

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462622

研究課題名(和文) 構造的転写共役因子を分子標的とした子宮体癌治療と薬剤耐性機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of drug resistance and treatment of endometrial cancer targeting to constitutional transcriptional cofactor

研究代表者

蜂須賀 徹 (HACHISUGA, Toru)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：70180891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：漿液性腺癌前がん病変と最も初期段階と考えられているp53 signature (p53S)について正常月経子宮内膜、萎縮子宮内膜、子宮内膜ポリープ、癌周囲の子宮内膜で検討した。その結果p53Sは閉経後萎縮内膜、ポリープ、類内膜型腺癌周囲内膜で約10%に認め、患者年齢と密接に関連していた。構造的共役因子の一つであるGalNac-T6の発現について子宮内膜漿液性腺癌・明細胞癌について検討したところGalNac-T6の発現は独立した予後因子であった。さらに、BAF57を卵巣癌細胞株において検討を加えると、BAF57はBCRPの発現を介して抗がん剤抵抗に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The p53 signature (p53S) has been proposed to be a marker of the earliest phase of development of endometrial serous carcinoma. We examined the presence of p53S in endometriums with menstrual cycle, postmenopausal endometrial glands, endometrial polyps and background endometrium in cases of endometrial carcinoma. As results, p53S was found about 10% of examined endometriums. The presence of p53S was closely associated with postmenopausal endometriums with an advanced age, regardless of endometrial disease. The expression of the GalNac-T6 was a useful marker for histological grade and the good prognosis of the patients with endometrioid adenocarcinoma of the endometrium. The uterine serous and clear carcinomas with positive GalNac-T6 were also shown a better prognosis than those with negative GalNac-T6. BAF57 is involved in ovarian cancer cell growth and sensitivity to anticancer agents. These constitutional transcriptional factors may be a target for gynecologic cancer therapy.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮体癌 薬剤耐性 p53 signature エストロゲン受容体 Ki-67 アポトーシス BAF57 GalNac-T6

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は構造的転写共役因子である HMG (high mobility group) 蛋白質ファミリーである BAF57 (BRG1-associated factor 57) や、ミトコンドリアを場とした薬剤耐性獲得に重要な役割を果たしていると考えられている mtTFA (mitochondrial transcription factor A) が子宮内膜癌の予後不良因子であることを報告している。さらに正常子宮内膜、子宮内膜ポリープ、子宮内膜増殖症、子宮体癌において p53 蛋白質発現とその変異またエストロゲンレセプター (ER) との関係を検討している。以上から本研究では、構造的転写共役因子と p53 または ER との関係を子宮体癌において明らかにし、これらが細胞増殖と細胞死に関連する分子標的薬として、また薬剤耐性のマーカーとしての可能性を検討することを目的としている。

2. 研究の目的

本研究では、課題名：子宮内膜ポリープ、子宮内膜増殖症、子宮体癌における細胞増殖と細胞死の解析で倫理委員会承認を受けている研究をさらに進め、特に類内膜癌と漿液性腺癌において Ki-67、ER、プロゲステロン受容体 (PR)、p53 などの免疫組織学的プロファイリングの相違を明らかにし、その発生母地としての癌周辺子宮内膜の検討を加え、新しい細胞増殖と細胞死に関連した免疫組織学的プロファイリングによる子宮体癌の分類を構築することを目指している。また検索されている以外の HMG 蛋白質ファミリーの抗体を用いて免疫組織学的に検討を進め、子宮内膜癌患者予後との関係を明らかにしていく。すでに患者予後との関係が明らかになった BAF57、mtTFA については、当教室に保存されている子宮内膜癌培養細胞を用いて、卵巣漿液性腺癌培養細胞株にて検討したように核内 mtTFA の存在の確認、Bcl2L1 発現との関係をクロマチン免疫沈降反応やリポーターアッセイで確認する。BIRC5 についても検討を加える。さらに p53 との関係では、ミトコンドリアゲノム内に p53 結合配列が報告され、p53 の変異はアポトーシス耐性であることからミトコンドリアを中心とした p53 と mtTFA の関係を検討することにより、

ミトコンドリアを場とした薬剤耐性の機序を明らかにしようと考えている。BAF57 については乳癌などで報告されている ER、PR の転写因子としての可能性を検討する。さらに、mtTFA、BAF57 を標的とした分子標的治療の妥当性を検討するために培養細胞とヌードマウスを用いた実験系で、その中和抗体、阻害剤の有効性を検討することを予定している。さらに構築された新しい免疫組織学的プロファイリングによる子宮体癌の分類に基づき臨床材料から mtTAF や BAF57 が分子標的治療となりうる子宮内膜癌の type を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、産婦人科研究生 2 名が研究代表者の補助をする。平成 25 年度は当大学分子生物学教室にて作成されている HMG 蛋白質ファミリーに対する多数の抗体をさらに免疫組織学的検討し子宮体癌における発現態度を検討する。さらに子宮内膜癌培養細胞・凍結材料を用いて BAF57 と mtTFA の蛋白定量の検討を予定している。子宮内膜癌培養細胞に対しては BAF57 並びに mtTFA 発現を siRNA で knock down して、増殖能・抗癌剤耐性について検討する。正常内膜、萎縮内膜、子宮内膜増殖症、子宮内膜癌において Ki-67、ER、PR、P53、アポトーシスの免疫組織学的検討を症例追加して行う。その結果、細胞増殖能と細胞死に関連した免疫組織学的プロファイリングに基づいた新しい子宮体癌分類を構築する。平成 26 年度以降は HMG 蛋白質ファミリーの中でターゲットとなる蛋白質を絞り、構築された子宮体癌免疫組織学的プロファイリングに基づいた HMG 蛋白質ファミリーを分子標的とした子宮体癌治療の可能性の検討、またシスプラチンを中心とした薬剤耐性獲得機序解析を目的としている。

