

博士論文

子宮体癌細胞株に対する抗マラリア薬クロロキンとサバイ  
ビン阻害薬 YM155 の抗腫瘍効果の検討

福田 友彦

## 目次

要旨 .....	5
序文 .....	6
1 子宮体癌の成因と治療 .....	6
2 オートファジーとがん .....	7
3 クロロキンとがん.....	10
4 SIRT6 とがん.....	12
5 サバイビンと子宮体癌 .....	13
6 本研究の目的.....	14
方法 .....	15
1 薬剤と抗体 .....	15
2 細胞培養.....	16
3 シスプラチン耐性 Ishikawa 子宮体癌細胞株の樹立 .....	17
4 MTT アッセイ .....	17
5 コロニー形成アッセイ .....	18
6 トランスフェクションと遺伝子サイレンシング .....	19
7 生存細胞数計測 (Trypan blue dye exclusion) .....	19
8 ウェスタンブロット法 .....	20
9 フローサイトメトリー (細胞周期・アポトーシス解析) .....	21
10 細胞蛍光免疫染色.....	22
11 免疫組織化学 (組織マイクロアレイ) .....	22

12	ルシフェラーゼレポーターアッセイ .....	24
13	RNA 抽出と定量的リアルタイム PCR .....	25
14	統計解析 .....	26
	結果 .....	27
<b>【1】</b>	子宮体癌細胞株に対するクロロキンの抗腫瘍効果の検討.....	27
1-1	クロロキンによる細胞増殖抑制 .....	27
1-2	クロロキンによるオートファジー阻害 .....	30
1-3	クロロキンによる増殖抑制とオートファジー阻害との関連性.....	32
1-4	シスプラチン誘導オートファジーの腫瘍促進効果 .....	34
1-5	クロロキンによるシスプラチン耐性の克服 .....	37
<b>【2】</b>	子宮体癌における SIRT6 の機能解析 .....	39
2-1	子宮体癌臨床検体と細胞株における SIRT6 発現 .....	39
2-2	SIRT6 のアポトーシス誘導による細胞増殖抑制 .....	42
2-3	SIRT6 のアポトーシス誘導機序におけるサバイビン抑制 .....	46
<b>【3】</b>	子宮体癌細胞株に対する YM155 の抗腫瘍効果の検討.....	50
3-1	子宮体癌細胞株におけるサバイビン抑制によるアポトーシス誘導 ....	50
3-2	YM155 のアポトーシス誘導による増殖抑制.....	52
	考察 .....	55
<b>【1】</b>	子宮体癌細胞株に対するクロロキンの抗腫瘍効果の検討.....	55
<b>【2】</b>	子宮体癌における SIRT6 の機能解析 .....	59

【3】子宮体癌細胞株に対する YM155 の抗腫瘍効果の検討.....	62
結論 .....	64
謝辞 .....	65
参考文献.....	66

## 要旨

子宮体癌は婦人科癌の中で最も発症頻度が高く、再発時の化学療法の選択肢が乏しいことから、新規化学療法の開発を目指し、抗マラリア薬クロロキンおよびサバイビン（抗アポトーシス因子）阻害薬 **YM155** の子宮体癌細胞株における抗腫瘍効果を検討したところ、クロロキンによる細胞死誘導がオートファジー阻害と関連することと、クロロキンによるオートファジー阻害がシスプラチン耐性を克服する可能性が示された。また、子宮体癌細胞株では、全般的に抗老化因子 **SIRT6** 発現が低下しており、**SIRT6** によるサバイビンの転写抑制を介する細胞死誘導機序が明らかとなり、サバイビン阻害薬 **YM155** は低濃度で顕著な細胞死を誘導した。以上より、子宮体癌細胞株に対するクロロキンと **YM155** の抗腫瘍効果が証明された。また、**SIRT6** は子宮体癌においてがん抑制遺伝子として機能しており、**SIRT6** を標的とした分子標的治療も子宮体癌に対する新規治療になり得る可能性が示唆された。

## 序文

### 1. 子宮体癌の成因と治療

子宮体癌は婦人科癌の中で最も発症頻度の高い癌であり、世界中で罹患者が増加していることが疫学的に明らかとなっている[1]。子宮体癌の治療は主に手術を施行することで、摘出検体の筋層浸潤、脈管侵襲、分化度、進行期により低リスク、中リスク、高リスク群に分類されるが、中リスク以上の症例には術後化学療法が施行される[1]。また、進行例に対しても化学療法が施行される。シスプラチンやカルボプラチン等の白金製剤を中心とした化学療法が主であり、化学療法後の再発時の治療選択肢は乏しく、新規抗がん剤、特に白金製剤耐性子宮体癌に対する抗がん剤が必要とされている。

子宮体癌は代謝と深い関連があり、糖尿病や肥満は子宮体癌のリスク比が各々1.8倍、1.5倍である[2][3]。また、糖尿病や肥満により引き起こされるインスリン抵抗性が子宮体癌の発癌に関与することが明らかとなってきた[3]。従って、Ⅱ型糖尿病の治療薬として頻用されるビグアナイド系抗糖尿病薬のメトホ

ルミンは子宮体癌の有望な治療薬とされている[4]。メトホルミンは AMP-activated protein kinase (AMPK) を活性化し、PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) –mTOR (mammalian target of rapamycin) 経路を抑制する。子宮体癌では PI3K や PTEN の変異が多く、PI3K-mTOR 経路の活性化を高頻度に認める[5][6]。従って、mTOR 阻害薬による PI3K-mTOR 経路の直接的な抑制は合理的な治療選択肢と考えられる。実際、分子標的薬を用いた子宮体癌の臨床試験の中でも temsirolimus や ridaforolimus などの mTOR 阻害薬は良好な成績を収めている[7][8]。しかし、奏効率は 30%程度であり、mTOR 阻害により insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) や AKT がフィードバックで活性化され治療抵抗性を獲得する機序が示されている[9][10]。今後は新たな経路をターゲットとした分子標的薬の登場が期待される。

## 2. オートファジーとがん

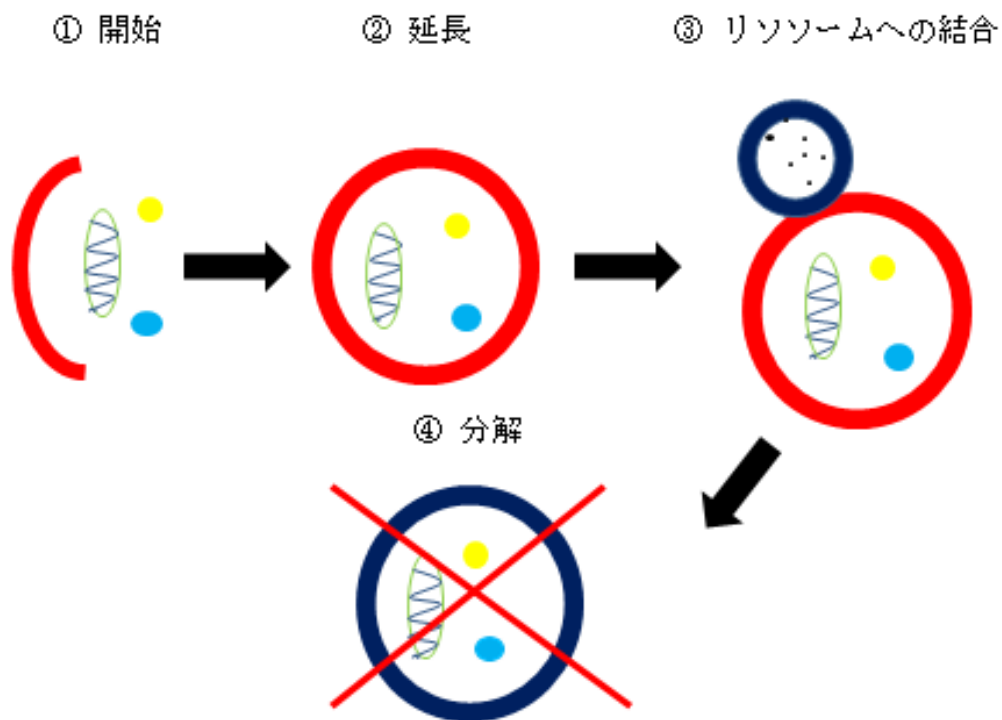
オートファジーは自己貪食を意味し、オルガネラや細胞質基質をリソソーム

により分解し細胞の代謝を制御する現象として知られる[11]。オートファジーはマクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーの3種類に分類される。その内マクロオートファジーが生体内で発生する主なものであり、一般的にオートファジーとはマクロオートファジーを意味する。オートファジーは開始、延長、リソソームへの結合、分解の4段階で構成される(図1)。具体的には、小胞体近傍で形成された隔離膜が延長し、オルガネラや細胞質基質を包み込んでオートファゴソームを形成後、リソソームと結合し、最終的にリソソーム酵素により内容物が分解される。*ATG5* や *ATG7* 等の Autophagy-related genes (ATGs) にコードされるタンパクはこの一連の段階を制御する[11]。実際に、*ATG5* や *ATG7* を欠損した細胞ではオートファジーが誘導されない[11]。オートファジーの活動性は一般的に microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) の発現で評価される。LC3にはLC3A、LC3B、LC3Cの3つのアイソフォームがあり、LC3Bが主にオートファジーの評価に用いられる[12]。オートファジーが誘導されると、細胞質に存在する16kDaのLC3-Iがフォスフ



ァチジルエタノールアミンと結合し、14kDa の LC3-II となりオートファゴソーム表面へ局在し分解される。従って、LC3-II はオートファゴソームのマーカーとなる。P62 は sequestosome (SQSTM1) とも呼ばれ、オートファジーで分解される[13]。オートファジーが誘導されると P62 は発現低下し、オートファジーが抑制されると P62 が蓄積するため、P62 もオートファジーの評価に用いられる。

オートファジーのがんにおける役割は複雑で議論が多い。オートファジーは発がん物質や損傷を受けたオルガネラを除去し発がんを抑制するとされる[14]。その反面、一旦浸潤癌になると、蓄積した代謝産物を再利用し癌細胞の代謝を正に制御することで、腫瘍増殖を促進する[14]。更にオートファジーは抗がん剤や放射線治療で賦活され、治療抵抗性に寄与する[15]。卵巣癌細胞株でオートファジーはシスプラチン抵抗性に関与することが報告されており[16]、シスプラチンは子宮体癌においても中心的な抗がん剤であり、オートファジー抑制は子宮体癌の有望な治療選択肢になり得る。オートファジー阻害薬には種々の薬剤があり、臨床使用されている薬剤はクロロキンとその誘導体である[11]。



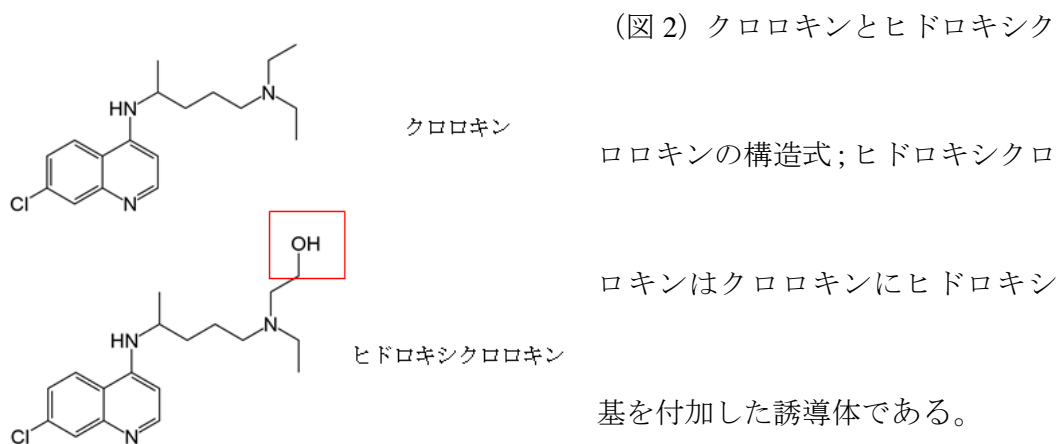
(図1) オートファジーの機序；①小胞体近傍で隔離膜が形成され、②延長しオルガネラや細胞質基質を包み込んでオートファゴソームとなり、③リソソームに結合しオートライソソームとなり、④内容物が分解される。

### 3. クロロキンとがん

クロロキン (図2) は1934年にドイツで合成され、長きに渡り抗マラリア薬として使用されている[17]。近年、クロロキンはオートファジー阻害薬としても注目されている。クロロキンはオートファゴソームのリソソームへの結合

を阻止し、結果的にオートファゴソームが蓄積する[18]。日本では、副作用の網膜症が原因で、クロロキンは1974年に発売中止となった[19]。その後、クロロキン網膜症の安全なスクリーニング方法が確立し[20]、副作用を早期に発見することで安全な投与方法が確立した。クロロキンと誘導体のヒドロキシクロロキン（図2）は抗炎症作用を持ち、関節リウマチ、全身性エリテマトーデスやシェーグレン症候群の治療に使用されてきている[21][22][23]。

クロロキンは *in vitro* と *in vivo* でオートファジーを抑制し抗腫瘍効果を発揮するため、大半は抗がん剤との併用であるが、肺癌等で数多くの臨床試験が施行されてきた[24][25]。しかし、子宮体癌に関するクロロキンの臨床試験やオートファジーの関与に関する研究は殆どなされていない。



#### 4. SIRT6 とがん

SIRT6 はクラス 3 ヒストン脱アセチル化酵素のサーチュインファミリーに属する[26]。SIRT6 は核に局在し、c-MYC、HIF1 $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B や TNF $\alpha$  を含む多数の腫瘍促進遺伝子と相互作用する[27][28][29]。また、SIRT6 は Warburg 効果として知られる、がんの特徴的な好氣的解糖を負に制御し、腫瘍抑制に働くと考えられている[27]。事実、SIRT6 ノックアウトマウスは腸管腫瘍を形成し短命になる[30]。一方、SIRT6 トランスジェニックマウスは雄のみ長寿になり、腫瘍発生が抑制される[31]。その他の SIRT6 の機能には、テロメアの維持[32][33]、DNA 二重鎖切断修復[34][35][36]、L1 レトロトランスポゾンの抑制[37]などがあり、SIRT6 はがんの治療標的として有望である。

現在の所、SIRT6 と子宮体癌との関連は明らかでない。SIRT6 は IGF1R-AKT-mTOR 経路を抑制し、心不全に対し保護的に働くことが知られている[38]。子宮体癌では PI3K-mTOR 経路が高頻度で活性化されており[5][6]、SIRT6 は同経路を負に制御し子宮体癌の進展を抑制する可能性がある。

