

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791696

研究課題名(和文)子宮内膜癌発癌進展過程におけるSIRT1発現と機能の解析

研究課題名(英文)Analysis of the expression and function of SIRT1 in endometrial carcinoma

研究代表者

浅香 亮一 (ASAKA, Ryoichi)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00623688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：免疫組織染色結果から、Sirtuin1(以下 SIRT1)は正常子宮内膜よりも子宮内膜癌で有意に高発現し、子宮内膜癌においては、SIRT1 高発現症例は有意に生存期間が短縮していた。子宮内膜癌細胞株においては、SIRT1 は細胞の増殖能を亢進しシスプラチン耐性を増強したが、SIRT1 選択的阻害剤 EX527 はこの作用を効果的に抑制した。ヌードマウスの子宮内膜癌異種移植腫瘍形成においても、SIRT1 過剰発現は腫瘍増大を亢進したがEX527 は有意に腫瘍増大を抑制した。SIRT1 は子宮内膜癌の新たな治療標的となり、その阻害薬 EX527 は新規治療薬候補として有望であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The immunohistochemical expression of Sirtuin1 (SIRT1) was significantly higher in endometrial carcinoma (108 cases) than in normal endometria (60 cases) ( $p < 0.05$ ), and its overexpression was associated with a shorter survival ( $p < 0.05$ ). The WST-1 assay revealed that SIRT1 accelerated the proliferation and cisplatin resistance of endometrial carcinoma cell lines (HHUA, HEC151 and HEC1B). Whereas the selective SIRT1 inhibitor (EX527) suppressed the proliferation and cisplatin resistance of those cell lines regardless of the p53 mutation. The effects of SIRT1 on tumor growth were examined in vivo using mice xenografts of HHUA and HEC1B cells. SIRT1 overexpression significantly increased tumor growth, however, EX527 significantly suppressed tumor growth in nude mice. In conclusion, SIRT1 is involved in the acquisition of the aggressive behavior associated with endometrial carcinoma, and the SIRT1 inhibitor, EX527, may be a useful agent for the treatment of this malignancy.

研究分野：婦人科腫瘍学

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：Sirtuin1 子宮内膜癌 シスプラチン耐性 SIRT1阻害剤 EX527

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は、本邦で急速に増加しており、エストロゲンや肥満との関連が指摘されているが、依然として不明な点が多い。また、子宮内膜癌に対する分子標的治療は、現在まで確立されておらず、あらたな癌発生や病態の解明が急務である。2007年のイギリスでの大規模な疫学調査 (Million Women Study) により、子宮内膜癌は肥満との関連性が最も高い癌であることが示された (Reeves GK, et al. BMJ 2007; 335:p1134)。しかし、肥満と子宮内膜癌発癌におけるメカニズムは諸説あるが、未だ確立したものはない。そこで我々は新たな分子機構として、長寿遺伝子として近年注目されている SIRT1 に着目した。SIRT1 は NAD 依存性ヒストン脱アセチル化酵素であり、カロリー制限や様々なストレスによって活性化され、メタボリックシンドロームとの関連が注目されている。また、活性化した SIRT1 は DNA 修復、アポトーシス抑制等の作用により細胞を保護し、寿命を延長させると言われている。(Vaziri H. et al., 2001. Cell.) このようなことから SIRT1 は癌抑制的に作用すると考えられており、痩せ型において子宮内膜癌発癌抑制に作用している可能性がある。一方、このような SIRT1 の作用は癌細胞の生存にも有利に働く可能性がある。実際、いくつかの癌種で SIRT1 の高発現が報告されており (Huffman D.M., et al. 2007. Cancer Res.)、これらの癌細胞において SIRT1 が重要な役割を担っている可能性がある。子宮内膜癌においても SIRT1 が進行や腫瘍細胞の生存に有利に作用している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

前述の学術的背景から、本研究では、正常子宮内膜および子宮内膜癌における SIRT1 発現とその機能を解析し、内膜癌における SIRT1 発現の意義を明らかにすることを目的とする。そして SIRT1 が、子宮内膜癌のあらたな予防法・治療法のターゲットとなる可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

子宮内膜癌および正常子宮内膜における SIRT1 発現の免疫組織学的検討

子宮内膜癌患者および非子宮内膜癌患者から、それぞれ子宮内膜癌組織 (108 例)、正常子宮内膜組織 (60 例) を採取し、抗 SIRT1 抗体を用いて免疫組織学的に SIRT1 発現を検討した。組織切片は、あらかじめ術前・生検前にインフォームドコンセントを得た後、摘出された検体を用いた。染色強度は、500 細胞中の陽性細胞率を Positivity Index (PI) で表し、評価した。

子宮内膜癌細胞株における SIRT1 発現の

## 検討

子宮内膜癌細胞株 (Ishikawa, HEC1B, HEC1B, HHUA, KLE, RL95-2, HEC108, HEC151, HEC265) における SIRT1 発現を Western blotting で検討した。

子宮内膜癌細胞株における SIRT1 発現変化と SIRT1 抑制

で明らかとなった SIRT1 高発現子宮内膜癌細胞株 HEC151 (p53 野生型) HEC1B (p53 機能喪失型変異) において、siRNA 法により SIRT1 発現を抑制する。また比較的低発現であった HHUA (p53 部分機能型変異) では SIRT1 発現ベクター導入により、SIRT1 を強制発現させた (HHUA-SIRT1)、さらにこれらの細胞に対し、培養液に SIRT1 選択的阻害剤 EX527 を添加して SIRT1 機能を抑制した。以下の実験に用いた。

(ア) 細胞増殖能

72 時間までの細胞増殖能を WST-1 assay で測定した。

(イ) シスプラチン耐性

シスプラチン添加 72 時間後の細胞生存を WST-1 assay で測定した。

ヌードマウスでの造腫瘍能における SIRT1 活性の影響

上述の子宮内膜癌細胞 HHUA (HHUA-control と HHUA-SIRT1) をよび HEC1B をヌードマウス皮下に異種移植し腫瘍を形成させ、EX527、シスプラチンを毎週腹腔内注入により投与し、腫瘍増大に対する影響を検討した。また有害事象検討のため、体重変化を測定した。

## 4. 研究成果

### 免疫染色結果

正常子宮内膜に比較して、子宮内膜癌組織では有意に SIRT1 タンパク発現が増強していた (PI 中央値: 8.50 vs 31.25,  $p < 0.05$ )。BMI (body mass index) によって SIRT1 発現に差は認めなかった。子宮内膜癌においては、SIRT1 は組織学的グレードが高いもの、脈管侵襲陽性例で有意に発現が上昇し ( $p < 0.05$ )、腫瘍の悪性度との関連が示唆された。また Kaplan-Meier 法による生存分析で SIRT1 高発現群 (PI  $\geq 50$ ) と SIRT1 非高発現群 (PI  $< 50$ ) で比較すると、SIRT1 の高発現群では有意に予後不良であった。 ( $p = 0.04$ )

子宮内膜癌細胞株での SIRT1 タンパク発現

ウエスタンブロット法では、検討したすべての細胞株でのタンパク発現を認めた。このうち、比較的高発現細胞株である HEC1B, HEC151 細胞と、比較的低発現株である HHUA 細胞を今後の細胞株での検討に

使用した。siRNA 法による SIRT1 タンパク発現抑制、発現ベクター導入による SIRT1 タンパク発現亢進も同様に確認した。

#### SIRT1 の増殖能への影響

HEC151, HEC1B 細胞では siRNA 法による SIRT1 発現抑制により有意に増殖が抑制された。また HHUA 細胞では SIRT1 発現亢進 (HHUA-SIRT1) により、有意に増殖が促進された。(図 1)

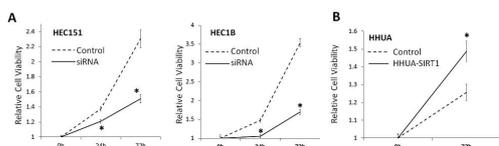


図 1 . 増殖能への影響 (WST-1 assay)

A : HEC151、HEC1B 細胞での siRNA による SIRT1 抑制。B : HHUA 細胞での SIRT1 遺伝子導入による SIRT1 発現亢進。

また、SIRT1 選択的阻害薬 EX527 添加は、HHUA-SIRT1 での増殖促進効果を相殺した。(図 2) また、増殖能促進効果は PI3K 阻害薬 (Wortmannin: Wort)、MAPK 経路の阻害薬 (U0126) でも相殺され、これらの経路の関与も示唆された。

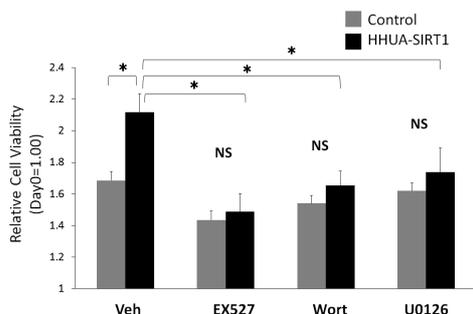


図 2 . HHUA-SIRT1 の増殖能と各種薬剤添加の影響 (WST-1 assay) (EX527 : SIRT1 阻害薬、Wort : PI3K 阻害薬、U0126 : MAPK 経路阻害薬)

#### SIRT1 の抗癌剤耐性への影響

HHUA-SIRT1 は Control 細胞に比べ、抗癌剤 (シスプラチン、パクリタキセル) に対する耐性の増強が観察された。(図 3) この差は EX527 添加で相殺されたが、PI3K 阻害剤では相殺されなかった。また、EX527 によるシスプラチン耐性減弱作用は HEC151、HEC1B でも観察され、EX527 は p53 変異状況に関係なく、子宮内膜癌細胞のシスプラチン耐性を減弱させると考えられた。(図 4)

#### ヌードマウスでの腫瘍増大への影響

HHUA-SIRT1 は Control 細胞に比べ、腫瘍増大が亢進し、シスプラチン耐性も増強していたが、EX527 投与はこの差を相殺し、著明に腫瘍増大を抑制した。また、HEC1B 細

胞においても、SIRT1 阻害薬 EX527 を 10mg/kg/week の腹腔内投与により、4 週間で腫瘍の増大に明らかな差を認め、SIRT1 阻害薬の抗腫瘍効果が認められた。(図 5) また EX527 に、マウスの体重増加に影響なく、明らかな有害事象は認められなかった。

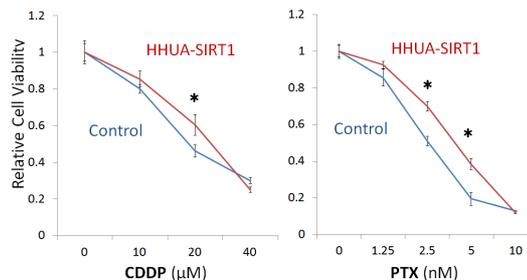


図 3 . 抗癌剤耐性 (WST-1 assay)

CDDP : シスプラチン、PTX : パクリタキセル

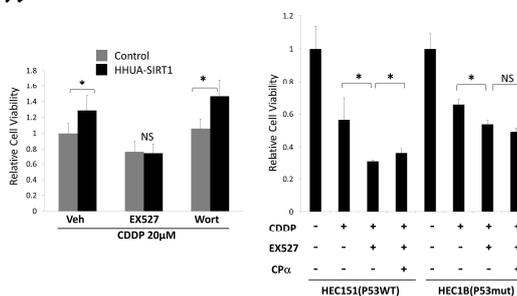


図 4 . EX527 の抗癌剤耐性への影響 (WST-1 assay)

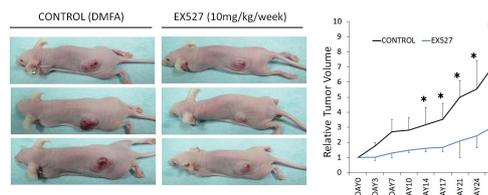


図 5 . HEC1B 細胞のヌードマウス異種移植腫瘍に対する EX527 の抗腫瘍効果

これらのことから、SIRT1 は子宮内膜癌の新たな治療標的となり、その阻害薬 EX527 は新規治療薬候補として有望であることが示唆された。

#### 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 2 件)

1. Kobara H, Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Yamada Y, Ishikawa K, Kikuchi N, Ohira S, Shiozawa T. Lipocalin2 enhances the matrix metalloproteinase-9 activity and

invasion of extravillous trophoblasts under hypoxia. *Placenta*. 2013; 34: 1036-43. (査読あり)

2. Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Ishikawa K, Yamada Y, Kobara H, Nakayama J, Shiozawa T. Immunohistochemical expression of core 2  $\beta$ 1,6-N-acetylglucosaminyl transferase 1 (C2GnT1) in endometrioid-type endometrial carcinoma: a novel potential prognostic factor. *Histopathology*. 2013; 62: 986-93. (査読あり)

[学会発表](計9件)

1. Asaka R, Miyamoto T, Ando H, Yamada Y, David Hamisi Mvunta, Ishikawa K, Kobara H, Shiozawa T: Sirtuin1(SIRT1) inhibitor suppresses tumor growth of endometrial carcinoma cell in nude mice. 第3回アジア婦人科腫瘍学会・第55回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 2013年12月13日~15日 京都
2. 浅香亮一、宮本 強、安藤大史、石川香織、山田 靖、小原久典、塩沢丹里: SIRT1は子宮内膜癌細胞において PI3K および MAPK 経路を介して、増殖能亢進とシスプラチン耐性獲得に関与する. 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3日~5日 横浜
3. 浅香亮一、宮本 強、石川香織、山田 靖、小原久典、塩沢丹里: 長寿遺伝子 sirtuin1 の子宮内膜癌細胞における増殖・抗癌剤耐性に関する作用の検討. 第12回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 2013年7月5日~6日 奈良
4. 浅香亮一、宮本 強、安藤大史、石川香織、山田 靖、塩沢丹里: 長寿遺伝子の Sirtuin1 の子宮内膜癌における発現と機能の検討. 第18回生殖医学フォーラム 2013年5月24日~25日 松本
5. 浅香亮一、宮本 強、石川香織、山田 靖、小原久典、鈴木昭久、塩沢丹里: Sirtuin1 は子宮内膜癌のシスプラチン耐性に関与する. 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 札幌
6. Asaka R, Miyamoto T, Ishikawa K, Yamada Y, Kobara H, Suzuki A, Taniguchi S, Shiozawa T: Sirtuin1, a longevity gene, is over-expressed and enhances proliferation and survival of endometrial carcinoma cells via deacetylation of p53. *American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013* 2013年4月7日 ワシントン D.C
7. Asaka R, Miyamoto T, Suzuki A, Ishikawa K, Yamada Y, Kobara H, Shiozawa T: Sirtuin1(SIRT1), a longevity gene, is

over-expressed in endometrial carcinoma. 14th International Gynecologic Cancer Society(IGCS)

- 2012年10月13日~16日 バンクーバー
8. 浅香亮一、宮本 強、石川香織、山田 靖、小原久典、鈴木昭久、塩沢丹里: 正常内膜および子宮内膜癌における Sirtuin1(SIRT1)の発現と機能の検討. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日~21日 札幌
9. 浅香亮一、宮本 強、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里: 正常子宮内膜および子宮内膜癌における sirtuin1 発現の検討. 第64回日本産科婦人科学会学術講演会 2012年4月13日~15日 神戸

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

浅香 亮一 (ASAKA, Ryoichi)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 00623688