

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月9日現在

機関番号：11301  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2009～2012  
 課題番号：21592119  
 研究課題名(和文) エストロゲンとタモキシフェンの生物学的差異を利用した、子宮体癌モデルマウス作成  
 研究課題名(英文) establishment of model mouse getting endometrial cancer utilizing the biological difference between estrogen and tamoxifen  
 研究代表者  
 新倉 仁 (NIIKURA HITOSHI)  
 東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
 研究者番号：80261634

### 研究成果の概要（和文）：

C57/B6マウスを用いてタモキシフェン(4-HT)のマウス子宮に対する影響を検討した。タモキシフェン投与により、コントロール群に比べて有意に子宮重量が増加した。4-HT投与マウスにおいては、著明な内膜腺の拡大および増加、間質組織の浮腫化が確認された。Steroid sulfatase について、Ishikawa 細胞において発現を検討し、その阻害剤投与で増殖が抑制された。

### 研究成果の概要（英文）：

The influence of tamoxifen (4-HT) to uterus was examined using C57/B6 mouse. By adding tamoxifen, the weight of uterus significantly increased in comparison with control group. Moreover, endometrial glands were enlarged and increasing, and the stroma had edematous change. The growth of Ishikawa was inhibited by STS inhibitor.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

### 研究分野：婦人科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜癌、タモキシフェン、発癌

#### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は近年急速に増加し大きな問題となっている疾患である。初期病変に関しては手術療法で比較的予後が良好であるが、進行・再発癌は治療抵抗性で予後不良である。さらに近年若年者に発症する子宮内膜癌に対してホルモン療法などの妊孕性温存療法が試みられているが、再発率が高いため挙児

に至らず手術治療が必要となる例も少なくない。このように子宮内膜癌には解決すべき臨床的な問題点が山積している。子宮内膜癌はエストロゲン依存性のあるタイプ I と萎縮内膜から de novo で発生するタイプ II の 2 種類に分けられ、それぞれ癌化に関連する遺伝子群が異なると考えられている。タイプ I では PTEN や k-ras、タイプ II では p53 や

c-erbB2 が原因遺伝子群とされており、実際に PTEN ヘテロノックアウトマウスでは高率で子宮内膜癌を発生する。しかしこの遺伝子操作マウスでは子宮内膜以外の癌発生率も高く、他部位での癌死が多いため、ヒト子宮内膜癌の疾患モデルとしては問題点が多い。

(1) 今まで子宮内膜腺上皮に定常的かつ特異的に発現する遺伝子は知られていない。その理由として子宮内膜腺が性ホルモンの制御を受けて周期的に増殖と脱落を繰り返すため、定常的に発現する遺伝子を同定するのが手技的に困難な事が挙げられる。また子宮内膜癌は内膜腺上皮のみから発生するが、従来の研究は子宮筋層・子宮内膜間質を内膜腺と分離せずに研究対象としている事も理由と考えられる。

(2) 子宮内膜腺は女性ホルモンであるエストロゲンの影響下で増殖するが、生体内では子宮内膜腺の他にも乳腺組織や骨組織などいくつかの組織がエストロゲンの影響を強く受ける。しかし抗エストロゲン作用のあるタモキシフェンは、乳腺組織には増殖抑制的に働くが子宮内膜腺は逆に増殖を亢進させるが、これはエストロゲンレセプターに結合する細胞内相補的因子の臓器（細胞）特異性が原因であることが示されている（Johnson JG et al, *Science* 2002, 295; 2465-2468）。臨床的にもタモキシフェン投与を受けている患者は子宮体癌のハイリスクとされており、しばしば著明な子宮内膜増殖を示す。つまりタモキシフェンは生体内において子宮内膜腺特異的なエストロゲンアゴニストとして利用できる可能性がある（他臓器では当然ながらエストロゲンアンタゴニストとして働く）。

## 2. 研究の目的

タモキシフェンは生体内において子宮内膜腺特異的なエストロゲンアゴニストとして利用できる性質を利用して、その目的とする分子を利用する際にタモキシフェン投与下で子宮内膜腺に特異的に発現するエストロゲン反応性分子を利用する。

