

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18170

研究課題名（和文）CDK4/6阻害剤を用いた子宮体がん新規治療法の確立

研究課題名（英文）CDK4/6 inhibitor: a new strategy for endometrial cancer

研究代表者

山本 拓郎（Yamamoto, Takuro）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・特任助教

研究者番号：00869787

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）：ホルモン感受性腫瘍と推測される患者腫瘍検体から上皮成分を抽出し、organoid cultureを用いて子宮体がん上皮細胞の培養に成功した。この培養細胞の培養条件の設定を行い、長期継代培養およびcell lineの確立を目指した。しかしながら、継代を重ねると増殖速度が遅くなったり、見た目の変化も来ことから、長期培養の確立には至らなかった。また、一般的な平面培養ではない培養系での薬剤評価を行う際の新たな実験系の確立が必要であったが、安定した培養条件が定まらず実験系の確立に至らなかった。以上から当初予定していた薬剤の治療効果を検討することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮体がんの増加に伴い、進行/再発などの予後不良例や妊孕能温存希望例が増加している。化学療法や分子標的薬が試行されているが未だ十分な結果が得られておらず、新たな治療戦略が必要とされている。本研究の目的は、乳がんが長期の効果と安全性が確認されているCDK4/6阻害剤を軸にした新たな治療戦略を乳がんと同じくホルモン依存性腫瘍である子宮体がんにおいて確立をすることである。本研究では、既存の細胞株にはホルモン感受性と言える細胞株が存在しないため、ホルモン感受性子宮体がん株の樹立し、新規治療法の確立を目指した。

研究成果の概要（英文）：We successfully cultured uterine cancer epithelial cells from tumor specimens of patients with hormone-sensitive uterine cancer using organoid culture. We set up culture conditions for these cultured cells and aimed to establish long-term passaging culture and cell lines. However, the proliferation rate slowed down and the appearance of the cells changed after repeated passages. We were unable to establish a long-term culture of these cells. In addition, although it was necessary to establish a new experimental system for drug evaluation in a culture system that is not a general culture system, we could not establish a stable culture condition and thus could not establish the experimental system. Therefore, it was not possible to study the therapeutic effect of the drug as originally planned.

研究分野：Cancer

キーワード：子宮体がん organoid culture

1．研究開始当初の背景

晩産化という社会的な背景をもとに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。妊孕能温存治療として、子宮内膜に限局する病変に限り古くからメドロキシプロゲステロン酢酸エステル（MPA）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、子宮体がんに対する新たな治療戦略が強く求められている。

近年、乳がんにおいてホルモン療法との併用で長期予後を劇的に改善させた CDK4/6 阻害剤は日本でも 2017 年にパルボシクリブ、2018 年にアベマシクリブが承認され、非常に注目される薬剤である。CDK4/6 は細胞周期を調節する重要なキナーゼである。細胞周期は、周期的に発現するサイクリンと周期的に活性化する CDK によって制御されているが、そのうち G1 期は外部からの刺激を受け入れる時期で細胞の運命を決定する重要な時期である。増殖刺激が入ると cyclin D が合成され CDK4/6 と複合体を形成し、核内へ移行し、Rb 蛋白をリン酸化する。リン酸化した Rb 蛋白は転写因子である E2F の抑制ができなくなり、転写が活性化されることで cyclin E の転写を増加させ、CDK2 と複合体を形成しその活性により細胞周期を G1 期から S 期へと移行させる。この細胞周期を標的とした CDK4/6 阻害剤は乳がんにおいてホルモン療法との併用で承認されているが、その機序はエストロゲン受容体阻害による cyclin D の抑制と、CDK4/6 阻害剤による CDK4/6 の活性抑制により、G1 期 arrest をもたらすことによる。

申請者が報告した乳がんに対する mTOR 阻害剤も cyclin D の機能的な抑制をもたらす分子標的薬の 1 つであるが、CDK4/6 阻害剤との併用により相乗効果を認めており、他の既報からも cyclin D を標的とした薬剤は CDK4/6 阻害剤との相乗的な効果を示す可能性が高い。また、申請者らは乳がんにおいて Rb 蛋白が CDK4/6 阻害剤の効果発現に必要であることを示してきたが、子宮体がんではその Rb 蛋白の発現が 6-7 割程度と報告されている。

