

(書式12)

氏名	辻 圭太
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成28年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	子宮内膜癌に対するレチノイン酸の作用および 治療標的としてのレチノイン酸受容体 $\beta$
論文審査委員	主査 教授 八重樫伸生 教授 伊藤潔 教授 木村芳孝 教授 森隆弘

## 論文内容要旨

### 研究目的

ビタミンA誘導体であるレチノイン酸は生体内で多くの生物学的作用を制御しているが、なかでも細胞死や分化誘導の作用から悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果に関して様々な癌において実証されてきた。レチノイン酸の受容体であるレチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor : 以下RAR) は3つのサブタイプ ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) を有している。RARはリガンドであるレチノイン酸と結合し、転写因子として標的遺伝子を制御していることから、RARの機能解析は不可欠と考えるが子宮内膜癌におけるRARサブタイプの機能は明らかになっていない。

本研究では子宮内膜癌に対するレチノイン酸の効果を明らかにするために、子宮内膜癌細胞株を用いて細胞増殖、アポトーシス、癌細胞遊走、マイクロアレイによる遺伝子変化について検証した。さらにRARの中でも特に抗腫瘍的な機能を持つと考えられるRAR $\alpha$ およびRAR $\beta$ の機能を検証するため、siRNAを用いたノックダウンによる検討や子宮内膜癌組織における発現と臨床病理学的因子の関連について検討し、新規治療薬としての可能性を探った。

### 方法

子宮内膜癌細胞株の中でもRAR $\beta$ 高発現であるRL95-2、RAR $\alpha$ 高発現であるHec1Aを用いて全トランスレチノイン酸 (all-trans retinoic acid ; 以下ATRA) による細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導作用、またRL95-2に対するATRAの遊走能に及ぼす効果を検討した。RL95-2へのATRA添加による遺伝子変化をマイクロアレイにて解析し、Gene Ontology (GO) term categoryを解析した。RL95-2に対して、siRNAによるRAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\alpha$ +RAR $\beta$ ノックダウンを行い、細胞増殖試験、遊走能試験を行い、RAR $\alpha$ とRAR $\beta$ の機能について比較検討した。RL95-2に対してRAR $\alpha$ アゴニストとRAR $\beta$ アゴニストを添加し細胞増殖試験を行い、両者の効果の違いについて検討した。さらには子宮内膜癌組織 (類内膜腺癌) 50例を対象にRAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ の免疫組織化学染色を行い、臨床病理学的因子との関連を解析した。

### 結果

細胞株の中で最もRAR $\beta$ が高発現しているRL95-2に対し、ATRAは細胞増殖抑制、アポトーシスおよび遊走能を抑制する効果を認めた。マイクロアレイの結果に基づくGO term categoryの結果からも、ATRAは細胞増殖、アポトーシスに関わる遺伝子群の発現制御に関わっており、全体的な遺伝子発現の変化も抗腫瘍作用を支持する結果が示された。またマイクロアレイデータおよびPCRの検証によりRAR $\beta$ はATRAによって強く発現の誘導がなされていることが示された。RAR $\alpha$ またはRAR $\beta$ をノックダウンした場合、ATRAによる細胞増殖抑制効果は減弱することはなかったが、RAR $\alpha$ とRAR $\beta$ を同時にノックダウンするとATRAの増殖抑制効果を阻害すること

(書式12)

を認めており、細胞増殖抑制に関しては RAR $\alpha$  と RAR $\beta$  が補完的に機能していることが示唆されたが、その際にも RAR $\beta$  は ATRA により著明に発現が増加していることを確認した。遊走能試験において、RAR $\alpha$  ノックダウンまたは RAR $\beta$  ノックダウンではいずれも ATRA による遊走抑制効果は阻害されていたが、RAR $\alpha$  ノックダウンでは ATRA の効果はやや残る傾向があったのに対し、RAR $\beta$  ノックダウンでは ATRA の遊走抑制効果は消失しており、RAR $\beta$  の方が遊走抑制に寄与している可能性が示唆された。RAR $\beta$  アゴニストは RAR $\alpha$  アゴニストと比較して、より強い増殖抑制効果を持つことが示唆された。子宮内膜癌組織における免疫組織化学染色では 50 例のうち RAR $\alpha$  陽性は 33 例 (66%)、RAR $\beta$  陽性は 16 例 (32%) であった。また形態が低分化なほど陽性症例の割合は増加し、一方で RAR $\beta$  は高分化なものほど陽性の割合は増加する傾向を認めた。

#### 結論

レチノイン酸は子宮内膜癌に対し、細胞増殖抑制、アポトーシス誘導、遊走能阻害などの複数の効果をもたらすことで抗腫瘍効果をもたらしている。レチノイン酸の子宮内膜癌治療において RAR $\beta$  の発現動態は治療効果に寄与する可能性が示唆された。

## 審査結果の要旨

博士論文題目 ..... 子宮内膜癌に対するレチノイン酸の作用および  
..... 治療標的としてのレチノイン酸受容体 $\beta$  .....

所属専攻・分野名 ..... 医科学専攻 ..... 婦人科学 ..... 分野 .....

学籍番号 ..... B2MD5088 ..... 氏名 ..... 辻 圭太 .....

晩婚化、未婚、未経妊などの社会的背景や食生活の欧米化、肥満の増加により、子宮内膜癌の罹患率は増加傾向にある。その治療には手術療法を主として、化学療法や放射線療法を組み合わせられている。妊孕能温存を要する症例や手術不能例、進行再発症例に対しては、唯一の内分泌療法として高用量黄体ホルモン療法が行われることがあるが十分な治療成績は得られておらず、新たな治療戦略が望まれる。

本研究にて用いたレチノイン酸は食餌によって摂取されたビタミン A から誘導されるカルボン酸であり、様々な癌種で新規治療薬として報告されている。レチノイン酸はレチノイン酸受容体 (Retinoic acid receptor: 以下 RAR) を介して作用することが知られている。また RAR にはサブタイプとして RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$  が存在しており、特に RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$  は抗腫瘍的な作用をもたらすと考えられている。

レチノイン酸は RAR $\beta$  が高発現している細胞株 RL95-2 に対しては増殖抑制効果とアポトーシス誘導、遊走能阻害を認めたが、RAR $\alpha$  が高発現している細胞株 Hec1A に対してはそれらの効果は認められなかった。またレチノイン酸が RL95-2 において細胞増殖抑制やアポトーシス誘導に関わる遺伝子群を制御していること、RAR $\beta$  を標的遺伝子として発現誘導していることが明らかとなり、それらの効果は RAR $\beta$  依存的である可能性が示唆された。RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$  のノックダウンアッセイにより、細胞増殖抑制効果や細胞遊走阻害について RAR $\alpha$  と RAR $\beta$  両者が機能している結果となったが、その際にも RAR $\beta$  は強く発現誘導されていた。また RAR アゴニストを用いた細胞増殖試験において、RAR $\beta$  アゴニストは RAR $\alpha$  アゴニストに比べ、強い細胞増殖抑制効果が認められた。さらに子宮内膜癌組織における RAR $\alpha$  および RAR $\beta$  の発現を確認している。

以上の結果から細胞株の中でも RAR $\beta$  の発現優位である細胞に対してレチノイン酸の抗腫瘍効果が明らかとなった。また RAR $\alpha$  と RAR $\beta$  の機能について比較検討した研究は初めてであり、その結果からレチノイン酸の抗腫瘍効果は RAR $\beta$  の発現動態に依存的であることが示唆された。子宮内膜癌組織において RAR $\beta$  の発現が高い症例に対してレチノイン酸の効果を期待できると考えられ、臨床応用の際にはオーダーメイドな治療が期待される。以上より本研究は学位に十分値するものと考えられる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。