子宮内膜腺特異的なプロモーターを同定したのちに、このトランスジェニックマウスと Cre-loxP system で PTEN や p53 が欠失するマウスを掛け合わせることで、タモキシフェン投与時に子宮内膜腺上皮特異的に PTEN や p53 などの癌抑制遺伝子が欠失するマウスを作成する。このマウスでは子宮内膜でのみ癌が発生する事が予想され、実際の病態に非常に

近い形のヒト子宮内膜癌のモデルとなりうると考える。

以上のように子宮内膜に限局して癌を発生するような実際の病態に近いヒト子宮内膜癌モデルを作成し、子宮内膜癌の病因解明、診断・治療の発展に寄与する事を研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) タモキシフェン投与時の特異的遺伝子発現の確認

タモキシフェン投与後、摘出、冷凍保存した子宮から内膜腺を含む子宮組織の薄切標本を作製し、レーザーキャプチャードマイクロダイセクション法 (LCM 法) にて子宮内膜腺のみを選択的に集めて RNA を採取する。この RNA をタモキシフェン投与群とコントロール群で遺伝子マイクロアレイ解析を行い、網羅的に発現の変化している遺伝子群を観察する。同様の LCM を 3 回行い、再現性をもち変化する遺伝子を同定し、同定された遺伝子について文献的な検索を行う。その遺伝子が Tg マウス作成未報告であれば以下のごとくマウス作成に移る。

(2) Cre Tg mouse の作成と解析

まずエストロゲン結合モチーフを含むプロモーター領域の DNA フラグメントを PCR で作成し、これを当科で保持している Cre 発現ベクターにサブクローニングする。そのベクターで Cre 発現トランスジェニックマウス (Cre Tg mouse) を作成し、Cre が発現すると lacZ を発現する Rosa-26 系レポーターマウスと交配する。Rosa-26 レポーターマウスは Cre 発現部位でのみ lacZ が発現する遺伝子改変マウスなので、X-gal 染色での青変部位は、その部位で Cre が発現していることを示す。このマウスにタモキシフェンを投与し、子宮内膜腺を X-gal 染色して子宮内膜腺での Cre 発現を調べる。またコントロールとして、生理的に発現が知られている臓器があればその部分での Cre 発現も同様に調べる。

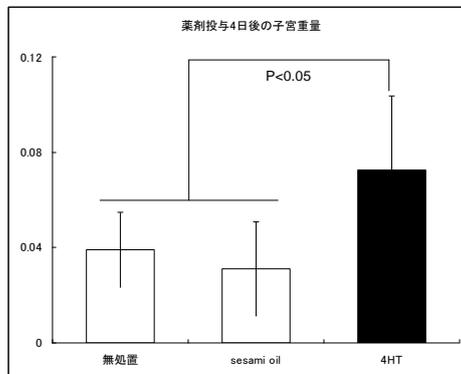
(3) 子宮内膜癌モデルマウスの作成と解析

(2) の実験でタモキシフェン投与時に子宮内膜腺特異的な Cre 発現が確認できたら、次いで Cre Tg mouse を PTEN コンディショナルノックアウトマウスと交配する予定である。PTEN がホモで欠失した遺伝子改変マウスは胎生致死になるが、Cre-loxP system を用いて Cre 特異的に PTEN が欠失するコンディショナルノックアウトマウスでは子宮内膜癌が発生すると予想している。

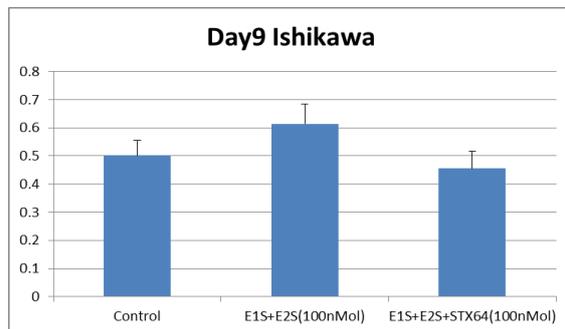
## 4. 研究成果

C57/B6マウスを用いてタモキシフェン(4-HT)のマウス子宮に対する影響を検討した。12週齢のメスマウスを麻酔下に開腹し両側卵巣を摘出した。術後2週目より(1)無処置群(2)セサミオイル投与群(3)4-HT(セサミオイルに溶解)群に分け、薬剤投与4日目に子宮を摘出し重量を測定した。図の如く4-HT投与群では(1),(2)のコントロール群に比べて有意に子宮重量が増加した。

またHE染色標本の検討では、(1)(2)のコントロール群では同週齢マウスに比較し、卵巣摘出の影響で子宮内膜腺および間質組織の萎縮を認めた。一方で4-HT投与マウスにおいては、同週齢マウスに比較して著明な内膜腺の拡大および増加、間質組織の浮腫化が確認された。



これと並行して、同じエストロゲン依存性疾患である乳癌で検討されているSteroid sulfatase について、Ishikawa細胞において発現を検討し、その阻害剤投与で増殖が抑制されることを確認した。(図1)

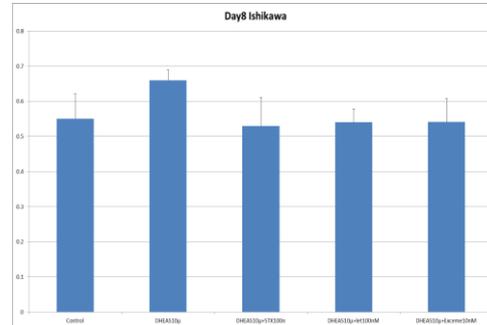


(図1)

DHEAS (Dehydroepiandrosterone) 添加時には Aromatase 阻害剤 (ER (estrogen receptor) 経路に関与)、STS 阻害剤 (ER 経路、AR (androgen receptor) 経路に関与) の細胞増

殖抑制効果はほぼ同等であった。(図2)

(図2)



## 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 22 件)

- ① Tanaka S, Nagase S, Kaiho-Sakuma M, Nagai T, Kurosawa H, Toyoshima M, Tokunaga H, Otsuki T, Utsunomiya H, Takano T, Niikura H, Ito K, Yaegashi N. Clinical outcome of pelvic exenteration in patients with advanced or recurrent uterine cervical cancer. Int J Clin Oncol. 査読有、2013、in press <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23404487>.
- ② Tokunaga H, Nagase S, Yoshinaga K, Tanaka S, Nagai T, Kurosawa H, Kaiho-Sakuma M, Toyoshima M, Otsuki T, Utsunomiya H, Takano T, Niikura H, Ito K, Yaegashi N. Small cell carcinoma of the uterine cervix: clinical outcome of concurrent chemoradiotherapy with a multidrug regimen. Tohoku J Exp Med. 査読有、229(1) ;75-81、2013 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Small+cell+carcinoma+of+the+uterine+cervix%3A+clinical+outcome+of+concurrent+chemoradiotherapy+with+a+multidrug+regimen>.
- ③ Nagai T, Niikura H, Kurosawa H, Tanaka S, Otsuki T, Utsunomiya H, Nagase S, Takano T, Ito K, Kaiho Y, Nakagawa H, Arai Y, Yaegashi N. Individualized radical hysterectomy procedure using intraoperative electrical stimulation for patients with cervical cancer. Int J Gynecol Cancer. 査読有、22(9) ;1591-1596 .

- doi: 10.1097/IGC.0b013e31826fd684, 2012
- ④ Niikura H, Okamoto S, Otsuki T, Yoshinaga K, Utsunomiya H, Nagase S, Takano T, Ito K, Watanabe M, Yaegashi N. Prospective study of sentinel lymph node biopsy without further pelvic lymphadenectomy in patients with sentinel lymph node-negative cervical cancer. Int J Gynecol Cancer. 査読有、22(7) ;1244-1250 . doi: 10.1097/IGC.0b013e318263f06a, 2012
- ⑤ Ito K, Utsunomiya H, Niikura H, Yaegashi N, Sasano H. Reply to Comments on "Inhibition of estrogen actions in human gynecological malignancies: New aspects of endocrine therapy for endometrial cancer and ovarian cancer" Mol Cell Endocrinol. 査読有、340(2):161-7. doi: 10.1016/j.mce.2010.11.023. 2011、
- ⑥ Wong TF, Yoshinaga K, Monma Y, Ito K, Niikura H, Nagase S, Yamamoto M, Yaegashi N. Association of Keap1 and Nrf2 Genetic Mutations and Polymorphisms With Endometrioid Endometrial Adenocarcinoma Survival. Int J Gynecol Cancer. 査読有、21:1428-1435 . doi: 10.1097/IGC.0b013e31822d0eb2, 2011
- ⑦ Ito K, Utsunomiya H, Niikura H, Yaegashi N, Sasano H. Inhibition of estrogen actions in human gynecological malignancies: New aspects of endocrine therapy for endometrial cancer and ovarian cancer. Mol Cell Endocrinol. 査読有、340:161-167 . doi: 10.1016/j.mce.2010.11.023, 2011
- ⑧ Yoshinaga K, Ito K, Moriya T, Nagase S, Takano T, Niikura H, Sasano H, Yaegashi N, Sato Y. Roles of intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas. Cancer Science. 査読有、102:446-451 . doi: 10.1111/j.1349-7006, 2011
- ⑨ 新倉仁、八重樫伸生、広汎子宮頸部摘出術の適応と限界、臨産、査読無、265巻、2011年、1244-1247.
- ⑩ 新倉仁、センチネルリンパ節の同定、生検による微小転移の検索—確実なリンパ節郭清と治療の個別化—、日産婦誌、査読無、63巻、2011年、2209-2218.
- ⑪ Sakuma M, Otsuki T, Yoshinaga K, Utsunomiya H, Nagase S, Takano T, Niikura H, Ito K, Otomo K, Tase T, Watanabe Y, Yaegashi N. Malignant transformation arising from mature cystic teratoma of the ovary: a retrospective study of 20 cases. Int J Gynecol Cancer. 査読有、20(5);766-771、2010、  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Malignant+transformation+arising+from+mature+cystic+teratoma+of+the+ovary%3A+a+retrospective+study+of+20+cases>
- ⑫ Niikura H, Jin ZW, Cho BH, Murakami G, Yaegashi N, Lee JK, Lee NH, Li CA. Human fetal anatomy of the coccygeal attachments of the levator ani muscle. Clin Anat. 査読有、23(5) ;566-574 . doi: 10.1002/ca.20983, 2010
- ⑬ Yue X, Akahira J, Utsunomiya H, Miki Y, Takahashi N, Niikura H, Ito K, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N. Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) as a possible prognostic marker in epithelial ovarian cancer. Pathol Int. 査読有、60(5) ;400-406 . doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02546.x, 2010
- ⑭ Nagase S, et al ; Japan Society of Gynecologic Oncology. Evidence-based guidelines for treatment of cervical cancer in Japan: Japan Society of Gynecologic Oncology (JSGO) 2007 edition. Int J Clin Oncol. 査読有、15(2) ;117-124 . doi: 10.1007/s10147-010-0061-x, 2010
- ⑮ Takahashi-Shiga N, Utsunomiya H, Miki Y, Nagase S, Kobayashi R, Matsumoto M, Niikura H, Ito K, Yaegashi N. Local biosynthesis of estrogen in human endometrial carcinoma through tumor-stromal cell interactions. Clin Cancer Res. 査読有、15:6028-6034 . doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1013, 2009
- ⑯ Okamoto S, Niikura H, Yoshinaga K, Nagase S, Takano T, Ito K, Yaegashi N. Detection of micrometastases in cervical cancer with a system that evaluates both sentinel and nonsentinel lymph nodes. Int J Gynecol Cancer. 査読有、19:708-711 . doi: 10.1111/IGC.0b013e3181a39112, 2009
- ⑰ Matsubara A, Murakami G, Niikura H, Kinugasa Y, Fujimiya M, Usui T. Development of the human retroperitoneal fascia. Cells Tissues Organs. 査読有、190:708-711. doi: 10.1111/IGC.0b013e3181a39112, 2009