4. 研究成果

子宮内膜漿液性腺癌の組織発生はその多くに p53 遺伝子の変異があることが知られており p53 遺伝子とその組織発生に大きく関わっていると考えられており、近年異型は無いが p53 蛋白陽性の子宮内膜腺を p53 signature (p53S) として漿液性腺癌

発生の初期段階とする報告が多く見られる(文献番号 8,9)。そこで p53 の蛋白発現を正常月経子宮内膜、萎縮子宮内膜(文献番号6)、子宮内膜ポリープ(文献番号1)、癌周囲の子宮内膜(文献番号4)について検討した。正常月経子宮内膜では増殖期に軽度の p53 蛋白の発現を認めるも p53S は認めなかった。82 例の閉経後子宮内膜では、その 11% に p53 蛋白が過剰発現している子宮内膜腺を認め、その腺管は、エストロゲン受容体(ER)陽性、Ki-67 の発現は低下しており、アポトーシスは認めなかった。子宮内膜ポリープにおいても閉経前子宮内膜ポリープにおいては、p53S を認めず、閉経後子宮内膜ポリープでは 71 例中 9 例(12.7%) に p53S を認めその平均年齢は 70.2 歳であった。4 例で p53 遺伝子変異の解析を行い、2 例で変異を認めた。さらに癌周囲の子宮内膜について検討してみると子宮内膜癌 351 例のうち、子宮摘出標本にて背景内膜が十分確認できた 225 例を対象とした。p53、Ki-67、エストロゲン受容体(ER)を免疫組織学的に検討した。p53S を認めた症例は 22 例で平均年齢は 64.2 歳であった。Ki-67 指数は中央値 4.0% であり、すべての p53S で ER 陽性であった。背景内膜に増殖症を伴う例 34 例と増殖症を伴わない 191 例に分けると、それぞれ平均年齢は 47 歳と 61 歳であった。前者では p53S は類内膜腺癌(grade 1)の 2 例に認め、上皮内癌(EIC)は認めなかった。後者では p53S と EIC は、それぞれ類内膜腺癌(125 例)の 12 例(7.9%)と 0 例、USC(21 例)の 5 例(23.8%)と 9 例(42.9%)、明細胞癌(3 例)の 0 例と 2 例(66.7%)、癌肉腫(15 例)の 3 例(20.0%)と 9 例(60%)に認めた。上皮内癌(EIC)と p53S の合併は非類内膜癌のみで認め合併率は 87.5% であった。

糖鎖分子構造の決定に関わる糖転移酵素であり、構造的共役因子の一つである

Acetylgalactosaminyl transferase-6

(GalNAc-T6)の発現について子宮内膜類内膜腺癌で検討すると、GalNAc-T6 の陽性群は 168 例(70%)で、分化度(P=0.003)と有意な相関があった。10 年累積生存率は陽性群で 92.1%、陰性群で 80.1% であり、陽性群は有意に予後良好であった。さら

に子宮内膜漿液性腺癌・明細胞癌について検討したところ、I 期から IIIA 期までの 23 例の検討では、GalNAc-T6 の発現は、脈管侵襲と共に独立した予後因子であった。10 年累積生存率は陽性群で 90.0%、陰性群で 51.0% であり、陽性群は有意に予後良好であり、多変量解析でも独立した予後因子であった。構造的共役因子の一つである BAF57 について卵巣癌細胞株において検討を加えると(1)、BAF57 発現と CDDP、ADM および 5-FU の IC50 値に有意な正の相関を認めた。(2) 卵巣がん細胞株 A2780 細胞の BAF57 発現を siRNA で抑制すると G1 で細胞周期の停止を起こすだけでなく PXT、CDDP、ADM、5-FU の IC50 値が低下し抗がん感受性が増強した。(3) cDNA マイクロアレイ解析では抗がん剤排泄にかかわる BCRP(Breast Cancer Resistance Protein: ABCG2)が標的として挙げられた、BCRP が最も高発現している OVK18 細胞において、siRNA で BAF57 発現を抑制すると BCRP 発現は減少し、発現量依存的に BCRP の転写活性も低下した。以上より BAF57 は BCRP 発現を正に制御し抗がん剤抵抗性に関与していることが示唆され、有望な分子標的になると考えられた(文献番号5)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

Sho T, Hachisuga T, Kawagoe T, Urabe R, Kurita T, Kagami S, Shimajiri S, Fujino Y. Expression of p53 in endometrial polyps with special reference to the p53 signature. 査読有, *Histol Histopathol*. 2016;4:e-pub
Kurita T, Matsuura Y, Koi C, Kagami S, Kawagoe T, Hachisuga T. The Relationship between Positive Peritoneal Cytology and the Prognosis of Patients with Uterine Cervical Cancer. 査読有, *Acta Cytol*. 2015;59:201-6. doi: 10.1159/000382068.
Ebina Y, Yaegashi N, Katabuchi H, Nagase S, Udagawa Y, Hachisuga T, Saito T, Mikami M, Aoki Y, Yoshikawa H. Japan Society of Gynecologic Oncology guidelines 2011 for the treatment of uterine cervical cancer.

査読有, Int J Clin Oncol. 2015;20:240-8. doi: 10.1007/s10147-015-0806-7.

Nguyen TT, [Hachisuga T](#), Urabe R, Kurita T, Kagami S, Kawagoe T, Shimajiri S, Nabeshima K. Significance of p53 expression in background endometrium in endometrial carcinoma. 査読有, Virchows Arch. 2015;466:695-702. doi: 10.1007/s00428-015-1752-5.

Yamaguchi T, Kurita T, Nishio K, Tsukada J, [Hachisuga T](#), Morimoto Y, Iwai Y, Izumi H. Expression of BAF57 in ovarian cancer cells and drug sensitivity. 査読有, Cancer Sci. 2015;106:359-66. doi: 10.1111/cas.12612.

Koi C, [Hachisuga T](#), Murakami M, Kurita T, Nguyen TT, Shimajiri S, Fujino Y. Overexpression of p53 in the endometrial gland in postmenopausal women. 査読有, Menopause. 2015;22:104-7. doi: 10.1097/GME.0000000000000265.

Inagaki H, Toyohira Y, Takahashi K, Ueno S, Obara G, Kawagoe T, Tsutsui M, [Hachisuga T](#), Yanagihara N. Effects of selective estrogen receptor modulators on plasma membrane estrogen receptors and catecholamine synthesis and secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. 査読有, J Pharmacol Sci. 2014;124:66-75.

Sho T, [Hachisuga T](#), Nguyen TT, Urabe R, Kurita T, Kagami S, Kawagoe T, Matsuura Y, Shimajiri S. Expression of estrogen receptor- as a prognostic factor in patients with uterine serous carcinoma. 査読有, Int J Gynecol Cancer. 2014;24:102-6. doi:10.1097/IGC.000000000000029.PMID:24335662

Urabe R, [Hachisuga T](#), Kurita T, Kagami S, Kawagoe T, Matsuura Y, Shimajiri S. Prognostic significance of overexpression of p53 in uterine endometrioid

adenocarcinomas with an analysis of nuclear grade. J Obstet Gynaecol Res. 査読有, 2014;40:812-9. doi: 10.1111/jog.12215.

Yahara K, Ohguri T, Imada H, Yamaguchi S, Kawagoe T, Matsuura Y, [Hachisuga T](#), Korogi Y. Epithelial ovarian cancer: definitive radiotherapy for limited recurrence after complete remission had been achieved with aggressive front-line therapy. 査読有, J Radiat Res. 2013;54:322-9. doi: 10.1093/jrr/rrs108.

[学会発表] (計4件)

[Hachisuga T](#), Sho T, Nguyen TT, Urabe R, Kurita T, Kagami S, Kawagoe T, Matsuura Y. Expression of estrogen receptor-alpha as a prognostic factor in patients with uterine serous carcinoma. The 15th Biennial meeting of the International Gynecologic Cancer Society, November 11, 2014, Melbourne, Australia

Overexpression of p53 in endometrial glands of the postmenopausal women. The 3rd Biennial meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology. December 14, 2013, Westin Miyako Hotel Kyoto (Kyoto).

Sho T, [Hachisuga T](#), Matsuura Y, Kawagoe T, Kagami S, Kurita T. Expression of the estrogen receptor-alpha as prognostic factor in uterine serous carcinoma. The 3rd Biennial meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology. December 14, 2013, Westin Miyako Hotel Kyoto (Kyoto).

Nguyen TT, Kurita T, Koi C, Kagami S, Urabe R, Ueda T, Kawagoe T, Matsuura Y, [Hachisuga T](#). Expression of N-acetylgalactosaminyl transferase-6 in endometrial carcinoma: Clinicopathologic correlations and prognostic significance. The 3rd Biennial meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology. December 14, 2013, Westin Miyako

Hotel Kyoto (Kyoto).

[その他]

ホームページ

<http://uoeh-sanfujin.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蜂須賀 徹 (HACHISUGA Toru)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：70180891

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし