

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10711

研究課題名(和文) 子宮内膜癌におけるSIRT1機能とSIRT1阻害薬の効果の検討

研究課題名(英文) Investigation of SIRT1-function and the effect of SIRT1 inhibitor in endometrial cancer

研究代表者

浅香 亮一 (Asaka, Ryoichi)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：00623688

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)：卵巣癌においてもSIRT1発現の増強が認められ、高発現症例では予後不良であった。抗がん剤による細胞障害性ストレスはSIRT1発現を増強させ、SIRT1発現抑制は抗がん剤耐性を減弱させ、SIRT1強制高発現は増強したことから、SIRT1はこれらの細胞障害性ストレスに対し、細胞の生存能を増強すると考えられた。SIRT1は軟寒天培地での足場非依存性コロニー形成促進、Nanogなどの幹細胞性遺伝子発現を増強し、幹細胞性維持に作用すると考えられ、この作用が生存能増強にも作用する可能性が考えられた。SIRT1阻害剤EX527はSIRT1による軟寒天コロニー形成を相殺し、シスプラチンの抗腫瘍効果を増強した。

研究成果の概要(英文)：SIRT1 expression was enhanced in ovarian cancer tissues and the patients with strong expression of SIRT1 showed a poor prognosis. Cytotoxic stress caused by anticancer drugs and hydrogen peroxide enhanced the SIRT1 expression, suppression of SIRT1 expression attenuated the resistance against anticancer agents and forced-expression of SIRT1 enhanced that. Thus, SIRT1 may enhance the cell viability against cytotoxic stress such as anticancer drugs. SIRT1 promoted anchorage-independent colonization in soft agar and enhanced the expression of stemness-related genes such as Nanog. Thus, SIRT1 may act on stem cell maintenance and this function may also be involved in enhancing cell viability by SIRT1. The SIRT1 inhibitor, EX527, canceled the anchorage-independent colonization promoted by SIRT1 and enhanced the antitumor effect of cisplatin.

研究分野：産婦人科学、婦人科腫瘍学

キーワード：SIRT1 サーチユイン 子宮内膜癌 卵巣癌 抗がん剤耐性 癌幹細胞 SIRT1阻害薬

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は、本邦で急速に増加しており、エストロゲンや肥満との関連が指摘されているが、依然として不明な点が多い。また、子宮内膜癌に対する分子標的薬剤は本研究開始時には存在せず、あらたな癌発生や病態の解明が急務である。そこで我々は新たな分子機構として、長寿遺伝子として近年注目されている SIRT1 に着目した。SIRT1 は NAD 依存性ヒストン脱アセチル化酵素であり、カロリー制限や様々なストレスによって活性化され、メタボリックシンドロームとの関連が注目されている。また、活性化した SIRT1 は DNA 修復、アポトーシス抑制等の作用により細胞を保護し、寿命を延長させると言われている。(Vaziri H. et al., 2001. Cell.) このような SIRT1 の作用は、癌細胞の生存にも有利に働く可能性がある。実際、いくつかの癌種で SIRT1 の高発現が報告されており (Huffman D.M., et al. 2007. Cancer Res.)、これらの癌細胞において SIRT1 が重要な役割を担っている可能性がある。さらに SIRT1 阻害薬は既にいくつか開発されており、中でも EX527 は SIRT1 と NAD の結合を阻害する選択性の高い SIRT1 阻害薬である。(Napper A.D., et al. 2005. J. Med. Chem.)

我々はこれまでに SIRT1 とその阻害薬の機能について子宮内膜癌において以下のことを見出している。(Asaka R., et al. 2015. Lab Invest.)

SIRT1 蛋白は正常組織よりも癌組織で発現が高く、高発現例では全生存期間が有意に短縮する。

増殖能は SIRT1 過剰発現で亢進し、SIRT1 阻害薬で低下する。

SIRT1 の増殖能亢進効果は PI3K 阻害薬、MEK 阻害薬で打ち消される。

抗癌剤投与後再発癌組織では SIRT1 蛋白発現が上昇している。

SIRT1 蛋白、mRNA の発現は低酸素、酸化ストレス、紫外線照射、抗癌剤暴露により上昇する。

抗癌剤耐性は SIRT1 抑制で減弱し、SIRT1 過剰発現で増強する。

SIRT1 抑制は p53 発現を増強し、アポトーシスを促進する。

SIRT1 阻害薬は in vivo で SIRT1 高発現の細胞株に対し抗腫瘍効果を示す。

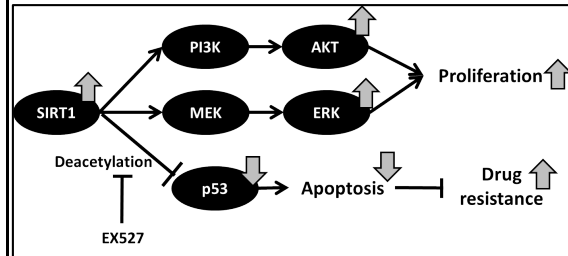
以上の我々の知見から SIRT1 の子宮内膜癌における作用として図 1 のような機序が示唆された。

2. 研究の目的

上記の背景をふまえて、本研究では子宮内膜症や子宮内膜癌、卵巣癌などの婦人科疾患、婦人科癌での SIRT1 が細胞生存や抗癌剤耐性に果たす機能の更なる追求と、SIRT1 阻害薬の分子標的薬剤としての有用性について検討することを目的とする。現在、子宮内膜癌の分子標的治療薬として mTOR 阻害剤も

検討されているが、SIRT1 はその上流を制御している可能性があり、SIRT1 阻害薬はより高い抗腫瘍効果を持つ可能性がある。

図 1: 我々の研究で示唆された子宮内膜癌で



の SIRT1 の作用経路の模式図。SIRT1 により増殖能が亢進し、アポトーシスが抑制され、抗癌剤耐性が増強する。

3. 研究の方法

子宮内膜癌で認められた SIRT1 高発現が癌種特異的である可能性があるため、正常卵巣 16 例、卵巣子宮内膜症 (OEM) 35 例、卵巣癌 68 例 (類内膜癌 16 例、明細胞癌 20 例、粘液性癌 16 例、漿液性癌 16 例) の摘出ホルマリン固定組織検体を用いて抗 SIRT1 抗体による免疫組織染色を行った。染色強度 (0=染色なし、1=弱陽性、2=強陽性) と染色範囲 (1=25% 未満、2=26-50%、3=51-75%、4=76% 以上) を定量し、両者を乗ずることにより免疫染色スコア (0-8) を算出した。スコア 0-5 の群を低 SIRT1 群、スコア 6-8 の群を高 SIRT1 群とし、両者の予後について検討した。また、組織型ごとの SIRT1 発現の検討を行った。

不死化卵巣表層上皮細胞 OSE7E および卵巣癌細胞株 11 株 (TOV112D, ES2, RMG1, TOV12G, A2780CDDp, A2780, SKOV-3, CAOV-3, OVCAR-3, IGROV-1, PA-1) に対し、ウエスタンブロット法、real-time RT-PCR 法により SIRT1 発現を検討した。

ES2 細胞をシスプラチン (CDDP) もしくは過酸化水素添加下に培養し、SIRT1 mRNA 発現を real time RT-PCR 法で検討した。

RMG1、A2780CDDP、TOV21G、ES2 細胞に対し shRNA 法で SIRT1 発現を抑制、SIRT1 cDNA 遺伝子導入で SIRT1 を強制発現させ、増殖能の変化と CDDP、パクリタキセルに対する耐性の変化を検討した。またアポトーシスした細胞の差を検討した。

ES2 細胞株に SIRT1 を強制発現させた ES2-SIRT1 細胞株を作成し、ソフトアガー培地にてコロニー形成能の変化を検討し、マトリゲルを用いて浸潤能の変化を検討した。また、両者の幹細胞関連遺伝子 (Oct4, Nanog, Lin28, Sox2, Smo, Bmi-1) の mRNA 発現量を検討した。

子宮内膜癌細胞株 (HHUA, ISHIKAWA, HEC151) 細胞を使用し、選択的 SIRT1 阻害薬である EX527 と CDDP の併用による相乗効果の検討を行った。

4. 研究成果

卵巣癌組織型による SIRT1 染色スコア (図 2) では漿液性癌を除く組織型でいずれも正常卵巣上皮よりも有意に上昇した。(P<0.05) また、OEM において癌を伴う場合に正常卵巣上皮に比べて有意にスコアが上昇した (P<0.01)。高 SIRT1 群と低 SIRT1 群では高 SIRT1 群で有意に全生存率が低下した。(図 3、A) この結果は SIRT1 発現の比較的低い漿液性癌を除いた場合 (図 3、B) においても同様であった。

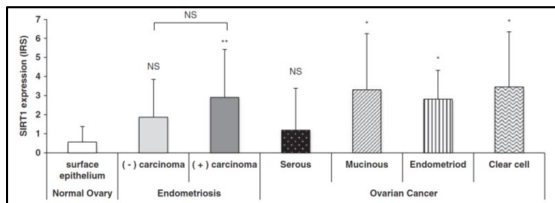


図 2: 卵巣正常上皮、子宮内膜症、卵巣癌における SIRT1 染色スコア (David MH., et al. 2017. App Immunohistochem Mol Morphol.)

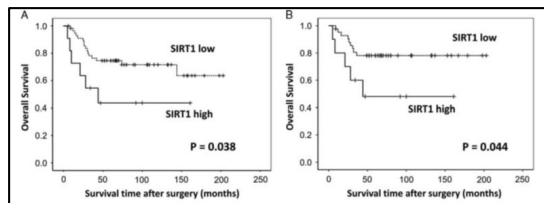


図 3: 卵巣癌における SIRT1 発現と累積全生存率 (Kaplan-Meier 法)。A: 全症例、B: 漿液性癌を除いた症例。(David MH., et al. 2017. App Immunohistochem Mol Morphol.)

OSE7E 及び卵巣癌細胞株での SIRT1 発現 (図 4) ではすべての卵巣癌細胞株が OSE7E に比べて蛋白、mRNA ともに発現が上昇していた。このうち比較的低発現の低い ES2、TOV21G、発現の高い RMG1、A2780CDDP をこの後の検討に使用した。

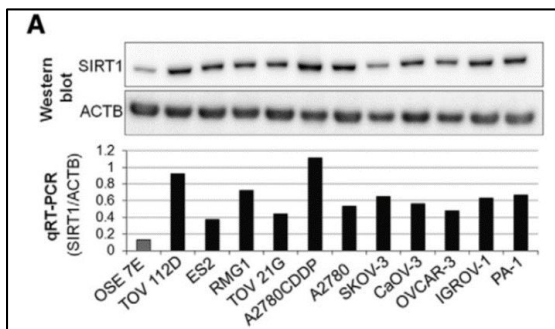


図 4: 不死化卵巣表層上皮細胞 OSE7E および卵巣癌細胞株における SIRT1 発現。(David MH., et al. 2017. Transl Oncol.)

卵巣癌細胞株 ES2 に対して CDDP、過酸化水素を添加して培養を行い、SIRT1 mRNA 発現変化を時間、濃度で検討した結果、両者ともに濃度、時間依存的に SIRT1 mRNA の発現量が上昇した (図 5)。細胞障害性ストレスにより SIRT1 が誘導されることが示唆された。

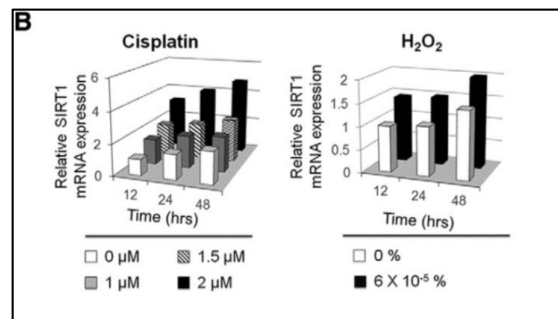


図 5: ES2 細胞での CDDP、過酸化水素添加による SIRT1 mRNA の発現の変化。(David MH., et al. 2017. Transl Oncol.)

RMG1、A2780CDDP、TOV21G、ES2 細胞に対し shRNA にて SIRT1 発現を抑制、SIRT1 cDNA を遺伝子導入し、SIRT1 を強制発現させ、増殖能の変化を WST-1 アッセイで検討した (図 6)。いずれの細胞株でも SIRT1 抑制で増殖抑制されたが、SIRT1 強制発現では増殖に差はみられなかった。

一方、抗がん剤 CDDP、パクリタキセルに対する耐性は、SIRT1 抑制で低下し、強制発現で増強した (図 7)。

ES2、A2780CDDP において SIRT1 抑制で CDDP 投与によるアポトーシス細胞が増加し、強制発現で減少する傾向にあった (図 8)。

これらのことから、SIRT1 はアポトーシスを抑制し、抗がん剤耐性を増強すると考えられた。

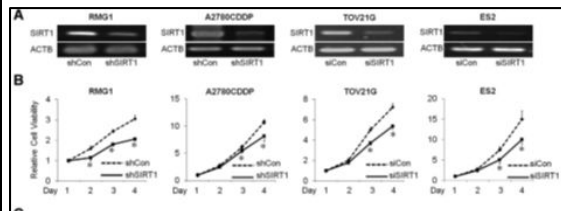


図 6: 各細胞株での SIRT1 発現抑制での増殖能の変化。WST-1 アッセイ。(David MH., et al. 2017. Transl Oncol.)