- ⑱ Kakuta Y, Nakaya N, Nagase S, Fujita M, Koizumi T, Okamura C, Niikura H, Ohmori K, Kuriyama S, Tase T, Ito K, Minami Y, Yaegashi N, Tsuji I. Case-control study of green tea consumption and the risk of endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Cancer Causes Control*. 査読有、20;617-624 . doi: 10.1007/s10552-008-9272-0、2009
- ⑲ Takenaka A, Soga H, Murakami G, Niikura H, Tatsumi H, Yaegashi N, Tanaka K, Fujisawa M. Understanding anatomy of "hilus" of detrusor nerves to avoid bladder dysfunction after pelvic surgery: demonstration using fetal and adult cadavers. *Urology*. 査読有、73;251-257 . doi: 10.1016/j.urology.2008.09.039、2009
- ⑳ 新倉仁、八重樫伸生、婦人科腫瘍におけるセンチネルリンパ節生検—現況と将来—、産婦人科治療、査読無、99 巻、2009 年、413-418.
- ㉑ 新倉仁、婦人科腫瘍におけるセンチネルリンパ節の現況、日産婦誌、査読無、61 巻、2009 年、314-320.
- ㉒ 新倉仁、八重樫伸生、外陰の腫瘍、類腫瘍、膣の腫瘍、類腫瘍、日産婦誌、査読無、61 巻、2009 年、77-85.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 新倉仁、婦人科癌における SNNS のエビデンスと今後の展望、第 14 回 SNNS 研究会、2012 年 11 月 17 日、名古屋
- ② 新倉仁、センチネルリンパ節同定の意義と実際、第 35 回日本産婦人科手術学会、2012 年 9 月 29 日、京都
- ③ 新倉仁、子宮頸癌・体癌におけるセンチネルノードナビゲーションサージャリー、第 52 回日本婦人科腫瘍学会、2012 年 7 月 19 日、東京
- ④ 新倉仁、子宮体癌における Sentinel Node Navigation Surgery の現状、第 37 回日本外科系連合学会、2012 年 6 月 29 日、福岡
- ⑤ 新倉仁、婦人科癌領域における SNNS と新たな戦略、第 13 回 SNNS 研究会、2011 年 12 月 3 日、東京
- ⑥ 新倉仁、子宮頸癌における骨盤神経温存手術、第 11 回埼玉県産婦人科医会手術、感染症研究会、2011 年 9 月 17 日、埼玉
- ⑦ 新倉仁、センチネルリンパ節の同定、生検による微小転移の検索—確実なリンパ節郭清と治療の個別化—、第 63 回日本産科婦人科学会、2011 年 8 月 30 日、

大阪

- ⑧ 新倉仁、広汎子宮全摘術—術後合併症をいかに防ぐか?—、第 49 回日本婦人科腫瘍学会、2010 年 12 月 5 日、佐賀
- ⑨ 新倉仁、八重樫伸生、婦人科領域におけるセンチネルリンパ節生検臨床応用の現況、第 12 回 SNNS 研究会、2010 年 11 月 16 日、横浜
- ⑩ 新倉仁、子宮頸がんにおけるセンチネルリンパ節に関して、第 47 回日本癌治療学会、2009 年 10 月 22 日、横浜
- ⑪ 新倉仁、子宮頸癌、体癌に対するセンチネルリンパ節ナビゲーション手術、第 46 回日本婦人科腫瘍学会、2009 年 7 月 10 日、新潟

[図書] (計 1 件)

- ① 新倉仁、診断と治療社、産科と婦人科、「子宮体癌とセンチネルリンパ節」、2012 年、165-169

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新倉 仁 (NIIKURA HITOSHI)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：80261634

齋藤 純香 (SAITO SUMIKA)  
東北大学・病院・特任助手  
研究者番号：60509595

### (2) 研究分担者

永瀬 智 (NAGASE SATORU)  
東北大学・病院・准教授  
研究者番号：00292326

吉永 浩介 (YOSHINAGA KOUSUKE)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：40343058

大槻 健郎 (OTSUKI TAKEO)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：40531330

海法 (佐久間) 道子 (KAIHO-SAKUMA MICHIKO)  
東北大学・病院・助教  
研究者番号：50531331