子宮体がんにおいては乳がんと同様に PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達経路の活性化ががんの増殖に関与していることが指摘されている。特にホルモン受容体陽性の子宮体がんでは PI3K-Akt 経路を抑制している PTEN の変異が約 70% に、PI3K の遺伝子である PIK3CA の変異が約 30% に、また PI3k-Akt の上流の KRAS の変異が約 20% に存在し PI3K-Akt の経路が異常に活性化されており、その下流にある mTOR も活性化されている。また、PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達経路はエストロゲン受容体シグナル経路と相互に働いており、ホルモン依存性腫瘍における増殖やがんの進展において重要な役割を果たす。このように子宮体がんにおいて PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達経路は重要な治療ターゲットとなりうる。また、妊孕能温存治療や進行・再発子宮体癌のホルモン療法には古くから MPA が用いてきたが、子宮体がんにおけるプロゲステロン受容体シグナル経路は乳がんとは異なり the activating protein-1 や c-Jun の発現およびプロモーター領域への移行を抑制することで cyclin D の発現を抑制する。また cyclin E/CDK2 複合体の阻害蛋白である p27 の分解を抑制することで細胞周期を G1 停止させる。このように PI3K-Akt-mTOR 経路やエストロゲン受容体やプロゲステロン受容体経路をターゲットとした治療は CDK4/6 阻害剤との併用で治療効果が期待できる。

2．研究の目的

子宮体がんに対して多くの分子標的治療薬が試行されているが、いずれも満足な結果は得られていない。その原因として、子宮体がんが単一の強い癌遺伝子変異で癌化することが稀である

こと、子宮体がんの生物学的特徴を十分に捉えていないことが挙げられる。本研究では乳がんでは長期的な使用での効果および安全性が確認されている CDK4/6 阻害剤を用いた新規治療法の確立を目指す。近年、子宮体がんは増加の一途をたどる中、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激増している。CDK4/6 阻害剤を用いた新たな治療戦略は子宮体がんに対する新たな妊孕能温存療法開発への重要な役割を担う。

3．研究の方法

本研究では次の 4 項目を大きな目標とする。

子宮体がんの CDK4/6 阻害剤を用いた新規の治療法の基礎基盤の確立を目標とする。

(1) CDK4/6 阻害剤と相乗効果を示す薬剤の網羅的な解析

これまでの既報およびわれわれの結果から cyclin D を標的とした薬剤を中心に薬剤併用スクリーニングを用い解析し、相乗効果を示す薬剤を同定する。また、相乗効果を示す候補の薬剤を用いて、抗腫瘍効果を細胞増殖抑制実験を用いて相乗効果を検討する。

(2) Organoid culture によるホルモン感受性子宮体がん株の樹立

子宮体がんにおいてはホルモン感受性の細胞株は確立されておらず、ホルモン療法の基礎研究が進展しない一因となっている。近年、organoid culture によるホルモン感受性の子宮内膜および子宮体がん株の樹立が報告されており、同手法でホルモン感受性長期培養子宮体がん株を樹立する。樹立した株は遺伝子解析により既存の遺伝子データと比較することで子宮体がんであることを確認する。また、HE 染色および免疫染色法を用いて、病理組織学的に患者腫瘍組織と合致することを確認する。

(3) 併用療法の抗浸潤・遊走能評価、細胞老化・アポトーシス誘導効果および作用機序の解析

併用療法のがんの各種機能に対する抑制効果を解析する。浸潤能評価には matrigel cell invasion assay、遊走能の評価には scratch assay および transwell migration assay、細胞老化・アポトーシス誘導効果についてはβガラクトシダーゼ染色および TUNEL 法により確認する。また併用療法の作用機序をウェスタンブロット法を用いて解析する。

(4) 併用療法の効果を in vivo で検討

併用療法の抗腫瘍効果についてマウスモデルを用いて併用療法の抗腫瘍効果および副作用について体重減少を検証する。また、摘出腫瘍は免疫染色法を用い、in vitro で確認した作用機序およびアポトーシス関連マーカー、血管新生マーカーなどについて検証する。

4．研究成果

ホルモン感受性腫瘍と推測される患者腫瘍検体から上皮成分を抽出し、organoid culture を用いて子宮体がん上皮細胞の培養に成功した。この培養細胞の培養条件の設定を行い、長期継代培養および cell line の確立を目指した。しかしながら、継代を重ねると増殖速度が遅くなったり、見た目の変化も来したことから、長期培養の確立には至らなかった。また、一般的な平面培養ではない培養系での薬剤評価を行う際の新たな実験系の確立が必要であったが、安定した培養条件が定まらず実験系の確立に至らなかった。以上から当初予定していた薬剤の治療効果を検討することができなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------