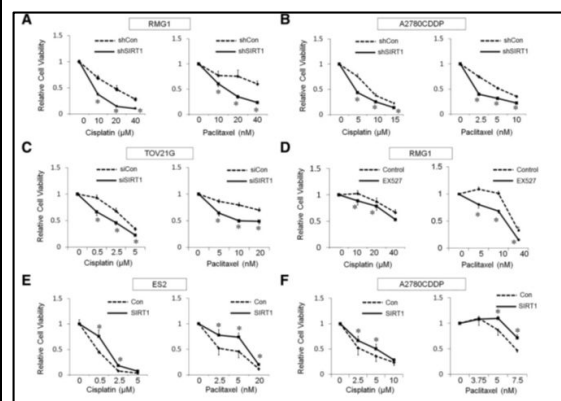


図 7: 各細胞株での SIRT1 発現抑制、強制発現での CDDP、パクリタキセルに対する耐性の変化。WST-1 アッセイ。(David MH., et al. 2017. Transl Oncol.)

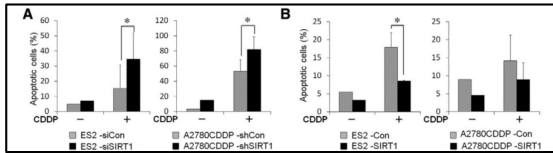


図 8 : ES2、A2780 CDDP 細胞における CDDP 投与下でのアポトーシス細胞の割合。 (David MH., et al. 2017. Transl Oncol.)

SIRT1 が癌幹細胞性に与える影響について検討した。ES2 細胞で SIRT1 強制発現により、軟寒天培地での足場非依存性コロニー形成は増加し、SIRT1 阻害薬添加でこの効果は減弱した (図 9)。

次に SIRT1 強制発現 ES2 細胞では対照 ES2 細胞と比較して、幹細胞性を示す Nanog, LIN28, Sox2, smo, Bmi-1 の mRNA のレベルの上昇がみられた (図 10)。

これらの結果から、SIRT1 は癌幹細胞性維持に作用している可能性が考えられ、このことが抗がん剤耐性増強にも作用している可能性が考えられた。

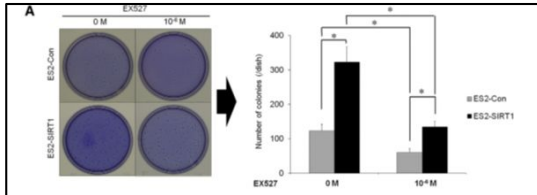


図 9 : ソフトアガー培地を使用したコロニー形成能の検討 (David MH., et al. 2017. Transl Oncol.)

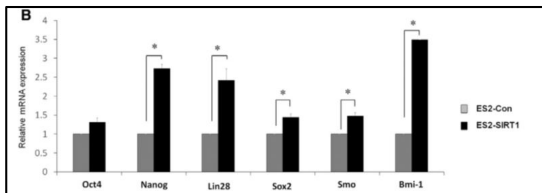


図 10 : SIRT1 強制発現 ES2 細胞における幹細胞性遺伝子発現の変化。 qRT-PCR 法。 (David MH., et al. 2017. Transl Oncol.)

子宮内膜癌細胞株 ISHIKAWA, HHUA, HEC151 細胞で CDDP と SIRT1 阻害薬の併用効果につき検討した (図 11)。CDDP 2.5 μM 投与し、それぞれコントロールとして DMFA と、EX527 10 μM を投与した。結果すべての細胞株で CDDP 単剤よりも EX527 併用で、抗腫瘍効果の増強を認めた。EX527 は細胞障害性の薬剤との併用で相乗効果が期待できると考えられた。

以上をまとめると、

卵巣癌においても SIRT1 発現の増強が認められ、高発現症例では予後不良であった。

SIRT1 はアポトーシスを抑制して抗がん剤耐性を増強するが、その作用には、SIRT1 による癌幹細胞性維持機構が作用している可能性が考えられた。

SIRT1 阻害剤 EX527 は CDDP の抗腫瘍効果を増強する可能性が考えられた。

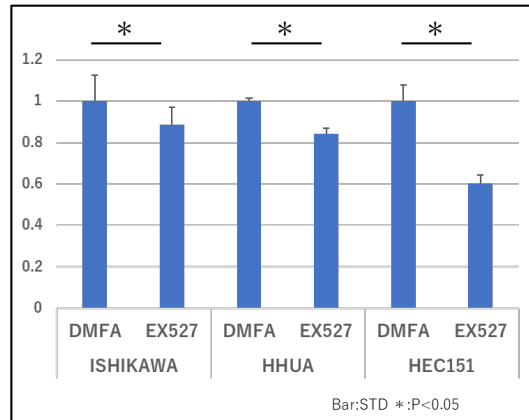


図 11 : シスプラチン 2.5 μM と EX527 10 μM の併用効果の検討。 WST-1 アッセイ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- [1] 宮本 強、塩沢 丹里 .【婦人科がん(第 2 版)-最新の研究動向-】子宮体がん 子宮体癌の発生 子宮体癌の発がん機構 . 日本臨床(査読なし) 2018 年 76 巻増刊 2 婦人科がん Page378-383
- [2] 宮本 強、塩沢 丹里 .【婦人科がんの予防 update】女性ホルモン製剤とがんの発生リスク . 産婦人科の実際(査読なし) 2017 年 66 巻 12 号 Page1685-1690
- [3] Mvunta DH, Miyamoto T, Asaka R, Yamada Y, Ando H, Higuchi S, Ida K, Kashima H, Shiozawa T. Overexpression of SIRT1 is Associated With Poor Outcomes in Patients With Ovarian Carcinoma. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 査読有 2017; Vol. 25(6):415-421.
- [4] 鹿島 大靖, 宮本 強, 塩沢 丹里【黄体ホルモン up to date】内膜増殖症・子宮体癌と黄体ホルモン . 産婦人科の実際(査読なし) 2017 年 66 巻 5 号 Page601-606
- [5] Ando H, Miyamoto T, Kashima H, Higuchi S, Ida K, Mvunta DH, Shiozawa T. Panobinostat Enhances Growth Suppressive Effects of Progestin on Endometrial Carcinoma by Increasing Progesterone Receptor and Mitogen-Inducible Gene-6. Horm Cancer. 査読有 2017; Vol. 8(4): 257-267.
- [6] Mvunta DH, Miyamoto T, Asaka R, Yamada Y, Ando H, Higuchi S, Ida K, Kashima H, Shiozawa T. SIRT1 Regulates the Chemoresistance and Invasiveness of Ovarian Carcinoma Cells. Transl Oncol. 査読有 2017; Vol. 10(4):621-631.
- [7] Ando H, Miyamoto T, Kashima H, Takatsu A, Ishii K, Fujinaga Y, Shiozawa T. Usefulness of a management protocol for patients with cervical

multicystic lesions: A retrospective analysis of 94 cases and the significance of GNAS mutation. J Obstet Gynaecol Res. 査読有 2016; Vol.42(11):1588-1598.

- [8] Yamada Y, Miyamoto T, Kashima H, Kobara H, Asaka R, Ando H, Higuchi S, Ida K, Shiozawa T. Lipocalin 2 attenuates iron-related oxidative stress and prolongs the survival of ovarian clear cell carcinoma cells by up-regulating the CD44 variant. Free Radic Res. 査読有 2016; Vol.50(4):414-25.
- [9] Asaka R, Miyamoto T, Yamada Y, Ando H, Mvunta DH, Kobara H, Shiozawa T. Sirtuin 1 promotes the growth and cisplatin resistance of endometrial carcinoma cells: a novel therapeutic target. Lab Invest. 査読有 2015; Vol.95(12):1363-73.

〔学会発表〕(計2件)

- [1] 浅香 亮一, 井田 耕一, 樋口 正太郎, 安藤 大史, 鹿島 大靖, 宮本 強, 塩沢 丹里 マウスモデルにおいて高濃度の血中エストロゲンは子宮内膜癌の発生を抑制する 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会 2017 年
- [2] Mvunta DH, Miyamoto T, Asaka R, Ando H, Yamada Y, Higuchi S, Ida K, Kobara H, Kashima H, Shiozawa T. SIRT1 plays a role in the acquisition of aggressiveness and chemo-resistance of ovarian carcinoma cells. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅香 亮一 (ASAKA RYOICHI)
信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教
研究者番号：00623688

(2)研究分担者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA TANRI)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：20235493

宮本 強 (MIYAMOTO TSUTOMU)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号：70418721