

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861348

研究課題名(和文) 婦人科癌におけるSIRT6のエピジェネティック制御機能の解明

研究課題名(英文) The role of SIRT6 protein in gynecologic cancer.

研究代表者

宮本 雄一郎 (Miyamoto, Yuichiro)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：70634955

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)：本研究では子宮体癌におけるNAD依存性脱アセチル化酵素SIRT6の分子細胞生物学的役割を解析し、SIRT6経路活性化による子宮体癌の発生・進展を阻害する新規治療戦略開発を検討した。

子宮体癌臨床検体において、SIRT6高発現群では低発現群と比較し、全生存率が良好な傾向があることを見出した。またアポトーシス関連蛋白の中でもがん治療のターゲットとして注目されるサバイピンに注目し、SIRT6タンパクがサバイピンを発現抑制することにより、細胞死を誘導することを見出した。さらにサバイピン阻害薬YM155が子宮体癌細胞株に対し濃度依存性に細胞増殖抑制することを見出し、子宮体癌新規治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The NAD-dependent deacetylase SIRT6 is participated in cancer metabolism and thought to be one of the molecular target in the treatment of the endometrial cancer.

The overall survival rate is preferable in SIRT6 overexpression group than underexpression group in our endometrial cancer clinical specimen. Moreover, SIRT6 protein induced cell death in endometrial cancer cell lines, via suppression the expression of survivin, which is an apoptotic related protein and the putative target of cancer therapy. We revealed the Survivin inhibitor YM155 prevent the cell growth of endometrial cancer. From these results, the inhibition of Survivin protein function via SIRT6 is supposed to be the putative target of endometrial cancer treatment.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮体癌 SIRT6 サバイピン YM155

1. 研究開始当初の背景

SIRT6 はその他の Sirtuin ファミリー分子と同様の NAD 依存性脱アセチル化酵素であり、標的タンパクの脱アセチル化機能調節を担っている。SIRT6 は核内に存在し、糖代謝機能を制御するだけでなく、テロメア長の維持、ゲノム恒常性の維持を司る機能を同時に有しており、癌の治療標的として近年特に注目されている。内在性 SIRT6 を欠いた細胞は、放射線照射、DNA 傷害物質 (methyl methanesulfonate)、過酸化水素などによる DNA 障害を受けやすく、その原因として base excision repair または DNA 二重鎖修復機能が損なわれていることが知られている (Tennen et al., Trends Biochem Sci 2011)。また SIRT6 ノックアウトマウスの解析によると、SIRT6 欠損は低酸素誘導因子 hypoxia inducible factor (HIF-1) の活性化を惹起する。低酸素状態では HIF-1 を介してミトコンドリアの代謝を電子伝達系より解糖系へとシフトさせることから、SIRT6 欠損はワールブルク効果 (解糖系の亢進) のように癌の発生と進展に関与した現象をもたらす。このような解糖系の亢進と同時にインスリンシグナルの亢進とそれに伴った Akt/PI3K 経路の活性化が起きているため、SIRT6 欠損マウス個体としては低血糖になることが近年明らかとなった (Jia et al. Mol. Cell Biochem 2012)。

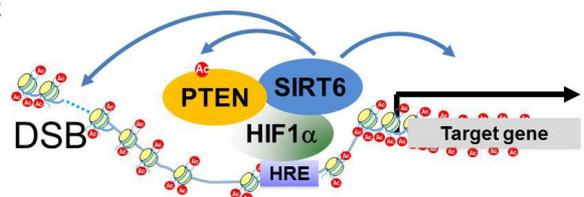
当申請者が重要視している子宮体癌において、Akt/PI3K 経路はその発症および進展過程に最も重要な経路の一つであり、PTEN は Akt 経路の最も重要な制御因子の一つである。近年 PTEN は SIRT1 により脱ア

セチル化制御を受けることが明らかとなった (Ikenoue et al., Cancer Res 2008) ことから、SIRT1 と同じく核に局在する SIRT6 にも脱アセチル化制御を受ける可能性は高いものと予想している。また Cancer Genome Atlas によると、ヒト子宮体癌において SIRT6 の発現は 20% 程度で減少していることが知られており、子宮体癌培養細胞株においても大半の細胞株で SIRT6 の発現が減少していることが知られている (Sebastian et al. Cell 2012) ことから、子宮体癌の病理学的背景に SIRT6 の機能異常があることが推察される。本研究においては、子宮体癌組織での SIRT6 の発現低下と病理学的解析を結びつける臨床的応用を検討するだけでなく、子宮体癌の進展過程に関連した SIRT6 経路を標的とした新規子宮体癌治療の開拓も期待される。

2. 研究の目的

SIRT6 は Sirtuin ファミリーの一つであり、核内においてゲノムの恒常性を維持することで抗腫瘍効果を持つとされる。本研究は、SIRT6 と、子宮体癌発症過程において重要な役割を担う PTEN との分子的相関をみることで子宮における SIRT6 の抗腫瘍作用を解明するとともに、子宮組織における SIRT6 活性調節を標的とした新規子宮体癌治療法の開発を目指す。

核



3. 研究の方法

子宮体癌臨床検体の組織マイクロアレイを用い、SIRT6 免疫染色を行い、予後データを解析した。

また子宮内膜細胞株に対し、SIRT6 の発現調節を行い、SIRT6 の細胞死への関与を検討した。

SIRT6 とサバイビンの関連に注目し、SIRT6 の子宮体癌細胞への細胞死誘導の機序を検討した。

サバイビン阻害薬 YM155 の子宮体癌細胞株への細胞増殖抑制効果について *in vitro* で検討した。

4. 研究成果

子宮体癌 104 症例の組織マイクロアレイを作成し免疫染色を施行し、SIRT6 高発現群では低発現群と比較し、全生存率が良好な傾向であった。

SIRT6 タンパクが比較的低発現であった子宮体癌 16 細胞株ではコントロールの子宮内膜不死化細胞と比較し SIRT6 タンパク発現が低下していた。

AN3CA, KLE 株に対し SIRT6 を過剰発現させると細胞増殖が抑制され、逆に SIRT6 を siRNA でノックダウンすると細胞増殖が亢進することから、SIRT6 が 2 株に対し細胞増殖抑制効果を持つことが分かった。フローサイトメトリー解析で、SIRT6 過剰発現で subG1 分画の有意な増加を認め、細胞死が誘導された。

以上から、SIRT6 は子宮体癌細胞株に細胞死を誘導し細胞増殖を抑制することが示された。

細胞死関連タンパクのウェスタンブロット法を施行し、SIRT6 過剰発現により、アポトーシス関連蛋白の中でもがん治療のターゲットとして注目されているサバイビン蛋白発現が抑制された。定量的リアルタイム PCR でもサバイビン mRNA

発現低下を認め、AN3CA 株を用いてサバイビンプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで評価したところ、SIRT6 は有意にサバイビンプロモーター活性を抑制した。また、AN3CA, KLE 株とコントロールの子宮内膜不死化細胞でサバイビンのノックダウンを行うと、子宮体癌細胞株特異的に細胞死が誘導された。従って、SIRT6 はサバイビンの発現抑制機序により、細胞死を誘導することが示された。これらの結果からサバイビンの阻害も子宮体癌に対し有効な治療選択肢となる可能性が示唆された。

以上の結果を受け、他がんと既に臨床試験も進行しているサバイビン阻害薬 YM155 に着目し、子宮体癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果について検討したが、YM155 は AN3CA, KLE 細胞株に対し、濃度依存性に細胞増殖を抑制した。またウェスタンブロット法では YM155 が 2 株に対し、濃度依存性にサバイビンのタンパク発現を抑制し、フローサイトメトリー解析で YM155 は 50nM の比較的低濃度で 2 株に対し顕著な細胞死を誘導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 12 件)

Fukuda T, Wada-Hiraike O, Oda K, Tanikawa M, Makii C, Inaba K, Miyasaka A, Miyamoto Y, Yano T, Maeda D, Sasaki T, Kawana K, Fukayama M, Osuga Y, Fujii T. Putative tumor suppression function of SIRT6 in endometrial cancer. FEBS Lett. 2015 Aug 4;589(17):2274-81. doi: 10.1016/j.febslet.2015.06.043. Epub 2015 Jul 13. (査読有)

Fukuda T, Shirane A, Wada-Hiraike O, Oda K, Tanikawa M, Sakuabashi A, Hirano M, Fu H, Morita Y, Miyamoto Y, Inaba K, Kawana K, Osuga Y, Fujii T.

HAND2-mediated proteolysis negatively regulates the function of estrogen receptor α .
Mol Med Rep. 2015 Oct;12(4):5538-44. doi: 10.3892/mmr.2015.4070. Epub 2015 Jul 9. (査読有)

Sakurabashi A, Wada-Hiraike O, Hirano M, Fu H, Isono W, Fukuda T, Morita Y, Tanikawa M, **Miyamoto Y**, Oda K, Kawana K, Osuga Y, Fujii T. CCAR2 negatively regulates nuclear receptor LXR α by competing with SIRT1 deacetylase.
J Steroid Biochem Mol Biol. 2015 May;149:80-8. (査読有)

Sakurabashi A, Wada-Hiraike O, Hirano M, Fu H, Isono W, Fukuda T, Morita Y, Tanikawa M, **Miyamoto Y**, Oda K, Kawana K, Osuga Y, Fujii T. CCAR2 negatively regulates nuclear receptor LXR α by competing with SIRT1 deacetylase.
J Steroid Biochem Mol Biol. 2015 May;149:80-8 (査読有)

Nagasaka K, Kawana K, Tomio K, Tsuruga T, Mori-Uchino M, Miura S, Tanikawa M, **Miyamoto Y**, Ikeda Y, Sone K, Adachi K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Osuga Y, Fujii T. Positive peritoneal cytology at interval surgery is a poor prognostic factor in patients with stage T3c advanced ovarian carcinoma: A retrospective study.
J Obstet Gynaecol Res. 2015 May;41(5):755-62 (査読有)

Fukuda T, Wada-Hiraike O, Oda K, Tanikawa M, Makii C, Inaba K, Miyasaka A, **Miyamoto Y**, Yano T, Maeda D, Sasaki T, Kawana K, Fukayama M, Osuga Y, Fujii T. Putative tumor suppression function of SIRT6 in endometrial cancer.
FEBS Lett. 2015 Aug 4;589(17):2274-81. doi: 10.1016/j.febslet.2015.06.043. Epub 2015 Jul 13. (査読有)

Fukuda T, Shirane A, Wada-Hiraike O, Oda K, Tanikawa M, Sakuabashi A, Hirano M, Fu H, Morita Y, **Miyamoto Y**, Inaba K, Kawana K, Osuga Y, Fujii T. HAND2 mediated proteolysis negatively regulates the function of estrogen receptor α .
Mol Med Rep. 2015 Oct;12(4):5538-44 (査読有)

Matsumoto Y, **Miyamoto Y**, Cabral H, Matsumoto Y, Nagasaka K, Nakagawa S, Yano T, Maeda D, Oda K, Kawana K, Nishiyama N, Kataoka K, Fujii T. Cancer Sci. 2016 Mar 14. doi: 10.1111/cas.12926. [Epub ahead of print] (査読有)

Sato M, Arimoto T, Kawana K, **Miyamoto Y**, Ikeda Y, Tomio K, Tanikawa M, Sone K, Mori-Uchino M, Tsuruga T, Nagasaka K, Adachi K, Matsumoto Y, Oda K, Osuga Y, Fujii T. Measurement of endometrial thickness by transvaginal ultrasonography to predict pathological response to medroxyprogesterone acetate in patients with grade 1 endometrioid adenocarcinoma.
Mol Clin Oncol. 2016 Apr;4(4):492-496. Epub 2016 Jan 28. (査読有)

Tsuruga T, Fujimoto A, Kawana K, Mori M, Hasumi Y, Kino N, Tomio K, Miura S, Tanikawa M, Sone K, **Miyamoto Y**, Ikeda Y, Kojima S, Adachi K, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Nakagawa S, Horie K, Yasugi T, Yokota H, Osuga Y, Fujii T. Radical hysterectomy with or without para-aortic lymphadenectomy for patients with stage IB2, IIA2, and IIB cervical cancer: outcomes for a series of 308 patients.
Int J Clin Oncol. 2016 Apr;21(2):359-66. doi: 10.1007/s10147-015-0907-3. Epub 2015 Oct 5. (査読有)

宮本雄一郎 岡田智志 石川光也 池田俊一
加藤友康 隅蔵智子 吉田正行 笠松高弘
子宮内膜細胞診陽性のみを呈していたが、急速に腹腔内進展を来たした卵巣漿液性腺癌の1例
日本臨床細胞学会雑誌第55巻第1号(2016年1月22日発行) pp.52-57 (査読有)

宮本雄一郎 富尾賢介 三浦紫保 栗原和子 堀江弘二 横田治重
悪性腫瘍専門施設における婦人科腹腔鏡下腔式子宮全摘術導入の試み
日本産科婦人科内視鏡学会誌 採択済 (2016/11 発刊予定)(査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

Tomohiko Fukuda, Osamu Wada-Hiraike, Katsutoshi Oda, Akira Shirane, Michihiro Tanikawa, Ayako Sakuabashi, Mana Hirano, **Yuichiro Miyamoto**, Kenbun Sone, Kanako Inaba, Kei Kawana, Yutaka Osuga, and Tomoyuki Fujii
HAND2 could serve as a tumor suppressor by inhibiting the transactivation function of ER α in endometrial carcinoma
第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 27 年 4 月 9-12 日 パシフィコ横浜

Tomohiko Fukuda, Osamu Wada-Hiraike, Katsutoshi Oda, Akira Shirane*, Michihiro Tanikawa, Ayako Sakuabashi, Mana Hirano, **Yuichiro Miyamoto**, Kenbun Sone, Kanako Inaba, Kei Kawana, Yutaka Osuga, and Tomoyuki Fujii
HAND2-mediated proteolysis negatively regulates estrogen receptor α function
第 73 回日本癌学会学術総会 平成 26 年 9 月 25-27 日 パシフィコ横浜

宮本雄一郎 村上直也 岡田智志 石川光也 池田俊一 加藤友康 笠松高弘
局所進行・再発子宮頸癌に対する組織内照射の有効性に関する検討
2014/4/19 第 66 回日本産科婦人科学会 学術講演会 (東京)

宮本雄一郎 岡田智志 石川光也 池田俊一 加藤友康 笠松高弘 隅蔵智子 佐々木直志 吉田正行 九嶋亮治
子宮細胞診で腺癌と診断したが、組織診・画像検査で病変が同定できなかった卵巣癌の一例
2014/6/6-8 第 55 回日本臨床細胞学会 学術講演会 (横浜)

Yuichiro Miyamoto, Osamu Hiraike, Kimmihiro Takechi, Kozo Aisaka and Tomoyuki Fujii
Evaluation of Single Mini-Incision Laparotomic Myomectomy
2015/6/3-6AOCOG 24th Asian&Oceanic Congress of Obstetrics&Gynecology (Malaysia)

宮本雄一郎 富尾賢介、三浦紫保、久保田知子、橋本耕一、堀江弘二、横田治重
当院における安全な腹腔鏡下腔式子宮全摘手術の導入
2015/8/7-9 第 57 回日本婦人科腫瘍学会 学術講演会 (盛岡)

宮本雄一郎・富尾賢介・三浦紫保・栗原和子・堀江弘二・横田治重
地域がんセンターにおける安全な腹腔鏡下

腔式子宮全摘手術の導入とその考察
2015/9/10-12 第 55 回 日本婦人科内視鏡学会 学術講演会 (横浜)

〔図書〕(計 1 件)

宮本雄一郎、平池修
選択的性ステロイドホルモン受容体修飾薬 TSEC:tissue specific estrogen complex
HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY Vol.23 No.1
(2016 年 3 月号) pp57-63

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
宮本 雄一郎 (MIYAMOTO, Yuichiro)
埼玉県立がんセンター 婦人科 医長
研究者番号：70634955

(2) 研究分担者
櫻橋 彩子 (SAKURABASHI, Ayako)
東京大学大学院医学系研究科 生殖・発達・加齢医学 大学院生

福田 友彦 (FUKUDA, Tomohiko)
東京大学大学院医学系研究科 生殖・発達・加齢医学 大学院生

(3) 連携研究者
該当なし