

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592466

研究課題名(和文) 子宮体部明細胞腺癌における新たな発癌プロセスと創薬

研究課題名(英文) Drug discovery and a new carcinogenic process in the clear cell adenocarcinoma of uterine body

研究代表者

平澤 猛 (HIRASAWA, Takeshi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：70307289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：目的:我々は卵巣明細胞腺癌でmTOR-HIF pathwayが特異的に亢進しており、この系の活性化が予後不良の一因であることを報告してきた。今回Type Iに比して予後不良であるType II体癌におけるmTOR-HIF系の動態について検討した。材料・方法:Type II体癌27例を用いてmTOR-HIF系の免疫組織化学を施行した。結果:全例でリン酸化mTOR、HIF-1、HDAC7の発現を認め、とりわけ明細胞腺癌で高い傾向を認めた。考察:Type II体癌においては組織型の差に関わらず全例でmTOR-HIF系の亢進が認められたことから、mTOR-HIF系が活性化していることが推察された。

研究成果の概要(英文)：Purpose: We have reported that the mTOR-HIF pathway is specifically activated in ovarian clear cell adenocarcinoma (OCCA), and that its activation is a factor related to a poor prognosis of this cancer. In the present study, we focused on Type II endometrial cancer, which has a poor prognosis compared with Type I cancer, and studied the dynamics of mTOR-HIF-related factors. Methods: We performed immunohistochemical staining and clinicopathologic analysis of mTOR-HIF-related factors in 27 patients (Type II endometrial cancer). Results: Expression of phospho-mTOR (p-mTOR), HIF-1a, and HDAC7 was detected at different levels in all of the Type II endometrial cancers. The level of expression tended to be higher in clear cell adenocarcinoma, but the difference was not significant. Discussion: In the present study, activation of the mTOR-HIF pathway was observed in all patients with Type II endometrial cancer regardless of the histology.

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：明細胞腺癌 Type II 体癌 mTOR HIF-1 HDAC7

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦においては肥満、糖尿病、食事の欧米化、晩婚化、出産回数低下などの社会的背景から子宮体癌の罹患率が増加傾向にあることが知られている。実際に子宮癌治療に対する子宮体癌の割合は増加の一途にある。多くの子宮体癌症例は早期癌として診断されることから、比較的予後良好の癌と認識されているが、実際には、早期子宮体癌の多くは手術療法単独のみならず術後放射線療法や補助化学療法との併用により治療することが多い。

子宮体癌は一般的には type 体癌とよばれる類内膜腺癌であることが多いが、近年 type 体癌と呼ばれる亜型である漿液性、明細胞腺癌の発生も増加傾向にある。これらの亜型は type 体癌に比較して予後不良であることから、治療に難渋する例もしばしば散見される。これらのことから type 体癌の治療戦略として同様の組織型を有する上皮性卵巣癌と同等の様々な分子標的治療薬の開発が急務であると考えられている。

我々は現在までに Type 体癌と類似する卵巣明細胞腺癌、漿液性腺癌において腫瘍の微小環境の変化がもたらす腫瘍の悪性化に着目し、低酸素誘導因子 HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1- α)の発現解析から、腫瘍細胞の虚血に伴う低酸素応答のメカニズムと腫瘍の増殖、転移、悪性化との関連性について検討を重ねてきた。HIF-1 は α 、 β のサブユニットからなり、細胞が低酸素に陥ると、二量体を形成し転写因子 HIF-1 として VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)をはじめとする約 50 種類以上の血管新生・腫瘍増殖関連因子および解糖系酵素を転写することが知られている。これらのことから、腫瘍においては、酸素恒常性の維持のみならず腫瘍増殖のマスター因子としてその機能に注目が集まっている。一方、現在までの我々の検討からは HIF-1 α の発現はこれらの組織型において、低酸素環境のみならずとりわけ悪性度の高い症例および明細胞腺癌に高頻度に発現しており、HIF-1 α の発現は低酸素に依存しない、新たな制御機構の存在が考えられた(Oncol Rep. 19: 111-6. 2008.)。近年これに関連して酸素濃度に依存しない HIF-1 α の制御が mTOR(mammalian Target of Rapamycin)シグナル伝達系により翻訳レベルで制御されることが報告されてきている。mTOR はマクロライド系抗生剤ラパマイシンによって阻害されるセリン/スレオニンキナーゼであり、ラパマイシンは、リンパ球増殖抑制による免疫応答の阻害をする。そこで我々は漿液性・明細胞腺癌において mTOR・p-mTOR(phosphorylated mTOR)の発現を解析した結果、漿液性に比較して明細胞腺癌において p-mTOR の発現が有意に亢進しており(p<0.001)、エフェクターのリン酸化も亢進していたことから明細胞腺癌においては

mTOR シグナル伝達系の亢進が酸素濃度に依存しない HIF-1 α の過剰発現を引き起こし、その結果 VEGF をはじめ様々な腫瘍増殖因子の発現を亢進させることで、悪性形質の獲得、さらには治療への抵抗性を示すものであることを報告した(Pathol Int. 59: 19-27. 2009.)。

mTOR の阻害剤であるラパマイシンはシクロポリン、タクロリムスに続く第 3 の免疫抑制剤である。ラパマイシンは FK506 と類似した構造を持ち、細胞内では mTOR のキナーゼドメインの N 末端側にある FRB ドメインに FKBP12(FK506-binding protein)とラパマイシンの複合体である Rapamycin-FKBP12 が結合することで mTOR のキナーゼ活性が阻害され、その下流エフェクターである p70S6K、4E-BP1 へのシグナル伝達がブロックされる。p70S6K、4E-BP1 のリン酸化が阻害されるとタンパク翻訳の低下が起こり、細胞の成長、増殖は阻害される。ラパマイシンはその免疫抑制作用から本邦でも心移植での拒絶反応を抑制する目的から 2007 年 3 月に誘導体 RAD001 (everolimus) は商品名サーティカン錠として発売された。everolimus は mTOR 経路の新しい経口阻害剤であり、近年、複数のタイプのがんに対して幅広い臨床的な有効性が報告されてきている。とりわけ everolimus は、先に述べたエフェクターである p70S6K、4E-BP1 がリボソームにおける mRNA からタンパクへの翻訳調節因子であることから、様々な mRNA の翻訳抑制するとともに、サイクリン D1 にも影響を与え、細胞周期のゲートキーパーとして働くことが明らかになってきた。また、血管新生にも大きな影響を与え、everolimus が、腫瘍細胞の成長を直接的に阻害するとともに、新しい血管の形成(angiogenesis)を阻害すること、さらにこれには HIF-1 を介した VEGF の抑制によるものであることが示されている。他方では、ラパマイシンは心臓冠状動脈治療における再狭窄防止効果も報告されており、幅広い分野で重要な位置を占めはじめています。

2. 研究の目的

近年、Hadson らにより、ラパマイシンによる mTOR の阻害は、HIF-1 α の発現を抑制すること、さらにこれに関連して Gaba らは、mTOR による VEGF の発現抑制に HIF-1 が関与しており、mTOR 阻害剤は、HIF-VEGF を通じた腫瘍増殖抑制、血管新生阻害効果もあることを報告した。一方、Huang らにより、変異型 p53 を発現する細胞がラパマイシン投与でアポトーシスが誘導されるのに対し、正常な p53 の導入することでアポトーシスが回避されることが報告されている。これらのことから将来的に癌細胞における p53 などの遺伝子変異パターンを解析することにより、ラパマイシンの感受性の予測が可能になる可能性も考えられる。さらに、Grunwald らはドキシソルピシンに対して耐性を示す前立腺

癌細胞に mTOR 阻害薬の処置を行った結果、mTOR 阻害薬による増殖阻害のみならず、ドキソルビシンに対する感受性が回復したことを報告しており、一般的に多剤併用が中心の婦人科領域において薬剤感受性を改善する可能性が秘められている。我々は現在までに上皮性卵巣腫瘍において HIF-1 α の発現は腫瘍の悪性化により発現が増大すること (Arch Gynecol Obstet 2008, 277:539-46)、とりわけ明細胞腺癌では HIF-1 α タンパクおよび mRNA 発現が有意に亢進していること (Oncol Rep. 2008, 19:111-6)、さらに上皮性卵巣癌の他の組織型に比して明細胞腺癌において HIF-1 の転写活性も高いことを報告しており (Arch Gynecol Obstet, 279: 789-96, 2009)、これらの結果を踏まえ、前段階基礎試験として mTOR 阻害薬 Rapamycin が卵巣明細胞腺癌培養株 (HUOCA-) において HIF-1 α 、VEGF の発現を抑制したことも既に報告している (Acta Histochem Cytochem, 40:139-42 2007)。最近では mTOR シグナル伝達系の亢進は抗アポトーシス活性を示し、とりわけ白金製剤に抵抗性を示すことも報告されてきており、明細胞腺癌術後抗癌剤治療において mTOR 阻害薬を併用したレジメンは現行の化学療法への感受性を飛躍的に改善することが強く期待される。これらのことから我々は子宮体癌の明細胞腺癌においても同様の現象が起きているものと予測し、

第一段階として当院における子宮体癌症例を用いた本シグナル伝達経路における種々の因子の発現について後方視的解析を行う。第二段階として、in vitro, in vivo における腫瘍増殖抑制、血管新生阻害に着目をした mTOR 阻害剤 (Rapamycin/Everolimus) における種々の発現動態の解明、第三段階として、mTOR 阻害剤単剤・多剤併用による mTOR-HIF シグナル伝達経路をターゲットした治療薬としての可能性、治療への応用性について検討する。これらのことから難治性である卵巣および子宮体部に発生する明細胞腺癌における新たな治療方針を分子生物学的側面から包括的に捉えることで、本邦におけるスピーディーな治療戦略の確立を目指し、治療成績の改善を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学を用いたタンパクの発現解析

当院産婦人科において当年度に根治を目的に外科的に切除された子宮体部腫瘍 type II 体癌の摘出検体を、10%ホルマリンによって固定後、パラフィン包埋し、薄切を行う。薄切したパラフィン切片を用い、脱パラフィン後に内因性ペルオキシダーゼ処理、抗原性賦活化処理を行った後、1 次抗体として HIF-1 α 抗体 (NOVUS Biological 社, 1:60)、mTOR ならびに p-mTOR 抗体 (Cell signaling, 1:100)、HDAC7 (NOVUS Biological 社, 1:100) を、2 次抗体には EnVision Kit (DAKO 社) を用い酵素抗体間

接法により免疫組織化学を施行し、種々の因子の発現について半定量的に病理学的解析を行い、用いた解析方法は、以下とした。

(2) 評価方法 (スコアリング)

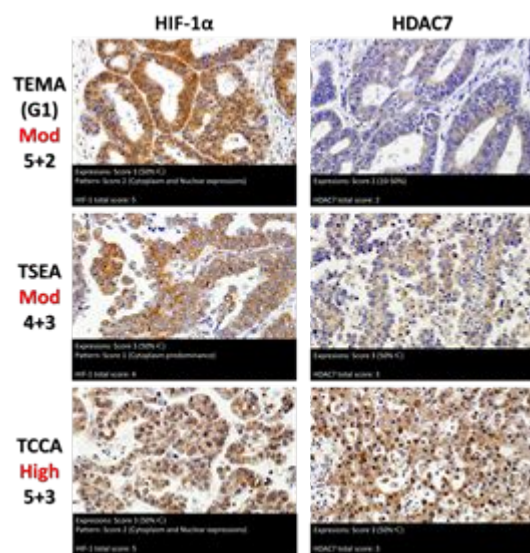
HIF-1 α 、HDAC7 の発現はその陽性率を 0 ~ 3 (0: 0%, 1: 1-10%, 2: 10-50%, 3: 50% <) で各種評価。

HIF-1 α の発現パターンも同様に

0 ~ 3 (0: no expression, 1: Cytoplasm predominance, 2: Cytoplasm and Nuclear expressions, 3: Nuclear predominance) で各種評価。

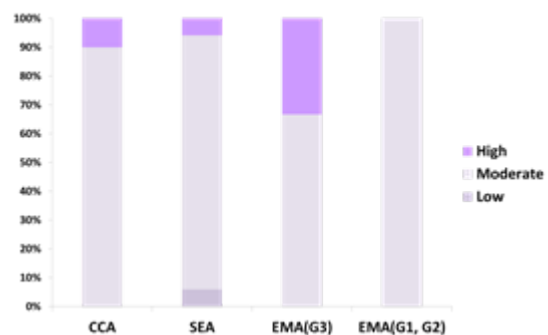
これらをすべて合計し、Score 0 ~ 9 で評価した。さらに 0 ~ 2: Low, 3 ~ 7: Moderate, 8 ~ 9: High に分類し、解析を行った。

4. 研究成果



Type II 体癌の全例で種々の程度の phospho-mTOR (p-mTOR)、HIF-1 α 、HDAC7 の発現を認めた。とりわけ明細胞腺癌で高い傾向を認めたが有意な差は認められなかった。HDAC7 の発現は heterogeneity な染色態度を示し、TSEA、TCCA とともに細胞質に発現を認めたが、TCCA の 1 例では唯一、核・細胞質の両者に発現を認めた。

HIF-1 α -HDAC7 発現プロファイルスコア



今回の検討から、Type II 体癌においては組織型の差に関わらず全例で mTOR-HIF pathway の亢進が認められたことから、

mTORの活性化が Type II 体癌の予後不良因子の一因であることが考えられた。また、HIF-1 α が細胞質・核陽性で HDAC7 強陽性症例は予後不良であったことから、今後 HIF-1 下流因子の発現と予後との相関についても詳細に検討したい。

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7件)

Ikeda M, Kan-no H, Hayashi M, Tsukada H, Shida M, Hirasawa T, Muramatsu T, Ogushi Y, Mikami M. Predicting perioperative venous thromboembolism in Japanese gynecological patients. PLoS One. 2014. in press. 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0089206. eCollection 2014.

Hirasawa T, Miyazawa M, Yasuda M, Shida M, Ikeda M, Kajiwara H, Matsui N, Fujita M, Muramatsu T, Mikami M. Alterations of hypoxia-induced factor signaling pathway due to mammalian target of rapamycin (mTOR) suppression in ovarian clear cell adenocarcinoma: in vivo and in vitro explorations for clinical trial. Int J Gynecol Cancer. 2013. 23(7):1210-8. 査読有 doi: 10.1097/IGC.0b013e31829d2d51.

Togo A, Muramatsu T, Tsukada H, Ikeda M, Shida M, Hirasawa T, Maeda H, Mikami M. Case of metastatic uterine cervical squamous cell carcinoma in the right atrium. Tokai J Exp Clin Med. 2013. 38(1):42-5. 査読有

Sugiyama T, Miyazawa M, Mikami M, Goto Y, Nishijima Y, Ikeda M, Hirasawa T, Muramatsu T, Takekoshi S, Iwamori M. Enhanced expression of sulfatide, a sulfated glycolipid, in well-differentiated endometrial adenocarcinoma. Int J Gynecol Cancer. 2012. 22(7):1192-7. 査読有 doi: 10.1097/IGC.0b013e31825f639f.

Tsukada H, Muramatsu T, Miyazawa M, Iida T, Ikeda M, Shida M, Hirasawa T, Kajiwara H, Murakami M, Yasuda M, Mikami M. Long Term Prognostic Implications of Expression of Glucose Transporter-1 and Hexokinase II in Patients with Stage I Uterine Leiomyosarcoma. Acta Histochem Cytochem. 2012. 45(2):147-54. 査読有 doi: 10.1267/ahc.11063.

Harasawa M, Yasuda M, Hirasawa T, Miyazawa M, Shida M, Muramatsu T, Douguchi K, Matsui N, Takekoshi S, Kajiwara H, Yoshiyuki Osamura R, Mikami M. Analysis of mTOR inhibition-involved pathway in ovarian clear cell adenocarcinoma. Acta Histochem Cytochem. 2011.44(2):113-8. 査読有 doi: 10.1267/ahc.10029.

Ikeda M, Muramatsu T, Shida M, Hirasawa T, Ishimoto H, Izumi S, Mikami M. Surgical management of vulvar lymphangioma circumscriptum: two case reports. Tokai J Exp Clin Med. 2011.36(1):17-20. 査読有

[学会発表](計50件)

平澤 猛, 宮澤 昌樹, 宮澤 麻里子, 榎山 知紗, 矢坂 美和, 榎山 知明, 菅野 秀俊, 田島 敏樹, 井浦 文香, 塚田 ひとみ, 池田 仁恵, 信田 政子, 村松 俊成, 安田 政実, 三上 幹男. Type II 子宮体癌の予後不良因子に mTOR-HIF-HDAC7 Pathway が関与している/第 54 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会/2013 年 7 月 19 日~21 日/グランパシフィック LE DAIBA

宮澤 昌樹, 平澤 猛, 宮澤 麻里子, 安田 政実, 加藤 智美, 梶原 博, 信田 政子, 池田 仁恵, 松井 成明, 村松 俊成, 三上 幹男/卵巣明細胞腺癌の予後改善を目指して 上皮性卵巣癌における HIF-1 の転写活性と HDAC7 発現の意義/第 54 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会/2013 年 7 月 19 日~21 日/グランパシフィック LE DAIBA

平澤 猛, 平野 結希, 菅野 秀俊, 田島 敏樹, 塚田 ひとみ, 池田 仁恵, 信田 政子, 村松 俊成, 石本 人士, 和泉 俊一郎/第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会/2013 年 5 月 10 日~12 日/ロイトン札幌、ホテルさっぽろ芸文館、札幌プリンスホテル、札幌市教育文化会館

宮澤 昌樹, 平澤 猛, 信田 政子, 池田 仁恵, 梶原 博, 松井 成明, 宮澤 麻里子, 村松 俊成, 安田 政実, 三上 幹男/上皮性卵巣癌における HIF-1 の転写と HDAC7 との関連性/第 52 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会/2012 年 7 月 19 日~21 日/グランプリンスホテル新高輪

平澤 猛, 宮澤 昌樹, 西島 義博, 杉山 太郎, 池田 仁恵, 信田 政子, 村松 俊成, 三上 幹男/ Type II 体癌では mTOR-HIF pathway が亢進している/第 52 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会/2012 年 7 月 19 日~21 日/グランプリンスホテル新高輪

Hirasawa T. New JGOG Trial Concept

for Recurrent Clear cell Carcinoma of
the Ovary (EVEROCC Phase II Trial).
14th Biennial Meeting of the
International Gynecologic Cancer
Society (IGCS). 2012年10月13日～16
日/Vancouver Convention Centre

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

平澤 猛 (HIRASAWA, Takeshi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：70307289