

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 24 年 4 月 23 日現在

機関番号： 32620  
 研究種目： 挑戦的萌芽研究  
 研究期間： 2010 ～ 2011  
 課題番号： 22659302  
 研究課題名（和文） 子宮内膜症発生・発癌機構へのゲノム多様性の関与  
 研究課題名（英文） Contribution of the genomic diversity to the development and carcinogenesis of endometriosis  
 研究代表者  
 加藤 聖子（ KATO KIYOKO ）  
 順天堂大学・医学研究科・准教授  
 研究者番号： 10253527

研究成果の概要（和文）：子宮内膜幹細胞に変異型 K-Ras を発現させると、長期増殖能・造腫瘍能・ER の発現の亢進・ER 転写能の亢進をみとめた。Ras/ER/AP-1/MDM2/p53/p21 経路に関与する遺伝子群のプロモーター領域の遺伝子多型を解析したところ、MDM2 SNP309 GG 型と TP53 72codonArg/Arg のかけあわせは、子宮体癌症例で有意にリスクの上昇をみとめ、子宮内膜の増殖への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Tumorigenicity and the ER transcriptional activity were enhanced in endometrial stem cells harboring mutant KRAS compared with that in NSP harboring mutant KRAS gene. The ER/MDM2/p53/p21 pathway play an important role in the occurrence of endometrial cancer. The combination of homozygous GG genotype of MDM2 SNP309 and homozygous Arg /Arg genotype of TP53 codon72 was significantly associated the risk of endometrial cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	0	1,900,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	270,000	3,070,000

研究分野：医歯薬学

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 子宮内膜症 子宮体癌 遺伝子多型 エストロゲン p53 MDM2

1. 研究開始当初の背景

(1) 内膜症はエストロゲン依存性疾患であり、悪性変化の報告も増えてきていることより、その発生や発癌機構の解明が急がれる。我々はこれまでに、活性化型 K-Ras の細胞増殖や癌化機構への関与

を研究してきた。その結果、エストロゲン依存性の細胞増殖や癌化機構に K-Ras/ER $\alpha$ /MDM2/p53/p21 のシグナル経路が関与すること (Kato K, Oncogene1997, Kato K, JBC 2002)、エストロゲン活性を抑制すると p53 安定化

し p21 の発現量が増大し細胞老化が誘導されることを報告した (Kato K, JBC2002, Suga S Gynecol Oncol, 2007)。また、プロゲステロンレセプターB (PR-B) を介する経路は ER 機能を抑制し、p21 や p27 の発現を増加させ、細胞老化を誘導し、細胞増殖能や造腫瘍能を著明に抑制した (Kato K, Oncogene 1997, Horiuchi S, Exp Cell Res 2005, Takahashi A, Gynecol Oncol 2009)。また、K-Ras の下流で作用する経路の中で、MAPK を介する経路が apoptosis を促進させ、PI3K を介する経路が apoptosis を回避することを明らかにした (Kuriaki Y, Cancer Res 2004)。最近、マウスを用いた卵巣の内臓症の研究で、K-ras 遺伝子の変異が起これと内臓症が発生し、更に P t e n の欠失が加わると卵巣癌へ進行するというモデルが提唱された。我々の結果と合わせて考えると、子宮内臓症は、子宮内臓細胞に K-Ras の機能亢進が起き、細胞老化機構が逸脱した病態であり、更に Ras の下流で PI3K 機能が MAP-kinase 機能を上回ると apoptosis が回避され細胞の修復機構が破綻し細胞が癌化するという機構が想定される。

(2) 一方細胞老化に関与するシグナルソームの破綻には従来明らかとされてきた体細胞変異のみではなく、ゲノム多様性 (DNA 多型) も関与する。最近では各遺伝子プロモータ領域に存在する一塩基多型の独特の組み合わせ (SNP ハプロタイプ) さらには微小欠失により対立遺伝子間での発現量に顕著な相違 (Allelic Expression Difference; AED) がもたらされることも判明している (Barboux et al 2007, Abdollahi et al 2007)。私たちは疾患感受性或いは薬剤

感受性の形成に関与する日本人に特有な SNP ハプロタイプを同定するため 200 例を超える 1 精子受精・雄核発生全奇胎 DNA ライブラリーを構築した。

## 2. 研究の目的

以上より我々は、子宮内臓症は正常子宮内臓細胞に K-Ras の機能亢進が起き、本来誘導される細胞老化がエストロゲンシグナルの亢進で逸脱した病態であり、更に Ras の下流で PI3K 機能が MAP-kinase 機能を上回ると apoptosis が回避され細胞の修復機構が破綻し細胞が癌化するというメカニズムを想定した。①この機構を証明することと、②その機能的破綻に関与する DNA 多型や AED を示す遺伝子群を明らかにすること、③内臓症でみられる DNA 多型や AED を示す遺伝子群について我々が作製した 1 精子受精・雄核発生全奇胎 DNA ライブラリーを用いて日本人一般集団における SNP ハプロタイプの種類および頻度を決定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 子宮内臓の細胞老化機構が逸脱における K-Ras シグナルの関与の解析

