

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 3 月 31 日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22591856
 研究課題名(和文) 核内受容体 PXR を標的とした卵巣癌抗癌剤耐性克服への分子内分泌学的治療戦略
 研究課題名(英文) The molecular endocrinological strategy using pregnane X receptor in drug-resistant ovarian cancer
 研究代表者
 増山 寿 (MASUYAMA HISASHI)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：30314678

研究成果の概要(和文)：予後の悪い卵巣癌で核内受容体 Pregnane X Receptor (PXR) を介した薬物代謝調節機構を解明し、薬物耐性を抑制する遺伝子治療法の開発へと研究を進めた。PXR-薬物耐性因子(MDR1)経路は卵巣癌で組織型や薬物耐性の有無などで異なった発現を認めた。さらに PXR の発現を抑制することにより PXR のリガンドである抗癌剤の抗腫瘍効果が促進されたことから、薬物耐性の治療標的となり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have revealed that pregnane X receptor (PXR) can function as a master regulator to control the expression of drug-metabolizing enzymes, CYP3A family, as well as members of the drug transporter family, including MDR1. We observed that PXR-MDR pathway was expressed in various ovarian cancer tissues and that PXR down-regulation caused a significant increase in cell growth inhibition and enhancement of apoptosis in the presence of the anti-cancer agents, paclitaxel, cisplatin. PXR down-regulation could be a novel therapeutic approach for the augmentation of sensitivity to anticancer agents, or to overcome resistance to them, in the treatment of ovarian cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：婦人科腫瘍学、分子内分泌学
 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：卵巣癌、薬物耐性、核内受容体

1. 研究開始当初の背景

Glucocorticoid, Progesterone, Estrogen, Thyroid hormone, Vitamin A, Vitamin D などの脂溶性リガンドには、それぞれ特異的な核内受容体が存在し、標的DNA配列に結合し遺伝

子の発現を制御している。核内受容体 Pregnane X Receptor (PXR) (SA Kliewer et al; Cell 92, 73-82, 1998) は、リガンドとして複数のステロイドホルモン Progesterone, Dexamethasone, Pregnenolone の他に薬剤な

どのxenobioticsが知られxenobiotics受容体の一つと考えられる。この受容体の標的DNA配列としては肝代謝酵素群のcytochrome P450に属し様々な薬剤や内因性のステロイドホルモンを代謝する酵素(CYP3A)の制御遺伝子上流領域が報告されており、PXRを介した新たなステロイドやxenobioticsの代謝調節機構の存在が示唆されている。

我々は、いくつかの内分泌攪乱物質(endocrine disrupting chemicals; EDC)がPXRを介した転写活性を誘導すること、核内受容体転写制御で重要な役割を持つCoactivatorがこれらEDCの存在下でPXRと結合することを報告してきた(H. Masuyama et al, Mol Endocrinol 14: 421-428, 2000)。このことはEDCの内分泌攪乱作用の機序として従来知られているエストロゲンレセプターなどの核内受容体に結合する直接的作用の他にPXRを介してステロイド代謝に影響する間接的作用の可能性が考えられる。また、PXRが内因性のリガンドであるProgesteroneの存在下で蛋白分解酵素Proteasomeの構成因子であるsuppressor for gall (SUG1)と結合するがPXRのligandであるEDCは、PXR-SUG1結合を誘導せず、PXR蛋白分解を阻害したことから、EDCはPXRのupregulationを介して内分泌機能へ影響を及ぼしている可能性が示唆された(H. Masuyama et al, Endocrinology 143:55-61, 2002)。一方、PXRは卵巣、子宮や胎盤にも発現しており、妊娠経過に伴いPXRやCYP3Aの発現が増加することも報告してきた(H. Masuyama, et al, Mol Cell Endocrinol 172: 47-56, 2001)。PXR-CYP3A系は生殖器官にも発現しており、妊娠中の内因性ステロイドホルモン過剰状態から母児を守る防御機構の役割を担っている可能性を示唆している。子宮内膜癌では、PXRおよびその標的遺伝子であるCYP3A4が発現しており、またPXRはCYP3A4

と正の相関を示し、ERとは負の相関を示したことから、PXRは、そのCYP3Aの発現制御を介して子宮体癌組織内でのステロイド・xenobiotics代謝に影響を及ぼすと考えられた(H. Masuyama, et al, J Clin Endocrinol Metab 88: 4446-4454, 2003)。更に子宮体癌細胞においてPXRのリガンドの中で抗癌剤cisplatinやpaclitaxelはmultiple drug transporterとして薬物耐性で重要な役割を持つ薬物耐性因子(multiple drug resistance 1:MDR1)を、また内因性ステロイドホルモンやEDCなどはステロイド・xenobiotics代謝酵素(CYP3A)をそれぞれの特異的なプロモーターを介して誘導すること(H. Masuyama, et. al., Mol Endocrinol 19: 1170-1180, 2005)、子宮体癌細胞においてRNA干渉法を用いてPXR発現を抑制することによりcisplatinやpaclitaxel投与によりMDR1の発現が誘導されず、薬剤の癌細胞への効果が促進されたことから、PXRの発現を抑制することは薬物耐性を克服する一つの方法と考えられること(H. Masuyama, et. al., Mol Pharmacol 72:1045-53, 2007)を報告した。

2. 研究の目的

卵巣癌では進行した状態で発見され手術不可能な症例や術後化学療法施行するにもかかわらず再発し抗癌剤に対して耐性を持つ症例が多く、5年生存率の向上は頭打ちの状態となっている。このためこれまでの研究成果を踏まえて、平成20年度岡山医学振興会の助成を受け、倫理委員会の許可を得た上で卵巣癌症例でのPXRの発現の検討に着手しpreliminaryなdataであるが多くの症例でその発現を認めた。本研究では引き続きPXRの発現と予後や薬物耐性との相関、組織による発現の相違などの検討を進めた。次にいくつかの卵巣癌由来培養細胞を用いてPXRのリガンドとなる抗癌

剤などの薬物の検索を行い、それらのリガンドの卵巣癌細胞増殖やPXR, CYP3A, MDR発現への影響や薬物耐性への関与などを検討した。更にsiRNAを用いてPXR発現を抑制し薬剤耐性を制御する方法を検討した。またマウスを用いてin vivoでのPXR発現の有無やPXR抑制による抗癌剤効果への影響について検討し、臨床応用に向けてsiRNA至適投与方法を探った。更に抗癌剤に対する感受性は組織型によって大きく異なることから、その原因や治療効果促進への役割についても調べ、明細胞癌など非常に予後の悪い組織型での治療への関わりを検討した。これらの検討によりPXRを介したステロイドホルモン・xenobiotics代謝調節機構を更に解明し、PXR-CYP3A/MDR pathwayの卵巣癌での生物学的動態での役割や薬物耐性機構について検討し、薬物耐性を阻害する治療法開発へと研究を進めていくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PXR-CYP3A4/MDR1経路の卵巣癌症例における臨床的検討

卵巣癌症例の摘出組織で、PXR, CYP3A4, MDR1の発現を免疫組織染色法にて検討し臨床経過、予後を比較検討した。更に組織型による相違、化学療法治療前後での変化、再発・薬剤抵抗性症例で発現などに注目して検討した。

(2) 卵巣癌細胞でのステロイドホルモンや抗悪性腫瘍薬などのPXRを介した転写への影響

異なる組織型由来の卵巣癌細胞におけるPXRおよびそのtarget geneであるCYP3A4やMDR1の発現を蛋白レベル, mRNAレベルで検討する。更にPXRの発現する細胞株を用いて、CYP3AやMDR1上流のPXR標的DNA配列 (PXRE) を組み込んだCAT reporter vector をco-transfectionし、様々な内因性ステロイド

ホルモンや抗癌剤などを投与しPXRを介した転写を誘導する物質(リガンド)を検索した。

(3) PXRリガンドの卵巣癌細胞増殖やPXR, CYP3AやMDR1の発現に及ぼす影響

実験(2)にて得られたPXRのリガンドを用いて、卵巣癌由来細胞の細胞増殖に及ぼす影響をMTS assay などを用いて、またPXR, CYP3AやMDR1の発現に及ぼす影響を蛋白およびmRNAレベルで検討した。

(4) CYP3A4やMDR1標的遺伝子上流の各プロモーター(PXRE)のPXRを介した転写誘導への影響

PXRのリガンドによる各PXREを介した転写誘導がリガンドにより異なるかを検討した。リガンドにより相違があれば、Gel shift assayを用いて各リガンドの存在下でのPXR/RXR複合体のPXREへの結合の違いを検討した。更にDNA affinity immunoblotting assayを用いてPXR/RXR/PXRE複合体へどのようなcoactivatorが結合するか検討し、それぞれのリガンドやプロモーターにより転写誘導に重要なcoactivatorが異なるか否か検討した。

(5) RNA干渉法を用いたPXR発現抑制によるPXRのCYP3AやMDR1発現での役割や細胞増殖へ関与の検討

siRNAを用いてPXRの発現を抑制し、PXRのリガンド、非リガンド両方の抗癌薬の存在下でCYP3AやMDR1発現への影響を検討する。更に細胞増殖やapoptosisへの影響を検討し薬剤の癌細胞への効果を促進するか調べた。また細胞内での薬物濃度や蛍光標識した薬物の細胞外への排出の相違を検討した。

(6) In vivoでのsiRNA直接投与によるPXR抑制のもたらす薬剤耐性阻害効果の検討

ヌードマウスの皮膚に様々な卵巣癌細胞(薬物耐性株、感受性株)を移植し、腫瘍組織へのsiRNA直接投与によりPXR発現が抑制さ

れるか検討した。次にsiRNA直接投与によるPXR発現抑制が腫瘍増大や抗癌剤投与による腫瘍縮小効果に影響を与えるか検討した。更にKnockoutマウスとsiRNA投与マウスでの抗癌剤による効果の比較を行った。

4. 研究成果

(1) ICを得た上で卵巣癌症例の摘出組織で、PXR, CYP3A4, MDR1の発現を免疫組織染色法にて検討し臨床経過、予後を比較検討したところ、PXR及び標的遺伝子CYP3A4, MDRの発現を認め、組織型により発現頻度に差を認めた。薬物抵抗症例で発現が強い傾向を認めた。

(2) 異なる組織型由来の卵巣癌細胞におけるPXRおよびCYP3A4やMDR1の発現を検討したところ、抗癌剤cisplatinやpaclitaxelはMDRの発現を誘導し、細胞腫により誘導能は異なっていた。細胞増殖への影響もPXRの発現量や細胞腫により相違を認めた。

(3) 異なる組織型由来の卵巣癌細胞におけるPXRおよびCYP3A4やMDR1の発現を検討したところ、抗癌剤cisplatinやpaclitaxelはMDRの発現を誘導し、細胞腫により誘導能は異なっていた。細胞増殖への影響もPXRの発現量や細胞腫により相違を認めた。

(4) PXRのリガンドによりPXREを介した転写誘導が異なっていた。各リガンドの存在下でのPXR/RXR複合体のPXREへの結合に相違はなく、PXR/RXR/PXRE複合体へ結合するcoactivatorに違いを認めた。

(5) RNA干渉法を用いてPXR発現を抑制することによりcisplatinやpaclitaxel投与によりMDR1の発現が誘導されず、薬剤の卵巣癌細胞への効果が促進された。

(6) ノードマウスの皮膚に卵巣癌細胞を移植し、その腫瘍組織へのsiRNA直接投与によりPXR発現が抑制され、腫瘍増大や抗癌剤投与による腫瘍縮小効果に影響を与えた。

以上よりPXR-CYP3A4/MDR1経路は卵巣癌細胞で組織型や薬物耐性の有無などで異なった発現を認め、PXRを抑制することにより抗癌剤の効果が促進されたことから、薬物耐性の治療標的となり得ると考えられた。今後、薬剤耐性卵巣癌細胞やPXR knockout mouseを用いた検討を進め、本研究を更に発展させ論文として公表する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① S. Inoue, H. Masuyama, T. Akagi, Y. Hiramatsu: Pregnancy and delivery in patients with Fontan circulation; a report of 2 cases. J Obstet Gynecol Res 39(1):378-382, 2013. 査読有
- ② H. Masuyama, E. Nobumoto, N. Okimoto, S. Inoue, T. Segawa, Y. Hiramatsu: Superimposed preeclampsia in women with chronic kidney disease. Gynecol Obstet Invest 74(4): 274-281, 2012. 査読有
- ③ H. Masuyama, Y. Hiramatsu: Treatment with Constitutive Androstane Receptor Ligand during Pregnancy Prevents Insulin Resistance in Offspring from High-fat Diet-Induced Obese Pregnant Mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 303(2): E293-300, 2012. 査読有
- ④ H. Masuyama, Y. Hiramatsu: Effects of a high fat diet exposure in utero on the metabolic syndrome-like phenomenon in mouse offspring through epigenetic changes in adipocytokine gene expressions. Endocrinology 153(6): 2823-2830, 2012. 査読有
- ⑤ H. Masuyama, E. Nobumoto, S. Inoue, Y. Hiramatsu: Potential interaction of

- brain natriuretic peptide with hyperadiponectinemia in preeclampsia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302(6): E687-E693, 2012. 査読有
- ⑥ H. Masuyama, E. Nobumoto, T. Segawa, Y. Hiramatsu: Severe Superimposed Preeclampsia with Obesity, Diabetes and Mild Imbalance of Angiogenic Factors. *Acta Med Okayama* 66: 173-177, 2012. 査読有
- ⑦ Y. Akahori, H. Masuyama, Y. Hiramatsu: The Correlation of Maternal Uric Acid Concentration with Small for Gestational Age Fetus in Normotensive Pregnant Women. *Gynecol Obstet Invest* 73: 162-167, 2012. 査読有
- ⑧ H. Masuyama, Y. Hiramatsu: Treatment with a constitutive androstane receptor ligand ameliorates the signs of preeclampsia in high-fat diet-induced obese pregnant mice. *Mol Cell Endocrinol* 348(1):120-127, 2012. 査読有
- ⑨ H. Masuyama, Y. Hiramatsu: Potential Role of Estradiol and Progesterone in Insulin Resistance through Constitutive Androstane Receptor. *J Mol Endocrinol* 47(2):229-239, 2011. 査読有
- ⑩ A. Masumoto, N. Takamoto, H. Masuyama, Y. Akahori, S. Inoue, Y. Hiramatsu: Effects of intermittent high glucose on BeWo choriocarcinoma cells in culture. *J Obstet Gynecol Res* 37(10):1365-1375, 2011. 査読有
- ⑪ H. Masuyama, S. Inoue, Y. Hiramatsu: Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in preeclampsia. *Endocrine J*, 58:47-53, 2011. 査読有
- ⑫ H. Masuyama, Y. Hiramatsu: Angiogenic proteins and adipocytokines as markers for prediction of preeclampsia. *Expert Rev Obstet Gynecol* 5:717-725, 2010. 査読有
- ⑬ A. Masumoto, H. Masuyama, N. Takamoto, Y. Akahori, Y. Hiramatsu: Expression of Antiangiogenic Prolactin Fragments in the Placentas of Women with Pregnancy Induced Hypertension. *Acta Med Okayama*, 64:249-255, 2010. 査読有
- ⑭ Y. Akahori, N. Takamoto, A. Masumoto, S. Inoue, H. Nakatsukasa, H. Masuyama, Y. Hiramatsu: Circulating Levels of Ciliary Neurotrophic Factor in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Acta Med Okayama*, 64:129-136, 2010. 査読有
- ⑮ H. Masuyama, H. Nakatsukasa, Y. Hiramatsu: Effect of Oncostatin M on Uridine Diphosphate-5' -Glucuronosyl-transferase 1A1 through Crosstalk with Constitutive Androstane Receptor. *Mol Endo* 24:745-753, 2010. 査読有
- ⑯ H. Masuyama, T. Segawa, Y. Sumida, A. Masumoto, S. Inoue, Y. Akahori, Y. Hiramatsu: Different profiles of circulating angiogenic factors and adipocytokines between early- and late-onset preeclampsia. *BJOG* 117:314-320, 2010. 査読有
- ⑰ A. Masumoto, H. Masuyama, Y. Sumida, T. Segawa, Y. Hiramatsu: Successful Management of Anti-Jra Allo-immunization in Pregnancy: A Case Report. *Gynecol Obstet Invest* 69:81-83, 2010. 査読有
- ⑱ H. Masuyama, M. Matsuda, K. Shimizu, T.

Segawa, Y. Hiramatsu: Pregnancy after living-related liver transplantation associated with severe preeclampsia and a review of the literature. Arch Gynecol Obstet 281(3):423-5, 2010. 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① H. Masuyama, Y. Hiramatsu; <Symposium> Insulin resistance and adipocytokines in gestational diabetes mellitus and preeclampsia. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress & 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, November 24-27, 2012 Kyoto, Japan.
- ② E. Nobumoto, N. Okimoto, S. Inoue, H. Masuyama, Y. Hiramatsu; Effects of the New Diagnostic Criteria for Gestational Diabetes Mellitus (GDM) in Japan, ACOG May 4-9, 2012 San Diego, USA.

[図書] (計5件)

- ① 増山 寿、平松祐司：頸管妊娠に対する妊孕性温存治療。OGS NOW13 機能温存、平松祐司、小西郁夫、櫻木範明、竹田 省編、メジカルビュー社、pp - , 2013.
- ② 増山 寿：妊婦の糖尿病。今日の治療指針2013、山口徹、北原光夫、福井次矢総編集、医学書院、pp647-648, 2013.
- ③ 山上誠二、多田由美子、林 智美、北尾

朋美、萩原雅子、井上五月、高馬章江、岡本真由美、安川純代、増山 寿：玉野市 安心すこやか産後の早期サポート事業報告書 平成23年度安心子ども基金地域子育て創生事業 安心すこやか産後の早期サポート事業報告書 pp1-34, 2012

- ④ 増山 寿；正常分娩および分娩直後の取り扱い、他。HANDBOOK臨床産婦人科，豊田長康監修，平松祐司，宮崎康二，佐川典正編，金芳堂，pp19-23, 24-26, 262-264, 265-271, 2010.
- ⑤ 増山 寿、平松祐司：子宮内容除去術。OGS NOW 4 産科手術、平松祐司、小西郁夫、櫻木範明、竹田 省編、メジカルビュー社、pp8-15, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増山 寿 (MASUYAMA HISASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30314678

(2) 研究分担者

平松 祐司 (HIRAMATSU YUJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80218817

(3) 連携研究者

なし