## 5. サバイビンと子宮体癌

サバイビンは inhibitors of apoptosis proteins (IAP) ファミリーに属する[39]。サバイビンは、Caspase 9 の直接的な不活化や X-linked IAP の安定化を通してアポトーシスを抑制する[40][41]。Ishikawa 子宮体癌細胞株において、siRNA によるサバイビンの抑制がアポトーシスを誘導することが報告されている[42]。従って、子宮体癌に対し、サバイビンの阻害は有効な治療選択肢となり得る。

種々のサバイビン阻害薬の中で、YM155 は最も有望な薬剤である。YM155 は、サバイビンプロモーターのルシフェラーゼアッセイを用いたスクリーニングでサバイビン阻害薬として同定された[43]。YM155 は様々ながん細胞株の増殖を抑制する[44]。また、悪性黒色腫、前立腺癌、非ホジキンリンパ腫で第2相試験が施行されている[45][46][47]。しかし、子宮体癌に対する YM155 の有効性は明らかでない。

## 6. 本研究の目的

本論文の研究目的は以下の3点である。

**【1】** 子宮体癌細胞株に対するクロロキンの抗腫瘍効果を評価し、オートファジー阻害との関連性を検討する。シスプラチン耐性とオートファジー誘導の関係を評価し、クロロキンがシスプラチン耐性を克服するか検討する。

**【2】** 子宮体癌臨床検体と細胞株において SIRT6 の発現を評価し、細胞株を用いて SIRT6 の機能を解析する。

**【3】** 子宮体癌細胞株に対する YM155 の抗腫瘍効果を評価する。

## 方法

### 1 薬剤と抗体

クロロキン (以下 CQ) とシスプラチンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から、サバイビン阻害薬 YM155 は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。一次抗体はマウスモノクローナル抗体の抗 p62/SQSTM1 抗体 (M162-3)、抗 LC3 抗体 (M152-3) (共に MBL, Nagoya, Japan)、抗 p53 抗体 (DO-1)、抗 Bcl-2 抗体 (100) (共に Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、抗  $\beta$ actin 抗体 (A2228) (Sigma-Aldrich)、ラビットモノクローナル抗体の抗 LC3B 抗体 (3868S)、抗 ATG5 抗体 (8540P)、抗 ATG7 抗体 (2631P)、抗 cleaved caspase3 抗体 (9664P)、抗 SIRT6 抗体 (2590)、抗 cleaved PARP 抗体 (9544)、抗 phospho-Akt (p-AKT Ser473 ) 抗体 (9271)、抗 phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (pERK) 抗体 (9101) (全て Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、抗サバイビン抗体 (NB500-201, Novus Biologicals)、ラビットポリクローナル抗体の抗 Bax 抗体 (P-19, Novus Biologicals) を使用した。二次抗体の Alexa Fluor 488 Goat anti-Mouse IgG

は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から購入した。

## 2 細胞培養

子宮体癌細胞株 16 株を実験に使用した。Ishikawa と HHUA 株は独立行政法人霞ヶ浦医療センターの西田正人先生に供与頂き、AN3CA (HTB-111)、KLE (CRL-1622) と RL95-2 (CRL-1671) 株は American Type Culture Collection から購入し、HEC-1B、HEC-6、HEC-50B、HEC-59、HEC-88、HEC-108、HEC-116、HEC-151、HEC-180、HEC-251 と HEC-256 株は共同研究者の蔵本博行先生により樹立された[48]。また、コントロールとして金沢大学の京哲先生から供与頂いた子宮内膜上皮不死化細胞 (以下 EIC) を使用した[49]。各々、10%FBS (Invitrogen) 添加 DMEM または MEM 溶液 (Sigma-Aldrich) を培地とし、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。AN3CA、KLE と Ishikawa 株は機能喪失型 p53 変異株 (AN3CA: R213Q; Ishikawa: M246V; KLE: R175H) で、HEC-6、HEC-108 と HEC-151 株は野生型 p53 株である[50]。



### 3 シスプラチン耐性 Ishikawa 子宮体癌細胞株 (以下 CP-r) の樹立

Ishikawa 子宮体癌細胞株をシスプラチン添加 DMEM 溶液で 12 週間培養した。

シスプラチン濃度は継代時に 1.0  $\mu\text{g/ml}$  まで徐々に上昇させた。4 週間 1.0  $\mu\text{g/ml}$  で培養後、シスプラチン非添加培地で更に 4 週以上培養し、MTT アッセイでシスプラチンへの感受性を評価した。シスプラチン非添加培地で 4 週間培養時と 12 週間培養時に施行した MTT アッセイでは、シスプラチンへの感受性は不変でシスプラチン耐性の獲得を確認した。

### 4 MTT アッセイ

子宮体癌細胞株を 96well プレートに 2,000 細胞/well で撒き、種々の濃度の CQ (0.05 – 100  $\mu\text{M}$ )、シスプラチン (0.05 – 100  $\mu\text{M}$ ) と YM155 (6.25 – 10,000 nM) を添加した培地で 72 時間培養した。培養後、10  $\mu\text{l}$  のテトラゾリウム塩 WST-8 (Cell Counting Kit-8: Dojindo, Tokyo, Japan) を各々の well に添加し、450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Biotek) で測定し細胞生存率を評価した。細胞生

存率はCQ、シスプラチンと YM155 でそれぞれ蒸留水 (CQ の溶媒) と DMSO (シスプラチンと YM155 の溶媒) 添加群を 100%とし、吸光度を相対比較し標準化した。トランスフェクションまたは遺伝子サイレンシング同時施行時は、プラズミドまたは small interfering RNA (siRNA) を添加し、24 時間後に種々の濃度の薬剤を添加した培地に交換後、更に 48 時間培養し、測定を施行した。同実験を 4 回施行し、結果を解析した。

## 5 コロニー形成アッセイ

Ishikawa、AN3CA と KLE 株を 6well プレートに 1000 細胞/well で撒き、24 時間培養後、CQ を 0.2 – 100  $\mu$ M で添加し、更に 14 日間培養した。薬剤を添加した培地は 3 日おきに交換した。培養後、細胞をメタノールで固定し、ギムザ染色 (Wako, Japan) を施行し、コロニー数を目視で測定し、薬剤非添加培地のコロニー数に対する相対値を算出した。同実験を 3 回施行し、結果を解析した。

## 6 トランスフェクションと遺伝子サイレンシング

AN3CA と KLE 株を 24 時間培養後、Addgene (Cambridge, MA, UK) から購入した Flag タグ付き野生型 *SIRT6* プラスミドを、Effectene transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA) を使用し、形質転換した。ネガティブコントロールは、pcDNA3.0 (Invitrogen) を使用した。

Ishikawa 株を DMEM 溶液で 24 時間培養後、培地を交換し、*ATG5* と *ATG7* の small interfering RNA (siRNA) を 25 nM で添加した。AN3CA と KLE 株と EIC を 24 時間培養後、*SIRT6* とサバイビンに対する siRNA を 25 nM で添加した。siRNA 添加後、更に 72 時間培養した。siRNA は Stealth RNAi siRNA kit (Invitrogen) を使用し、試薬は Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen) を推奨濃度で添加した。ネガティブコントロール (以下 siCT または siNC) には、Stealth RNAi siRNA Negative Control Kit (Invitrogen) を使用した。

## 7 生存細胞数計測 (Trypan blue dye exclusion)

AN3CA と KLE 株を 6well プレートに  $3 \times 10^5$  細胞/well ずつ、プラスミドまたは siRNA を Lipofectamine2000 (Invitrogen) 推奨のリバーストランスフェクションプロトコールで形質転換させた。24 時間と 48 時間培養後に、細胞をトリプシンで回収した。トリパンブルー染色施行後、光学顕微鏡下で生存細胞数を計測した。同実験を 3 回施行し、結果を解析した。

## 8 ウェスタンブロット法

細胞培養後、lysis buffer (Sigma-Aldrich) を用いてタンパクを回収した。タンパク濃度は Bradford assay (BioRad, CA, USA) で測定した。SDS-PAGE 法で泳動し、Immobilon トランスファーメンブレン (Millipore, MA, USA) に転写した。スキムミルク (Wako, Japan) でブロッキング後、一次抗体を一晩、二次抗体を 1 時間添加した。タンパク発現は ECL select Western Blotting detection reagent (GE Healthcare Life Science, NJ, USA) を使用し検出した。コントロールには  $\beta$  actin を使用した。一部の結果は ImageJ を用いてタンパク発現を定量化した。

## 9 フローサイトメトリー（細胞周期・アポトーシス解析）

Ishikawa、AN3CA と KLE 株を 6 cm dish に  $5 \times 10^5$  細胞/well で撒き、薬剤を添加し 48 時間培養した。浮遊細胞とトリプシンで剥がした付着細胞を共に回収し、洗浄後、エタノールで固定し、propidium iodide (PI; 50  $\mu\text{g/ml}$ ; Sigma-Aldrich) を添加し 4 度の暗所で 30 分静置した。フローサイトメーター (BD FACS Calibur HG; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) を用いて、蛍光を検出し、細胞周期分布図は CELL Quest pro software v.3.1. (Beckman Coulter Epics XL, Brea, CA) を用いて作成した。同実験を 3 回施行し、結果を解析した。

アポトーシスはアネキシン V-PI 二重染色を施行し検出した。Ishikawa、AN3CA と KLE 株を 6cm dish に  $5 \times 10^5$  細胞/well で撒き、DMEM 溶液で 24 時間培養後、薬剤を添加し更に 24 から 48 時間培養した。細胞周期解析と同様に細胞を回収、洗浄し、fluorescein isothiocyanate (FITC) 結合アネキシンと PI を推奨濃度で染色した (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I ; BD Biosciences)。フローサイトメーターを用いて、アネキシン V と PI 染色が共陽性の分面の割合を算出し、

アポトーシスを起こした細胞の割合を決定した。同実験を 3 回施行し、結果を解析した。

## 10 細胞蛍光免疫染色

細胞内のオートファジーの動態を明らかにするため、オートファゴソームのマーカーである LC3 の細胞免疫染色を施行した。Ishikawa 株を 0.1% ゼラチン PBS でコートしたカバーグラスが入った 6well プレートに疎らに撒き、DMEM 溶液で 24 時間培養後、薬剤を添加し、更に 48 時間培養した。4%パラフォルムアルデヒドで固定を行い、0.2%トライトン X-100 で処理後、6% bovine serum albumin (BSA) でブロッキングした。一次抗体は、抗 LC3 抗体 (M152-3) (MBL) を使用し 200 倍に希釈し 4 度で一晩静置した。二次抗体は、Alexa Fluor 488 Goat anti-Mouse IgG (Invitrogen) を使用し 100 倍に希釈し室温で 1 時間静置した。Hoechst33342 で核染色施行し、スライドは共焦点顕微鏡 (BX50; Olympus, Japan) を用いて観察を行った。

## 11 免疫組織化学 (組織マイクロアレイ)

東京大学医学部附属病院にて初回治療が行われた子宮体癌 104 例の手術時採取の腫瘍サンプルを使用した。腫瘍サンプルはいずれも凍結保存しており、研究目的の使用を説明し文書にて同意を得ている。さらに研究で使用するにあたり、東京大学医学部の倫理委員会で承認を得た（申請番号 683）。腫瘍サンプルから組織マイクロアレイを作成し、SIRT6 発現を免疫組織染色で評価した。抗 SIRT6 抗体 (NB100-2522, Novus Biologicals) を使用し、核内の SIRT6 発現を二人の検者が Allred score（表 1）を用いて得点化し、平均値を算出した。平均値が 5 点以下を SIRT6 低発現群、5 点より上を SIRT6 高発現群とし、GraphPad Prism 6 software (GraphPad, San Diego, CA) を用いて、全生存率（以下 OS）のカプラン-マイヤー曲線を描出した。

Allred score = A+B						
A	0	1	2	3	4	5
割合	none	<1/100	=1/100 to <1/10	=1/10 to <1/3	=1/3-2/3	=>2/3
B	0	1	2	3		
強度	none	weak	intermediate	strong		

(表 1) Allred score; 染色性を割合と強度に分けて判定し合計で評価する。

## 12 ルシフェラーゼレポーターアッセイ

サバイビンタンパクの転写を観察するため、サバイビンプロモーターのルシフェラーゼアッセイを施行した。AN3CA 株への Flag タグ付き野生型 SIRT6 プラスミド、pcDNA3.0 (ネガティブコントロール) の導入時にレポーターとして National Institute of Health (Bethesda, MD, USA) の Chu-Xia Deng 先生から供与頂いたサバイビンプロモーターを上流に配置したルシフェラーゼプラスミドの pSRVN-Luc [51] を 0.25  $\mu$ g、コントロールとして phRL CMV-Renilla vector (Promega, WI, USA) を 0.01 ng、Effectene transfection reagent を使用し同時に導入し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定を行った。同実験を 3 回施行し、結果の解析を行った。



### 13 RNA 抽出と定量的リアルタイム PCR

AN3CA 株を 24 時間培養後、Flag タグ付き野生型 SIRT6 プラスミド、pcDNA3.0 (ネガティブコントロール) を各々導入し、48 時間後に細胞を回収した。Total RNA を RNeasy Min Kit (Qiagen) を用いて抽出し、ReverTra Ace  $\alpha$  (TOYOBO, Osaka, Japan) で total RNA から cDNA を合成した。ABI7300 (Applied Biosystems, San Mateo, CA, USA) を用いて、96well プレート上で SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を添加しリアルタイム PCR を施行した。プライマーの配列を表 2 に示す。各々の標本のサイクル数の閾値 (Ct) は同一標本を 3 重に測定し決定した。サバイビンの Ct 値は GAPDH に対する相対値を算出した。同実験を 3 回施行し、結果を解析した。

BIRC5(サバイビン)	forward	TGCTTCAAGGAGCTGGAAGG
	reverse	AGAAGCACCTCTGGTGCCAC
GAPDH	forward	TGCACCACCAACTGCTTAGC
	reverse	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

(表 2) プライマー配列; BIRC5 (サバイビン) と GAPDH 各々のプライマー配列を示す。

## 14 統計解析

統計解析のため全ての実験は 3 回以上反復し、データは平均値±標準誤差で示した。GraphPad Prism 6 software (GraphPad, San Diego, CA) を用いて、全生存率の有意差は log-rank test で、3 標本間以上の有意差は One-way analysis of variance (ANOVA) と post-hoc test で解析した。P<0.05 を統計学的有意差ありとした。

## 結果

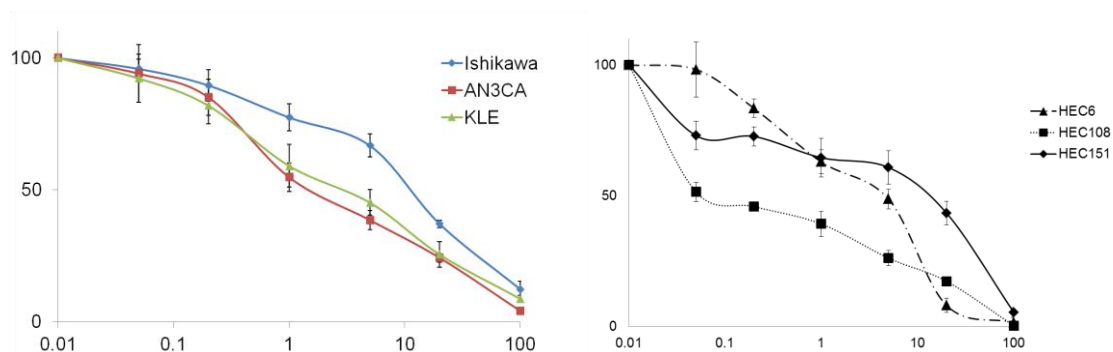
### 【1】 子宮体癌細胞株に対するクロロキンの抗腫瘍効果の検討

#### 1-1 クロロキンによる細胞増殖抑制

CQ による細胞増殖抑制効果を評価するため、MTT アッセイを施行した。機能喪失型 p53 変異株 (図 3 左)、野生型 p53 株 (図 3 右) 共に、濃度依存性に細胞増殖を抑制した。50%増殖阻止濃度(IC<sub>50</sub>)は Ishikawa、AN3CA、KLE 株で各々 12、1.5、3  $\mu$ M であった。長期の細胞増殖抑制効果を評価するために Ishikawa、AN3CA と KLE 株でコロニー形成アッセイを施行した。コロニー形成アッセイでも MTT アッセイと同様、濃度依存性にコロニー形成が有意に抑制された (図 4)。CQ による細胞増殖抑制が細胞周期停止か、または細胞死が原因か確かめるため、CQ を 5、20  $\mu$ M 添加し、細胞周期解析を施行したところ、Ishikawa、AN3CA と KLE 株全てで有意に subG1 の増加を認めた (図 5)。ウエスタンブロット法でも、CQ 濃度依存性の cleaved caspase-3 の集積を認め (図 6)、フローサイトメトリーでアポトーシスを解析すると、CQ 濃度依存性にアポトーシスが誘導される

傾向にあった (図 7)。以上から CQ は子宮体癌細胞株にアポトーシスを誘導し

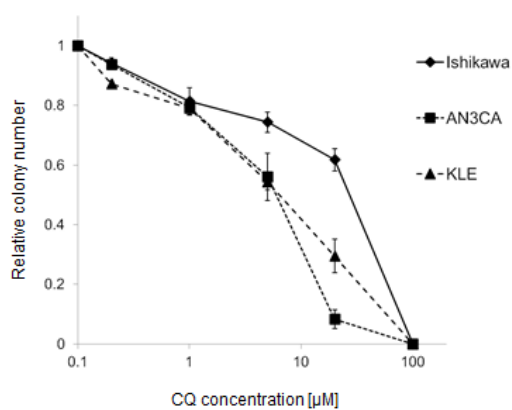
細胞増殖を抑制する可能性が示唆された。



(図 3) MTT アッセイの結果。縦軸に細胞生存率、横軸に CQ 濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を示す。全ての

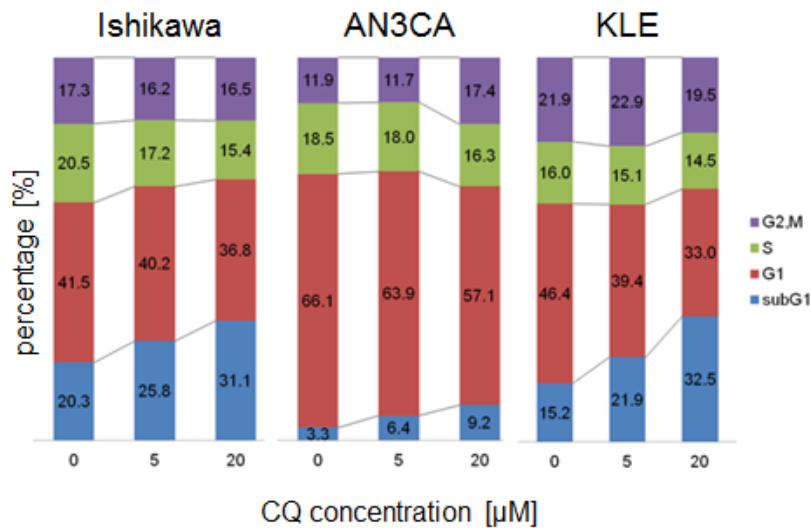
子宮体癌細胞株で濃度依存性に細胞増殖が抑制された。同実験を 4 回反復し、データは平

均値  $\pm$  標準誤差で示した。



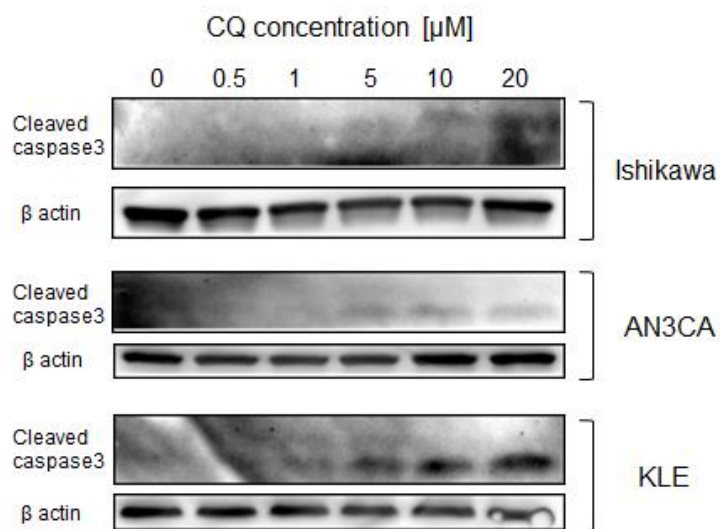
(図 4) コロニー形成アッセイの結果。全ての子宮体癌細胞株で濃度依存性に細胞増殖が抑

制された。同実験を 3 回反復し、データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。



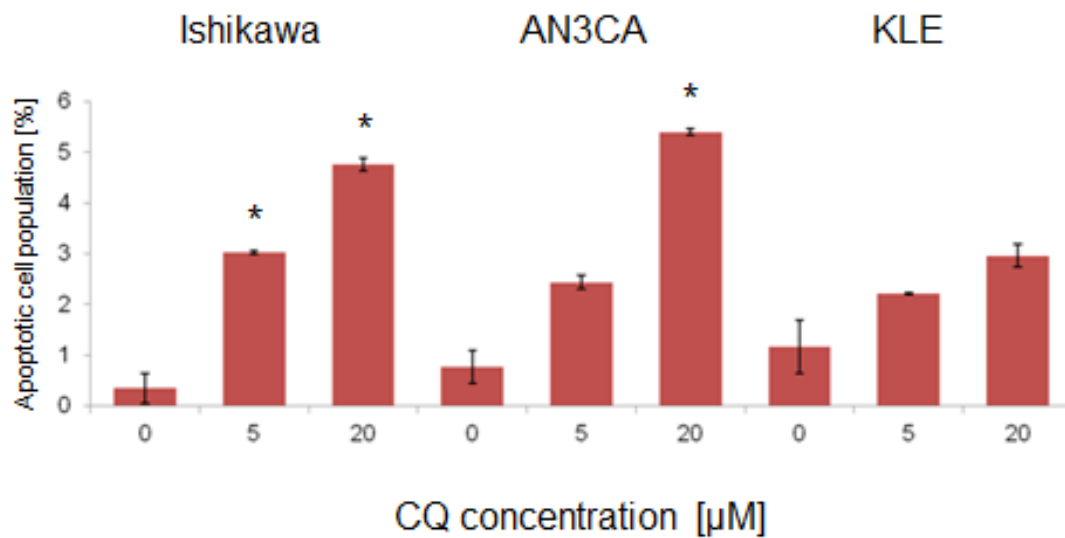
(図 5) 細胞周期解析の結果。全ての子宮体癌細胞株で濃度依存性に subG1 の増加を認め

た。同実験を 3 回反復し、データは平均値で示した。



(図 6) ウェスタンブロット法の結果。全ての子宮体癌細胞株で濃度依存性に cleaved

caspase-3 の集積を認めた。

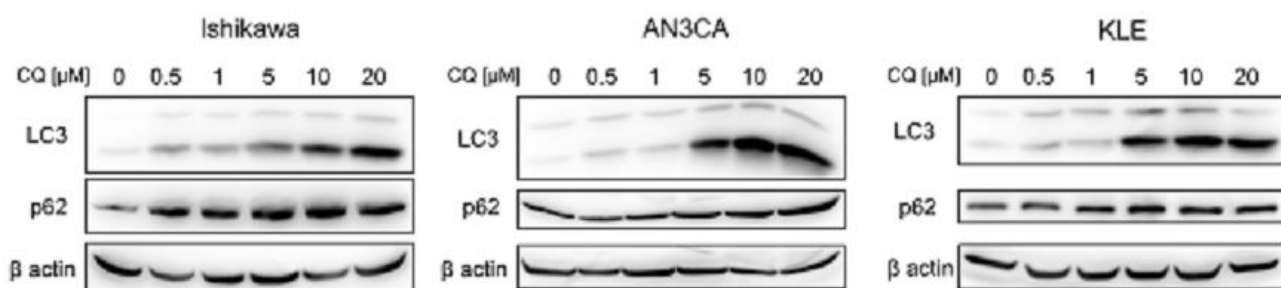


(図 7) アネキシン V-PI 二重染色によるアポトーシス検出の結果。Ishikawa、AN3CA 株では有意な、KLE 株でも濃度依存性にアポトーシスが誘導される傾向にあった。同実験を 3 回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。\*P<0.05。

### 1-2 クロロキンによるオートファジー阻害

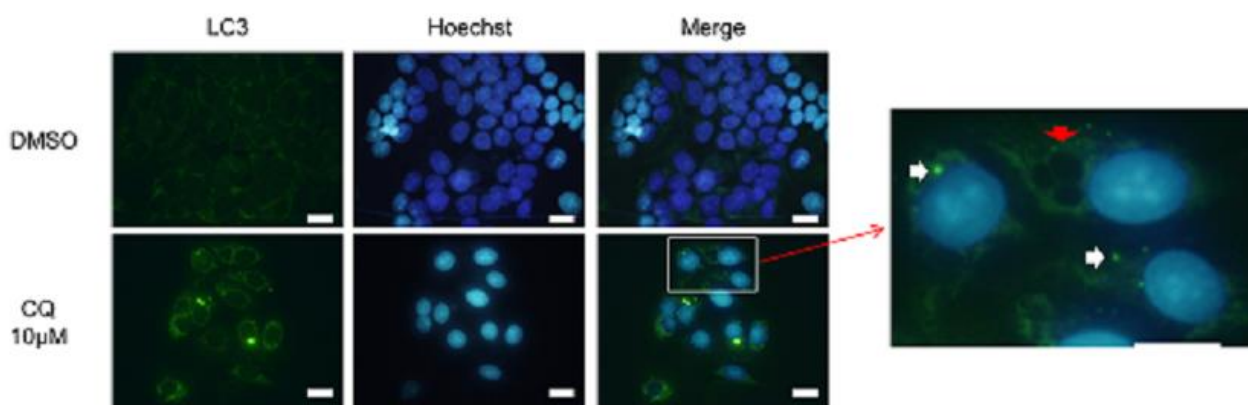
CQ による子宮体癌細胞株に対するオートファジー阻害を評価するため、抗 LC3B 抗体を用いて、ウエスタンブロット法と細胞免疫染色を施行した。Ishikawa、

AN3CA と KLE 株で、CQ により濃度依存性に LC3-II と p62 の蓄積を認め (図 8)、CQ が子宮体癌細胞株でもリソソームへの結合阻止を介してオートファジーを阻害する結果、オートファゴソームが蓄積することが示された。Ishikawa 株の細胞免疫染色でも、10  $\mu$ M の CQ への曝露でオートファゴソームの蓄積を認めた (図 9)。



(図 8) ウェスタンブロット法の結果。全ての子宮体癌細胞株で濃度依存性の LC3-II と p62

の蓄積を認めた。



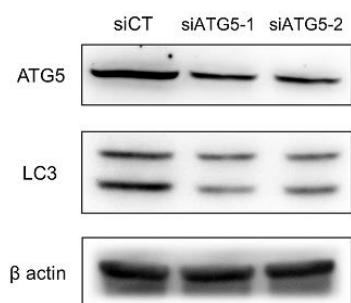
(図 9) 細胞免疫染色の結果。Ishikawa 株に 10  $\mu$ M の CQ を添加すると、オートファゴソーム (白矢印) の蓄積と、細胞内空胞の形成 (赤矢印) を認めた。スケール=20  $\mu$ m

### 1-3 クロロキンによる増殖抑制とオートファジー阻害との関連性

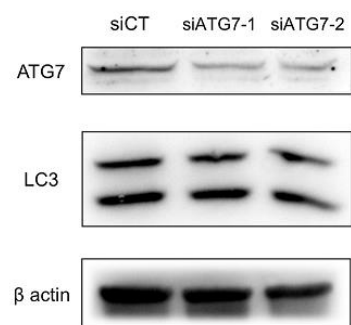
CQ による増殖抑制がオートファジー阻害と関連があるか調べるため、Ishikawa 株でオートファジー関連遺伝子 *ATG5* と *ATG7* の遺伝子サイレンシングを、各々2種類の siRNA を用いて施行した。*ATG5* と *ATG7* 共に、コントロール (siCT) と比較し2種類の siRNA でタンパク発現低下を認め、同時に LC3-II 発現も抑制され (図 10)、*ATG5* と *ATG7* のノックダウンでオートファジーが抑制されることが示された。MTT アッセイで *ATG5* と *ATG7* の遺伝子サイレンシングが細胞増殖に与える影響を評価したところ、*ATG5* と *ATG7* のノックダウンで細胞増殖が抑制される傾向にあり (図 11 左)、オートファジーが細胞増殖を正に制御することが示唆された。次に、*ATG5* と *ATG7* の遺伝子サイレンシングを併用し、CQ の MTT アッセイを施行した。*ATG5* と *ATG7* のノックダウンで CQ へ



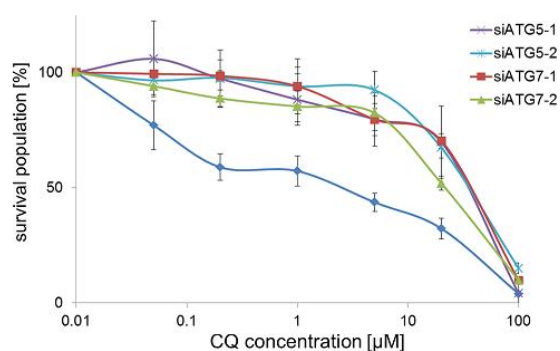
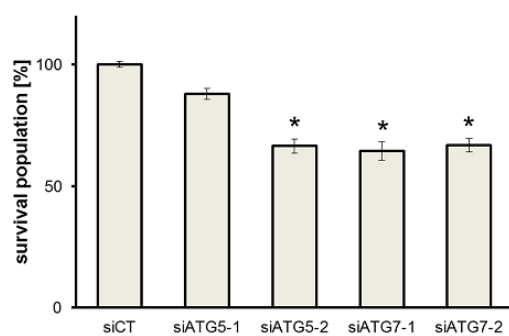
の感受性が低下し (図 11 右)、CQ の子宮体癌細胞株の増殖抑制効果がオートファジー阻害依存性であることが示された。



(図 10) ウェスタンブロット法の結果。ATG5



と ATG7 共に、2 種類の siRNA でタンパク発現が低下し、LC3- II 発現も抑制された。



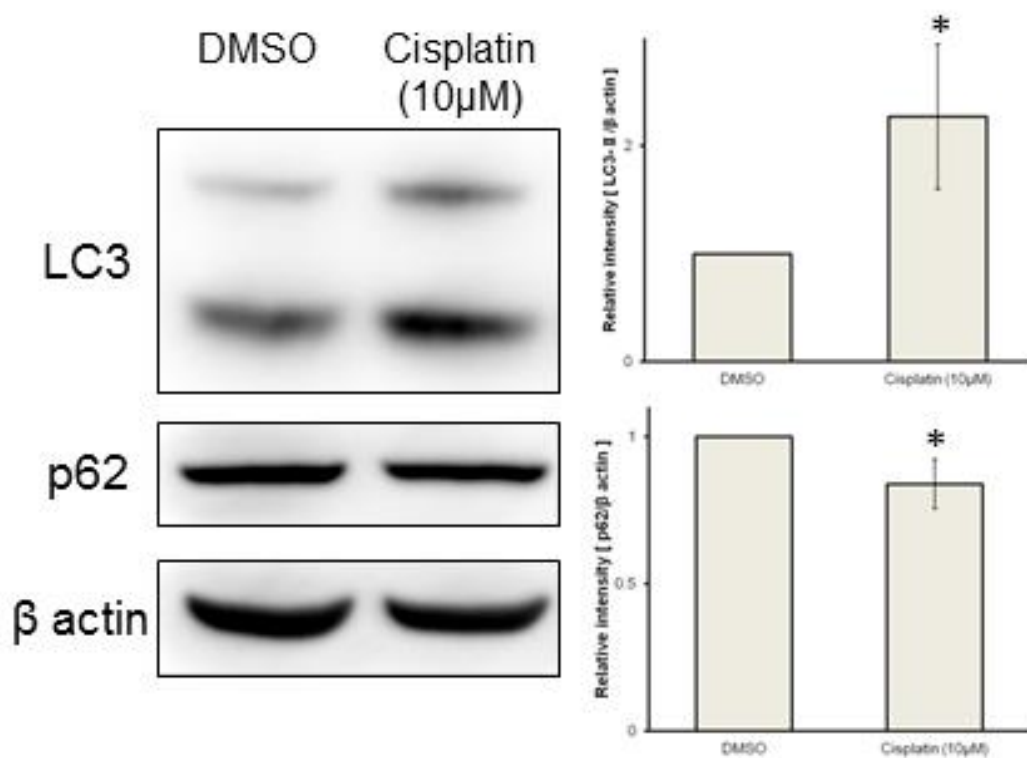
(図 11) MTT アッセイの結果。(左)ATG5 と ATG7 のノックダウンで細胞増殖が抑制され

る傾向にあった。(右)ATG5 と ATG7 のノックダウンで CQ への感受性低下を認めた。同実

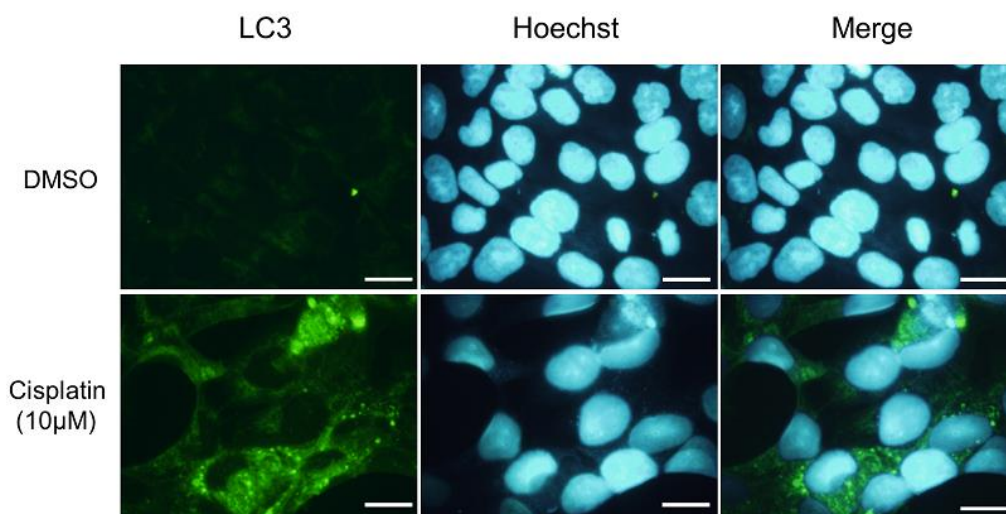
験を 4 回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。\*P<0.05。

#### 1-4 シスプラチン誘導オートファジーの腫瘍促進効果

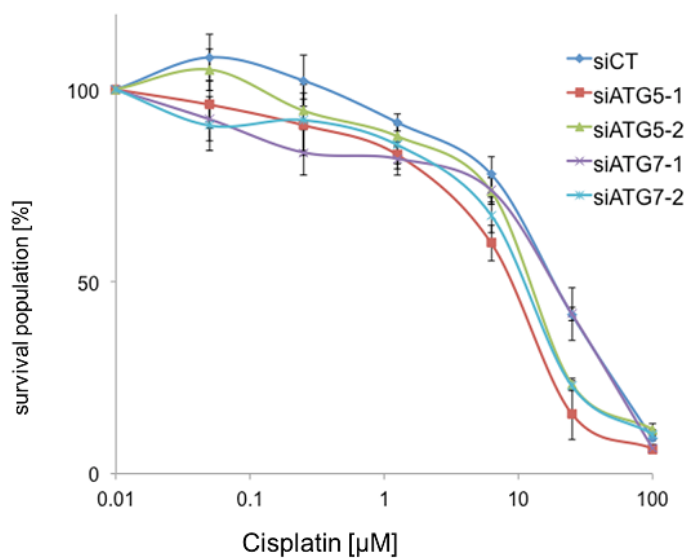
シスプラチンは様々ながん細胞でオートファジーを誘導することが知られており[15]、子宮体癌細胞株でもシスプラチンがオートファジーを誘導するか調べるために、Ishikawa 株に 10  $\mu$ M のシスプラチンを 48 時間添加すると、LC3-II の発現亢進と p62 の軽度発現低下を認めた (図 12)。細胞免疫染色でもオートファゴソームの蓄積を認め (図 13)、シスプラチンがオートファジーを誘導することが示された。次に、*ATG5* と *ATG7* の遺伝子サイレンシングを併用し、シスプラチンの MTT アッセイを施行した。*ATG5* と *ATG7* のノックダウンでシスプラチンへの感受性が亢進する傾向にあり (図 14)、シスプラチン誘導オートファジーが子宮体癌細胞株の増殖促進効果を持つ可能性が示唆された。



(図 12) ウェスタンブロット法の結果。(左)代表的な結果を示す。(右上)LC3-IIタンパク発現を、(右下)p62タンパク発現を定量化した結果を示す。シスプラチン添加でLC3-IIの蓄積とp62の軽度発現低下を認めた。同実験を3回反復し、データは平均値±標準偏差で示した。\*P<0.05。



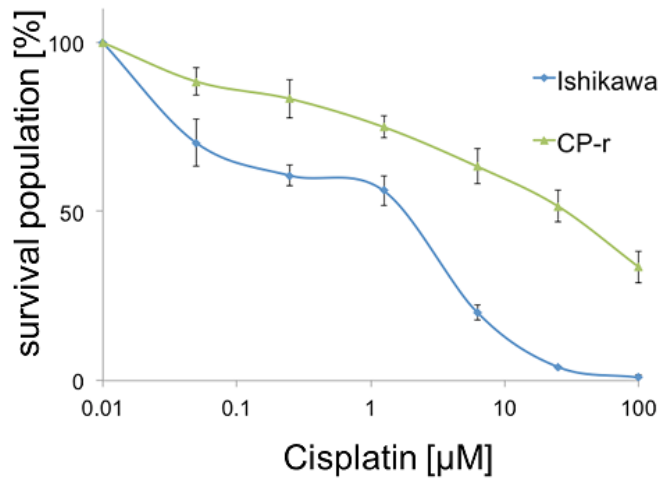
(図 13) 細胞免疫染色の結果。Ishikawa 株に 10  $\mu\text{M}$  のシスプラチンを添加すると、オートファゴソーム (左下図の点状集積) の蓄積を認めた。スケール=20  $\mu\text{m}$



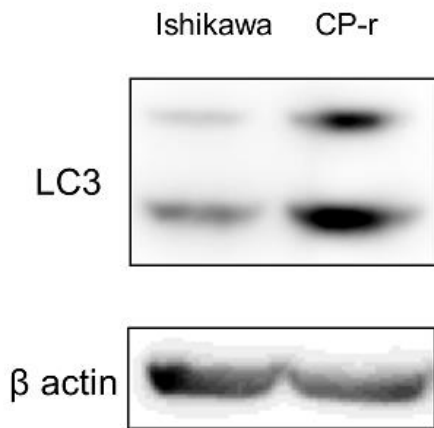
(図 14) MTT アッセイの結果。siATG5-1 では有意に、他の *ATG5* と *ATG7* のノックダウンでもシスプラチンへの感受性が亢進する傾向にあった。同実験を 4 回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。

## 1-5 クロロキンによるシスプラチン耐性の克服

シスプラチン耐性に対するオートファジーの関与を調べるため、シスプラチン耐性 Ishikawa 子宮体癌細胞株 (CP-r) を樹立した。MTT アッセイの  $IC_{50}$  は親株で  $1.5 \mu\text{M}$ 、CP-r で  $30 \mu\text{M}$  と顕著に後者で高値であった (図 15)。また、CP-r は親株と比較し LC3-II タンパク発現が高値であり (図 16)、CP-r でのオートファジー亢進が示された。MTT アッセイで、CQ への感受性は CP-r で親株より亢進していた (図 17)。次に、この 2 株で  $0.01-100 \mu\text{M}$  のシスプラチンに  $1 \mu\text{M}$  の CQ を併用し MTT を施行したところ、CP-r でのみ CQ 併用による相乗効果を認めた (図 18)。以上の結果から、CQ がシスプラチン耐性株にも有効で、併用によりシスプラチン抵抗性を部分的に克服しうる可能性が示唆された。

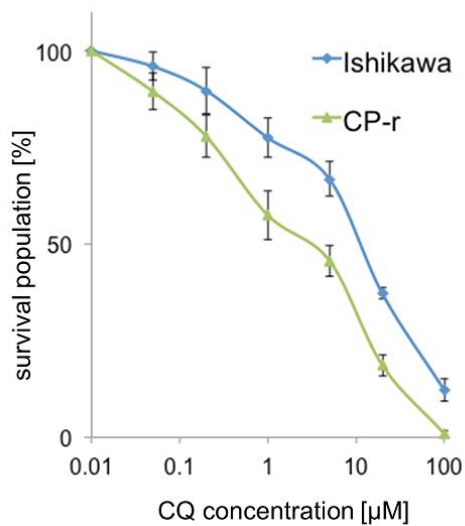


(図 15) MTT アッセイの結果。  
長期シスプラチン添加培養でシスプラチン耐性株 (CP-r) を樹立した。同実験を 4 回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。



(図 16) ウェスタンブロット法の結果。

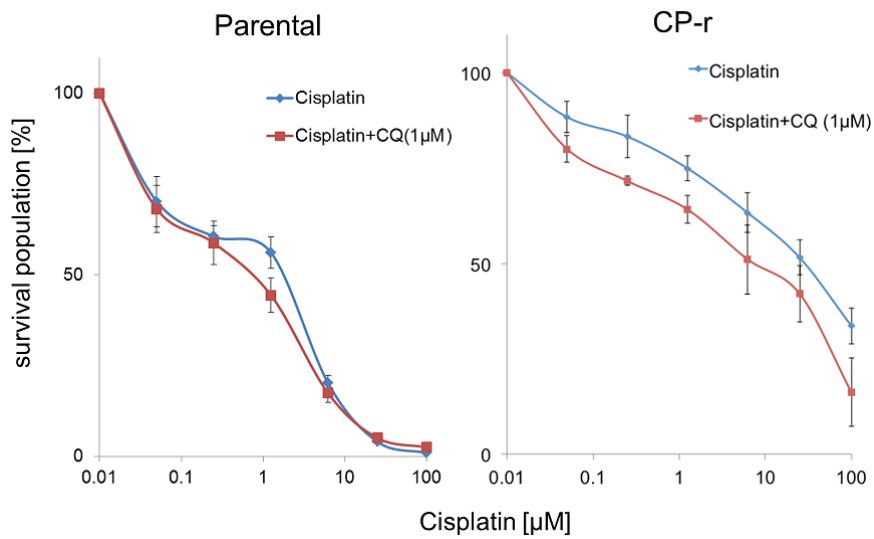
CP-r で LC3-II 発現亢進を認めた。



(図 17) MTT アッセイの結果。

CP-r で CQ への感受性が亢進していた。

同実験を 4 回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。



(図 18) CQ 併用によるシスプラチンの MTT アッセイの結果。CP-r でのみ CQ 併用によるシスプラチン感受性亢進を認めた。同実験を 4 回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。

## 【2】 子宮体癌における SIRT6 の機能解析

### 2-1 子宮体癌臨床検体と細胞株における SIRT6 発現

子宮体癌 104 例の患者背景を表 3 に記す。子宮体癌患者年齢の中央値は 55 歳 (範囲 ; 25~76 歳)、組織型は類内膜腺癌が 98 例 (94%)、腺扁平上皮癌が 5 例 (5%)、明細胞腺癌が 1 例 (1%) であった。類内膜腺癌の分化度は、高分化型 (Grade 1) が 68 例 (65%)、中分化型 (Grade2) が 20 例 (19%)、低分化型 (Grade3)

が 10 例 (10%) であった。症例の進行期は、Stage I が 65 例 (62%)、Stage II が 9 例 (9%)、Stage III が 25 例 (24%)、Stage IV が 5 例 (5%) であった。

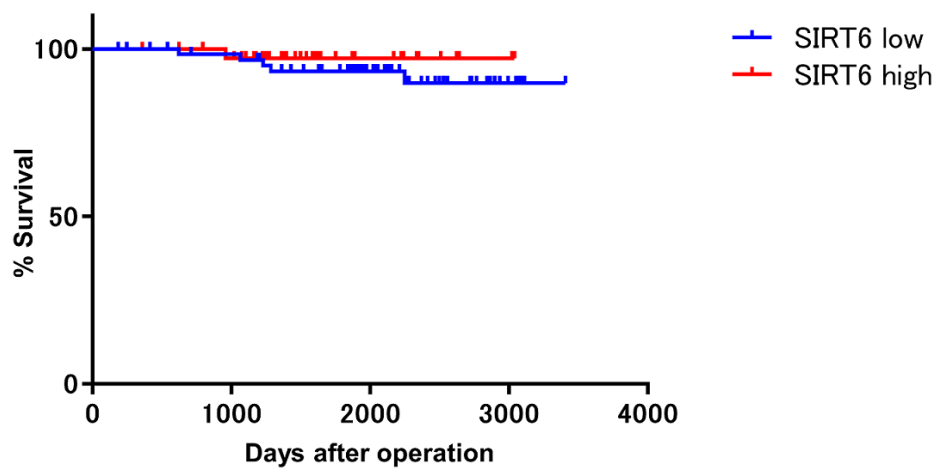
以上の 104 例で組織マイクロアレイを作成し、抗 SIRT6 抗体で免疫組織染色を施行した結果を図 19 に示す。核局在する SIRT6 の発現を Allred score で評価したところ、SIRT6 高発現群は低発現群と比較し、全生存率が高く、有意差はなかったが ( $p=0.18$ )、予後が良い傾向にあった。

次に子宮体癌 16 細胞株で SIRT6 タンパク発現をコントロールの子宮内膜上皮不死化細胞 (以下 EIC) と比較した (図 20)。子宮体癌 16 細胞株では EIC と比較し SIRT6 タンパク発現が軒並み低い傾向にあった。以上から SIRT6 発現低下が子宮体癌の発癌に関与する可能性が示唆された。

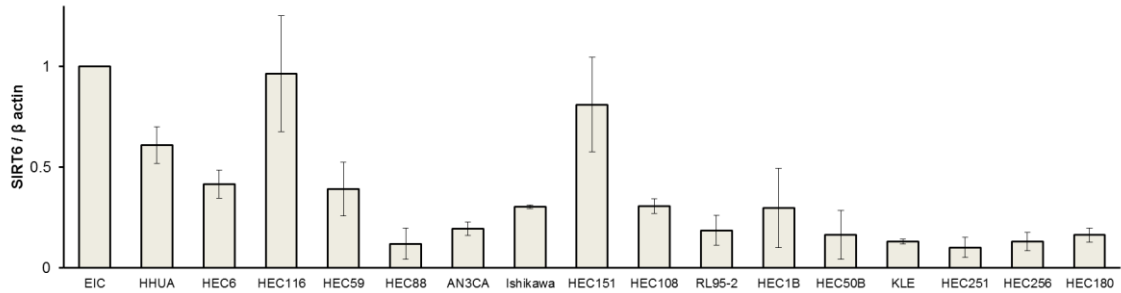
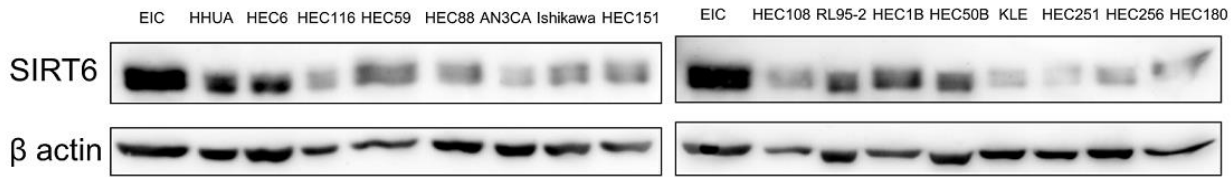


臨床病理学的背景(104例)			
項目		数	%
年齢	中央値	55	
組織型			
類内膜腺癌		98	94
高分化型(G1)		68	65
中分化型(G2)		20	19
低分化型(G3)		10	10
腺扁平上皮癌		5	5
明細胞腺癌		1	1
Stage	I	65	62
	II	9	9
	III	25	24
	IV	5	5

(表 3) 臨床病理学的背景



(図 19) 子宮体癌 104 例における SIRT6 発現解析



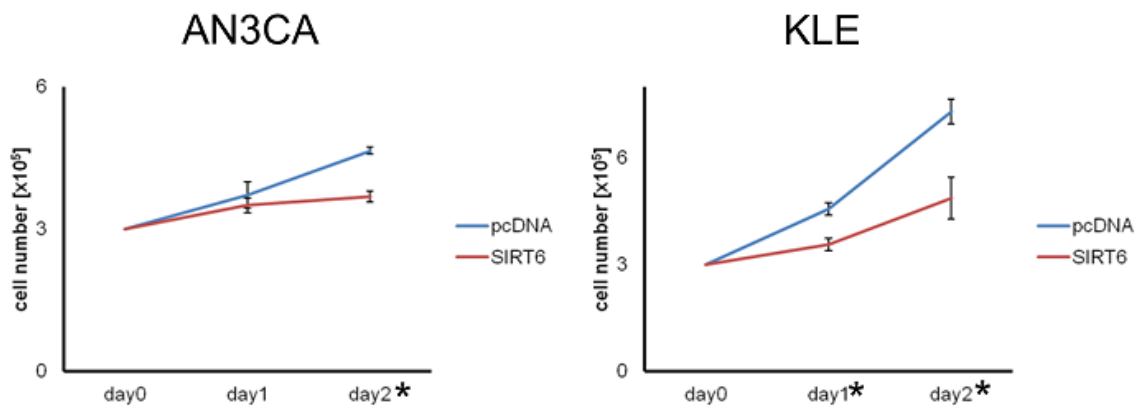
(図 20) 子宮体癌 16 細胞株と子宮内膜上皮不死化細胞のウェスタンブロット法の結果。(上)

代表的な結果を示す。(下)p62 タンパク発現を定量化した結果を示す。子宮体癌株では概ね SIRT6 タンパク発現が低い傾向にあった。同実験を 3 回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。

## 2-2 SIRT6 のアポトーシス誘導による細胞増殖抑制

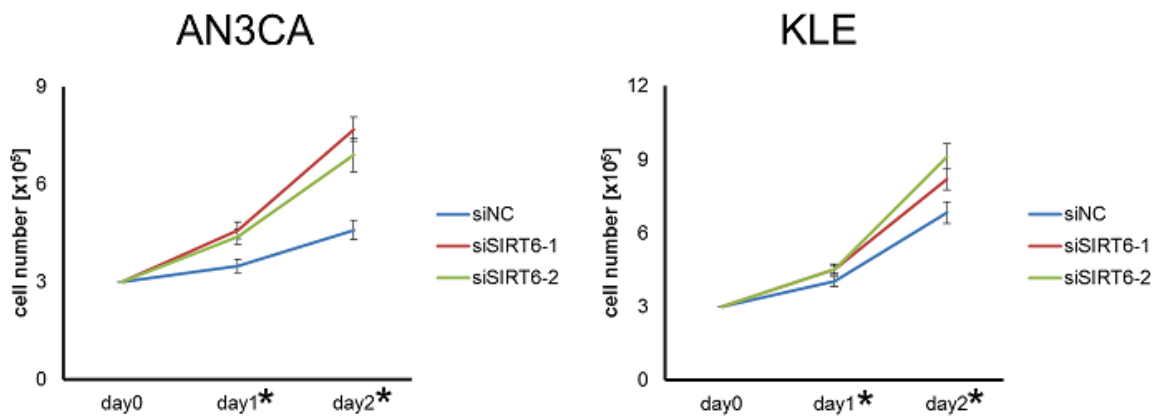
子宮体癌細胞株における SIRT6 の機能解析のため、比較的 SIRT6 低発現であった AN3CA、KLE の 2 株を使用し (図 20)、以後の実験を施行した。まず、SIRT6 過剰発現とノックダウンと同時に生存細胞数計測を施行した。SIRT6 過剰発現で

2株の細胞増殖は抑制された（図 21）。対照的に、SIRT6 ノックダウンで2株の細胞増殖は促進された（図 22）。SIRT6 による細胞増殖抑制が細胞死か細胞周期停止によるものか調べるため、SIRT6 を過剰発現し細胞周期解析を施行した。コントロールには EIC を使用した。SIRT6 過剰発現で、EIC は細胞周期の有意な変化を認めなかったが、AN3CA では有意に、KLE でも subG1 分画の増加傾向を認めた（図 23）。次に、SIRT6 を過剰発現しフローサイトメトリーでアポトーシスを解析すると、AN3CA、KLE の2株でのみ有意にアポトーシスが誘導された。以上から、SIRT6 は子宮体癌細胞株にアポトーシスを誘導し細胞増殖を抑制することが示された。



(図 21) SIRT6 過剰発現時の生存細胞数計測の結果。2 株共に、SIRT6 過剰発現で細胞増

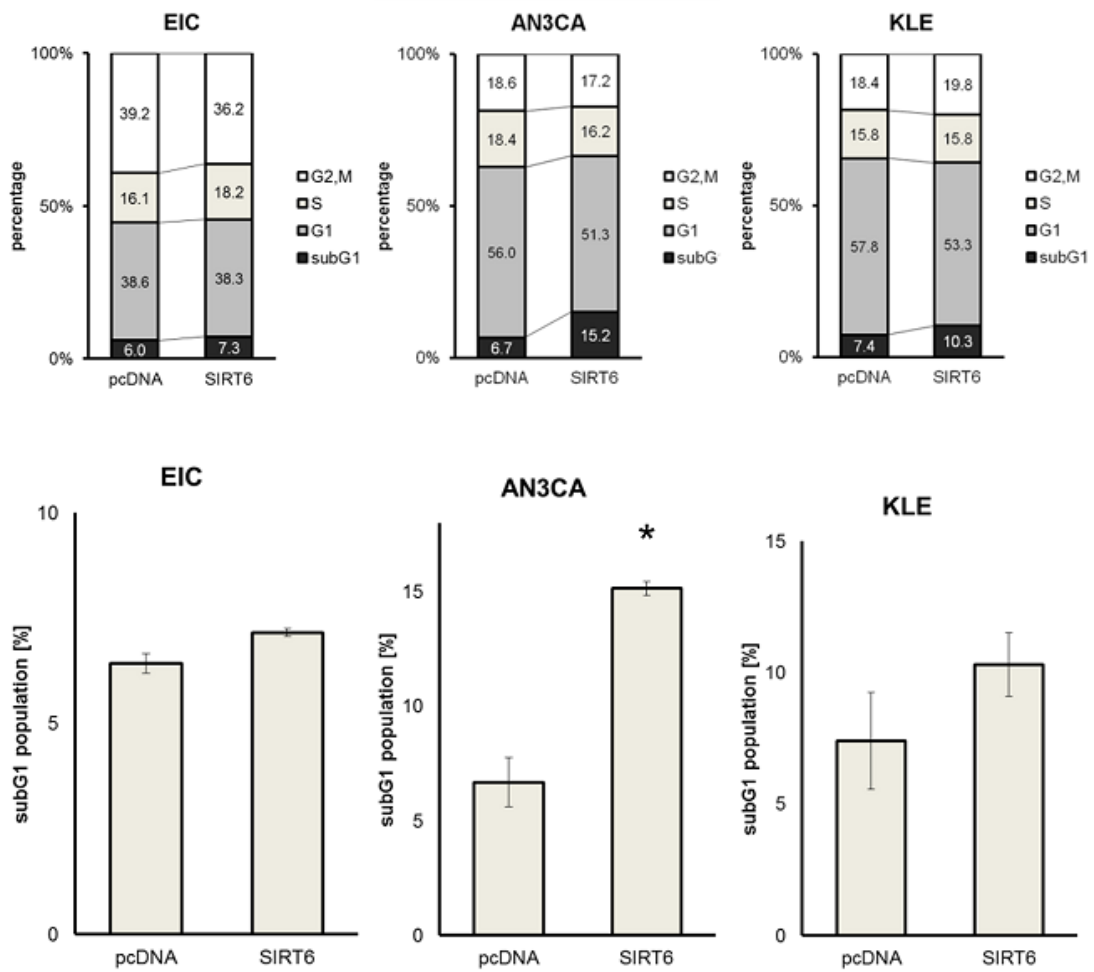
殖が抑制された。同実験を 3 回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。\*:  $p < 0.05$



(図 22) SIRT6 ノックダウン時の生存細胞数計測の結果。2 株共に、SIRT6 ノックダウン

で細胞増殖が亢進した。同実験を 3 回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。\*:  $p$

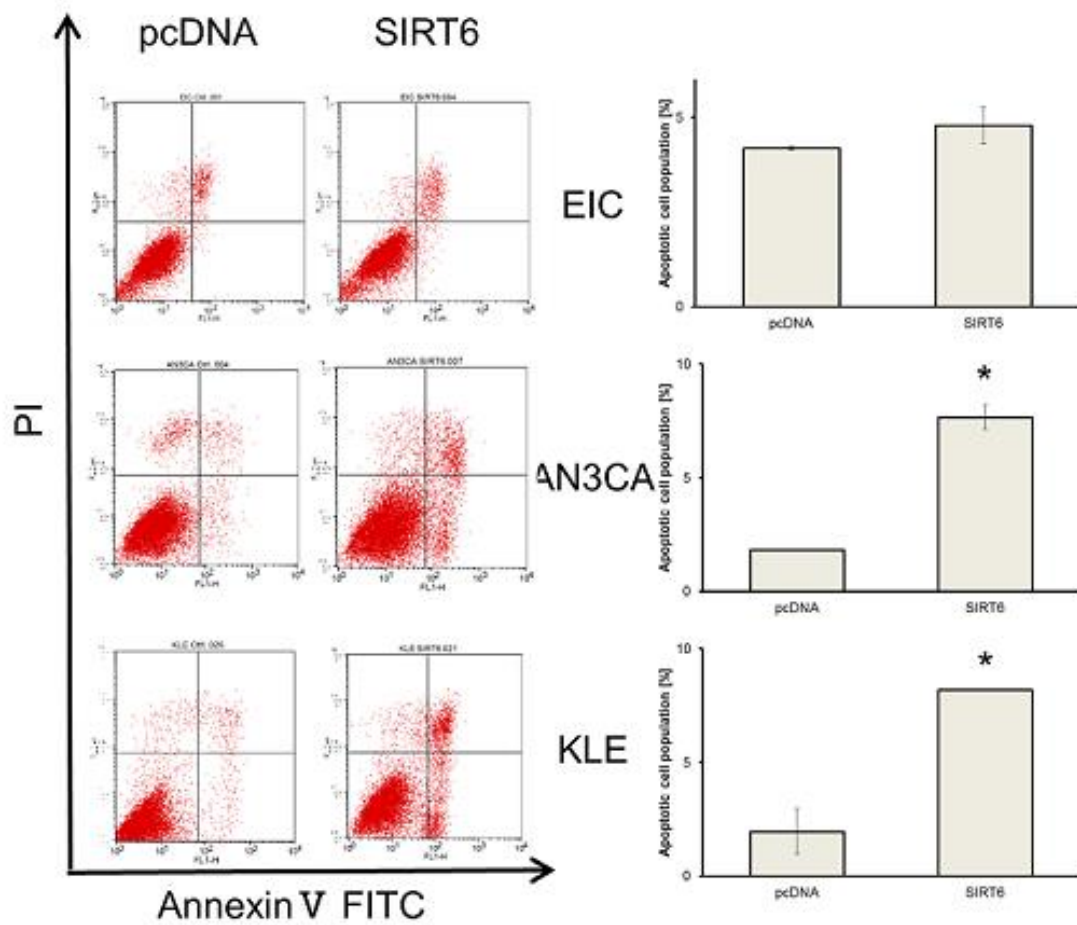
$< 0.05$



(図 23) SIRT6 過剰発現時の細胞周期解析の結果。変化の乏しい EIC と対照的に子宮体癌

2 細胞株では、SIRT6 過剰発現で AN3CA では有意に、KLE でも subG1 分画が増加する傾

向にあった。同実験を 3 回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。\*:  $p < 0.05$



(図 24) SIRT6 過剰発現時のアネキシン V-PI 二重染色によるアポトーシス検出の結果。

子宮体癌 2 細胞株でのみ、SIRT6 過剰発現で有意なアポトーシス誘導を認めた。同実験を

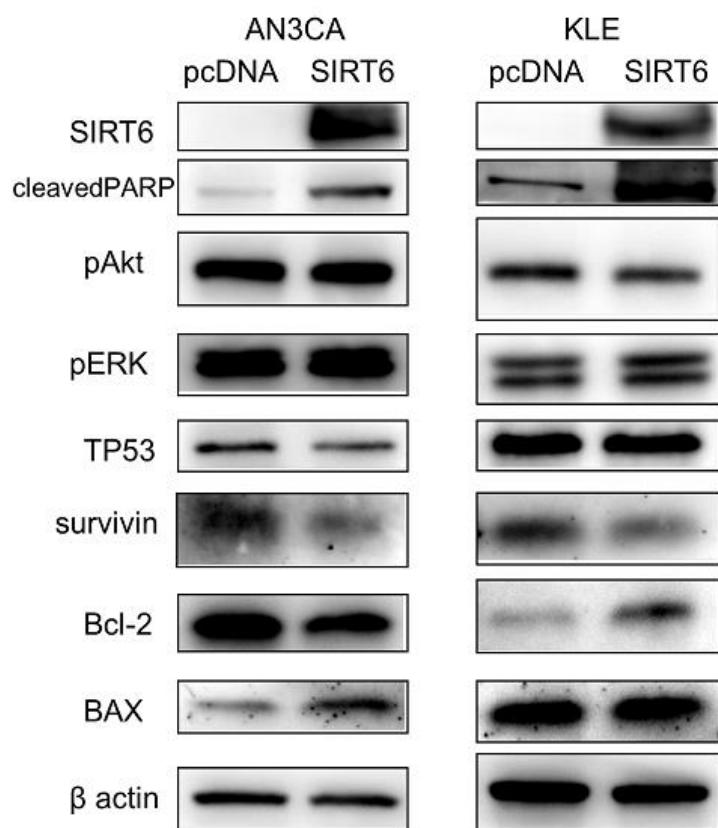
3 回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。\*:  $p < 0.05$

### 2-3 SIRT6 のアポトーシス誘導機序におけるサバイビン抑制

SIRT6 によるアポトーシス誘導機序を調べるため、AN3CA、KLE の 2 株でウ

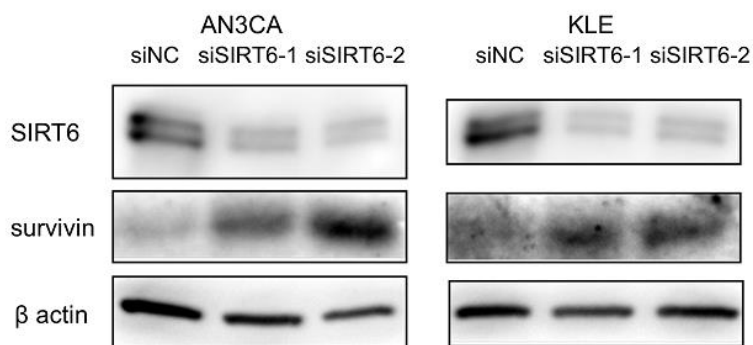
エスタンプロット法を施行した (図 25)。2 株共に SIRT6 過剰発現で cleaved PARP の蓄積を認め、アポトーシスの誘導を確認した。pAkt、pERK、p53、Bax と Bcl-2 発現には共通の傾向を認めなかったが、サバイビンの発現は 2 株共に抑制された。更に 2 株で SIRT6 ノックダウンを施行し、サバイビンタンパク発現を調べたところ、SIRT6 ノックダウンで逆にサバイビンの発現は 2 株共に亢進した (図 26)。次に、SIRT6 によるサバイビンタンパク発現抑制が転写抑制または転写後制御か調べるため、AN3CA 株を使用し、ルシフェラーゼレポーターアッセイでサバイビンのプロモーター転写活性を評価した。SIRT6 は pSRVN のルシフェラーゼ活性を有意に抑制した (図 27)。また、定量的リアルタイム PCR でも SIRT6 過剰発現で BIRC5 (サバイビン) mRNA 発現が抑制される傾向にあった (図 28)。

以上から、SIRT6 はサバイビンの転写を抑制しアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。



(図 25) SIRT6 過剰発現時のウエスタンブロット法の結果。2 株共に cleaved PARP の蓄

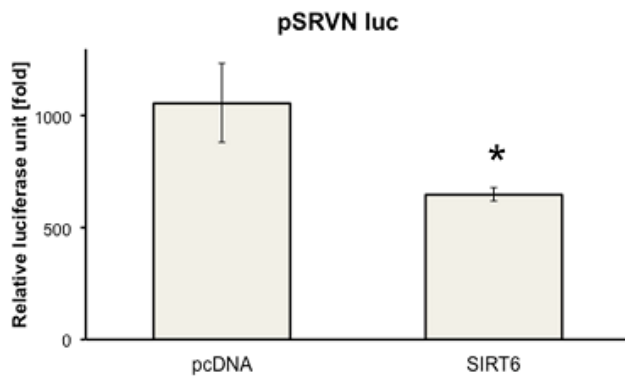
積を認め、アポトーシス誘導を確認した。サバイビン抑制が共通して観察された。



(図 26) SIRT6 ノックダウン時のウエスタンブロット法の結果。サバイビン発現亢進が共

通して観察された。

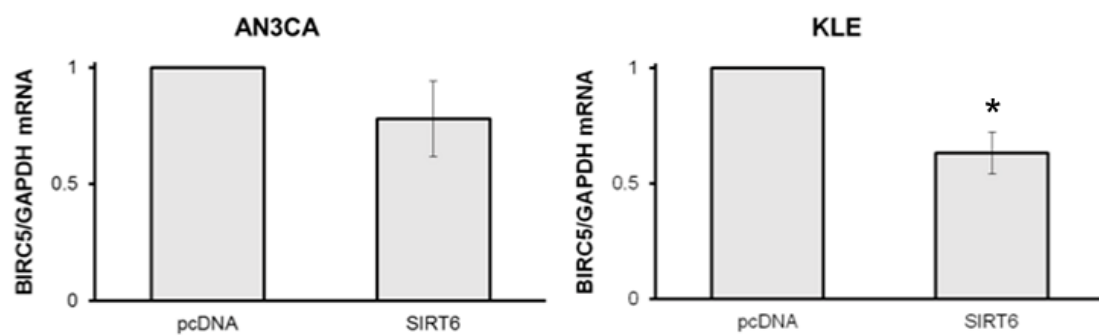




(図 27) pSRVN luc のルシフェラーゼレポーターアッセイの結果。SIRT6 はルシフェラー

ゼ活性を有意に抑制した。同実験を 3 回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。\*: p

<0.05



(図 28) SIRT6 過剰発現時のリアルタイム PCR の結果。SIRT6 はサバイビン mRNA を

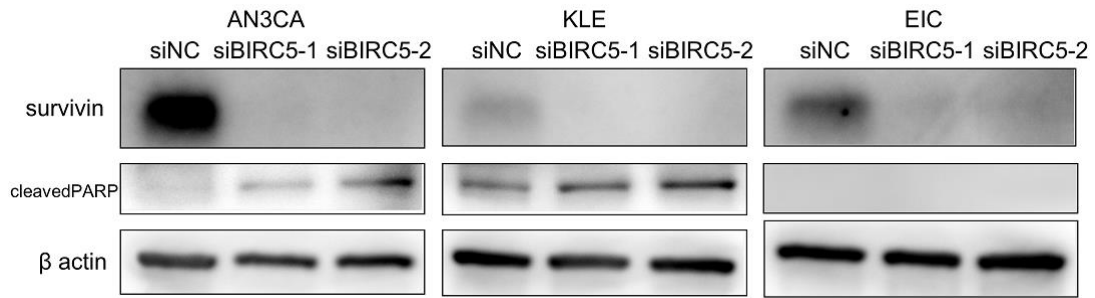
KLE では有意に、AN3CA でも抑制する傾向にあった。同実験を 3 回反復し、データは平

均値±標準誤差で示した。\*: p<0.05

### 【3】 子宮体癌細胞株に対する YM155 の抗腫瘍効果の検討

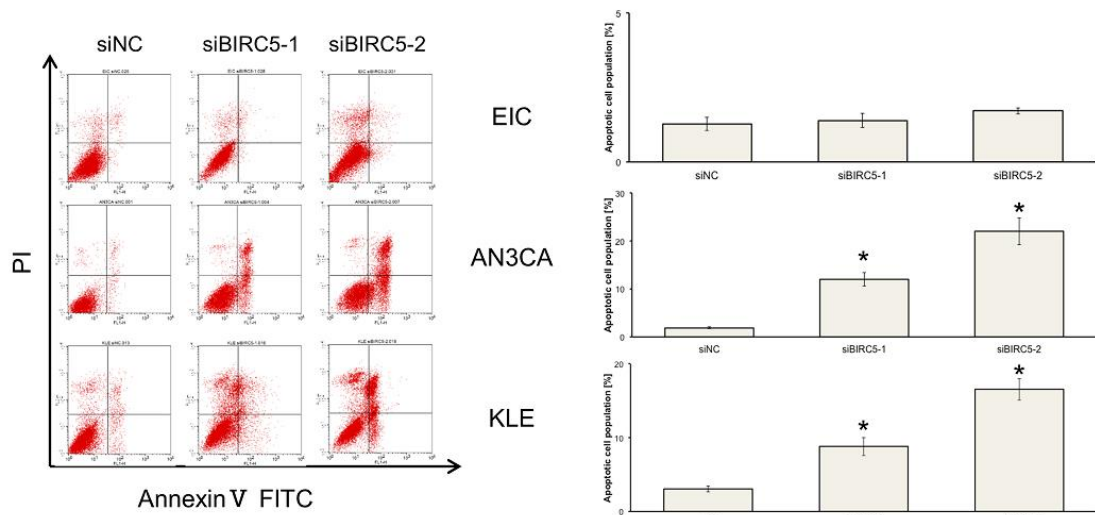
#### 3.1 子宮体癌細胞株におけるサバイビン抑制によるアポトーシス誘導

子宮体癌細胞株でサバイビン抑制がアポトーシスを誘導するか調べるため、AN3CA、KLE の 2 株とコントロールとして EIC を使用し以後の実験を施行した。遺伝子サイレンシングによりサバイビンをノックダウンし、ウェスタンブロット法による cleaved PARP の蓄積とアネキシン V-PI 二重染色によるフローサイトメトリー解析によりアポトーシスを評価した。2 種類の siRNA 共に、サバイビントタンパク発現を抑制し、子宮体癌細胞株でのみ cleaved PARP の蓄積を認めた (図 29)。また、フローサイトメトリー解析でも同様に、子宮体癌細胞株でのみ、サバイビンのノックダウンでアポトーシスが有意に誘導された (図 30)。以上から、サバイビン抑制は子宮体癌細胞株特異的にアポトーシスを誘導することが示された。



(図 29) サバイビンノックダウン時のウエスタンブロット法の結果。2 種類の siRNA は共

にサバイビン発現を抑制し、AN3CA、KLE の 2 株でのみ cleaved PARP の蓄積を認めた。



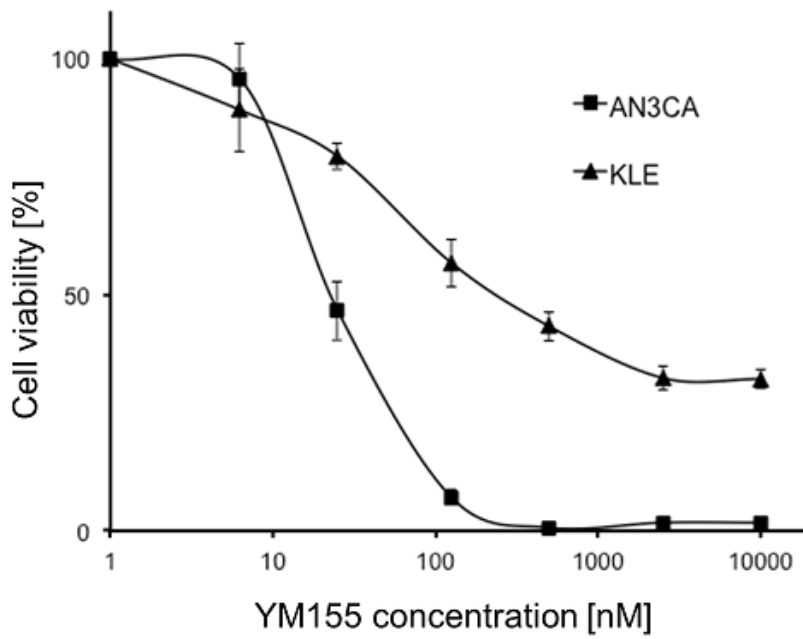
(図 30) サバイビンノックダウン時のアネキシンV-PI 二重染色によるアポトーシス検出の

結果。AN3CA、KLE の 2 株でのみサバイビンノックダウンで有意なアポトーシス誘導を

認めた。同実験を 3 回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。\*: p < 0.05

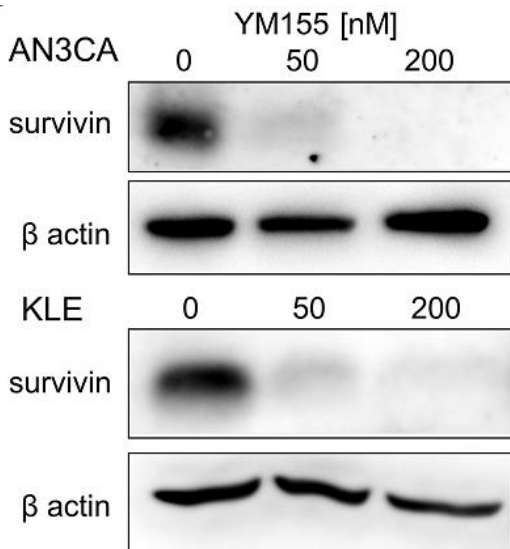
### 3-2 YM155 のアポトーシス誘導による増殖抑制

サバイビン阻害薬 YM155 が子宮体癌細胞株に対し抗腫瘍効果を持つどうかを調べるため、AN3CA、KLE の 2 株を使用し、細胞増殖を MTT アッセイで評価した。YM155 は濃度依存性に 2 株の細胞増殖を抑制し、50%増殖阻止濃度 (IC<sub>50</sub>) は AN3CA、KLE 株でそれぞれ 25、250 nM であった (図 31)。また、同じ 2 株に YM155 を 50、200 nM 添加し、サバイビタンパク発現をウエスタンブロット法で評価したところ、濃度依存性にサバイビタンパク発現抑制を認めた (図 32)。アネキシン V-PI 二重染色によるフローサイトメトリー解析では、YM155 は 50 nM の低濃度から有意にアポトーシスを誘導した (図 33)。以上から、YM155 は子宮体癌細胞株にアポトーシスを誘導し細胞増殖を抑制することが示された。



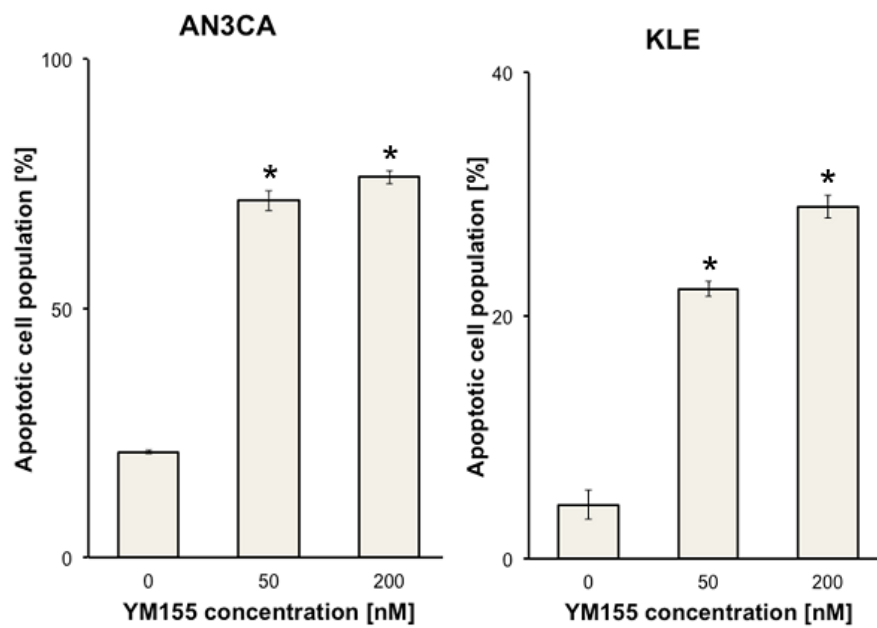
(図 31) MTT アッセイの結果。YM155 は濃度依存性に細胞増殖を抑制した。同実験を 4

回反復し、データは平均値±標準誤差で示した。



(図 32) ウェスタンブロット法の結果。YM155 は濃度依存性にサバイビンタンパク発現を

抑制した。



(図 33) アネキシン V-PI 二重染色によるアポトーシス検出の結果。YM155 は 50 nM の低

濃度から有意にアポトーシスを誘導した。同実験を 3 回反復し、データは平均値±標準誤

差で示した。\*:  $p < 0.05$

## 考察

### 【1】子宮体癌細胞株に対するクロロキンの抗腫瘍効果の検討

CQ は抗マラリア薬として広く使用されているが、近年オートファジー阻害作用が注目されている[17]。CQ の抗腫瘍効果は、脳腫瘍、乳癌、肺癌や大腸癌等の様々な細胞株で証明されているが[17]、子宮体癌においてオートファジーの役割や CQ の抗腫瘍効果は不明であった。本研究で我々は CQ の抗腫瘍効果、CQ によるオートファジー阻害とアポトーシス誘導、シスプラチン耐性細胞株における CQ によるシスプラチン耐性の克服の 3 点に着目した。

まず、CQ は Ishikawa、AN3CA、KLE 株の細胞増殖を抑制し、IC<sub>50</sub> は 1.5 から 12 μM の間であった。この濃度は通常 250 mg を連日内服する CQ の治療域を超えず[20]、既報の他癌種細胞株の IC<sub>50</sub> より低値であり[52][53][54][55]、子宮体癌が他の癌種より CQ 高感受性である可能性が示唆された。

CQ の子宮体癌細胞株の増殖抑制はアポトーシス誘導に起因した。CQ によるアポトーシス誘導機序は明確には同定されていないが、p53 依存性の機序と p53

非依存性の機序が考えられている。CQ はグリオーマ細胞株で p53 依存性アポトーシスを誘導し[56]、悪性黒色腫細胞株では p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) の安定化を介しアポトーシスを誘導する[57]。しかし、p53 変異グリオーマ細胞株や p53 欠失大腸癌細胞株 (HCT116 p53<sup>-/-</sup>) でもアポトーシスを誘導する[58] [59]。肺癌細胞株では 32  $\mu$ M 未満の低濃度でも細胞増殖は抑制するが、アポトーシス誘導は 64  $\mu$ M 以上の高濃度でのみ観察されている[60]。本研究で CQ は p53 野生株と変異株で同様に細胞増殖を抑制し、アポトーシス誘導が p53 依存性機序のみで無いことが確認された。従って、CQ への感受性やアポトーシス誘導機序は癌種によって異なる可能性が示唆される。

また、本研究で CQ の細胞増殖抑制機序が部分的にオートファジー阻害によることが示された。アポトーシスとオートファジーの関係は複雑である[61]。Ishikawa 株で、隔離膜形成を阻害し初期の段階でオートファジーを阻害する 3-methyladenine はアポトーシスを誘導しないが、CQ と同様の機序でオートファジーを阻害する Bafilomycin A はオートファゴソームを蓄積しアポトーシスを誘



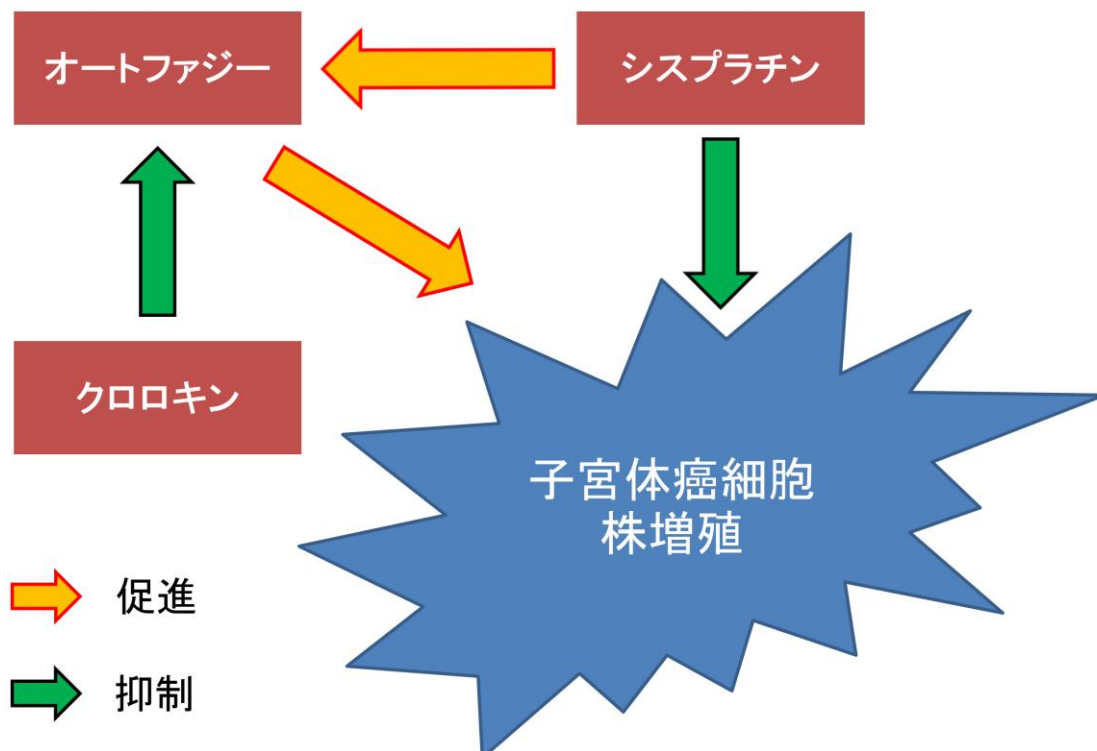
導する[62]。よって、オートファゴソームの蓄積がアポトーシスを誘導する可能性が示唆される[62]。しかし、本研究ではオートファジー関連遺伝子の *ATG5*、*ATG7* のノックダウンで子宮体癌細胞株の増殖が抑制され、*CQ* によるアポトーシス誘導機序がオートファゴソーム蓄積だけでなく、オートファジー自体の阻害による可能性が考えられる。

*PI3K/mTOR* 経路は *PIK3CA* と *PTEN* 変異により子宮体癌で高頻度に活性化されており[5]、*mTOR* 阻害薬は有望な治療薬である。しかし、*mTOR* 阻害はオートファジーを誘導するため、オートファジーは *mTOR* 阻害薬投与時の有効な治療標的となり得る。実際、ヒドロキシクロロキンと *mTOR* 阻害薬である *temsirolimus* との併用の第1相試験が治療抵抗性固形がんで行われ、その有効性が示されており[63]、子宮体癌においても *mTOR* 阻害薬と *CQ* の併用は有望な治療選択肢となり得る。

子宮体癌において、シスプラチン等の白金製剤を中心とした化学療法への感受性は、進行例や再発例の予後を規定する[64]。本研究において、オートファジ

一阻害はシスプラチン感受性を亢進させた。加えて、CP-r 細胞株では、CQ 感受性が高く、シスプラチンとの併用で CQ が有意に感受性を亢進させることが示された (図 34)。卵巣癌と子宮頸癌細胞株ではオートファジー阻害がシスプラチン感受性を亢進させることが示されており [16][65]、シスプラチンと CQ の併用は婦人科癌の有望な治療選択肢となる可能性が示唆された。

本研究は子宮体癌細胞株を用いた *in vitro* の実験であり、今後 *in vivo* の実験や臨床試験が望まれる。クロロキンの臨床使用で重症腎障害の副作用報告は無いが [19]、オートファジーがシスプラチンの腎障害に対し保護的に作用する可能性が示唆されており [66]、シスプラチンとの併用時は十分な利尿等の配慮が必要と考えられる。また、オートファジー誘導がシスプラチン特異的作用か、細胞障害性薬剤に共通的作用かについても、今後他の抗がん剤を用いた更なる検討が必要である。



(図 34) 本研究結果の概念図。オートファジーは子宮体癌細胞株の増殖を促進し、シスプ

ラチンとクロロキンは各々、オートファジーを促進、抑制する。

## 【2】子宮体癌における SIRT6 の機能解析

SIRT6 は脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌や肝細胞癌等の細胞株に対しアポトーシスを誘導することが知られているが[37][67]、本研究で新たに子宮体癌細胞株に対して抗腫瘍効果を持つことを証明した。SIRT6 タンパク発現は子宮体癌細胞株で軒

並み低く、子宮体癌の発癌との関連性が示唆された。臨床検体では、SIRT6 高発現群は予後良好な傾向であったが有意差は見出せなかった。当科における子宮体癌症例の予後は比較的良好であることが有意差を見いだせなかった主たる原因と考えられるため、今後症例数のみならず病期の異なる検体を更に増やした検討が必要である。SIRT6 と同じサーチュインファミリーの SIRT1 は腫瘍に対し、増殖亢進、抑制の両方向に働くことが知られている[26]。SIRT1 は染色体安定性を亢進させ腫瘍抑制的に働く[68]反面、p53 の機能を脱アセチル化により抑制し、腫瘍促進的に作用する[69]。しかし、SIRT6 は SIRT1 と異なり p53 の脱アセチル化能を持たず[26]、治療標的としてより適切と考えられる。

SIRT6 はアポトーシスを誘導し子宮体癌細胞株の増殖を抑制した。AN3CA と KLE 株は共に p53 変異株であり、SIRT6 によるアポトーシス誘導機序は p53 非依存性と考えられる。SIRT6 過剰発現時に、心筋細胞と異なり、Akt の抑制は明らかでなかったが、サバイビンタンパク発現は明らかに抑制された。肝細胞癌の進展時に、SIRT6 によるサバイビン抑制が解除され、免疫組織染色で肝細胞癌

患者の SIRT6 発現が有意に低いことが報告されており[70]、子宮体癌と肝細胞癌の発癌に共通の機序が存在する可能性がある。また、AN3CA 株において、SIRT6 によるサバイビン抑制は mRNA レベルと比較し、タンパクレベルでより顕著であり、SIRT6 がサバイビンの転写抑制に加えて、転写後制御にも関与する可能性が示唆される。本研究では SIRT6 によるサバイビンの転写抑制の具体的機序については同定に至らず、脱アセチル化の関与を含めた直接作用を持つ転写因子の同定が今後必要である。

また、SIRT6 は AN3CA 株に対し、Bax の活性化と Bcl-2 の不活化を誘導し、これらの機序もアポトーシス誘導に関与する可能性がある。KLE 株ではこれらの機序は見られず、SIRT6 によるアポトーシス誘導機序は細胞腫により異なる可能性がある。

