

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23659120

研究課題名(和文) CRHR1 陽性子宮内膜癌細胞発現におけるストレス影響と遺伝的背景の解明

研究課題名(英文) Effect of Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) and CRH Receptor1 (CRH-R1) Gene Variants in Human Endometrial Cancer

研究代表者

佐藤 菜保子 (Sato, Naoko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40457750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Corticotropin-Releasing Hormone (CRH)は視床下部より分泌され、Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis: HPA軸とよばれる生体調節システムに中枢性に関与し、ストレス防御に不可欠な糖質コルチコイドの合成・分泌の制御を行い、ストレスのcommon mediatorとして重視されている。本研究において87例の子宮内膜癌患者の分析を行なった結果、CRH、CRHR1、CRHR2の発現が子宮内膜癌細胞の細胞質において確認され、CRHR1の腫瘍組織内の発現は独立した予後因子である可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Corticotropin-releasing hormone (CRH), a major regulator of the stress response, regulates various biological functions through its interaction with CRH receptors 1 (CRHR1) and 2 (CRHR2). CRH, CRHR1, and CRHR2 have recently been reported in several types of carcinoma. In our study results, CRH, CRHR1, and CRHR2 immunoreactivity was detected in the cytoplasm of endometrial carcinoma cells. And suggest that intratumoral CRH-CRHR1 signaling plays an important role in the progression of endometrial carcinoma and that CRHR1 is a potent prognostic factor in patients with this disease.

研究分野：がん ストレス CRH 健康関連QOL

キーワード：がん ストレス CRH QOL

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は女性の生活習慣および環境の変遷によって罹患率が上昇し、死亡率も増加しているとされている(阪埜,2008)。子宮癌は他癌と同様、癌遺伝子変異や癌抑制遺伝子変異による発症が要因の一つと考えられているが、ジェネティックな変化のみでは発癌の機序は十分に説明できておらず(阪埜,2008)、多様な要因によって発症し、増殖するものと考えられ、各方面での研究が進められている。また、ストレス社会と言われる近年では、一般に、癌の発症とストレスとの関連について注目されている。しかし、この関連についてはまだ解明には至っていない。

ストレスに関する専門分野では、ストレスの common mediator として Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) が重視されている(Fukudo,1998)。CRH は視床下部より分泌され、Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis: HPA 軸とよばれる生体調節システムに中枢性に関与し、ストレス防御に不可欠な糖質コルチコイドの合成・分泌の制御を行っており(金澤,2007)、ストレスに関連した内分泌機能の中枢として重要な意味を示す。この CRH とそのレセプターである Corticotropin-Releasing Hormone Receptor 1 (CRHR1) は子宮内膜にも存在し(Grammatopoulos,1998,1999;Grazia,2006)、おもに月経や出産時に生じるとされる子宮内膜の脱落膜反応を制御していることが明らかにされている(Blasio,1997)。これは、子宮内膜において CRH と CRHR1 が内分泌作用に関与していることを示し、その作用は、個体の受けるストレス感受性の影響を受ける可能性も有り得ると考えられる。

また、CRH とそのレセプターは子宮において、正常細胞のみならず癌細胞にも発現が見られるタイプの癌があることが子宮内膜癌細胞の免疫染色によって確認されている(Grazia,2006)。さらに、in vitro の実験では、子宮内膜癌の細胞株のひとつである Ishikawa 細胞は CRH 投与によってテロメアが短縮する(Faraoni,1997,2000)など、CRH が癌の発生や増殖に分子生物学的およびジェネティックにも関与している可能性が示唆されている。CRH はストレス感受性と遺伝的要因の解明の側面から、CRH の遺伝子多型と実際のストレス反応の表現型に関する分析が世界的にも注目が高まっている。癌細胞の発現・増殖に関しても、ストレスとの関連を考える際、CRH との関連を明らかにすることは重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究はストレスの common mediator として重視されている CRH およびそのレセプターである CRHR1 に着目し、癌の発現・増殖との関連を明らかにすることを目的とする。具

