA阻害とHDAC阻害の併用効果  
子宮内膜癌細胞株にサイクリンA特異的  
shRNAを遺伝子導入し、安定発現細胞株を作  
製する。その細胞にHDAC阻害剤を添加し、  
細胞増殖能、浸潤能を検討する。

#### 4. 研究成果

免疫染色による検討から、クラスI HDACは  
正常内膜と比較し子宮内膜癌で発現亢進し  
ていることが明らかとなった。HDACサブタイ  
プのうち、HDAC2は増殖マーカーと正の相関  
を認め、また、HDAC2陽性症例は陰性症例と  
比較し予後不良であることが示された。

使用したHDAC阻害剤は有効濃度(IC50)は異  
なるものの6細胞株全てにおいて増殖抑制  
作用を示した。細胞周期調節因子の発現を検  
討したところ、HDAC阻害剤はp21発現を増強  
し、逆にサイクリンD、サイクリンA発現を  
低下させることがわかった。使用した3種の  
HDACの中でTSAが最も低いIC50を示したが、  
TSAにおいてはSAHA, APと比較し、サイクリ  
ンA抑制作用が強いことが明らかとなった。  
そこで、SAHAおよびRNAiによるサイクリ  
ンA抑制を併用したところ、SAHAの増殖抑制作  
用が有意に増強した。

#### 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6件)

①Miyamoto 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

Dec;64(12):1058-63. Epub 2011. PubMed  
PMID: 21836037.(査読あり)

②Miyamoto 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 Oct;91(2):563-8. Epub 2011.

PubMed PMID: 21763306.(査読あり)

③ 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  
Sep;42(9):1265-74. Epub 2011. PubMed  
PMID: 21334721.(査読あり)

④Fakhry H, Miyamoto T, Kashima  
H, Suzuki A, Ke H, Konishi I, Shiozawa T.

Immunohistochemical detection of  
histone deacetylases in endometrial  
carcinoma: involvement of histon  
deacetylase 2 in the proliferation of  
endometrial carcinoma cells.

Hum Pathol. 2010; 848-858(査読あり)

⑤ 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(6):1332-46. PubMed PMID:

20049841.(査読あり)

©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;2305-17.doi:10.1111/j.1582-4934.  
2009.00839.x. PubMed PMID:19583808.  
(査読あり)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 昭久 (SUZUKI AKIHISA)

信州大学・医学部・助教

研究者番号 : 10547095

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :