

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24034

研究課題名（和文）CRISPR/Cas9を用いた子宮体癌におけるエストロゲン関連受容体伝達機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of estrogen-related receptor signaling pathway by using CRISPR/Cas9 in endometrial cancer

研究代表者

古株 哲也（KOKABU, TETSUYA）

京都府立医科大学・女性生涯医科学・助教

研究者番号：80848490

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：子宮体癌のエストロゲン伝達系を制御するエストロゲン関連受容体（ERR）に着目し、分子制御機構の解明を目的とした。化学療法抵抗性子宮体癌細胞株（抵抗性株）を樹立し、CRISPR/Cas9を用いてERRと治療抵抗性獲得機序につき評価を行った。単一薬剤で作成した抵抗性株は多剤に対し薬剤感受性低下を示し、ERR、MDR1の発現が増加していた。一方でMDR1安定性に関与するmiR-9は発現低下していた。正常および抵抗性株でERR発現を調節することにより、ERRがmiR-9発現と逆相関し、MDR1発現と相関することを示した。ERRが治療抵抗性獲得を制御し、治療標的となりうることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の子宮体癌患者は急激に増加しているが、予後不良な進行・再発例や妊孕能温存が必要な若年例における治療成績は十分とは言えない。本研究は子宮体癌の腫瘍学的特徴であるホルモン依存性疾患に着目し、エストロゲン伝達系制御による包括的な治療を目標としている。我々はエストロゲン関連受容体（ERR）が子宮体癌において予後因子であること、腫瘍進行を制御することを示した。また化学療法抵抗性獲得に密接に関与することを示し、これらの結果は従来の治療法と異なった作用機序による腫瘍制御を可能としており、ERRが子宮体癌における新規治療戦略における有用な標的となり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that estrogen-related receptor (ERR) regulated tumor progression in endometrial cancer. Recent studies revealed that ERR also regulated resistance of cancer cells to chemotherapy in various cancers. Therefore, we evaluated the association between ERR and chemo-resistance in endometrial cancer. Chemo-resistant endometrial cancer cell (CREC) models were developed in our laboratory. ERR expression was edited by using CRISPR/Cas9 and small interfering RNA. WST-8 assay revealed CRECs were resistant to plural anticancer agents. RT-PCR and western blotting showed increased levels of ERR, MDR1, XIAP, and Bcl-2 in CRECs. Additionally, CRECs also presented decreased level of miR9, which was involved in ERR regulated mRNA stability of MDR1. On the other hand, knockdown of ERR induced down-regulation of MDR1 expression via up-regulation of miR9 expression. Therefore, these findings suggested that ERR regulated chemo-resistance in endometrial cancer.

研究分野：子宮体癌

キーワード：子宮体癌 endometrial cancer estrogen chemoresistance estrogen receptor ER ERR

1. 研究開始当初の背景

女性のライフスタイルの変化に伴い子宮体癌の罹患率は激増し、死亡率もこの数十年間漸増し続けている。特に若年症例の増加が顕著で、治療の原則は子宮全摘出術であり、晩婚化・初産の高齢化がすすむ本邦において若年症例では妊孕能温存が問題となる。また進行・再発例における有効な治療法は確立しておらず、上記理由から新規治療戦略が危急の課題である。

これまで子宮体癌に対し、数多くの臨床試験が実施されてきたが、いずれも満足できる成績は得られていない。近年、がんゲノム医療が飛躍的に進歩し、多くの悪性腫瘍でその分子腫瘍学的特徴が明らかとなってきた。その一方で、子宮体癌は様々な遺伝子変異や異常活性化した伝達系を持つ heterogenous な疾患であることが示され、同時に単一の遺伝子変異を標的とした治療が困難であることが示唆された。さらに新規戦略として期待の高い免疫チェックポイント阻害薬による臨床試験も行われてきたが、現状を打開しうる結果は得られなかった。以上より子宮体癌の生物学的特徴を十分に理解し、より包括的な腫瘍制御を目指した治療戦略が必要と考えられる。

子宮体癌の腫瘍学的特徴はエストロゲン依存性疾患である。申請者らはエストロゲン受容体 (ER) と応答配列を共有し、エストロゲンシグナル伝達系を制御するエストロゲン関連受容体 (ERR) に着目し、研究を展開してきた。そしてこれまでに ERR が子宮体癌において予後因子であること、腫瘍増殖、血管新生、浸潤、転移、アポトーシスを制御することを明らかにし、治療標的として有用であることを実証してきた (引用文献 1、2)。一方で、ERR の腫瘍制御機構の全貌は未だ不明であり、ERR の機能解明は子宮体癌治療において重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究は子宮体癌における ERR を介したホルモン伝達系およびその腫瘍制御に関わる未知の機構を解明し、革新的な治療法開発の基盤を確立を目標とする。

近年の子宮体癌罹患率・死亡率の増加は憂慮すべき事態であるが、現状を打開しうる有効な治療法は確立していない。その原因として、子宮体癌の遺伝学的背景と生物学的特徴を十分に捉えていないことが挙げられる。本研究の特徴はエストロゲン依存性腫瘍である子宮体癌においてエストロゲン応答を制御しうるホルモン受容体を標的としている点であり、申請者らはこれまでに子宮体癌における ERR の腫瘍制御機構について世界に先駆けて明らかにしてきた (引用文献 1、2)。ERR が腫瘍進展をより包括的に制御する有用な治療標的であることを示唆する一方で、応答配列を共有する ERR と ER によるシグナルの相互干渉がもたらす腫瘍病態への影響や、ERR と治療抵抗性獲得機序の詳細は未だ明らかでない。とりわけ ER との相互作用を紐解くことはエストロゲン依存性疾患である子宮体癌の特性を理解する上で不可欠であり、新規治療戦略を確立するに当たりこれらに対する学術的関心は高い。本研究ではこれまでの従来の研究手法に加え、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用いて ERR が生体内で及ぼす影響について明らかにする。

3. 研究の方法

ERR を標的とした遺伝子導入を行うことで、以下の項目を検証する。

1. RT-PCR や western blotting で ERR 発現を確認した後、WST-8 や colony formation assay を用い細胞増殖を検討する。また invasion assay を用い浸潤能への影響を、caspase assay や ROS assay を用いアポトーシスについて評価を行う。
2. ERR と ER のクロストークを検証する
ER 陽性子宮体癌細胞株に ERR をノックダウンし、エストロゲン存在の有無によるシグナル伝達系への影響を western blotting を用い検証する。子宮体癌の進展に関わり、高頻度に異常活性化している PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達系を中心に評価する。
3. ERR と治療抵抗性獲得の機序および分子学的背景から新規治療薬の同定を行う
ERR と薬剤抵抗性に関与するタンパク (MDR や P-glycoprotein, MDR-associated protein 等) を western blotting で評価する。また子宮体癌の key drug を用いて薬剤抵抗性細胞株を作成し、当該薬剤への感受性を含む化学療法への感受性評価や、前述のシグナル伝達系を治療標的とした薬剤との相乗効果につき検証する。

4. 研究成果

ERR を knockdown により細胞増殖試験で増殖抑制を認めた。さらに colony formation assay でも colony 形成を抑制していた。また caspase3/7 が誘導されることで apoptosis を促進していると考えられた。ROS に関しては有意な差は確認できなかった。

子宮体癌細胞株 (HEC-1A, Ishikawa) を用い、子宮体癌の key drug である cisplatin および

paclitaxel を低濃度から徐々に濃度を上昇させつつ培養・継代することで各薬剤に対する抵抗性細胞株（抵抗性株）を樹立した。抵抗性株 CRISPR/Cas 9 を用いて ERR の腫瘍制御機構および治療抵抗性機序につき評価を行った。

まず、作成した抵抗性株が各薬剤に対し、薬剤感受性低下を示すことことを WST-8 で確認した。そして抵抗性株が多剤に対し薬剤感受性低下を示すことを確認した。

子宮体癌では PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達系が高頻度で異常活性化していることが知られているが、抵抗性株ではこの伝達系がさらに活性化していた（図 1）。すでに ERR を抑制することで mTOR の下流を制御することを証明しており、ERR を標的とした治療が抵抗性株にも有用であることを示唆する。

さらに抗性株では ERR と MDR1 が増加していることを western blotting で確認した（図 2）。また PT-PCR では抵抗性株において ERR α や HIF1 α を増加させる一方で、MDR1 安定性に関与する miR9 は発現低下していることを示した（図 3）。さらに正常株における ERR の強発現では MDR1 が増加し、miR9 は低下すること、抵抗性株における ERR α の knockdown は MDR1 を低下させ、miR9 を増加させることを確認した。

これらから ERR と MDR1 は正の相関を示し、miR9 が負の相関を示すことを確認した。ERR の inverse agonist である XCT790 によって抵抗性株では miR9 が増加かつ MDR1 発現が低下していた。ERR が治療抵抗性獲得を制御すると考えられる。実際に ERR の inverse agonist とされる XCT790 を併用することで抵抗性株における薬剤感受性が改善した。これらから子宮体癌においても ERR が治療抵抗性獲得に重要な役割を果たし、従来と異なった機序によって子宮体癌治療成績の改善に寄与する可能性を示した。

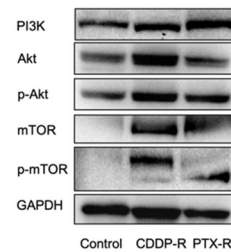


図1 抵抗性株におけるPI3K/AKT/mTOR pathway

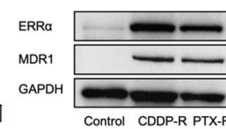


図2 抵抗性株におけるERR α とMDR1

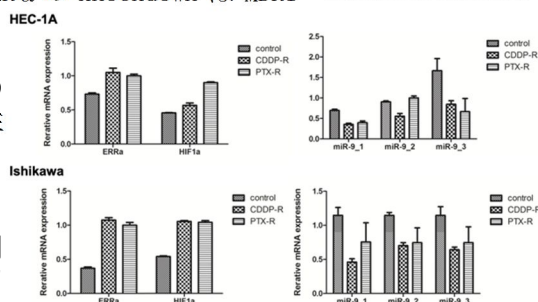


図3 抵抗性株におけるERR α , HIF1 α , miR9発現

引用文献

1. Antitumor effect of XCT790, an ERR inverse agonist, on ER α -negative endometrial cancer cells. Cell Oncol. 2019; 42(2): 223-235.
2. Anti-tumor effect of estrogen-related receptor alpha knockdown on uterine endometrial cancer. Oncotarget. 2016; 7(23): 34131-48.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 T. KOKABU, T. MORI, H. MATSUSHIMA, K. YORIKI and J. KITAWAKI
2. 発表標題 Antitumor Effect of XCT790, an Estrogen-Related Receptor Inverse Agonist, on Endometrial Cancer
3. 学会等名 ACOG annual clinical and scientific meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------