

200925040A

厚生労働科学研究費補助金
がん臨床研究事業

子宮体がんに対する標準的化学療法の
確立に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 青木大輔

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 構成員名簿	2
II. 総括研究報告	
子宮体がんに対する標準的化学療法的确立に関する研究 青木大輔, 進 伸幸, 富永英一郎, 野村弘行	3
III. 分担研究報告	
1. 子宮体癌に対する骨盤および傍大動脈リンパ節郭清の有用性に関する検討 櫻木範明, 藤堂幸治	10
2. 子宮体癌に対する標準的化学療法的确立に関する研究 八重樫伸生, 志賀尚美	12
3. 子宮体がんに対する標準的化学療法的确立に関する研究 深澤一雄	20
4. Performance status 不良の進行子宮体癌に対する weekly paclitaxel + carboplatin 療法の有用性 木口一成	22
5. 子宮体癌における Heparanase 発現と臨床病理学的予後因子との関連 青木陽一	27
6. 連続変数を層別因子とした最小化法に関する研究 竹内正弘, 高橋史朗	30
7. 子宮体癌における術後療法の有用性の検討 寒河江 悟	34
8. 子宮体癌に対する低侵襲手術適応の検討 渡部 洋	37
9. 子宮体癌に対する術前化学療法の検討 中西 透	39
10. プラチナ製剤を既治療の子宮頸癌患者における二次プラチナ製剤治療の意義 勝俣範之	44
IV. 資料	
1) モニタリングレポート (試験概要を含む)	47
2) 実施計画書	61
V. 研究成果の刊行に関する一覧表	127
VI. 研究成果の刊行物・別刷	131

構 成 員 名 簿

研究代表者

青木大輔 慶應義塾大学医学部産婦人科 教授

研究分担者

櫻木範明 北海道大学大学院医学研究科生殖内分泌・腫瘍学分野 教授

八重樫伸生 東北大学大学院医学系研究科婦人科学分野 教授

深澤一雄 獨協医科大学産婦人科 教授

木口一成 聖マリアンナ医科大学産婦人科 教授

青木陽一 琉球大学医学部器官病態医科学講座女性・生殖医学分野 教授

竹内正弘 北里大学薬学部臨床医学（臨床統計学） 教授

寒江江 悟 JR 札幌病院産婦人科 副院長

渡部 洋 近畿大学医学部産科婦人科 准教授

中西 透 愛知県がんセンター中央病院婦人科 部長

勝俣範之 国立がんセンター中央病院 臨床試験・治療開発部薬物療法室 医長

研究協力者

藤堂幸治 北海道がんセンター婦人科 医長

志賀尚美 東北大学病院婦人科

高橋史朗 北里大学薬学部臨床医学（臨床統計学） 講師

野中美和 北里研究所・臨床薬理研究所・臨床試験コーディネーティング部門

進 伸幸 慶應義塾大学医学部産婦人科 講師

富永英一郎 慶應義塾大学医学部産婦人科 助教

野村弘行 慶應義塾大学医学部産婦人科 助教

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）

総括研究報告書

子宮体がんに対する標準的化学療法の確立に関する研究

研究代表者	青木大輔	慶應義塾大学医学部産婦人科	教授
研究協力者	進 伸幸	慶應義塾大学医学部産婦人科	講師
研究協力者	富永英一郎	慶應義塾大学医学部産婦人科	助教
研究協力者	野村弘行	慶應義塾大学医学部産婦人科	助教

研究要旨

子宮体がん 高再発危険群の予後改善を目指し、標準的化学療法である Doxorubicin + Cisplatin (AP 療法) と Taxane 製剤と Platinum 製剤の組み合わせのうち DP 療法 (Docetaxel + Cisplatin) および TC 療法 (Paclitaxel + Carboplatin) を比較するランダム化比較臨床第Ⅲ相試験を開始した。本試験の primary endpoint は無増悪生存期間、secondary endpoint は全生存期間、有害事象発生率、投与状況、リンパ節郭清状況とした。

研究分担者

櫻木範明

北海道大学大学院医学研究科
生殖内分泌・腫瘍学分野 教授

八重樫伸生

東北大学大学院医学系研究科
婦人科学分野 教授

深澤一雄

獨協医科大学産科婦人科 教授

木口一成

聖マリアンナ医科大学産婦人科
教授

青木陽一

琉球大学医学部器官病態医科学講
座女性・生殖医学分野 教授

竹内正弘

北里大学薬学部臨床医学（臨床統計学） 教授

寒河江 悟

JR 札幌病院産婦人科 副院長

渡部 洋

近畿大学医学部産科婦人科 准教授

中西 透

愛知県がんセンター中央病院

婦人科 部長

勝俣範之

国立がんセンター中央病院

臨床試験・治療開発部薬物療法室

医長

研究協力者

藤堂幸治

北海道がんセンター婦人科 医長

志賀尚美

東北大学病院婦人科

高橋史朗

北里大学薬学部臨床医学（臨床統計学） 講師

野中美和

北里研究所・臨床薬理研究所 臨床試験コーディネーティング部門

進 伸幸

慶應義塾大学医学部産婦人科 講師

富永英一郎

慶應義塾大学医学部産婦人科 助教

野村弘行

慶應義塾大学医学部産婦人科 助教

A. 研究目的

子宮体がん 高再発危険群の予後改善を目指し、従来から標準的化学療法とされてきた Doxorubicin + Cisplatin 併用療法（AP療法）と Taxane 製剤+Platinum 製剤併用療法とによるランダム化比較臨床第Ⅲ相試験を実施し、それぞれの治療法の無増悪生存期間（PFS）等を比較することにより、子宮体がん 高再発危険群に対するより有効な新しい標準的化学療法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1) 既に実施された Taxane + Platinum併用療法の第Ⅱ相試験（進行・再発子宮体癌に対する DP