体的には、仮説：CRH および CRHR1 の発現の有無によって、癌の進行や予後(生存期間)に違いがある、を検証する。この仮説を検証するために以下のステップを踏む。

(ステップについては、研究体制の変更に伴い、当初の計画に修正を加えた。ステップ 2 以降は癌種を変更とした。)

ステップ 1) CRH および CRHR1 の発現の状況を子宮内膜癌の過去症例を用い明らかにし、無再発生存期間および全生存期間との関連を明らかにする。

ステップ 2) 前向き調査により、癌細胞における CRH および CRHR1 陽性の発現と被験者のストレス感受性との関連を明らかにするとともに、長期的には被験者の無再発生存期間および全生存期間との関連を明らかにする。

ステップ 3) 癌細胞における CRH および CRHR1 の遺伝子多型を解析し、遺伝子型による無再発生存期間および全生存期間との関連の関連を明らかにする。

3. 研究の方法

ステップ 1) 子宮内膜組織の癌部・非癌部の病理組織標本を用いて、CRH、CRHR1、CRH 系の作用による変化の可能性が考えられる性ホルモン等を免疫染色し、組織内における発現部位、発現量を評価する。結果をカテゴリー分類し癌の進行ステージなど種々の臨床病理的因子と比較する。

ステップ 2) 病理組織に関する部分はステップ 1 に準じた前向き調査を実施する。ストレスに関する調査は、治療前、手術前、手術後 1、3、6 カ月の時点で評価を行う。調査はストレスを反映すると考えられる QOL、抑うつ、不安等に関する質問紙を用いる。組織学的な結果と臨床病理的因子とストレス、QOL の各尺度との関連を分析する。

ステップ 3) 摘出した腫瘍細胞および同一症例の末梢血液から DNA を抽出し、CRH ならびに CRHR1 の DNA の塩基配列の分析を行う。さらに末梢血液の DNA において CRHR1 遺伝子多型の遺伝子型を分類し、種々の臨床病理的因子および質問紙調査の結果得られたストレス表現型と比較する。

細胞組織の評価は、先行研究(F. Miceli et al. 2009) を参考に手術後検体パラフィン包埋ブロックを用い、CRHR1 の発現について、抗体による免疫組織化学染色によって解析する。

4. 研究成果

研究は研究期間内にステップ 1、2 まで実施し、仮説：CRH および CRHR1 の発現の有無によって、癌の進行や予後(生存期間)に違いがある、が成り立つという一定の結果を得

た。
 具体的には、子宮内膜癌の過去標本を用いて CRH, CRHR1, CRHR2 抗体を用いた免疫染色によりがん細胞ならびに他の細胞組織におけるこれらの分子の局在を明らかにした結果、CRH、CRHR1、CRHR2 は癌細胞の細胞質に陽性となり、各々26%、15%、10%の症例が陽性であった。(Fig.1)。

Figure 1.

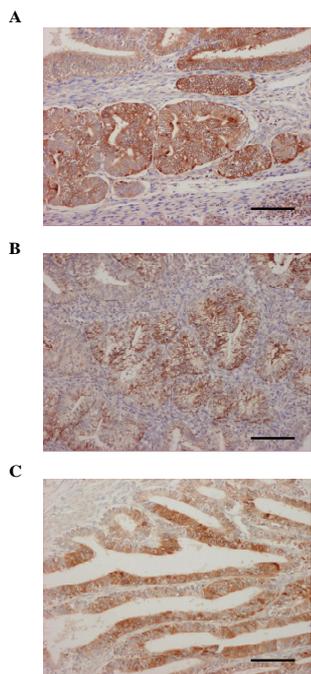


Figure 1. Immunohistochemistry for CRH (A), CRHR1 (B), and CRHR2 (C) in endometrial carcinoma specimens. Corticotropin-releasing hormone, CRHR1, and CRHR2 are immunolocalized in the carcinoma cells. Bar, 100 μm.

また、再発・生存等の診療情報を収集し、これらの分子の発現と子宮内膜癌の再発・生存予後の関連について Kaplan Meier 法による生存分析を行った結果、CRHR1 陽性群は陰性群よりも無再発生存期間 ($p = 0.023$ Fig. 2C) および全生存期間 ($p = 0.009$ Fig. 2D) で不良だった。また、多変量解析によって CRHR1 は無再発生存期間および全生存期間において独立した予後因子であることが示唆されるという結果が得られた。

現段階の解析の結果では子宮内膜癌は一般的に予後が良く、次のステップの前向き研究で生存分析を行う際は、さらに適格な疾患を検討し候補に挙げる必要性も示唆された。よって子宮内膜癌に限定せず癌に対する CRH の働きを明らかにするために症例を検討したところ、膵癌は未だ予後不良であること、内分泌系の臓器であること、男女に発症することなどの理由から、前向き調査部分の検討は癌種を変更し、子宮内膜癌の研究と並行して膵癌の過去症例の検討および前向き調査を開始した。

膵癌では子宮内膜癌と同様、CRHR1 で全生存期間が低下する結果を示していた。患者のストレスとの関連については、情動と QOL との関連を今後検討してゆく予定であり、現在は症例の蓄積を継続しながら、患者のストレスと QOL に関する部分の公表を適宜進めている。

ステップ 3 の CRH 系の遺伝子多型に関して、現在は別途、過敏性腸症候群を対象としたストレスの表現型との関連に関する共同研究を進めている。遺伝子解析に関する近年の状況は、研究手法が研究計画段階よりも飛躍した。癌を対象とした本研究は、当初計画した限定 SNP の解析だけでなく、未知の SNP の存在も視野に、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析の活用が望ましいと考えられ、予算的側面で再検討が必要な状況である。

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)

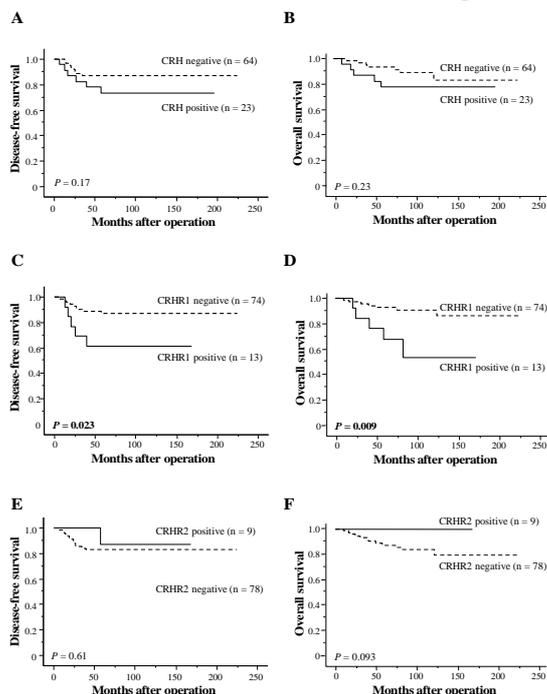
〔雑誌論文〕(計 1 件)

Naoko Sato, Kiyoshi Takagi, Takashi Suzuki, Yasuhiro Miki, Sota Tanaka, Satoru Nagase, Hitoshi Warita, Shin Fukudo, Fumiko Sato, Hironobu Sasano, and Kiyoshi Ito. Immunolocalization of corticotropin-releasing hormone (CRH) and its receptors (CRHR1 and CRHR2) in human endometrial carcinoma: CRHR1 as a potent prognostic factor. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2014 Nov;24 (9):1549-57. (査読あり)

〔学会発表〕(計 10 件)

佐藤菜保子, 佐藤富美子, 片寄友, 中川

Figure 2.



圭, 元井冬彦, 川口圭, 海野倫明. 膵腫瘍患者の手術後6ヶ月までのQOLに関する縦断研究, 第29回日本がん看護学会学術集会, 2015年2月28日-3月1日. 横浜市(パシフィコ横浜)

小室葉月, 佐藤菜保子, 佐々木彩加, 鈴木直輝, 金澤素, 青木正志, 福土審. コルチコトロピン放出ホルモン受容体2(CRHR2)遺伝子における一塩基多型と過敏性腸症候群との関連, 第80回日本心身医学会東北地方会, 2015年2月28日. 仙台市(民陵会館記念ホール)

Katayose Y., Sato N., Motoi, F., Nakagawa K., Yoshida H., Morikawa T., Hayashi H., Mizuma M., Fukase K., Aoki T., Kawaguchi K., Naitoh T., Unno M.: Quality Of Life (QOL) Evaluation For Pancreatic Tumor Surgery Patients At The Three And Six Months After Surgery In A Single Center Prospective Study. The 45th Anniversary Meeting of APA & JPS, November 5-8, 2014 (発表 November 7). Hawaii, America

川口桂, 片寄友, 佐藤菜保子, 岡田良, 益田邦洋, 石田晶玄, 藪内伸一, 深瀬耕二, 大塚英郎, 水間正道, 坂田直昭, 中川圭, 岡田恭穂, 森川孝則, 林洋毅, 吉田寛, 元井冬彦, 海野倫明. SF36v2を用いた術前化学療法前後のQOL評価. 第9回膵癌術前治療研究会, 2014年10月18日. 鹿児島市(鹿児島県医師会館)

川口桂, 片寄友, 佐藤菜保子, 元井冬彦, 海野倫明. SF36v2を用いた膵頭十二指腸切除術後のQOL評価. 第168回東北外科集談会・第83回日本小児外科学会東北地方会・第26回日本血管外科学会東北地方会, 2014年9月13日. 秋田市(秋田県総合保健センター)

佐藤菜保子, 片寄友, 元井冬彦, 中川圭, 吉田寛, 森川孝則, 川口桂, 藪内伸一, 工藤克昌, 佐藤昌美, 佐藤富美子, 海野倫明. 膵腫瘍患者の手術後3ヶ月時点のQOLとFACT-Hep症状項目との関連. 第52回日本癌治療学会, 2014年8月29日. 横浜市(パシフィコ横浜)

片寄友, 佐藤菜保子, 元井冬彦, 中川圭, 吉田寛, 森川孝則, 岡田恭穂, 林洋毅, 坂田直昭, 水間正道, 深瀬耕二, 青木豪, 藪内伸一, 川口桂, 江川新一, 内藤剛, 海野倫明. 健康関連QOL尺度SF36v2による膵腫瘍手術の術後3ヶ月評価: 初期54例からの検討. 第45回日本膵臓学会大会, 2014年7月11-12日. 北九州市(北九州国際会議場)

佐藤菜保子, 高木清司, 鈴木貴, 三木康宏, 割田仁, 福土審, 佐藤富美子, 八重樫伸夫, 伊藤潔. ヒト子宮内膜癌におけるCRH発現と予後の関連, 第51回日本癌治療学会学術集会, 2013年10月24日. 京都市(国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都)

佐々木彩加, 佐藤菜保子, 鈴木直輝, 金澤素, 青木正志, 福土審. 過敏性腸症候群における副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン関連遺伝子, 第76回日本心身医学会東北地方会, 2013年2月23日. 仙台市(民陵会館記念ホール)

佐々木彩加, 佐藤菜保子, 鈴木直輝, 金澤素, 青木正志, 福土審. コルチコトロピン放出ホルモン関連遺伝子における一塩基多型と過敏性腸症候群との関連, 第74回日本心身医学会東北地方会, 2012年2月25日. 仙台市(民陵会館記念ホール)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 菜保子 (SATO, Naoko)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 40457750

(2) 研究分担者

鈴木 貴 (SUZUKI, Takashi)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10261629

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

福土 審 (FUKUDO, Shin)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 80199249