

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20212

研究課題名(和文)日本人における妊娠関連乳癌の病態解明と抗老化因子SIRT1の果たす役割の解明

研究課題名(英文)An analysis of SIRT1 in the pathophysiology of pregnancy associated breast cancer

研究代表者

平池 春子(Hiraike, Haruko)

帝京大学・公私立大学の部局等・講師

研究者番号：30771258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、進捗状況から当初予定を変更し、ヒトグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) アナログ・リラグルチドを用いて、子宮体癌細胞株に対する生理的影響と、GLP-1受容体の子宮体癌における病態的意義を検討した。リラグルチドはヒト子宮体癌培養細胞株Ishikawaの細胞増殖を抑制したが、オートファジーを誘導しかつ細胞死をもたらすことが明らかとなった。子宮体癌病理組織においてGLP-1受容体が高いと無増悪進展期間が延長するため、子宮体癌におけるGLP-1受容体の病的意義とリラグルチドが糖尿病またはインスリン抵抗性があるような子宮体癌症例に対するアジュバント療法としての臨床応用への基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：The pathophysiological role of glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) in endometrial cancer has not been fully elucidated. Here, we investigated the effects of the GLP-1R agonist liraglutide in endometrial cancer cells and examined the association between GLP-1R expression and clinicopathological characteristics in endometrial cancer patients. Liraglutide dose dependently suppressed the cellular growth of Ishikawa endometrial cancer cells and the effect was turned out to be the induction of autophagy and subsequent cell death. Immunohistochemical analysis revealed that GLP-1R expression was associated with positive estrogen and progesterone receptor status, and higher GLP-1R expression was significantly correlated with better progression-free survival. The use of liraglutide to target autophagy in endometrial cancer cells may be a novel potential treatment for endometrial cancer; and higher GLP-1R expression may be associated with better prognosis in endometrial cancer patients.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮 糖代謝 オートファジー インクレチン GLP-1受容体

1. 研究開始当初の背景

本研究は、当初妊娠関連乳癌 (pregnancy associated breast cancer: PABC) に関する検討をおこなうことを予定していた。PABC は妊娠期間中または分娩後 1 年以内に診断される乳癌と定義され、初婚年齢の上昇と社会環境の変化から妊娠・出産が高年齢化している現在の社会状況を考えると、今後 PABC の発生頻度は確実に増加するものと見込まれるため、PABC に罹患した患者の検体を用いて免疫組織化学染色を行ないサブタイピングすることと、本申請者がこれまでの研究で明らかにしてきた SIRT1 および DBC1 の PABC における生物学的役割と予後との関連を明らかにすることで、PABC の分子細胞生物学的性格を明らかにすること、両者の発現が PABC の予後とどのように関連するかについて検討することを本研究の主要な目的としていた。しかし本研究の柱であった胎盤組織の初代培養がうまくいかないことから、同じホルモン依存性疾患である子宮体癌の研究内容にするよう変更して研究を継続することとした。

子宮体癌は婦人科悪性腫瘍の中で最も発症頻度が高く、近年の社会傾向から考えても今後さらなる罹患頻度の上昇が危惧される。また生活様式の変遷により日本人における糖尿病の頻度は増加の一途を辿っている。近年 II 型糖尿病治療標的として近年ヒトグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) アナログが臨床応用されるようになった。リラグルチドは、血糖値の高い場合にのみインスリン分泌効果等を発揮し、臨床的に有意な血糖降下作用を示す。リラグルチドが各種癌細胞種においてを用いて、子宮体癌細胞株に対する生理的影響と、GLP-1 受容体の子宮体癌における病態的意義を検討した。

2. 研究の目的

本研究は、子宮体癌培養細胞株 Ishikawa 細胞を用いて GLP-1 受容体の子宮体癌における病態的意義を検討することを目指した。GLP-1 受容体アゴニストであるリラグルチドを用いて、リラグルチドの抗腫瘍効果の有無を検討することとした。また子宮体癌手術検体における GLP-1 受容体発現状態を検討することで、リラグルチドの臨床応用の可能性も検討した。

3. 研究の方法

(1.) 以下の手法で検討をおこなった。ヒト子宮体癌培養細胞株 Ishikawa および子宮体癌患者における GLP-1 受容体発現と、GLP-1 受容体アゴニストの効果に関する検討

Ishikawa 細胞を含む代表的な子宮体癌培養細胞株においてウェスタンブロット法をおこなうことで GLP-1 受容体の存在を検討した。

(2.) GLP-1 受容体アゴニストであるリラグルチドによる細胞増殖抑制メカニズムの解明

既報によると膀胱癌細胞株 X はリラグルチドにより細胞増殖能が抑制されることが知られている。またリラグルチドと同じ GLP-1 受容体アゴニストであるエキセナチドが子宮体癌培養細胞株に対し抗腫瘍効果をもつことが報告されていたことから、本研究においてはリラグルチドの抗腫瘍効果を見ることとした。細胞増殖抑制効果については MTT アッセイをおこなった。またコロニー形成アッセイをおこなうことで、長期投与におけるリラグルチドの効果をも検討することとした。

リラグルチドも含めた GLP-1 受容体アゴニストがどのようなメカニズムで抗腫瘍効果を持つかという点については既報では検討が不十分であったため、細胞内糖レベルのマスター制御因子である AMPK に着目し AMPK のリン酸化状態をウェスタンブロット法で検討した。また、細胞内オートファジー状態を検討するため LC3 および p62 レベルをウェスタンブロット法で検討した。細胞のオートファゴソーム集積はオートファジーが起きているかどうかの指標であるため、リラグルチドを投与した培養細胞に対し傾向免疫染色法をおこなった。

(3.) GLP-1 受容体の子宮体癌における病態的意義

当院で子宮体癌の手術を受けた 154 名の手術時検体は既に tissue microarray の状態にしてあった。この検体を用いて、GLP-1 受容体発現と年齢、病期、筋層浸潤、リンパ節および遠隔転移、BMI、脂質異常症、糖尿病などの有無、ホルモン受容体 (エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体)、p53 および PTEN 変異などの臨床的パラメーターとの関連を検討した。本検討をおこなうにあたり患者から同意を得ており、当院における IRB 承認を得ている。

4. 研究成果

(1.) ヒト子宮体癌培養細胞株 Ishikawa および子宮体癌患者における GLP-1 受容体発現と、GLP-1 受容体アゴニストの効果に関する検討

予備実験として、Ishikawa、HEC1B、RL95-2 など代表的な子宮体癌培養細胞株においてウェスタンブロット法をおこなったところ、いずれも GLP-1 受容体の発現を認めた。これら細胞株において、本研究はホルモン受容体陽性子宮体癌における検討をおこなうこととしたため、以降培養細胞としては Ishikawa 細胞を用いた。Ishikawa 細胞にリラグルチドを control, 10 nM, 100 nM, 1000 nM で 96 時間処理したところ、濃度依存性の GLP-1 受容体発現増加を認めた。

(2.) リラグルチドによる細胞増殖抑制メカニズムの解明

細胞増殖抑制効果については MTT アッセイをおこなった。Ishikawa 細胞にリラグルチドを control, 10 nM, 100 nM, 1000 nM で 96 時間処理したところ、cell viability は濃度依存性に低下した。また長期投与におけるリラグルチドの効果を検討するためコロニー形成アッセイをおこなった。Ishikawa 細胞にリラグルチドを control, 10 nM, 100 nM, 1000 nM で処理し、10 日間曝露したが、MTT アッセイと一致して濃度依存性にコロニー数の減少を認めた。

リラグルチドがどのようなメカニズムで抗腫瘍効果を持つかという点について検討するため、細胞内糖レベルのマスター制御因子である AMPK に着目し AMPK のリン酸化状態をウェスタンブロット法で検討した。また、細胞内オートファジー状態を検討するため LC3 および p62 レベルをウェスタンブロット法で検討した。Ishikawa 細胞をリラグルチド control, 10 nM, 100 nM, 1000 nM で処理したところ、リン酸化 AMPK 発現は濃度依存性に上昇した。また LC3 発現も同様に上昇したが、p62 発現は低下したため、リラグルチドは AMPK 経路の活性化を引き起こすことで細胞のオートファジーを誘導することが明らかとなった。細胞のオートファゴソーム集積はオートファジーが起きているかどうかの指標であるため、リラグルチドを投与した培養細胞に対し蛍光免疫染色法をおこなった。Positive control として AICAR を用いたが、リラグルチドはそれ単独および AICAR の存在下いずれの条件においてもオートファゴソームの集積を促進した。フローサイトメーターを用いて細胞動態を更に検討したところ、リラグルチド 1000 nM + AICAR 1 nM 処理により早期細胞死分画が増加しており、リラグルチドにより S 期の停止が生じていることも判明した。

(3.) GLP-1 受容体の子宮体癌における病態的意義

まず、正常子宮における GLP-1 受容体の存在を免疫組織化学染色法にて確認したところ、子宮内膜上皮、間質の細胞質において GLP-1 受容体の発現を認めた。月経周期における変化は検討していない。癌組織における GLP-1 受容体発現は Allred score 法にて評価した。当院で子宮体癌の手術を受けた 154 名の手術時検体は既に tissue microarray の状態にしてあった。この検体を用いて、GLP-1 受容体発現と年齢、病期、筋層浸潤、リンパ節および遠隔転移、BMI、脂質異常症、糖尿病などの有無、ホルモン受容体（エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体）、p53 および PTEN 変異などの臨床的パラメーターとの相関を検討した。本検討をおこなうにあたり患者から同意を得ており、当院における IRB 承認を得ている。GLP-1 受容体低発現群は 12.3% (19/154)、高発現群は 87.7% (135/154)

においてみられた。19 例の GLP-1 受容体低発現群において 52.6% (10/19) は GLP-1 受容体発現をほとんど認めなかった。Kaplan–Meier 法により生存曲線を評価したが、検討対象のうち 25 例は原病死、32 は再発を認めていた。GLP-1 受容体発現と全生存率 (OS) については特に関係を認めず、無増悪進展期間 (PFS) は GLP-1 受容体発現が高い方が長いことが明らかとなった。また、GLP-1 受容体発現は子宮体癌分化状態、grade、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体などに関連することが明らかとなった。

GLP-1 受容体発現は低分化群 90.8%、組織学的低 grade 群 76.4%

本研究により GLP-1 受容体の子宮体癌における意義が明らかとなった。GLP-1 受容体は子宮体癌の予後規定因子として有用なバイオマーカーとなり得ることを示し、リラグルチドと同じ糖尿病治療薬であるメトフォルミンが抗腫瘍的効果があることを考慮すると、今後リラグルチドが子宮体癌のアジュバント療法として検討され得る基盤を構築することが本研究により達成された。

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 4 件)

1. Effects of gaps in priorities between ideal and real lives on psychological burnout among academic faculty members at a medical university in Japan: a cross-sectional study.
Chatani Y, Nomura K, Horie S, Takemoto K, Takeuchi M, Sasamori Y, Takenoshita S, Murakami A, Hiraike H, Okinaga H, Smith D.
Environ Health Prev Med. 2017; 22: 32.
doi: 10.1186/s12199-017-0626-7.
2. Impact of macroprolactin on galactorrhea and the rate of patients possibly affected by macroprolactin.
Aisaka K, Tsuchiya F, Sueta M, Itabashi K, Nose S, Hasegawa A, Obata S, Hiraike H, Yokoyama T.
Endocr J. 2018; 65: 203-211.
doi: 10.1507/endocrj.EJ17-0358.
3. Organizational climate with gender equity and burnout among university academics in Japan.
Taka F, Nomura K, Horie S, Takemoto K, Takeuchi M, Takenoshita S, Murakami A, Hiraike H, Okinaga H, Smith DR.
Ind Health. 2016; 54: 480-487.
4. Loss of the cell polarity determinant human Discs-large is a novel molecular marker of

nodal involvement and poor prognosis in endometrial cancer.

Sugihara T, Nakagawa S, Sasajima Y, Ichinose T, Hiraike H, Kondo F, Uozaki H, Fukusato T, Ayabe T.

Br J Cancer. 2016; 114: 1012-8.

doi: 10.1038/bjc.2016.24.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Macroprolactin 血症の臨床的背景と PCOS との関係
板橋香奈、土屋富士子、末田雅美、竹原也恵、長谷川亜希子、秋山純子、木村好秀、合阪幸三、小畑清一郎、平池春子
第 70 回日本産科婦人科学会学術集会 (2018 年 5 月 仙台)
2. 結腸癌術後経過観察中に卵巣奇形腫が小腸に穿通し、同部位に結腸癌の血行性転移を認めた 1 例
中川一平、長屋陽平、小池良子、神田蘭花、岸本倫太郎、一瀬隆行、平池春子、松本泰弘、末永昭彦、梁栄治、綾部琢也
第 70 回日本産科婦人科学会学術集会 (2018 年 5 月 仙台)
3. Pregnancy outcomes of MD twins
Miki Nishizawa, Koichiro Kido, Rina Sakurai, Takayuki Ichinose, Shigenari Namai, Rintaro Kishimoto, Yasuhiro Matsumoto, Haruko Hiraike, Masahiro Shiba, Yukifumi Sasamori, Eiji Ryo, Takuya Ayabe
第 70 回日本産科婦人科学会学術集会 (2018 年 5 月 仙台)
4. Pregnant women with low TSH and normal FT4 in early pregnancy may have relatively low risk of preterm delivery
Masahiro Shiba, Koichiro Kido, Youhei Nagaya, Michiharu Seto, Rina Sakurai, Shigenari Namai, Rintaro Kishimoto, Haruko Hiraike, Yasuhiro Matsumoto, Yukifumi Sasamori, Eiji Ryo, Takuya Ayabe
第 70 回日本産科婦人科学会学術集会 (2018 年 5 月 仙台)
5. The expression of glucagon-like peptide-1 receptor could be a novel biomarker of endometrial cancer possibly by stimulating autophagy via AMPK signaling pathway
Ranka Kanda, Haruko Hiraike, Yasuhiro Matsumoto, Yuko Sasajima, Kazunori Nagasaka, Osamu Hiraike, Eiji Ryo, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii, Takuya Ayabe
第 70 回日本産科婦人科学会学術集会 (2018 年 5 月 仙台)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

平池 春子 (HIRAIKE Haruko)

帝京大学・国際教育研究所・講師

研究者番号：30771258

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

神田 蘭花 (KANDA Ranka)

帝京大学・産婦人科学講座・助手