

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791802

研究課題名(和文)子宮内膜癌におけるステロイドサルファターゼ阻害剤を用いた新たな内分泌療法の確立

研究課題名(英文) Steroid sulfatase inhibitor may be one of the promising novel endocrine therapies for endometrial cancer.

研究代表者

志賀 尚美 (SHIGA, Naomi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20595558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌の増殖は腫瘍局所で合成されたエストロゲンが関与するとされるが詳細な解明には至っていない。本研究は腫瘍局所環境を再現する共培養法を用いて、サルファターゼ経路に着目して子宮内膜癌局所のエストロゲンの合成メカニズムの解明を試みた。さらにサルファターゼ経路の阻害剤であるSTS阻害剤の効果を検討した。

間質細胞と共培養した子宮内膜癌細胞株でサルファターゼ経路の関連酵素の発現上昇を認め上皮と間質の相互作用が示唆された。共培養した子宮内膜癌細胞株にSTS阻害剤を添加したところ細胞増殖抑制効果を認めた。以上よりSTS阻害剤の有効性が示唆され、子宮内膜癌の新規内分泌治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Estrogen contributes toward the growth and development of endometrial cancer. The steroid sulfatase pathway may be related to estrogen-dependent biological characteristics. However, the role of the steroid sulfatase pathway and the possible effect of steroid sulfatase inhibitor on endometrial cancer are unclear.

Cell proliferation in endometrial cancer cells was significantly decreased by steroid sulfatase inhibitor in co-culture with stromal cells. Estrogen receptor and steroid sulfatase mRNA levels were significantly higher in co-culture with stromal cells. These data indicated the local biosynthesis of estrogens through the steroid sulfatase pathway and tumor-stromal interactions. Steroid sulfatase inhibitor may be a promising novel endocrine therapy for endometrial cancer. Our results may provide important information on the metabolism and synthesis of intratumoral estrogens with regard to the etiology and progression of endometrial cancer.

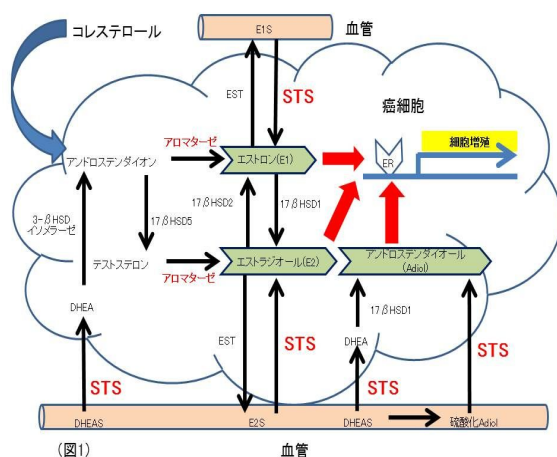
研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜癌 スルファターゼ経路 STS阻害剤 共培養 間質細胞

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は乳癌と並ぶ代表的なエストロゲン依存性腫瘍である。子宮内膜癌の標準治療は手術療法だが、妊娠能温存希望症例や手術後の再発症例に対して内分泌療法は大きく期待されている。しかし、現在子宮内膜癌において本邦で認可されている内分泌療法は高用量酢酸メドロキシプロゲステロンのみで、その奏効率は限定的で治療後の再発が多いことが問題となっている。

子宮内膜癌の増殖、進展には癌局所で合成される高濃度のエストロゲンが深く関与しているとされる (Berstein LM. *et. al.* 2003)。子宮内膜癌組織局所におけるエストロゲン合成は2つの主要な経路からなる (図1)。1つはコレステロールから合成されたアンドロゲンからアロマターゼを介してエストロゲンが合成されるアロマターゼ経路で、もう1つは、血管内の硫酸化エストロゲン(硫酸化エストロン:E1S、硫酸化エストラジオール:E2S)からステロイドスルファターゼ(STS)を介してエストロゲンが合成されるスルファターゼ経路である。このスルファターゼ経路は、エストロン(E1)、エストラジオール(E2)合成とは別に、アンドロステンダイオール(Adiol)合成に関わる経路にも関与する。



子宮内膜癌と同じエストロゲン依存性腫瘍である乳癌は以前より腫瘍局所のエストロ

ゲン合成におけるスルファターゼ経路の重要性が報告され、閉経後エストロゲンレセプター陽性、進行・再発乳癌患者を対象とした STS 阻害剤の第1相試験まで進んでいる (Stanway SJ. *et. al.* 2006)。一方、子宮内膜癌におけるスルファターゼ経路の解明は発展途上である。1993年に Yamamoto らが子宮内膜癌の STS 活性は正常子宮内膜の12倍と報告した (Yamamoto T. *et. al.* 1993)。さらに2004年に我々は子宮内膜癌において STS 免疫染色陽性率86%、EST陽性率29%と STS 発現が有意であり、STS/EST活性の比が臨床予後と有意に相関することを報告した (Utsunomiya H. *et. al.* 2004)。また正常内膜、子宮内膜癌、乳癌の STS 活性、EST 活性を比較し、子宮内膜癌の STS 活性が正常内膜、乳癌と比較して有意に高いこと、子宮内膜癌における EST 活性は正常内膜と比較して有意に低く、乳癌と有意差を認めないこと、子宮内膜癌における STS/EST 活性比は正常内膜および乳癌に比較して有意に高いことを確認した。以上より子宮内膜癌におけるスルファターゼ経路は乳癌よりも局所のエストロゲン産生に重要な役割を果たしている可能性が示唆され、子宮内膜癌に対する STS 阻害剤の治療効果が期待できる。しかし、今まで STS 阻害剤により子宮内膜症、子宮内膜癌において STS 活性を抑制した報告はあるものの (Purohit A. *et. al.* 2008, Day JM. *et. al.* 2009)、in vitro で子宮内膜癌細胞株の細胞増殖抑制効果を明らかにした報告はない。子宮内膜癌のアロマターゼ経路の重要性とアロマターゼ阻害剤の効果については我々がすでに報告している (Shiga N. *et. al.* 2009)。

2. 研究の目的

子宮内膜癌局所のエストロゲン合成にスルファターゼ経路がどのように関わっているのかを解明し、STS 阻害剤が新たな内分泌治療薬になり得るか模索することが本研究の目的である。最終的にはアロマターゼ経路と

スルファターゼ経路の両方から総合的に子宮内膜癌局所のエストロゲン合成、代謝を検討し新たな内分泌療法を構築したい。子宮内膜癌局所のエストロゲン合成、代謝経路に癌細胞と間質細胞がどのように関わっているのか検証するために、Yamaguchi らが構築した共培養法を採用した(Yamaguchi Y. *et. al.* 2005)。共培養法とは細胞培養プレート内において上皮細胞と間質細胞を同時に培養する手法のことで、生体内の微小環境を再現する目的で構築された手法である。本研究では子宮内膜癌細胞株と間質細胞を共培養し、子宮内膜癌局所の微小環境を再現する。初めに、間質細胞と共培養した子宮内膜癌細胞株について酵素や受容体の発現を検討し、子宮内膜癌細胞株の単独培養と比較する。また、培養により合成された E2 や Adiol 産生量を測定する。そして、2 種類の基質(硫酸化エストロゲン: E1S + E2S、 硫酸化デハイドロエピアンドロステロン (DHEAS)) を用いて子宮内膜癌細胞株に対する STS 阻害剤とアロマターゼ阻害剤の細胞増殖抑制効果を比較検討する。

3. 研究の方法

(1) 試料

細胞株

茨城県霞ヶ浦病院の西田正人先生より分与された、子宮内膜癌細胞株 Ishikawa 細胞を使用した。

間質細胞

2011 年から 2012 年にかけて東北大学医学部産婦人科学教室にて子宮内膜癌と診断され外科的に摘出された子宮内膜癌組織 10 例から間質細胞を初代培養した。用いた子宮内膜癌組織は免疫組織学的に ER の発現を検討し本研究に相当であることを確認した。エストロゲン受容体には ER と ER が存在することが知られているが子宮内膜癌や正常子宮内膜においては ER 発現が優位であること、またエストロゲン作用は ER を介する経

路が主体であることが報告されているため、本研究においては ER のみの検討とした。共培養には Grade1(高分化型)、Grade2(中分化型)、Grade3(低分化型)を 1 症例ずつ検討した。本研究は東北大学大学院倫理委員会の承認を得ている(承認番号 2009-75)。

(2) 単独培養、共培養における ER、STS 発現およびホルモン産生量の検討

6 穴の細胞培養プレートに培養液を静置した後 Ishikawa 細胞を 6 穴の細胞培養用プレートの上段へ、間質細胞を下段へ播種し、これを共培養群とした。単独培養群は Ishikawa 細胞を 6 穴の細胞培養用プレートの上段へ播種した群とした。72 時間単独培養、もしくは共培養した後に単独培養群と共培養群から培養液を回収して E2 と Adiol 濃度を LC-MS/MS 法(液体クロマトグラフィー質量分析法)で測定し比較検討した。さらに単独培養群、共培養群それぞれの Ishikawa 細胞から RNA を抽出し Real-time quantitative RT-PCR にて ER、STS の mRNA 量を比較定量した。

(3) 細胞増殖試験

初めに単独培養した Ishikawa 細胞を 96 穴細胞培養用プレートに播種した。基質として E1S + E2S、DHEAS を添加し、STS 阻害剤として STX64、アロマターゼ阻害剤としてレトゾール、エキセメスタンを使用した。これら使用薬剤の濃度については全て過去の文献を参考に、臨床的に許容される濃度で施行した(Ishida H. *et. al.* 2007, 2008)。次に間質細胞と 72 時間共培養した Ishikawa 細胞を 96 穴細胞培養用プレートに播種し単独培養群と同条件で基質、阻害剤を添加した。細胞増殖試験については WST-8 法を用いて、Day6 と Day8 で測定した。本研究ではコントロールとしてエタノールを使用した。

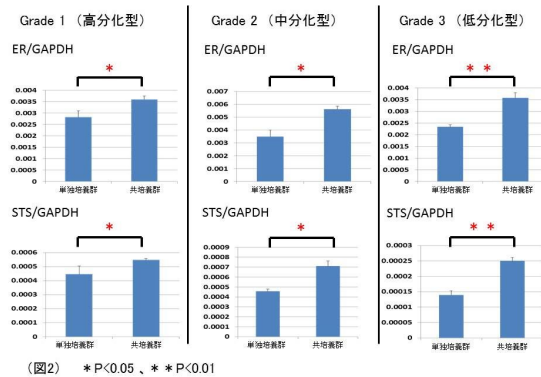
(4) 解析方法

2 群間の有意差検定は全て t 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした (JMP Pro 9 software program (SAS Institute Inc., Tokyo, Japan)).

4. 研究成果

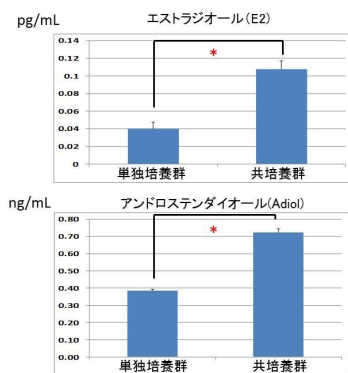
(1) 単独培養と共培養における ER、STS 発現およびホルモン産生量の比較検討

間質細胞の Grade1、Grade2、Grade3 の各症例と共培養した Ishikawa 細胞は、全てにおいて単独培養群と比較して ER と STS の mRNA 発現が有意に上昇した。(図 2)。



(図2) * P<0.05, ** P<0.01

さらに、E2、Adiol 産生濃度は単独培養群よりも共培養群において有意な上昇を認めた(図 3)。



(図3) * P<0.05

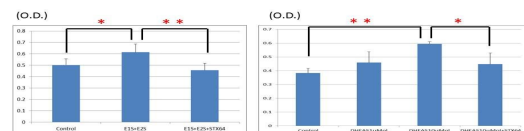
共培養することにより癌細胞と間質細胞との間で相互作用がおこり、単独培養群と比較して共培養群で ER、STS の mRNA レベルが高発現し、E2、Adiol の産生がともに有意な上昇を示したことは新しい知見であり、微小環境を再現する共培養法は非常に有用であ