(Docetaxel+Cisplatin) , DC (Docetaxel+Carboplatin) , TC (Paclitaxel+Carboplatin) のランダム化第Ⅱ相試験)の中からDP療法 (Docetaxel 70 mg/m² + Cisplatin 60 mg/m² day 1 q3 weeks) とTC療法 (Paclitaxel 180 mg/m² + Carboplatin AUC 6 day 1 q3 weeks) を選択し、これらの臨床的有効性を、従来から標準的化学療法とされてきたDoxorubicin+ Cisplatin (AP療法: Doxorubicin 60mg/m² + Cisplatin 50mg/m² day 1 q3 weeks) とのランダム化比較第Ⅲ相試験によって比較検証する。本試験のprimary endpointは無増悪生存期間 (progression free survival: PFS)、Secondary endpointは全生存期間 (overall survival: OS)、有害事象発生率、投与状況 (tolerability)、リンパ節郭清状況とした。なお、本試験の遂行に際しては、ヘルシンキ宣言に規定された倫理的原則を遵守し、実施計画書（プロトコル）、同意説明文書等はすべての参加施設の倫理委員会または臨床試験審査委員会 (IRB) の承認を得るなど「医薬品の臨床試験の実施の基準」等が尊重された。

2) 本試験に引き続くべき将来の臨床試験を考案するために役立つ以下の情報収集や付随的研究を実施した。

- ・海外における子宮体がんを対象とした臨床試験の動向の調査。
- ・後腹膜リンパ節郭清の位置づけとその有用性に関する検討。

- ・初期子宮体がんの妊孕性温存療法の効果と安全性。
- ・進行がん（IV期）における化学療法を含む集学的治療の考察。
- ・子宮体がん治療の個別化に役立つ新たな指標や biomarker の検討。
- ・新たなホルモン療法の可能性に関する検討。
- ・通常の子宮体がんとは異なる治療が検討されている癌肉腫についての臨床試験の立案。
- ・QOL も加味した統計学的評価方法の検討。

C. 研究結果

1) 本第Ⅲ相試験に先立って行われた進行・再発子宮体癌に対する DP (Docetaxel + Cisplatin), DC (Docetaxel + Carboplatin), TC (Paclitaxel + Carboplatin) のランダム化第Ⅱ相試験の最終解析結果では、奏効率は DP 療法 51.7% (15/29, 95%CI: 32.5 ~ 70.6%), DC 療法 48.3% (14/29, 95%CI: 29.4 ~ 67.5%), TC 療法 60.0% (18/30, 95%CI: 40.6 ~ 77.3%) であった。そこで、本第Ⅲ相試験では、期待奏効率 50% を超えた上位 2 つの DP 療法と TC 療法を試験治療として、標準治療である AP 療法と比較するデザインとした。

対象としては、原発巣が子宮体がん（肉腫、がん肉腫を除く）であることが組織学的に確認されている患者で、筋層浸潤 1/2 を超える G2, G3 の I-II 期症例 (high-intermediate risk) または残存腫瘍 2 cm 以下の III-IV 期の

症例（腹腔を超えた部位への遠隔転移を認める症例を除く）、すなわち高再発危険群とし、さらに子宮全摘出術と両側付属器切除術に加えて少なくとも骨盤リンパ節郭清を施行した症例とした。

目標症例数は、過去の試験結果より本試験における AP 療法の 5 年無増悪生存率を 60% 程度と推測し、臨床的に意義のある療法と判断するための AP 療法に対する DP 療法もしくは TC 療法のハザード比を 63% として、各群 200 例、計 600 例とした。本試験の登録期間については、参加施設への子宮体がん治療実態調査の結果をふまえ、3 年間、登録終了後の追跡期間を 5 年間とした。primary endpoint は PFS、secondary endpoint は OS、有害事象発生率、投与状況 (tolerability)、リンパ節郭清状況とした。

本第Ⅲ相試験のプロトコルは、2006 年 9 月に特定非営利活動法人婦人科悪性腫瘍化学療法研究機構 (JGOG) の臨床試験審査委員会の承認が得られ、JGOG に所属する各施設の IRB の承認のもと、同年 12 月より登録が開始された。2009 年 12 月の時点で 600 症例の登録がなされ、この間、計 6 回のモニタリングを実施し、安全性の確認をした。

第 6 回モニタリング (2009 年 12 月) を行った時点での登録症例の治療前背景因子は以下の通りである。年齢中央値は AP 群 58.0 (28-74) 歳、DP 群 58.0 (29-73) 歳、TC 群 59.0 (31-74) 歳であった。進行期 I-II 期は AP 群

64例、DP群63例、TC群63例、進行期Ⅲ-Ⅳ期はAP群139例、DP群139例、TC群138例であった。組織学的分化度G1/G2はAP群128例、DP群126例、TC群125例、組織学的分化度G3/予後不良型はAP群75例、DP群76例、TC群76例であった。初回手術として骨盤リンパ節郭清に加え、傍大動脈リンパ節郭清を施行された症例は57%（479例中273例）であった。Grade3（CTCAE ver.3）以上の有害事象発生状況（神経毒性についてはGrade2以上）のうち10%を超える頻度のものは、AP群でHb低下31%、白血球減少81.3%、好中球減少94.8%、DP群でHb低下16.1%、白血球減少74.5%、好中球減少89.3%、神経障害・知覚性10.1%、TC群でHb低下25.8%、白血球減少64.2%、好中球減少84.8%、血小板減少16.6%、神経障害・知覚性25.8%であった。

第5回定期モニタリング時点までの登録症例において、割付群を明らかにせず全例での患者背景を検討したところ、術後再発に関するhigh risk群に比べ予後が良好であることが近年報告されている腹腔細胞診陽性所見のみでⅢ期に該当した症例が登録症例の比較的多くの割合を占めている可能性が指摘された。このような場合には、現状の目標症例数では各群の統計学的な差を検出するだけのイベントが発生しない可能性がある。NSGO EC-9501/EORTC-55991試験ではI期、II期、IIIa期（腹腔細胞診陽性のみ）、IIIc期（骨盤リンパ節転移陽性

のみ）の子宮体がん術後患者の5年無増悪生存率を、術後放射線治療群で72%、術後放射線治療/化学療法（AP療法を含む）併用群で79%と報告している。これを踏まえ本試験のAP療法の5年無増悪生存率を75%程度と設定し、同様の統計学的考察に基づき、1群当たりの症例数を260例、合計780例と再設定し、本試験の登録期間を4年間に延長し、試験の継続を行うこととした。

2) 子宮体がんの治療に関する調査研究の結果、海外における子宮体がん治療では放射線療法と化学療法の優劣が論じられるだけでなく、併用療法の有効性が検討されていることが判明した。特に北欧を中心としたグループでは全骨盤照射と化学療法（化学療法のレジメが厳密に規定されていない）を併用すると照射単独より予後が良好であることを示していることから、その際にどのような化学療法のレジメンがもっとも有効かという課題が注目され多数の臨床試験が立案されつつある。また、子宮体がんではホルモン療法も治療の選択肢の1つとして考慮できるが、アロマターゼ阻害剤もその候補の1つとなる可能性が示された。一方で、進行がんの治療については同時化学放射線療法や術前化学療法、あるいはpaclitaxelのweekly投与などの有用性が検討された。リンパ節郭清の範囲や程度は施設によってはさまざまであり、特に傍大動脈リンパ節郭清については現時点でも一定

の見解が得られているとは言い難いが、系統的骨盤および傍大動脈リンパ節郭清が適確な術後化学療法と組み合わせられることによって予後の改善が見込まれることも示された。さらに、MSI の状態や BRAF、あるいは Heparanase の発現が子宮体がんの予後に関連するか検討が行われた。これらの知見は、今後の治療の個別化を包含した臨床試験を考案する際に役立つものと考えられたが、あわせて、連続変数を層別因子とした最小化法に関する新たな統計解析手法についても検討された。

D. 考察

臨床第Ⅲ相試験である本試験が開始され、データセンターおよび試験事務局を中心とした組織が順調に機能し、実際の運用が行われている。2010年3月の時点で112施設から639症例の登録がなされ、多数の施設が参加する本試験の運営にあたっては今後もデータマネジメント機能を強化し試験の質を維持することが重要である。また、モニタリングによる品質管理もさらに進めていく必要がある。

E. 結論

子宮体がん 高再発危険群の術後化学療法として国際的に標準治療と考えられている AP 療法と、試験治療として Taxane 製剤+Platinum 製剤併用療法のうち DP 療法および TC 療法を選択し、これらを比較するランダム化比較第Ⅲ相試験を開始した。現在、

順調に症例の集積が行われており、次年度中には症例集積が完了する見込みである。

F. 健康危険情報

本第Ⅲ相試験において、2010年2月に急送報告を要する重篤な有害事象が報告された。AP 療法3サイクル目施行後に死亡が確認された症例であり、死因は臨床的に心筋梗塞による可能性が高いとのことである。本症例の適格性には問題なく、効果・安全性評価委員会において審議がなされ試験の継続は可と判定されたことから、本事象について周知した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 野村弘行, 青木大輔: 子宮体癌 術後補助化学療法. 婦人科癌化学療法ポケットマニュアル (監修 野田起一郎): 34-44, メディカルレビュー社, 東京, 2009
- 2) 青木大輔: 各種のがん 子宮体がん (子宮内膜がん). 日本医師会雑誌 がん診療 update 生涯教育シリーズ 76 (監修 跡見裕 編集 島田安博, 杉原健一, 谷本光音, 吉村泰典): S258-S261, 日本医師会, 東京, 2009
- 3) Watanabe Y, Kitagawa R, Aoki D, Takeuchi S, Sagae S, Sakuragi N, Yaegashi N; Disease Committee of Uterine Endometrial Cancer, Japanese Gynecologic Oncology Group: Practice pattern for

postoperative management of endometrial cancer in Japan: a survey of the Japanese Gynecologic Oncology Group. *Gynecol Oncol*, 115: 456-459, 2009

- 4) Kawaguchi M, Yanokura M, Banno K, Kobayashi Y, Kuwabara Y, Kobayashi M, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D: Analysis of a correlation between the BRAF V600E mutation and abnormal DNA mismatch repair in patients with sporadic endometrial cancer. *Int J Oncol*, 34:1541-1547, 2009
- 5) Kawaguchi M, Banno K, Yanokura M, Kobayashi Y, Kishimi A, Ogawa S, Kisu I, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D: Analysis of candidate target genes for mononucleotide repeat mutation in microsatellite instability-high (MSI-H) endometrial cancer. *Int J Oncol*, 35:977-982, 2009

2. 学会発表

- 1) 進 伸幸, 平沢 晃, 鶴田智彦, 市川義一, 末盛友浩, 山上 亘, 片岡史夫, 鈴木 淳, 阪埜浩司, 津田浩史, 青木大輔, 吉村泰典: 若年体癌症例に対する子宮温存目的酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)療法の pitfall - 子宮摘出に至っ

た 21 症例における子宮外病変の検討より - 第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会 (京都), 2009 年 4 月

- 2) 富永英一郎, 進 伸幸, 平沢 晃, 赤羽智子, 長島義男, 照井仁美, 青木大輔: シンポジウム 子宮体癌腹腔細胞診の臨床的意義. 第 50 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) (東京), 2009 年 6 月
- 3) 小林佑介, 阪埜浩司, 野村弘行, 堀場裕子, 平沢 晃, 進 伸幸, 塚崎克己, 青木大輔: 子宮体癌治療後腔再発症例の解析による腔壁部分切除の意義についての検討. 第 46 回日本婦人科腫瘍学会学術集会 (新潟), 2009 年 7 月
- 4) 富永英一郎, 進 伸幸, 赤羽智子, 山上 亘, 東口敦司, 平沢 晃, 青木大輔: 子宮体癌における腹腔細胞診の臨床的意義と新規診断マーカーの検索. 第 50 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (大津), 2009 年 9 月
- 5) Susumu N, Hirasawa A, Kobayashi Y, Tsuruta T, Ichikawa Y, Yamagami W, Nomura H, Kataokia F, Suzuki A, Banno K, Tsuda H, Aoki D: Pitfalls in fertility-preserving high-dose medroxyprogesterone acetate (MPA) therapy for young patients with endometrial cancer. The 16th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology

(ESGO), Belgrade Serbia, Oct 11-14, 2009

- 6) 岸見有紗, 阪埜浩司, 小林佑介, 小川誠司, 木須伊織, 野村弘行, 照井仁美, 進 伸幸, 塚崎克己, 青木大輔: 子宮癌肉腫症例における術前内膜細胞診の有用性について—子宮肉腫との対比—. 第 48 回日本臨床細胞学会秋期大会 (博多), 2009 年 10 月
- 7) 荒井ゆり子, 照井仁美, 長島義男, 野村弘行, 平沢 晃, 阪埜浩司, 藤井多久磨, 進 伸幸, 塚崎克己, 青木大輔: 子宮体部癌肉腫 12 例の細胞学的検討. 第 48 回日本臨床細胞学会秋期大会 (博多), 2009 年 10 月
- 8) Hirasawa A, Akahane T, Matsumura S Tsuruta T, Banno K, Susumu N, Aoki D: Genetic polymorphism involved in estrogen metabolism and endometrial cancer risk. Eighth Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Hawaii USA, Feb 5-9, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

子宮体癌に対する骨盤および傍大動脈リンパ節郭清の有用性に関する検討

研究分担者 櫻木範明 北海道大学医学研究科生殖内分泌・腫瘍学分野・教授
研究協力者 藤堂幸治 北海道がんセンター婦人科・医長

研究要旨

2つの3次がん治療病院（北海道大学病院、北海道がんセンター）で骨盤リンパ節郭清のみあるいは骨盤+傍大動脈リンパ節郭清で治療された2群の患者についてのコホート研究を行った。中リスク・高リスク体癌症例に対して骨盤および傍大動脈リンパ節郭清を行うことで骨盤リンパ節郭清のみに比べて死亡リスクを0.44にまで低下させることが明らかになった。中リスク、高リスク体癌症例に対しては骨盤および傍大動脈リンパ節郭清を行うことが推奨される。

A. 研究目的

子宮体癌における傍大動脈リンパ節郭清の治療的意義を明らかにする。

B. 研究方法

北海道大学病院と北海道がんセンターで1986年1月から2004年6月までの期間に骨盤リンパ節郭清のみあるいは骨盤+傍大動脈リンパ節郭清で治療された2群の患者についての比較コホート研究を行った。解析患者数は671例であり、325例が系統的骨盤リンパ節郭清、346例が系統的骨盤および傍大動脈リンパ節郭清を受けた。再発の中リスク、高リスク例には術後補助療法（放射線治療あるいは全身化学療法）を行った。

C. 研究結果

全生存期間は骨盤+傍大動脈リンパ節郭清群で骨盤リンパ節のみ郭清群よりも有意に長かった（ハザード比0.53、95%信頼区間：0.38-0.76、 $p=0.0005$ ）。中リスク、高リスク例でもこの効果が認められた（ $p=0.0009$ ）。しかし低リスク症例ではこの生存期間延長効果は認められなかった。複数の予後因子についての多変量解析の結果、傍大動脈リンパ節を骨盤リンパ節郭清に加えることで中リスク、高リスク例の死亡リスクを0.44に低下させる独立因子であることが示された（ $p<0.0001$ ）。術後補助療法を行った患者での多変量解析で

傍大動脈リンパ節郭清（ハザード比 0.48、 $p=0.0049$ ）と化学療法（ハザード比 0.59、 $p=0.0465$ ）がそれぞれ独立して予後を改善することが示された。

D. 考察

比較コホート研究から骨盤リンパ節郭清に傍大動脈リンパ節郭清を加えることで中リスク、高リスク体癌患者の予後を改善することが明らかとなった。

E. 結論

中リスク、高リスク体癌患者の手術治療では傍大動脈リンパ節郭清を行うことが推奨される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watari H, Xiong Y, Hassan MK, Sakuragi N: Cyr61, a member of ccn (connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed) family, predicts survival of patients with endometrial cancer of endometrioid subtype. *Gynecol Oncol*, 112: 229-234, 2009
- 2) Mitamura T, Watari H, Todo Y, Koshida T, Sakuragi N: A 14-year-old female patient with FIGO stage IB endometrial carcinoma: a case report. *Int J Gynecol Cancer*, 19: 896-897,

2009

- 3) Watari H, Mitamura T, Moriwaki M, Hosaka M, Ohba Y, Sudo S, Todo Y, Takeda M, Ebina Y, Sakuragi N: Survival and failure pattern of patients with endometrial cancer after extensive surgery including systematic pelvic and para-aortic lymphadenectomy followed by adjuvant chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer*. 19: 1585-1590, 2009
- 4) Todo Y, Kato H, Kaneuchi M, Watari H, Takeda M, Sakuragi N: Survival effect of para-aortic lymphadenectomy in endometrial cancer (SEPAL study): a retrospective cohort analysis. *Lancet*. 2010 Feb 24. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

子宮体癌に対する標準的化学療法の確立に関する研究

研究分担者 八重樫伸生 東北大学大学院医学系研究科婦人科学分野 教授
研究協力者 志賀 尚美 東北大学病院婦人科

研究要旨

子宮内膜癌の多くはエストロゲン依存性腫瘍であり、子宮内膜癌組織内のエストロゲン濃度は正常子宮内膜組織や血中濃度に比較して有意に高い。これまでの報告から、局所の癌組織では間質のアロマターゼによりエストロゲンが合成され、その増殖・進展に深く関与すると考えられている。しかしこれまでに、局所における子宮内膜癌細胞と間質細胞の相互作用についての詳細な検討はない。今回、エストロゲン合成の key enzyme であるアロマターゼに着目し、共培養という手法を用いて子宮内膜癌の局所におけるエストロゲンの合成・代謝メカニズムの解明を試みた。さらにアロマターゼ阻害剤の子宮内膜癌細胞株に対する効果を検討し、新規内分泌療法の可能性を探った。

2種類の子宮内膜癌細胞株、対照としての乳癌細胞株と当教室にて外科的に摘出された子宮内膜癌より初代培養した間質細胞を用いて以下の実験を行った。まず、細胞株を単独培養した場合と、間質細胞と共培養した場合のエストロゲン合成関連酵素（ 17β -HSD type 1、 17β -HSD type 2、アロマターゼ）および $ER\alpha$ の mRNA 発現を検討した。単独培養した場合と共培養した場合のエストロゲン合成関連酵素および $ER\alpha$ の mRNA 発現に有意差を認めなかった。次に単独培養した場合と共培養した場合のアロマターゼ活性を測定し比較検討した。細胞株、間質細胞ともにアロマターゼ活性を認め、共培養によりアロマターゼ活性は有意に上昇した。また、エストロゲン合成の基質であるアンドロゲンを共培養した子宮内膜癌細胞株および乳癌細胞株に添加し、合成されたエストロゲン活性を測定した。アンドロステンダイオン、テストステロンのどちらを投与した場合もエストロゲン活性の著しい上昇を認めた。産生されたエストロゲンは、子宮内膜癌細胞株ではエストロンがエストラジオールに比較して有意に高値であった。一方、乳癌細胞株ではエストラジオールがエストロンに比較して有意に高値であった。さらに、 17β -HSD type 2 の発現が異なる間質細胞と共培養した子宮内膜癌細胞株に 2種類のアロマターゼ阻害剤を投与し効果を検討した。すべての組み合わせで有意に子宮内膜癌細胞株の細胞死が促進された。 17β -HSD type 2 の発現

の有無によって細胞死の促進率に有意差は認めなかった。

子宮内膜癌局所において、癌細胞と間質細胞の相互作用によりアロマターゼ活性が増強し、アンドロゲンからエストロゲンが合成されると推察された。子宮内膜癌と乳癌では局所で合成されるエストロゲンの種類が異なっており、細胞増殖に関して子宮内膜癌ではエストラジオールのみならずエストロンも重要な役割を持つ可能性が示された。またアロマターゼ阻害剤によって細胞死が有意に促進されたことから、アロマターゼ発現症例ではアロマターゼ阻害剤が治療薬となる可能性があるかと推察された。

A. 研究目的

子宮内膜癌局所で子宮内膜癌細胞と間質細胞がどのように関わってエストロゲンが合成・代謝されているのか検証し、さらに子宮内膜癌に対するアロマターゼ阻害剤の効果を検討することを目的とした。

B. 研究方法

2 種類の子宮内膜癌細胞株 (Ishikawa, RL95-2)、対照としての乳癌細胞株 (MCF-7)、コントロールとして 3T3-L1 を使用した。間質細胞は、2004 年から 2006 年にかけて東北大学医学部産婦人科学教室にて子宮内膜癌の診断で手術療法にて摘出された子宮内膜癌組織から初代培養し使用した。症例は 3 例 (#3、#11、#16) であり、すべて類内膜腺癌 Grade1、進行期は Ia 期であった。今回の研究に使用することは東北大学大学院倫理委員会の承認を得ている。使用した間質細胞のエストロゲン合成関連酵素の mRNA 発現は、#3 はアロマターゼ陽性、 17β -HSD type 2 陰性、#11 と #16 はアロマターゼ、 17β -HSD type 2 共に陽性である。

細胞株と間質細胞を単独培養もしくは共培養するために Transwell permeable supports (0.4 μ m pore;

Corning Incorporated, Corning, NY, USA) の 6 穴細胞培養用プレートを用いた。細胞株をプレートの上段へ播き、間質細胞を下段へ播き、共培養もしくは単独培養した。共培養の場合は共培養 24 時間後に細胞株と間質細胞を分け、さらに 24 時間単独培養し、それぞれアロマターゼ活性、エストロゲン活性を測定した。また細胞を回収して trypan blue exclusion (TBE) にて細胞数を計測し、RNA を抽出し mRNA 量を real-time quantitative RT-PCR を用いて評価した。単独培養の場合は 48 時間単独培養し同様の測定を行った。以下単独培養した細胞株を MO、共培養した細胞株を CO と表記する。

(例: Ishikawaco, #3co, Ishikawamo)
RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用して細胞株と間質細胞から RNA を抽出した。SuperScript III Platinum CellsDirect Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用して抽出した RNA から cDNA を合成した。Real-time quantitative RT-PCR はアロマターゼに関しては LightCycler Taqman Master ready-to-use hot start reaction mix for PCR (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,

Germany) を用いて、そのほかに関しては the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH) を用いて、LightCycler ST300 instrument (Roche Diagnostics GmbH) で測定した。プライマーの設定はアロマトラーゼ: forward 5'-CCT TCT GCG TCG TGT CAT GCT-3' reverse 5'-GGA GAG CTT GCC ATG CAT CAA-3'、ER α : forward 5'-TGC TCA AGG AGG GAG TGC-3' reverse 5'-GGC GAC AAT TTC TGG TTC GGG TCA GGC ATG GCA TAG-3'、 β -actin: forward 5'-ACC CAG CAC AAT GAA GAT-3' reverse 5'-GGT GTA ACG CAA CTA AGT CA-3'、17 β -HSD type 1: forward 5'-TGC TGG ACG TGA ATG TAG TA-3' reverse 5'-GTA TTG GAA GCG GTG GAA G-3'、17 β -HSD type 2: forward 5'-CAA AGG GAG GCT GGT GAA T-3' reverse 5'-TCA CTG GTG CCT GCG ATA-3' とした。アロマトラーゼのプライマーは the Universal Probe Library System (Roche Diagnostics GmbH) で設定した。 β -actin のプライマーは NIHON GENE RESEARCH LABORATORIES Inc. (Miyagi, Japan) で設定した。17 β -HSD type 1 と type 2 のプライマーは OLIGO Primer Analysis Software (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) で設定した。PCR の設定については、アロマトラーゼは 45 cycles (95°C, 10sec; 60°C, 35sec)、ER α は 45 cycles (95°C, 10sec; 65°C, 10sec; 72°C, 10sec)、 β -actin は 35 cycles (95°C, 10sec; 63°C, 10sec; 72°C, 10sec)、17 β -HSD type 1 は 45 cycles (95°C, 15sec; 60°C, 5sec; 72°C, 10sec)、17 β -HSD type 2 は 45 cycles

(95°C, 10sec; 70°C, 5sec) とした。合成された mRNA 量は β -actin の mRNA との比で相対定量した。

Ishikawamo、Ishikawaco、RL95-2_{MO}、RL95-2_{CO}、MCF-7_{MO}、MCF-7_{CO}、#3_{MO}、#3_{CO} に関して 6 α -methylandroster-4-ene-3, 17-dione (MeAD) 活性を用いてアロマトラーゼ活性を測定した。アンドロゲンアナログである MeAD がアロマトラーゼによってエストロゲンアナログである 6 α -methyl estradiol (MeE2) へ変換されることを利用して、MeE2 を測定することによって正確なアロマトラーゼ活性の測定が可能である。MeE2 の liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (ASKA Pharma Medical Co., Ltd. (Kanagawa, Japan)) による測定をあすか製薬メディカルに依頼した。細胞株を播種しない培養液をコントロールとした。

Ishikawaco、RL95-2_{CO}、MCF-7_{CO} に基質として 10 nmol/L のアンドロステンダイオン (Toronto Research Chemicals Inc, North York, Canada) とテストステロン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Japan) を投与し、FBS-free RPMI 1640 の培養液で 37°C、24 時間培養した。培養液中のエストロンとエストラジールの活性はあすか製薬メディカルに依頼し、LC-MS/MS (ASKA Pharma Medical Co., Ltd.) にて測定した。細胞株を播種しない培養液をコントロールとした。

次に子宮内膜細胞株に対するアロマトラーゼ阻害剤の効果を検討した。Ishikawa、RL95-2 と間質細胞を 6 穴細胞培養プレートで共培養し、24 時間後 phenol red (-)、FBS (-) の培

養液に基質として 10^{-8} mol/L のテストステロンを投与し単独培養した。24 時間後細胞を回収し、96 穴の細胞培養用プレートに 5×10^4 cells/mL の濃度で播種し直した。24 時間後テストステロン (10^{-8} mol/L) とアロマターゼ阻害剤 (10^{-6} mol/L ~ 10^{-10} mol/L) を投与し細胞増殖の程度を WST-8 法 (Cell Counting Kit-8; Dojindo Molecular Technologies Inc., Kumamoto, Japan) を用いて 0 時間、24 時間、48 時間、72 時間で計測した。アロマターゼ阻害剤は、アロマターゼの活性部位に可逆的に結合し、触媒部位を占拠し、生成物の形成を阻害する非ステロイド系阻害剤と、アロマターゼの活性部位に不可逆的に結合することにより拮抗し阻害するステロイド系阻害剤の 2 種類に分かれる。今回は非ステロイド系阻害剤としてアナストロゾール (Toronto Research Chemicals Inc., North York, Canada)、ステロイド系阻害剤としてエキセメスタン (LKT Laboratories, Inc., St. Paul, MN, USA) を使用した。エタノールはコントロールとして使用した。

2 群間の有意差検定には t 検定を用いた (StatFlex 5.0 software program (Artec Inc., Osaka, Japan))。

C. 研究結果

1. Ishikawa, RL95-2, MCF-7, #16 における関連酵素、ER α の mRNA 発現

Ishikawa_{MO}, RL95-2_{MO}, MCF-7_{MO}, #16_{MO} と、Ishikawa_{CO}, RL95-2_{CO}, MCF-7_{CO}, #16_{CO} すべてにおいて 17 β -HSD types 1, type 2, アロマターゼ、ER α の mRNA 発現を認め、単独培養した場合と共培養した場合で

有意差を認めなかった。

2. Ishikawa, RL95-2, #16 のアロマターゼ活性

Ishikawa_{MO}, RL95-2_{MO}, #16_{MO} はアロマターゼ活性を認めた。Ishikawa_{CO}, RL95-2_{CO}, #16_{CO} のアロマターゼ活性はそれぞれ Ishikawa_{MO}, RL95-2_{MO}, #16_{MO} と比較して有意に上昇した。 ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.05$)

3. Ishikawa, RL95-2, #16 のエストロゲン活性

基質としてアンドロステンダイオンもしくはテストステロンを投与したときの Ishikawa_{MO}, RL95-2_{MO}, MCF-7_{MO}, #16_{MO} と、Ishikawa_{CO}, RL95-2_{CO}, MCF-7_{CO}, #16_{CO} のすべてにおいてエストロンとエストラジオールの生成が認められた。アンドロステンダイオンを基質として投与した場合、Ishikawa_{CO} と RL95-2_{CO} においてエストロンがエストラジオールに比較して有意に高かった。 ($p < 0.001$, $p < 0.001$) 一方、MCF-7_{CO} においてはエストラジオールがエストロンに比較して有意に高かった。 ($p < 0.001$) テストステロンを基質として投与した場合、Ishikawa_{CO} と RL95-2_{CO} においてエストロンがエストラジオールに比較して高かった。 ($p < 0.01$, n.s.) 一方、MCF-7_{CO} においてはエストラジオールがエストロンに比較して有意に高かった。 ($p < 0.01$)

4. Ishikawa と RL95-2_{CO} に対するアロマターゼ阻害剤の効果

最初に、アロマターゼ阻害剤の濃度を設定するため、Ishikawa, RL95-2 と #16 の共培養にアロマターゼ阻害剤を 10^{-6} mol/L ~ 10^{-10} mol/L まで投与し効果を検討した。2 種類のアロマターゼ阻害剤で Ishikawa, RL95-2 両方と

も濃度依存性に細胞死の促進効果を認めた。特に 10^{-9} ~ 10^{-10} mol/L と比較して 10^{-6} ~ 10^{-8} mol/L のアロマターゼ阻害剤の効果は強かった。またこれまでの乳癌細胞株における報告でも、アロマターゼ阻害剤の濃度は 10^{-8} mol/L で検討されていた。よって、 10^{-8} mol/L が細胞死の促進効果があり最も細胞毒性が低い濃度と考え、以下の実験はアロマターゼ阻害剤は 10^{-8} mol/L で設定した。

子宮内膜癌細胞株の増殖における 17 β -HSD type 2 の効果を検討するため 17 β -HSD type 2 の発現が異なる間質細胞を用い、間質細胞と細胞株の組み合わせは、Ishikawa と #3、#11、#16、RL95-2 と #3、#11、#16 の 6 組とした。アロマターゼ発現を認めない 3T3-L1 と #3、#11、#16 の共培養をコントロールとした。全ての Ishikawa と RL95-2 において 2 種類のアロマターゼ阻害剤で有意に細胞死が促進された。3T3-L1 にはアロマターゼ阻害剤によって有意な細胞死促進効果を認めなかった。すべての組み合わせで細胞株の細胞死促進率に有意差は認めなかった。

D. 考察

エストロゲン、特にエストラジオールは生物学的活性の高いエストロゲンであり、エストロゲン依存性腫瘍である子宮内膜癌や乳癌の増殖・促進に大きく関与していると考えられている。しかしながら子宮内膜癌の多くは卵巣のエストロゲン産生が低下し、血中エストロゲンも低下する閉経後に発症する。子宮内膜癌を発症した女性の血中エストロゲンは発症していない女性と有意差はないとされている。ではエストロゲンはどこから供給さ

れ腫瘍の増殖・促進に働いているのか。この疑問に対して、肉眼的に正常な子宮内膜組織のエストロゲン濃度に比較して内膜癌組織のエストロゲン濃度は有意に高いとする報告や閉経後子宮内膜癌患者において癌組織のエストロン、エストラジオール、テストステロン濃度が血中濃度に比較して有意に高いとする報告がなされるようになり、子宮内膜癌局所でエストロゲンの合成・代謝が行われていると考えられるに至った。Tseng らや Yamaki らは子宮内膜癌においてアロマターゼを介してアンドロゲンがエストロゲンに変換されることを報告した。Watanabe らは、アロマターゼは正常子宮内膜や子宮内膜増殖症では発現を認めず、主に子宮内膜癌の間質細胞に発現を認めることを報告した。

乳癌においてはアロマターゼの発現について間質細胞、癌細胞から IL-1、IL-6、IL-11、tumor necrosis factor- α 、prostaglandin E₂ などのさまざまなアロマターゼ刺激因子が放出され、癌細胞と間質細胞の相互作用がおこり腫瘍の増殖・促進に関わっていることが報告されている。しかし、子宮内膜癌においてはアロマターゼ発現について間質細胞、癌細胞からの刺激因子の有無や相互作用の有無などについて未だ解明されていない。そこで今回高分化子宮類内膜腺癌由来である Ishikawa と低分化子宮類内膜腺癌由来である RL95-2 を用いて、共培養システムを使って単独培養と共培養のアロマターゼ活性を測定して、子宮内膜癌のアロマターゼ発現について癌細胞と間質細胞の相互作用があるのか検討した。アロマターゼ活性は Ishikawa、RL95-2、#16 とともに単独

培養と比較して共培養で有意に高かった。#16のアロマターゼの mRNA 発現は微量であったが、活性レベルでは細胞株より高活性であり Watanabe らの報告に矛盾しないと考えられた。今回の検討によりアロマターゼ活性に癌細胞と間質細胞の相互作用が関与している可能性が強く示唆された。

エストロゲン依存性腫瘍である子宮内膜癌と乳癌において腫瘍組織内エストロゲン合成・代謝過程には違いがあるとする報告がある。エストロゲン合成関連酵素である 17 β -HSD type 1 と 17 β -HSD type 2 はエストロンとエストラジオールの双方向の変換を触媒している。17 β -HSD type 1 はエストロンをエストラジオールへ還元している。17 β -HSD type 2 はエストラジオールをエストロンへ酸化している。乳癌においては 17 β -HSD type 1 が主に発現し 17 β -HSD type 2 はほとんど発現しておらず、17 β -HSD type 1 が腫瘍内のエストラジオール濃度を制御しているといわれている。それに対して正常子宮内膜、子宮内膜増殖症、子宮内膜癌では 17 β -HSD type 2 が主に発現し 17 β -HSD type 1 は発現しておらず、17 β -HSD type 2 が腫瘍内のエストラジオール濃度を制御していると考えられている。今まで正常子宮内膜や子宮内膜癌においてアンドロゲンからエストロゲンへの変換を報告したものはあったが、今回は子宮内膜癌細胞株と間質細胞の共培養システムを使用して、合成されたエストロゲンを LC-MS/MS で測定した最初の検討である。興味深いことに 2 種類の子宮内膜癌細胞株で、2 種類のアンドロゲン投与で、エストロンがエストラジオールと比較して有意に高く、乳癌細胞株ではエストラジ

ールがエストロンと比較して有意に高かった。アンドロステンダイオンを基質とした場合、アロマターゼを介してエストロンが産生され、17 β -HSD type 1 により変換されずエストロンが貯留したか、17 β -HSD type 5 によってテストステロンへ変換され、テストステロンがアロマターゼによってエストラジオールへ変換されて 17 β -HSD type 2 によってエストロンに変換されて貯留したか、どちらかの経路によってエストロンが貯留し、エストラジオールと比較して有意に高かったと考えられた。テストステロンを基質とした場合、テストステロンがアロマターゼによってエストラジオールへ変換されて 17 β -HSD type 2 によってエストロンに変換されて貯留したと考えられた。今回使用した Ishikawa と RL95-2 は 17 β -HSD type 1 の mRNA 発現は MCF-7 と同様認められた。子宮内膜癌組織で 17 β -HSD type 1 活性が認められていないことが報告されており、今回使用した子宮内膜癌細胞株が *in vivo* を正確に反映していない可能性がある。しかし 17 β -HSD type 1 の mRNA 発現が認められている条件でもエストロンがエストラジオールと比較して有意に高いので、*in vivo* ではよりエストロンが貯留している可能性がある。また 17 β -HSD type 2 の mRNA 発現に関して Ishikawa は MCF-7 と同様低く、RL95-2 は高く発現していた。アンドロステンダイオンを基質とした場合は、エストロン/エストラジオール比は Ishikawa と比較して RL95-2 で高く 17 β -HSD type 2 の mRNA 発現を反映していると思われた。テストステロンを基質とした場合は、エストロン/エストラジオール比は Ishikawa と

比較して RL95-2 で低かったが、RL95-2 のエストロン測定値のばらつきが大きかったためと思われる。

今回の検討により子宮内膜癌組織局所のエストロゲン合成・代謝におけるアロマターゼの重要性を確認できた。アロマターゼ阻害剤は乳癌において臨床現場で使用されている内分泌治療薬剤である。しかし子宮内膜癌の分野では未だ研究途上であり、治療効果についても賛否両論である。これらの報告の問題点として、対象症例が進行、再発症例のみであること、エストロゲン合成関連酵素の発現を確認していないことがあげられ、今後のエビデンスの蓄積が望まれる段階にある。子宮内膜癌に対するアロマターゼ阻害剤の効果を検討するため、アロマターゼ発現を確認した間質細胞と子宮内膜癌細胞株の共培養にアロマターゼ阻害剤を投与し効果を検討した。また 17 β -HSD type 2 は局所のエストラジオールをエストロンへ変換することによってエストロゲン活性を抑制し、ひいては細胞死の促進効果が高める重要な役割をもっているのではないかと考えられてきた。よって 17 β -HSD type 2 の発現が低いと、より局所のエストロゲン活性が高まりアロマターゼ阻害剤の効果が大きいのではないかと予想し、比較検討のため間質細胞は 17 β -HSD type 2 の発現していない#3 と発現している#11、#16 を用いた。アロマターゼ阻害剤は非ステロイド系阻害剤の代表としてアナストロゾール、ステロイド系阻害剤の代表としてエキセメスタンを使用した。乳癌の臨床では現時点でステロイド系阻害剤と非ステロイド系阻害剤の作用機序の違いで効果に差はないと考えられている。今回、すべて

の子宮内膜癌細胞株と間質細胞の組み合わせで有意に細胞死の促進効果を認め、ステロイド系阻害剤と非ステロイド系阻害剤で効果に差を認めなかった。また、間質細胞の 17 β -HSD type 2 の発現の有無によるアロマターゼ阻害剤の効果の差異は認めなかった。局所のエストロゲン活性に 17 β -HSD type 2 だけでなくほかのエストロゲン合成関連酵素がかかわっている可能性と、腫瘍増殖にとってエストラジオールだけでなくエストロンも重要な役割を持っている可能性が示唆された。

E. 結論

細胞株の共培養システムを用いて、アンドロゲンを基質としてアロマターゼを介して子宮内膜癌組織局所でエストロゲンを合成する経路を確認した。今回の検討によって子宮内膜癌組織局所で癌細胞と間質細胞が相互作用しアロマターゼ活性を高め、局所でエストロゲンを合成し、合成されたエストロゲンはエストラジオールだけでなくエストロンも重要な役割を持っていることを示唆した。またアロマターゼが発現している症例に対してアロマターゼ阻害剤が細胞死を促進する可能性を示唆し、今後の治療応用への足掛かりとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi-Shiga N, Utsunomiya H, Miki Y, Nagase S, Kobayashi R, Matsumoto M, Niikura H, Ito K, Yaegashi N: Local Biosynthesis of Estrogen in Human Endometrial Carcinoma through Tumor -Stromal Cell

Interactions. Clinical Cancer Research, 15: 6028-6034, 2009

2. 学会発表

- 1) 高橋尚美, 宇都宮裕貴, 松本光代, 伊藤 潔, 八重樫伸生: 子宮内膜癌におけるエストロゲンの合成・代謝の解明と 新規内分泌療法の検討. 第 61 回日本産科婦人科学会総会 (京都), 2009 年 4 月
- 2) Takahashi N, Utsunomiya H, Miki Y, Kobayashi R, Matsumoto M, Yoshinaga K, Nagase S, Takano T, Niikura H, Ito K, Yaegashi N: Local Biosynthesis of Estrogen in Human Endometrial Carcinoma through Tumor -Stromal Cell Interactions. International meeting of the European Society of Gynecological Oncology (第 16 回欧州婦人科癌腫瘍会議), Belgrade Serbia, Oct 11-14, 2009

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし