

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16774

研究課題名（和文）子宮体癌におけるエストロゲン関連受容体による治療抵抗性機構解明と新規治療法提唱

研究課題名（英文）Elucidation of the multidrug resistance mechanisms by estrogen-related receptor and development of novel therapeutic strategies in endometrial cancer

研究代表者

古株 哲也（KOKABU, TETSUYA）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：80848490

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：子宮体癌細胞株（HEC-1AとIshikawa）を用いて殺細胞性抗がん剤耐性細胞株（以下、抵抗性株）を作成し、非抵抗性株との比較からERRと治療抵抗性に関するABCB1、miR-9の関連を明らかにした。次ががん微小環境、特に低栄養環境に着目し評価を行った。低栄養環境下ではGLUT、xCT、MCT、VEGF、HIF-1、ERRが発現増加し、化学療法抵抗性を示した。ROSを制御するxCTは低栄養環境だけでなく、抵抗性株でも発現増加しており、xCT阻害はROS増加だけでなく化学療法感受性を改善させた。本研究結果は子宮体癌における治療抵抗性機構を解明し、新規治療標的を想起させるものである。

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を糸口とした治療抵抗性獲得機構の解明と新規治療法提唱を目的とする。我々はエストロゲン関連受容体（ERR）が化学療法抵抗性獲得に密接に関与することを示し、またがん微小環境における治療抵抗性獲得機構を解明した。本研究結果は子宮体癌における治療抵抗性機構を解明し、従来の治療法と異なった側面からのアプローチによる、新規治療標的を想起させるものである。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that estrogen-related receptor (ERR) regulated tumor progression in endometrial cancer. In the present study, we generated anticancer drug-resistant cell lines using endometrial cancer cell lines (HEC-1A and Ishikawa) and elucidated the mechanism of chemo-resistance related with ERR, ABCB1 and miR-9. Additionally, we focused on the tumor microenvironment. The nutrient-deprived condition provided cancer cells increased not only levels of GLUT, xCT, MCT, VEGF, HIF-1, and ERR, but also resistance to chemotherapy. On the other hand, xCT, which regulates reactive oxygen species, was upregulated both in the nutrient-deprived condition and in the chemo-resistant cells. xCT inhibition increased ROS levels and improved chemo-sensitivity. These results elucidate the mechanism of chemo-resistance in uterine endometrial cancer and suggest the novel molecular target for the chemo-resistant endometrial cancer.

研究分野：子宮体癌

キーワード：エストロゲン受容体 エストロゲン関連受容体 子宮体癌 化学療法抵抗性 miRNA

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だが、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は数多くの臨床試験が実施されてきたが、その成績は満足できるものではない。また近年は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、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、有効性は限定的で現状を開拓する結果ではなかった。以上より子宮体癌においては腫瘍学的特徴を理解した上で腫瘍進展をより包括的に制御をする治療標的の同定が不可欠と考えられる。

研究代表者は子宮体癌のエストロゲン依存性疾患という腫瘍学的特徴に着目し、特にエストロゲン受容体(ER)と応答配列を共有し、エストロゲングナル伝達系を制御するエストロゲン関連受容体(ERR)を中心に研究を展開してきた。これまで 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、上皮間葉転換を制御することを明らかにしてきた(引用文献1、2、3)。これらの基礎研究は ERR を標的とした治療が従来の治療法と異なった作用機序を持ち、停滞した子宮体癌治療を開拓する選択肢として期待できることを確認づけた。さらに近年では ERR と治療抵抗性の関係が報告が散見されている。子宮体癌における両者の関係性は未知であるが、研究代表者は ERR の抑制が子宮体癌細胞株においての一部の薬剤に対する感受性を増強させることを先行実験で示し、ERR の治療抵抗性制御機構解明が従来治療への相乗効果をもたらす可能性を示した。また、先の研究では ERR と ER の間に存在する複雑な crosstalk による各々のシグナル伝達系への干渉など、ERR の機能解明には多くの課題も残っている。すなわち、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

本研究の目的は、子宮体癌における ERR を介したエストロゲン伝達系制御機構の解明および治療抵抗性メカニズムの解析による革新的な治療法開発の基盤を確立させることである。現在まで子宮体癌に対し多くの臨床試験がなされてきたが、予後改善に寄与するほどの結果は得られていない。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するホルモン受容体を標的としている点であり、その子宮体癌における ERR の腫瘍制御機構および治療標的としての有用性については世界に先駆けて明らかにしてきた(引用文献1、2、3)。また、近年では ERR と化学療法抵抗性の関連が示唆されている。研究代表者が先行して作り出したパクリタキセル抵抗性細胞株では ERR の発現が増加する証左を得ており、治療抵抗性獲得と ERR の関連性は確固たるものと考えられる。以上より、子宮体癌の腫瘍学的特徴であるエストロゲン伝達系を制御は、研究代表者が明らかにしてきた抗腫瘍効果に加え、既知の薬剤による奏効率を飛躍的に改善することが期待でき、ERR と治療抵抗性獲得機序の関係性を解明することに対する学術的関心は高い。本研究では子宮体癌細胞株を用い、ERR と ER を介したエストロゲン伝達系における相互干渉および薬剤抵抗性獲得の分子病態機序を明らかにすることで子宮体癌における新規治療戦略の基盤を確立させる。

3. 研究の方法

1. ER 陽性および陰性子宮体癌細胞株を用い、key drug に対する抵抗性細胞株を作成する
既存の子宮体癌細胞株にパクリタキセルやシスプラチンなどの key drug を用いて、培養液中の薬剤濃度を徐々に高めつつ培養・継代し、薬剤抵抗性細胞株を樹立する。各々の薬剤に対する抵抗性評価には WST-8 assay やコロニーフォーメーションアッセイを用いる。
2. ERR と治療抵抗性獲得の機序および分子学的背景から適切な治療薬の同定を行う
それぞれの薬剤抵抗性細胞株における ERR と薬剤抵抗性に関与する ATP-binding cassette (ABC) トランスポーター (ABCB1、ABCC1、ABCG2 等) の発現を real-time PCR 法や western blotting で評価する。また ERR の発現や転写活性を調節することで ABC トランスポーターを制御する機序を同定し、薬剤抵抗性細胞株における当該薬剤への感受性変化や、エストロゲン伝達系を治療標的とした薬剤との相乗効果につき WST-8 assay を用い検証する。ERR 発現の増強あるいは抑制はプラスミドベクターもしくは small interfering RNA の導入を用い、転写活性抑制には inverse agonist (XCT790) を用いる。
3. ERR と ER の crosstalk を検証する
ER 発現の有無、エストロゲン存在の有無によって子宮体癌細胞株に ERR を抑制または強発現

した際の、エストロゲン伝達系への影響を real-time PCR 法、western blotting を用い検証する。薬剤抵抗性細胞株においても ERR の発現制御による影響を調べる。薬剤抵抗性細胞株では ABC トランスポーターへの影響も検証する。また臨床検体を用いた ER および ERR 発現と、薬剤ごとの予後への影響から crosstalk の影響を確認する。

4. 研究成果

まず子宮体癌細胞株の HEC-1A (ER 陰性) と Ishikawa (ER 陽性) を用い、CDDP 耐性細胞株 (CDDP-R) および PTX 耐性細胞株 (PTX-R) を作成した。各々の細胞株で ERR α の発現が増加していることを real time PCR で確認した。また耐性細胞株では薬剤抵抗性に関与する ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの一つである MDR1 (ABCB1) の発現が増加し、同時に MDR1 を制御する miR-9 の発現が低下していた (図 1)。一方で非抵抗性株では ERR α 強発現により miR-9 は低下し、MDR1 の mRNA は増加していた。耐性細胞株では ERR α のノックダウンにより miR-9 は増強し、ERR α の inverse agonist である XCT790 によっても同様の結果であった (図 2)。miR-9 と MDR1 の発現は逆相関することが示された。また MDR1 は ERR α の強発現で増加し、XCT790 により抑制され (図 3)、ERR α の下流に miR-9 が存在することが示唆された。また XCT790 によって抵抗性株の薬剤感受性が改善したことから ERR α が miR-9、MDR1 を介して薬剤抵抗性に関与することが示唆された (図 4)。一方でその他の ABC トランスポーターである ABCG1 や ABCG2 に関しては、耐性細胞株で発現が増強する傾向にあるものの、ERR α 強発現による影響は限定的であり、ABCB1 とは異なる制御経路が存在が考慮された。

また子宮体癌の臨床検体を用いた検討では、既報と同様に ERR α の発現強度が予後と相関し、ER α 発現が高い腫瘍は予後が良好であった。ER α 高発現腫瘍に限るとこれまで予後因子と報告されてきた ERR α の発現強度は予後に影響しなかった。ER α 高発現腫瘍では crosstalk により ERR α シグナル伝達系の影響が限定的であることが示唆されるものである。

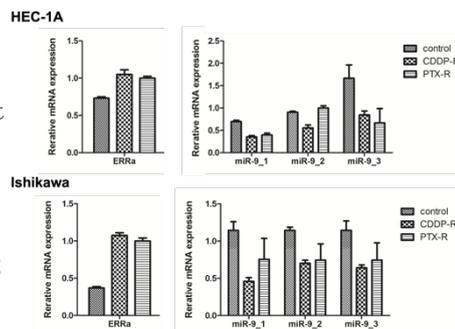


図1 各抵抗性株とERR α , miR-9発現

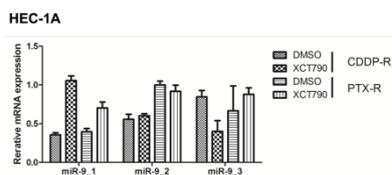


図2 XCT790によるmiR-9発現変化

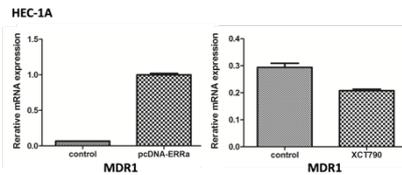


図3 ERR α がMDR1の発現を制御する

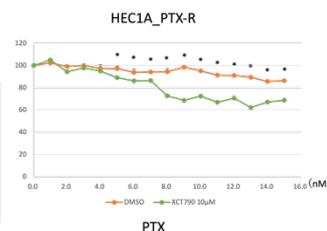


図4 XCT790による薬剤感受性の回復

さらに ERR α の既知の分子学的動態と挙動 (エネルギー代謝に関与、低栄養環境で発現増加、腫瘍増殖を制御、ROS を制御など) と本研究でこれまで得た知見から、更なる抵抗性獲得の機序を解明するため、がん微小環境、特に低栄養環境に着目し、評価を行った。低栄養環境下が惹起する TCA 回路系、解糖系、アミノ酸代謝系への影響を評価したところ、糖取り込みに関連する GLUT、シスチン取り込みに関与する xCT、乳酸取り込みに関与する MCT、腫瘍増殖に関与する VEGF、HIF-1 α 、ERR α が発現増加した。さらに低栄養環境下では、化学療法抵抗性を示すことを確認した。しかし、ERR α との関連を評価するため ERR α を抑制したところ、MCT 発現は低下したが、その他代謝関連因子に大きな変化はなかった。次に低栄養環境で発現増加し、活性酸素種 (ROS) を制御する xCT 焦点をあてて検討した。xCT は低栄養環境だけでなく、治療抵抗性株でも発現増加しており、発現増加する低栄養環境下では ROS が低下していることを確認した。そして xCT 阻害は ROS を増加させ、同時に化学療法感受性を改善させた。以上の本研究結果は、子宮体癌における治療抵抗性機序を解明し、新規治療標的を想起させるものである。

参考文献

1. Antitumor effect of XCT790, an ERR α 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.
3. Estrogen-related receptor alpha induces epithelial-mesenchymal transition through cancer-stromal interactions in endometrial cancer. Sci Rep. 2019; 9(1): 6697.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tetsuya Kokabu, Kohei Aoyama, Yosuke Tarumi, Hisashi Kataoka, Kaori Yoriki, Taisuke Mori	4. 巻 43
2. 論文標題 Successful nedaplatin desensitization therapy in a patient with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: A case report and literature review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 101065
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gore.2022.101065.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yosuke Tarumi, Taisuke Mori, Koki Shimura, Yuko Izumi, Hiroyuki Okimura, Hisashi Kataoka, Tetsuya Kokabu, Fumitake Ito, Akemi Koshiba, Khaleque N Khan, Izumi Kusuki, Jo Kitawaki	4. 巻 107
2. 論文標題 Progesterone Receptor Status of Epithelial Cells as a Predictive Marker for Postoperative Recurrence of Endometriosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 1552-1559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/clinem/dgac118.	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 -
1. 著者名 Kaori Yoriki, Taisuke Mori, Kohei Aoyama, Yosuke Tarumi, Hisashi Kataoka, Tetsuya Kokabu, Jo Kitawaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Genistein induces long-term expression of progesterone receptor regardless of estrogen receptor status and improves the prognosis of endometrial cancer patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-13842-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akihiro Tani, Yosuke Tarumi, Akiyo Kakibuchi, Kohei Aoyama, Tetsuya Kokabu, Hisashi Kataoka, Kaori Yoriki, Michiko Nagamine, Taisuke Mori	4. 巻 44
2. 論文標題 Giant retroperitoneal dedifferentiated liposarcoma mimicking ovarian cancer: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 101088
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gore.2022.101088.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akiyo Kakibuchi, Fumitake Ito, Tetsuya Kokabu, Hiroyuki Okimura, Osamu Takaoka, Taisuke Mori	4. 巻 97
2. 論文標題 Robot-assisted laparoscopic hysterectomy for early-stage endometrial cancer with massive uterine leiomyomas: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Surgery Case Reports	6. 最初と最後の頁 107473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijscr.2022.107473.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miho Iwai, Kaori Yoriki, Kohei Aoyama, Yosuke Tarumi, Hisashi Kataoka, Tetsuya Kokabu, Toshiaki Numajiri, Taisuke Mori	4. 巻 46
2. 論文標題 Successful resection of growing teratoma syndrome in the abdominal wall with reconstruction using tensor fascia lata muscle flap: A case report and literature review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 101161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gore.2023.101161.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kokabu T, Masui K, Tarumi Y, Noguchi N, Aoyama K, Kataoka H, Matsushima H, Yoriki K, Simizu D, Yamazaki H, Yamada K, Mori T	4. 巻 14(5)
2. 論文標題 3D-Image-Guided Multi-Catheter Interstitial Brachytherapy for Bulky and High-Risk Stage IIB-IVB Cervical Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14051257.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 0件)

1. 発表者名 古株哲也、森泰輔、垂水洋輔、片岡恒、寄木香織、北脇城
2. 発表標題 エストロゲン関連受容体をターゲットとした新たな子宮体癌治療の向けの基盤確立
3. 学会等名 第63回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021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
---------	---------