

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16862

研究課題名(和文) 子宮体癌の新規内分泌療法を目的としたエストロゲン関連受容体のリガンド同定

研究課題名(英文) To Identify the ligands of estrogen related receptor aiming new hormonal therapy for uterine endometrial cancer

研究代表者

松島 洋 (MATSUSHIMA, HIROSHI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・学内講師

研究者番号：30785548

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)：本研究の目的は、オーファン受容体であるERRのリガンドを同定/作成し、ERRの系を介した分子機序を解明、新規内分泌治療戦略を確立することである。子宮体癌細胞株に対して、既知のERRの inverse agonistであるXCT790が、ERR抑制を介した抗腫瘍効果を有すること、およびそのin vitroでの機序を示した。また、同様の効果がin vivoでも得られ、アポトーシスの促進と血管新生抑制が関与していることを示した。これらの結果は、XCT790の子宮体癌に対するERRを介した抗腫瘍効果として報告した(Cell Oncol. 2019, Kokabu, Matsushima et al.)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮体癌は手術療法により比較的良好な経過をたどる。しかし、切除不能の進行/再発症例に対する有効な治療法は未だ確立されていない。また、近年のライフスタイルの変化によって出産年齢の高齢化が加速しており、妊孕能温存を希望する担癌患者は急増しているが、子宮温存治療の適応は極めて限定される。本研究の課題であるERR経路を標的とした系は、子宮体癌に対する切除不能症例や妊孕能温存希望症例に対する新たな治療法開発への突破口となりうる。本研究で得られた、ERR経路を介した子宮体癌における分子機序や同定されたリガンドは、婦人科分野や癌領域のみならず、包括的な生理学的作用機序を理解する上で重要なツールとなり得る。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to identify or create a ligand for ERR, an orphan receptor, elucidate the molecular mechanism through the ERR system, and establish a novel endocrine therapeutic strategy. We showed the antitumor effect of XCT790, a known inverse agonist of ERR, mediated by ERR to endometrial cancer cell lines, and its mechanism in vitro. In addition, the effects were also obtained in vivo, indicating that promotion of apoptosis and inhibition of angiogenesis are involved. These results were reported as an antitumor effect of XCT790 on endometrial cancer via ERR (Cell Oncol. 2019, Kokabu, Matsushima et al.).

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮体癌 ERR XCT790

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

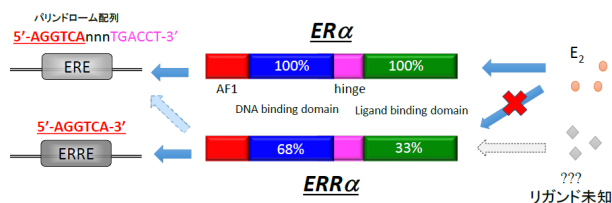
1. 研究開始当初の背景

子宮体癌の患者数は急激に増加している。特に子宮外病変を伴う III/IV 期の進行例や再発例が増加しているが、有効な治療法はなく予後不良である。また一方、初期例は比較的予後良好のものが多く、治療の原則は子宮および卵巣摘出術であり、将来的な妊娠を断念せざるをえない。また、内膜に限局に病変に対してのみ古くから酢酸メドロキシプロゲステロン療法が行われているが、高い再発率が問題となっている。このように、子宮体癌に対する新たな治療戦略が強く求められている。

子宮体癌の腫瘍学的特徴で最も重要な点はホルモン依存性であり、その増殖や発癌にエストロゲンやプロゲステロンが深く関与する。エストロゲンはエストロゲン受容体 (ER) と結合してプロモーター上のエストロゲン応答配列を認識することで様々な遺伝子の転写を制御する。乳癌ではエストロゲン受容体拮抗剤やエストロゲン生合成酵素 (アロマターゼ) 阻害剤が広く用いられるのに対して子宮体癌ではその有用性は確立されておらず、より複雑なエストロゲン伝達経路の存在がうかがわれる。

エストロゲン関連受容体 (ERR) は ER と非常によく似た構造を有するが、エストロゲンのような強力なリガンドを持たないオーファン核内受容体として知られている (図 1)。われわれは ERR に以前より注目し、子宮体癌におけるその発現や機能について明らかにしてきた。研究代表者らは ERR α ノックダウンが子宮体癌 (HEC-1A、KLE 細胞) における細胞増殖を抑制し、G2/M 期 arrest から caspase-3 依存性アポトーシスを強力に誘導させることを明らかにした。また浸潤能遊走能を低下させるだけでなく、VEGF を介した血管新生も制御した。同じ G2/M 期 arrest よりアポトーシスを引き起こすパクリタキセルとの併用で増感効果を示した。さらにマウスの腫瘍形成能を抑制させることを示した。以上より、子宮体癌において ERR α を介する経路が治療標的となりうると期待できる (業績 #1 Matsushima H, et al. *Oncotarget* 2016, in press)。

図 1 ERR と ER の構造とリガンド



ERR はオーファン核内受容体として知られ、今のところリガンドは同定されていない。代表的なリガンド候補とされている薬剤はタモキシフェン (TAM)、ジエチルスチルベストロール (DES)、genistein や daidzein (大豆イソフラボン) であり、いずれもエストロゲン受容体に対する作用を有することは ERR を介した新たなエストロゲン伝達経路の関与が示唆され、興味深い。また、ERR の結合領域とされる ERE、ERRE を有するルシフェラーゼアッセイを樹立し、これによって低分子化合物薬剤ライブラリーをスクリーニングし、ERR α 抑制能を有する新たな低分子化合物が同定できる。これらの薬剤を用いてその抗腫瘍能、抗浸潤・遊走能、アポトーシス誘導能、抗がん剤増感のメカニズムを明らかにし、ERR α をターゲットとした新たな治療法の開発を目指した。

2. 研究の目的

子宮体癌の増加に伴い、進行/再発などの予後不良例や妊娠能温存希望例が激増している。分子標的薬が試行されてきたがいずれも十分な結果が得られず、ホルモン依存性である特徴を生かした新たな治療戦略が求められている。われわれはオーファン核内受容体であるエストロゲン関連受容体 (ERR) が子宮体癌における腫瘍増殖・浸潤転移・血管新生・アポトーシス誘導を強力に抑制していることを報告した (Matsushima et al. *Oncotarget*, 2016)。本研究課題では、ERR を標的とした新規内分泌療法の開発を目的として、ハイスループットスクリーニング法や立体構造解析からドラッグデザインを行うことにより、ERR のリガンドを同定または作製を目的とした。

3. 研究の方法

既知のリガンド候補化合物の ERR 経路制御に及ぼす作用機序の解明：TAM、DES、イソフラボン類他の ERR に対するリガンドとしての作用を検証する。低分子化合物ライブラリーを用いたリガンドの同定：ハイスループットスクリーニング法を用いて ERR のリガンドとなりうる低分子化合物を同定する。立体構造解析からのドラッグデザイン：ERR リガンド結合ドメインの立体構造解析からドラッグデザインを行う。

同定/作製した化合物の抗腫瘍効果の検討：同定/作製した各化合物の抗腫瘍効果を明らかにし、臨床応用の可能性を検討する。

4. 研究成果

平成29年度の計画は、まず既知のリガンド候補として明らかになっている化合物を用いて、そのERRを介した特性や機能を評価すること、ERR抑制で引き起こされる細胞増殖抑制やアポトーシス誘導におけるシグナル伝達経路の解明である。XCT790は既知のERRの inverse agonist であり、その子宮体癌のERRのシグナル系に対する作用機序は不明であった。今回このXCT790の子宮体癌細胞株 (HEC1A、KLE) に対する作用機序を解析した。まず、XCT790はERRによるエストロゲン応答転写活性の抑制効果を示した(Fig 1)。WST-8 assayおよびcolony formation assayで有意な細胞増殖抑制効果を認めた(Fig 2)。

Fig 1

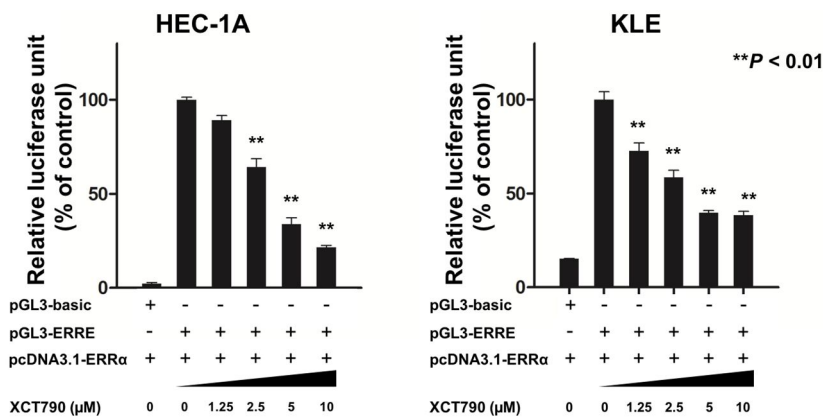
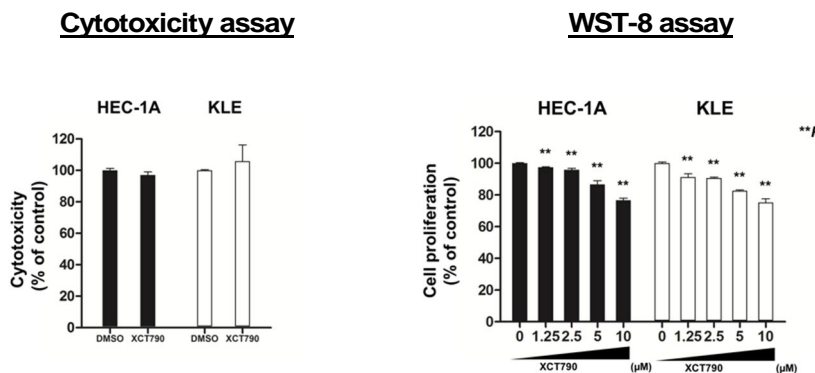


Fig 2



様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

また、Western blotやFACSなどによるアポトーシスおよび細胞周期の解析では、caspase3/7を介したアポトーシス誘導やM期での細胞周期停止を確認した(Fig 3,4)。

Fig 3

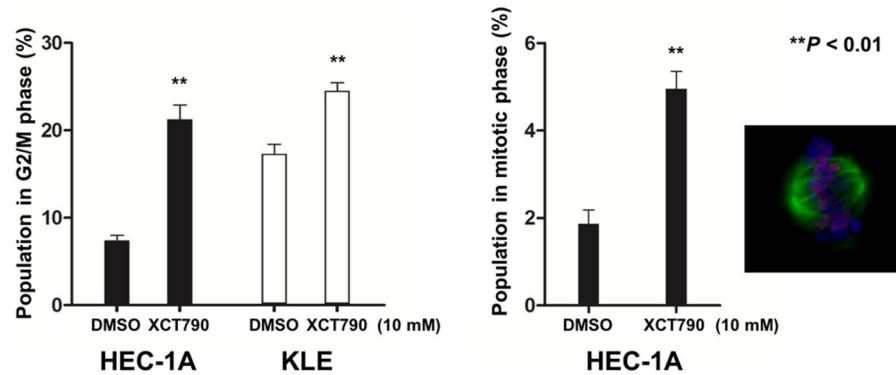
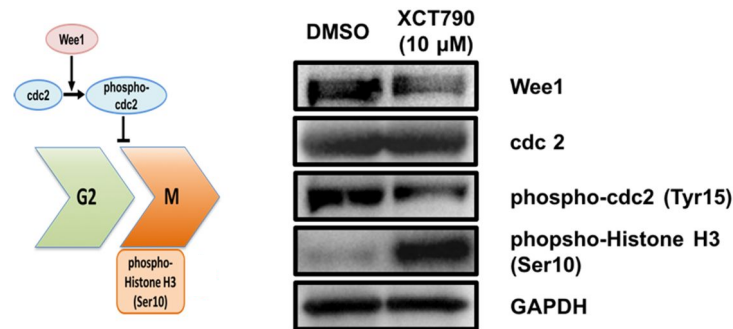
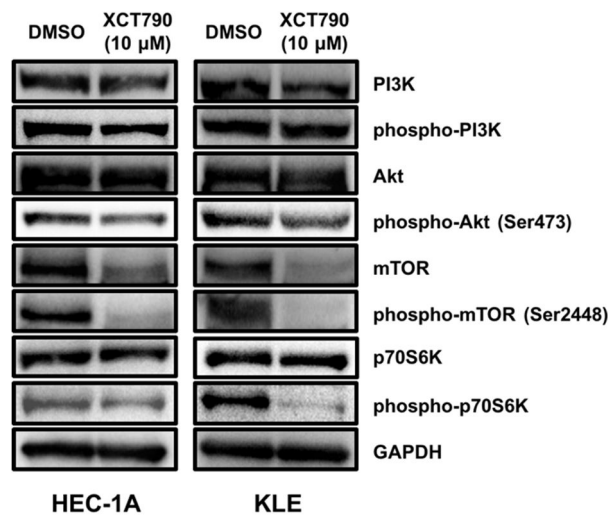


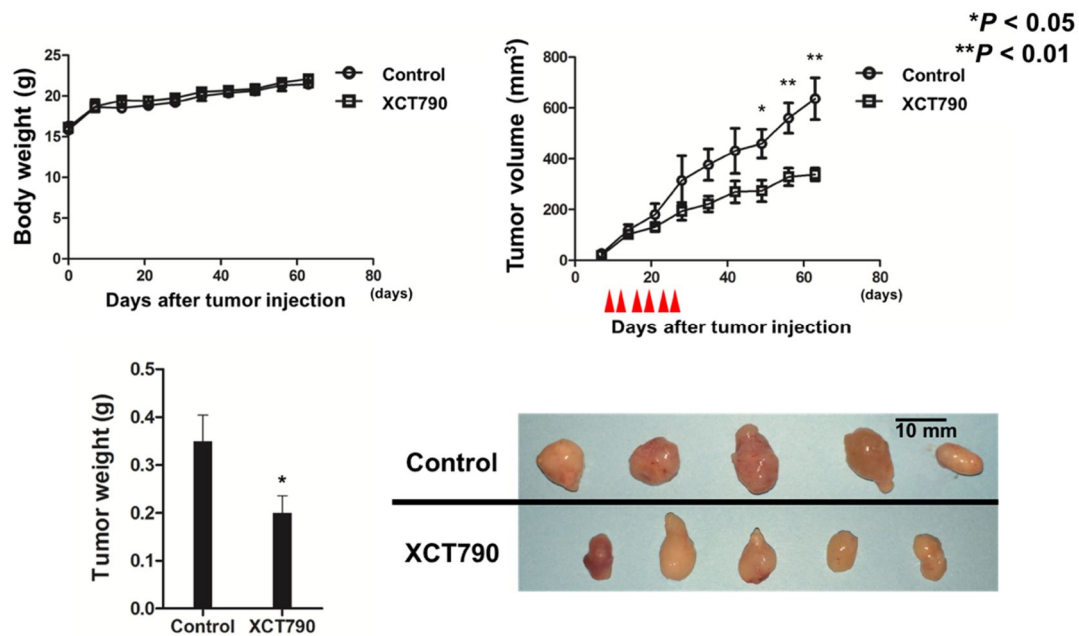
Fig 4



さらに、Western blotによるPI3K/Aktシグナル経路への解析を行ったところ、PI3Kの下流にあるAkt、mTOR、p70S6Kの発現やリン酸化抑制を認めた。これらより、XCT790が多様な経路を介して腫瘍増殖を抑制することが分かった。

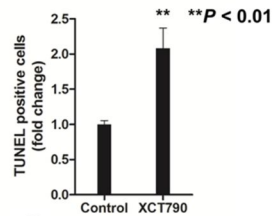
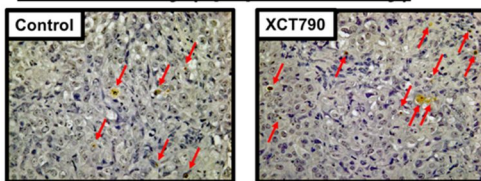


またHEC1A細胞株を用いたマウス皮下異種移植モデルでも、腫瘍の有意な成長抑制効果を確認した。

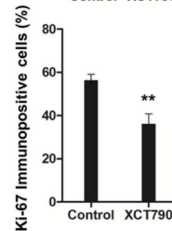
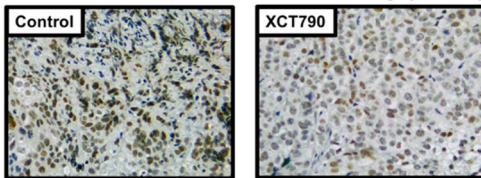


このXCT790のin vivoでの腫瘍成長抑制効果について、その分子機構の解明をHEC1A細胞株を用いて行なった。その結果として、TUNEL assayでアポトーシス促進が関与すること、CD31を用いたangiogenesis assayで血管新生抑制が関与することを示した。これらの結果は平成29年度の結果も含め、XCT790の子宮体癌に対するERRを介した抗腫瘍効果として報告した (Cell Oncol. 2019, Kokabu, Matsushima et al.)。

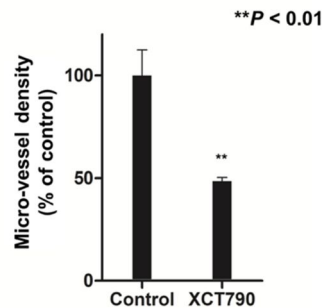
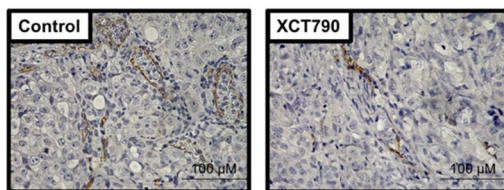
TUNEL assay (apoptosis assay)



Immunohistochemical staining (Ki-67)



Micro-vessel density analysis



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kokabu T, Mori T, Matsushima H, Yoriki K, Kataoka H, Tarumi Y, Kitawaki J.	4. 巻 42(2)
2. 論文標題 Antitumor effect of XCT790, an ERK inverse agonist, on ERK-negative endometrial cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Celler Oncology	6. 最初と最後の頁 223-235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13402-019-00423-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----