① ラット子宮内臓細胞より幹細胞分画が多く含まれる細胞集団 (side-population: SP) 細胞と non-SP 細胞を分離し、培養した。

② それぞれの細胞に [<sup>125</sup>I] KRAS 遺伝子を形質導入し、活性化型 K-Ras を過剰発現する細胞株を樹立した (SP-Kras, NSP-K-ras)。

③ それぞれの細胞株の増殖能・腫瘍

能・細胞生物学的特性を解析した。

(2) 子宮内膜の癌化機構に関わる遺伝子多型の解析

- ① 学内倫理委員会の承認を得た後、インフォームドコンセントを得た子宮内膜症や子宮体癌の患者から血液を採取し、DNA を抽出した。
- ② 我々が細胞老化逸脱機構に重要と考 えて いる Ras/ER/AP-1/MDM2/p53/p21 経路に関与する遺伝子群の DNA 多型を解析し、子宮内膜症や子宮体癌に頻度の高い DNA 多型を決定した。

4. 研究成果

(1) ラット子宮内膜細胞株 RENT4 細胞から幹細胞の分画を含むことが報告されている side population 細胞と non-SP 細胞を分取した。Estrogen Receptor の発現は SP 細胞に有意に亢進していた。それぞれの細胞に内膜症の発生に関与があることが報告されている K-ras 遺伝子を形質導入した。SP 細胞に K-ras 遺伝子を形質導入したときのみ、長期増殖能・造腫瘍能・ER の発現の亢進・ER 転写能の亢進をみとめた。

さらに、SP細胞とnon-SP細胞の間で発現に差がある遺伝子をマイクロアレイで解析したところ、エストロゲンシグナルに関与する遺伝子やサイトカインの発現の亢進をみとめた。子宮内膜症合併卵巣癌のサンプルを用いて、免疫染色を行ったところ、正常腺上皮に比べて異型内膜腺上皮の部分に epithelial-mesenchymal transition に関与する遺伝子の発現亢進がみられた。以上より、子宮内膜症の発生に子宮内膜幹細胞が関与し、エストロゲンやサイトカインのシグナルが重要であることが示唆された。

(2)

①以前我々が、子宮内膜の増殖や癌化に重要であると報告した Ras/ER/AP-1/MDM2/p53/p21経路に関与す

る遺伝子群のプロモーター領域の遺伝子多型を解析するためのプライマーを設計した(MDM2 SNP309, TP53 Arg72Pro, ER $\alpha$  PvuII and XbaI, p21 codon31)。②子宮内膜症の患者サンプル数が目標解析数に達していないため、まず、同意を得た子宮体癌125症例、健常者200例から血液を採取し、DNAを抽出後、PCRとRFLPにより上記遺伝子多型を解析した。③MDM2 SNP309 GG型はTT型に比べ、子宮体癌患者でのオッズ比が上昇していたが、有意差はなかった(OR 1.79 [0.93-3.30])。TP53, ER $\alpha$ , p21の多型はいずれも関連をみとめなかった。④MDM2 SNP309 GG型とTP53 72codonArg/Argのかけあわせは、子宮体癌症例で有意にリスクの上昇をみとめた。p53とMDM2の結合阻害剤であるRITAを用いて子宮体癌細胞株の増殖抑制効果を検討したところ、非添加群に比べてMDM2 SNP309 TT型のHec6は90%、TG型のHHUAは54%、GG型のSawanoは49%であり、MDM2 SNP309のGアリの存在が阻害剤の効果に影響することが示された。

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 11 件)

- ① Fukushima K, Tsukimori K, Li D, Takao T, Morokuma S, Kato K, Seki H, Takeda S, Matsumura S, Wake N. Effect of transient TCDD exposure on immortalized human trophoblast-derived cell lines. Hum Exp Toxicol (査読有) Published online before print October 25, 2011, doi: 10.1177/0960327111424305
- ② Takao T, Asanoma K, Kato K, Fukushima K, Tsunematsu R, Hirakawa T, Matsumura S, Seki H, Takeda S, Wake N. Isolation and Characterization of Human Trophoblast Side-Population (SP) Cells in Primary Villous Cytotrophoblasts and

- HTR-8/SVneo Cell Line. PLoS One. (査読有)6:2011, e21990
- ③ Onoda A, Ueno T, Uchiyama S, Hayashi SI, Kato K, Wake N. Effects of S-equol and natural S-equol supplement (SE5-OH) on the growth of MCF-7 in vitro and as tumors implanted into ovariectomized athymic mice. Food Chem Toxicol. (査読有) 49(9):2011, 2279-2284.
- ④ Kato K, Kuhara A, Yoneda T, Inoue T, Takao T, Ohgami T, Dan L, Kuboyama A, Kusunoki S, Takeda S, Wake N. Sodium Butyrate inhibits the Self-Renewal Capacity of Endometrial Tumor Side-Population Cells by Induction a DNA Damage Response. Mol Cancer Ther. (査読有)10:2011,1-10
- ⑤ 寺尾泰久, 須賀新, 楠木総司, 木村美葵, 荻島大貴, 加藤聖子, 竹田省, 正岡亜希子, 樋野興夫, 福村由紀, 八尾隆史.子宮内膜症ダグラス窩深部病変から発生したと考えられる腺癌の一例. 日本産科婦人科学会関東連合地方部会誌. (査読有)47:2010, 149-156.
- ⑥ 卵巣子宮内膜症性のう胞摘出後の再発に関する検討. 中村博子、加藤聖子、内田聡子、恒松良祐、磯邊明子. 日産婦内視鏡学会雑誌. (査読有)25:2010,442-446.
- ⑦ A definitive haplotype map as determined by genotyping duplicated haploid genomes finds a predominant haplotype preference at copy number variation events. Kukita Y, Yahara K, Tahira T, Higasa K, Sonoda M, Yamamoto K, Kato K, Wake N, Hayashi K. The American Journal of Human Genetics. (査読有) 86:2010,918-928.
- ⑧ Specific regulation of point-mutated K-ras-immortalized cell proliferation by a photodynamic antisense strategy. Higuchi M, Yamayoshi A, Kato K, Kobori A, Wake N, Murakami A. Oligonucleotides. (査読有)20,2010,37-44.
- ⑨ Low-dose mithramycin exerts its anti-cancer effect via the p53 signaling pathway and synergizes with nutlin-3 in gynecologic cancers. Ohgami T, Kato K, Kobayashi H, Sonoda K, Inoue T, Yamaguchi S, Yoneda T, Wake N. Cancer Sci. (査読有)101:2010, 1387-1395.
- ⑩ Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage. Kato K, Takao T, Kuboyama A, Tanaka Y, Ohgami T, Yamaguchi S, Adachi S, Yoneda T, Ueoka Y, Kato K, Hayashi S, Asanoma K, Wake N. Am J Pathol. (査読有)176:2010, 381-392.
- ⑪ Characterization of side-population cells in human normal endometrium and endometrial cancer cells.Review. Kato K. and Wake N. Curr.Res. in Cancer. (査読無)4:2010, 51-66.
- [学会発表] (計8件)
- ① Sodium butyrate inhibits the self-renewal capacity of endometrial tumor

- side-population cells by inducing a DNA damage response. Kiyoko Kato, Aya Kuhara, Tomoko Yoneda, Takafumi Inoue, Tomoka Takao, Tatsuhiro Ohgami, Li Dan, Ayumi Kuboyama, Soshi Kusunoki, Satoru Takeda, Norio Wake. 第9回 幹細胞シンポジウム 2011 5.13-14 (東京)
- ② 子宮内膜幹細胞 (side population細胞) の発癌機構への関与. 加藤聖子、楠木総司、木村美葵、金田容秀、須賀新、寺尾泰久、和氣徳夫、竹田省. 第50回日本婦人科腫瘍学会 2011 7.22-24 (札幌)
- ③ 子宮体癌stem-like cellに対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果と作用機序. 加藤聖子、楠木総司、金田容秀、木村美葵、須賀新、寺尾泰久、和氣徳夫、竹田省. 第63回日本産科婦人科学会学術集会 2011 8.29-31 (大阪)
- ④ Sodium butyrate inhibits the self-renewal capacity of endometrial tumor side-population cells by inducing a DNA damage response. Kiyoko Kato第70回日本癌学会学術総会 2011 10.3-5 (名古屋)
- ⑤ 子宮体癌幹細胞の生物学的特性の解析と癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発. 加藤聖子第15回バイオ治療法研究会 2011 12.3 (福岡)
- ⑥ Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage. Kiyoko Kato The 8<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium 2010/5/13-15 (Awazi city)
- ⑦ 子宮体癌幹細胞における生物学的特性の解析と標的治療開発の試み. 加藤聖子 第48回日本癌治療学会学術集会 シンポジウム 2010/10/28-30 (京都)
- ⑧ Characterization of side population cells in human endometrium and endometrial cancer Kiyoko Kato Kaohsiung International Cancer Symposium 2010/11/21-22 (Kaohsiung, Taiwan)
- [図書] (計2件)
- ① 楠木総司、加藤聖子 学研メディカル秀潤社 婦人科・乳腺外科疾患ビジュアルブック 胞状奇胎 2011、236-239
- ② 寺尾泰久、加藤聖子 学研メディカル秀潤社 婦人科・乳腺外科疾患ビジュアルブック 絨毛癌、存続絨毛症 2011 240-244
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
加藤聖子 ( KATO KIYOKO )  
 順天堂大学・医学研究科・准教授  
 研究者番号：10253527
- (2) 研究分担者  
 北出真理 (KITADE MARI)  
 順天堂大学・医学部・准教授  
 研究者番号：20266026
- 和氣徳夫 (WAKE NORIO)  
 九州大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：60091584