ると考えられた。ただし、相互作用の要因について詳細な機序を検討するまでには至らなかった。子宮内膜癌においても FGF や EGF 含め様々な因子が腫瘍の増殖に関与しているとする報告があり (Wesche J. *et. al.* 2011, Ejskjaer K. *et. al.* 2007) これらの因子が共培養することにより過剰発現し相互作用に寄与した可能性があると考えられた。

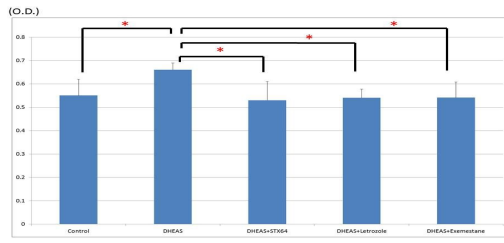
(2) 細胞増殖試験

単独培養での細胞増殖試験

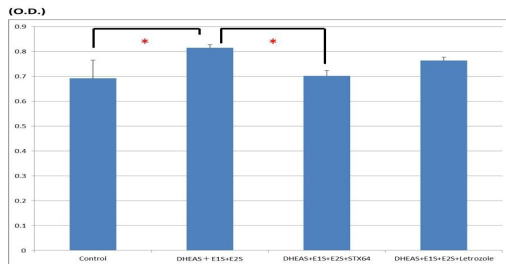
基質として E1S + E2S または DHEAS の添加により細胞増殖が引き起こされ、STS 阻害剤で細胞増殖が抑制されることを確認した(図 4)。また、基質として DHEAS、阻害剤として STS 阻害剤、アロマターゼ阻害剤を各々添加したところ、両剤で細胞増殖抑制効果を認め、その効果はほぼ同等であった(図 5)。次に基質として E1S + E2S と DHEAS を添加し、STS 阻害剤、アロマターゼ阻害剤を各々投与したところ、両剤で細胞増殖抑制効果を認めたものの、STS 阻害剤でのみ有意差を認めた(図 6)。基質が E1S + E2S の場合はスルファターゼ経路しか介さないが、DHEAS の場合スルファターゼ経路とアロマターゼ経路の両経路を介する。よって E1S + E2S と DHEAS を添加した場合、両経路とも阻害する STS 阻害剤のほうがより細胞増殖抑制効果を示した可能性がある。なお、この検討に用いた 2 剤のアロマターゼ阻害剤間で細胞増殖抑制効果は同等であったため、以後の検討においてはレトロゾールのみを使用した。



(図4) * P<0.05, ** P<0.01



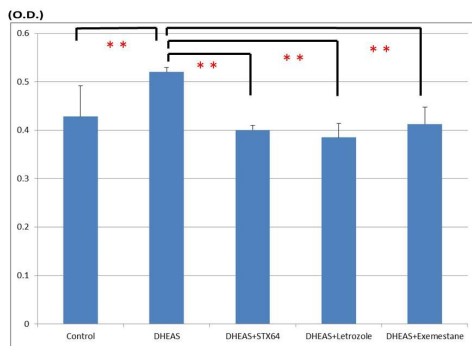
(図5) * P<0.05



(図6) * P<0.05

(2) 共培養後の細胞増殖試験

共培養群を用いて、基質はDHEASを、阻害剤としてSTS阻害剤、アロマターゼ阻害剤を各々投与したところ、単独培養時と比較してSTS阻害剤、アロマターゼ阻害剤ともにより強い細胞増殖抑制効果を認めた(図7)。



(図7) ** P<0.01

STS阻害剤とアロマターゼ阻害剤の間においては細胞増殖抑制効果に有意差は認めなかった。単独培養に比較して共培養の方がSTS阻害剤、アロマターゼ阻害剤共に著明な細胞増殖抑制効果を認めたのは、共培養によってSTSが高発現し癌細胞のSTS阻害剤に対する感受性が増強したためと推察された。

以上より、子宮内膜癌局所では癌細胞と間質細胞の相互作用があり、スルファターゼ経路、アロマターゼ経路を介したエストロゲン合成がダイナミックに行われている可能性が示唆された。さらにSTS阻害剤が単独培養、

共培養共に、そしてどの基質の組み合わせにおいても有意な細胞増殖効果を認めたことから、子宮内膜癌の新たな内分泌治療薬になる可能性が示唆された。また、生体内では基質としてE1S+E2S、DHEAS全てが供給されていると想定され、2種類の基質を添加した場合が最も生体内の微小環境に近いと考える。2種類を基質として添加した実験でアロマターゼ阻害剤よりもSTS阻害剤の方が有意な細胞増殖抑制を認めた。これは、STS阻害剤はE1S、E2Sからエストロゲンへの経路、DHEASからテストステロンを介してE2への経路、そしてDHEASからAdiolへの経路すべてを阻害するのに対して、アロマターゼ阻害剤はE1S、E2Sからエストロゲンへの経路、そしてDHEASからAdiolの経路を阻害しないためと推察された。よってin vivoにおいてもSTS阻害剤はアロマターゼ阻害剤よりも有用な可能性がある。しかし本研究では基質にコレステロールの代替物を添加しておらず、腫瘍局所でアロマターゼ経路が働く微小環境を再現できていない限界性があり、癌局所のエストロゲン合成におけるアロマターゼ経路の真の寄与度は本研究からは検討できない。今後は、より子宮内膜癌局所の微小環境を再現した共培養法、ならびに子宮内膜癌モデルマウスなどを使用して、子宮内膜癌局所におけるエストロゲン合成機序の解明をさらにすすめ、子宮内膜癌に有効な内分泌治療法の構築に貢献したい。

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2件)

Takano T, Niikura H, Ito K, Nagase S, Utsunomiya H, Otsuki T, Toyoshima M, Tokunaga H, Kaiho-Sakuma M, Shiga N, Nagai T, Tanaka S, Otsuki A, Kurosawa

H, Shigeta S, Yamaguchi T, Yaegashi N. Feasibility study of gemcitabine plus docetaxel in advanced or recurrent uterine leiomyosarcoma and undifferentiated endometrial sarcoma in Japan. *International Journal of Clinical Oncology*. 2014 査読有 ; 19(5):897-905.

doi:10.1007/s10147-013-0627-5.

Naomi Shiga, Masafumi Toyoshima, Jun-ichi Akahira, Satoru Nagase, Hitoshi Niikura, Nobuo Yaegashi. Carcinosarcoma of the uterine cervix with a clear cell adenocarcinoma component. *International Cancer Conference Journal*. 2013 査読有 ; 2(3):154-156. doi:10.1007/s13691-012-0080-8.

[学会発表](計4件)

西本光男、宇都宮裕貴、辻圭太、志賀尚美、鈴木史彦、永瀬智、伊藤潔、八重樫伸生 子宮内膜癌におけるエストロゲン合成・代謝機構の解明と新規内分泌療法の検討 2014年4月5日 第28回日本内分泌学会東北地方会 東北大学片平さくらホール(仙台市)

西本光男、宇都宮裕貴、志賀尚美、海法道子、鈴木史彦、徳永英樹、伊藤潔、八重樫伸生 子宮内膜癌における Steroid Sulfatase 阻害剤の有用性に関する検討 2013年9月7日 第61回北日本産科婦人科学会 旭川グランドホテル(北海道旭川市)

西本光男、宇都宮裕貴、志賀尚美、海法道子、鈴木史彦、徳永英樹、伊藤潔、八重樫伸生 子宮内膜癌における Steroid Sulfatase 阻害剤の有用性に関する検討 2013年5月10日 第65回日本産科婦人科学会 札幌プリンスホテル(札幌市)

西本光男、宇都宮裕貴、志賀尚美、山下泰恒、辻圭太、海法道子、鈴木史彦、徳永英樹、伊藤潔、八重樫伸生 子宮内膜癌における Steroid Sulfatase 阻害剤の有用性に関する検討 2012年11月17日 第25回日本内分泌学会東北地方会 フォーラムアキタ秋田県労働会館(秋田市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

志賀 尚美 (SHIGA, Naomi)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号:20595558

(2)研究協力者

伊藤 潔 (ITO, Kiyoshi)
宇都宮 裕貴 (UTSUNOMIYA, Hiroki)
西本 光男 (NISHIMOTO, Mitsuo)