本研究では SIRT6 が子宮体癌において癌抑制遺伝子として働くことが示された。しかし、現在に到るまで、SIRT6 の特異的活性化薬は同定されておらず、SIRT6 の制御機序もユビキチン化程度しか判明していない[71]。今後、SIRT6 の制御機

序の解明による、特異的活性化薬の同定が望まれる。

### 【3】 子宮体癌細胞株に対する YM155 の抗腫瘍効果の検討

遺伝子サイレンシングによるサバイビンの抑制が Ishikawa 株でアポトーシスを誘導することは既に報告されており[42]、本研究でも AN3CA と KLE の子宮体癌細胞株 2 株でアポトーシスを誘導することを確認した。サバイビンのノックダウンは EIC に対してはアポトーシスを誘導せず、癌細胞株特異的にアポトーシスを誘導することが示された。大半の抗がん剤は正常細胞に対しても細胞毒性を持ち、副作用を発現するため、サバイビン阻害薬は一般的な抗がん剤の副作用を回避出来る可能性がある。

YM155 は最も成功を収めているサバイビン阻害薬であり、本研究でも子宮体癌細胞株に対し、非常に低濃度でアポトーシスを誘導し細胞増殖を抑制することが示された。YM155 と siRNA によるサバイビントタンパク発現抑制は同程度であったが、アポトーシスを起こした細胞の割合は YM155 で明らかに高く、

YM155 のサバイビン阻害以外の作用機序が示唆される。最近の報告では、YM155 による death receptor 5 (DR5) の発現亢進[72]や Mcl-1 の発現抑制[73]の機序が示されており、今後子宮体癌に対する YM155 の臨床応用を考慮するためにも、更なるアポトーシス誘導機序の解明が必要である。また、子宮体癌においてサバイビン発現が正常内膜と比較し発現が上昇しているかどうかについては議論があり[74] [75]、自身の検討でも十分に評価するに至っておらず、今後の検討課題である。

## 結論

子宮体癌細胞株に対して、抗マラリア薬クロロキンとサバイビン阻害薬 YM155 が共にアポトーシスを誘導し細胞増殖を抑制することを証明した。クロロキンによるアポトーシス誘導にはオートファジー抑制が関与し、併用によりシスプラチン耐性を克服する可能性が示された。また、SIRT6 が子宮体癌において癌抑制遺伝子として働くことを示し、その機序としてサバイビンの転写抑制を同定した。サバイビン抑制は子宮体癌細胞株特異的にアポトーシスを誘導し、子宮体癌の有効な治療標的と考えられる。

今後、クロロキンは白金製剤耐性子宮体癌症例の治療薬として、YM155 は子宮体癌症例に対する初回単剤治療薬としての臨床応用が期待される。



## 謝辞

稿を終えるにあたり、御指導・御協力頂いた、東京大学医学部産婦人科学教室の藤井知行教授、織田克利准教授、平池修准教授に深く感謝致します。また、実験計画・実験手技につき御指導・御協力頂いた、東京大学医学部産婦人科学教室の大須賀穰教授、川名敬准教授、有本貴英講師、谷川道洋先生、曾根献文先生、宮本雄一朗先生、池田悠至先生、檜山智子先生、宮坂亜希先生、稲葉可奈子先生、牧井千波先生、東京大学医学部病理学教室の深山正久教授、佐々木毅准教授、前田大地先生、国立国際医療研究センター産婦人科の矢野哲先生、神奈川県予防医学協会の蔵本博行先生に心より御礼申し上げます。

## 参考文献

- [1] Burke WM, Orr J, Leitao M, Salom E, Gehrig P, Olawaiye AB, Brewer M, Boruta D, Vilella J, Herzog T, Abu Shahin F. Endometrial cancer: a review and current management strategies: part I. *Gynecol Oncol* 134: 385-92; 2010.
- [2] Liao C, Zhang D, Mungo C, Tompkins DA, Zeidan AM. Is diabetes mellitus associated with increased incidence and disease-specific mortality in endometrial cancer? A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Gynecol Oncol* 135: 163-71; 2014.
- [3] Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 371: 569-78; 2008.
- [4] Sivalingam VN, Myers J, Nicholas S, Balen AH, Crosbie EJ. Metformin in reproductive health, pregnancy and gynaecological cancer: established and emerging indications. *Hum Reprod Update* 20: 853-68; 2014.

- [5] Oda K, Stokoe D, Taketani Y, McCormick F. High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 65: 10669-73; 2005.
- [6] Kong D, Suzuki A, Zou TT, Sakurada A, Kemp LW, Wakatsuki S, Yokoyama T, Yamakawa H, Furukawa T, Sato M, Ohuchi N, Sato S, Yin J, Wang S, Abraham JM, Souza RF, Smolinski KN, Meltzer SJ, Horii A. PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet* 17: 143-4; 1997.
- [7] Oza AM, Elit L, Tsao MS, Kamel-Reid S, Biagi J, Provencher DM, Gotlieb WH, Hoskins PJ, Ghatage P, Tonkin KS, Mackay HJ, Mazurka J, Sederias J, Ivy P, Dancey JE, Eisenhauer EA. Phase II study of temsirolimus in women with recurrent or metastatic endometrial cancer: a trial of the NCIC Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 29: 3278-85; 2011.
- [8] Colombo N, McMeekin DS, Schwartz PE, Sessa C, Gehrig PA, Holloway R, Braly P, Matei D, Morosky A, Dodium PF, Einstein MH, Haluska F. Ridaforolimus as a

single agent in advanced endometrial cancer: results of a single-arm, phase 2 trial. *Br J*

*Cancer* 108: 1021-6; 2013.

[9] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-101; 2005.

[10] Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene* 26: 1932-40; 2007.

[11] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147: 728-41; 2011.

[12] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3: 542-5; 2007.

[13] Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171: 603-14; 2005.

[14] White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer.

Nat Rev Cancer 12: 401-10; 2012.

[15] Hu YL, Jahangiri A, Delay M, Aghi MK. Tumor cell autophagy as an adaptive

response mediating resistance to treatments such as antiangiogenic therapy. Cancer Res

72: 4294-9; 2012.

[16] Wang J, Wu GS. Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer

cells. J Biol Chem 289: 17163-73; 2014.

[17] Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old

drug for effective and safe cancer therapies. Eur J Pharmacol 625: 220-33; 2009.

[18] Tietze C, Schlesinger P, Stahl P. Chloroquine and ammonium ion inhibit

receptor-mediated endocytosis of mannose-glycoconjugates by macrophages: apparent

inhibition of receptor recycling. Biochem Biophys Res Commun 93: 1-8; 1980.

[19] Kishimoto M, Deshpande GA, Yokogawa N, Buyon JP, Okada M. Use of

hydroxychloroquine in Japan. J Rheumatol 39: 1296; 2012.

- [20] Marmor MF, Kellner U, Lai TY, Lyons JS, Mieler WF. Revised recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy. *Ophthalmology* 118: 415-22,; 2011.
- [21] van der Heijden JW, Dijkmans BA, Scheper RJ, Jansen G. Drug Insight: resistance to methotrexate and other disease-modifying antirheumatic drugs--from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3: 26-34; 2007.
- [22] Lee SJ, Silverman E, Bargman JM. The role of antimalarial agents in the treatment of SLE and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol* 7: 718-29; 2011.
- [23] Brito-Zeron P, Siso-Almirall A, Bove A, Kostov BA, Ramos-Casals M. Primary Sjogren syndrome: an update on current pharmacotherapy options and future directions. *Expert Opin Pharmacother* 14: 279-89; 2013.
- [24] Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 10: 1533-41; 2011.
- [25] Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer

W, DiPaola RS, Lotze MT, White E. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 17: 654-66; 2011.

[26] Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 16: 4623-35; 2005.

[27] Sebastian C, Zwaans BM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, Ram O, Truelove J, Guimaraes AR, Toiber D, Cosentino C, Greenson JK, MacDonald AI, McGlynn L, Maxwell F, Edwards J, Giacosa S, Guccione E, Weissleder R, Bernstein BE, Regev A, Shiels PG, Lombard DB, Mostoslavsky R. The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell* 151: 1185-9; 2012.

[28] Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, Guimaraes A, Marinelli B, Wikstrom JD, Nir T, Clish CB, Vaitheesvaran B, Iliopoulos O, Kurland I, Dor Y, Weissleder R, Shirihai OS, Ellisen LW, Espinosa JM, Mostoslavsky R. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via

Hif1alpha. Cell 12010;140: 280-93.

[29] Van Gool F, Galli M, Gueydan C, Kruys V, Prevot PP, Bedalov A,

Mostoslavsky R, Alt FW, De Smedt T, Leo O. Intracellular NAD levels regulate tumor

necrosis factor protein synthesis in a sirtuin-dependent manner. Nat Med 15: 206-10;

2009.

[30] Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L,

Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM, Mills KD, Patel P, Hsu JT, Hong AL,

Ford E, Cheng HL, Kennedy C, Nunez N, Bronson R, Frenthewey D, Auerbach W,

Valenzuela D, Karow M, Hottiger MO, Hursting S, Barrett JC, Guarente L, Mulligan R,

Demple B, Yancopoulos GD, Alt FW. Genomic instability and aging-like phenotype in

the absence of mammalian SIRT6. Cell 124: 315-29; 2006.

[31] Kanfi Y, Naiman S, Amir G, Peshti V, Zinman G, Nahum L, Bar-Joseph Z,

Cohen HY. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. Nature 483: 218-21;

2012.



- [32] Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, Cheung P, Kusumoto R, Kawahara TL, Barrett JC, Chang HY, Bohr VA, Ried T, Gozani O, Chua KF. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* 452: 492-6; 2008.
- [33] Michishita E, McCord RA, Boxer LD, Barber MF, Hong T, Gozani O, Chua KF. Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6. *Cell Cycle* 8: 2664-6; 2009.
- [34] Mao Z, Hine C, Tian X, Van Meter M, Au M, Vaidya A, Seluanov A, Gorbunova V. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science* 332: 1443-6; 2011.
- [35] Kaidi A, Weinert BT, Choudhary C, Jackson SP. Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation. *Science* 329: 1348-53; 2010.
- [36] McCord RA, Michishita E, Hong T, Berber E, Boxer LD, Kusumoto R, Guan S, Shi X, Gozani O, Burlingame AL, Bohr VA, Chua KF. SIRT6 stabilizes

DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging*

(Albany NY) 1: 109-21; 2009.

[37] Van Meter M, Mao Z, Gorbunova V, Seluanov A. SIRT6 overexpression induces massive apoptosis in cancer cells but not in normal cells. *Cell Cycle* 10: 3153-8; 2014.

[38] Sundaresan NR, Vasudevan P, Zhong L, Kim G, Samant S, Parekh V, Pillai VB, Ravindra PV, Gupta M, Jeevanandam V, Cunningham JM, Deng CX, Lombard DB, Mostoslavsky R, Gupta MP. The sirtuin SIRT6 blocks IGF-Akt signaling and development of cardiac hypertrophy by targeting c-Jun. *Nat Med* 18: 1643-50; 2012.

[39] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3: 917-21; 1997.

[40] O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13103-7; 2000.

- [41] Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, Marusawa H, Zou H, Armstrong R, Matsuzawa S, Salvesen GS, Reed JC, Altieri DC. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 279: 34087-90; 2004.
- [42] Ai Z, Yin L, Zhou X, Zhu Y, Zhu D, Yu Y, Feng Y. Inhibition of survivin reduces cell proliferation and induces apoptosis in human endometrial cancer. *Cancer* 107: 746-56; 2006.
- [43] Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, Mori M, Amino N, Takeuchi M, Tominaga F, Hatakeyama S, Kinoyama I, Matsuhisa A, Kudoh M, Sasamata M. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res* 67: 8014-21; 2007.
- [44] Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, Mori M, Amino N, Takeuchi M, Tominaga F, Kinoyama I, Matsuhisa A, Kudou M, Sasamata M. Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. *Cancer Sci* 102: 614-21; 2011.

- [45] Tolcher AW, Quinn DI, Ferrari A, Ahmann F, Giaccone G, Drake T, Keating A, de Bono JS. A phase II study of YM155, a novel small-molecule suppressor of survivin, in castration-resistant taxane-pretreated prostate cancer. *Ann Oncol* 23: 968-73; 2012.
- [46] Lewis KD, Samlowski W, Ward J, Catlett J, Cranmer L, Kirkwood J, Lawson D, Whitman E, Gonzalez R. A multi-center phase II evaluation of the small molecule survivin suppressor YM155 in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Invest New Drugs* 29: 161-6; 2011.
- [47] Cheson BD, Bartlett NL, Vose JM, Lopez-Hernandez A, Seiz AL, Keating AT, Shamsili S, Papadopoulos KP. A phase II study of the survivin suppressant YM155 in patients with refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer* 118: 3128-34; 2012.
- [48] Kuramoto H, Nishida M, Morisawa T, Hamano M, Hata H, Kato Y, Ohno E, Iida T. Establishment and characterization of human endometrial cancer cell lines. *Ann N Y Acad Sci* 622: 402-21; 1991.
- [49] Mizumoto Y, Kyo S, Ohno S, Hashimoto M, Nakamura M, Maida Y, Sakaguchi

J, Takakura M, Inoue M, Kiyono T. Creation of tumorigenic human endometrial epithelial cells with intact chromosomes by introducing defined genetic elements. *Oncogene* 25: 5673-82; 2006.

[50] Kamata Y, Watanabe J, Hata H, Hamano M, Kuramoto H. Quantitative study on the correlation between p53 gene mutation and its expression in endometrial carcinoma cell lines. *Eur J Gynaecol Oncol* 25: 55-60; 2004.

[51] Chen JS, Liu JC, Shen L, Rau KM, Kuo HP, Li YM, Shi D, Lee YC, Chang KJ, Hung MC. Cancer-specific activation of the survivin promoter and its potential use in gene therapy. *Cancer Gene Ther* 11: 740-7; 2004.

[52] Sharma N, Thomas S, Golden EB, Hofman FM, Chen TC, Petasis NA, Schonthal AH, Louie SG. Inhibition of autophagy and induction of breast cancer cell death by mefloquine, an antimalarial agent. *Cancer Lett* 326: 143-54; 2012.

[53] Egger ME, Huang JS, Yin W, McMasters KM, McNally LR. Inhibition of autophagy with chloroquine is effective in melanoma. *J Surg Res* 184: 274-81; 2013.

- [54] Schonewolf CA, Mehta M, Schiff D, Wu H, Haffty BG, Karantza V, Jabbour SK. Autophagy inhibition by chloroquine sensitizes HT-29 colorectal cancer cells to concurrent chemoradiation. *World J Gastrointest Oncol* 6: 74-82; 2014.
- [55] Liu F, Shang Y, Chen SZ. Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of lidamycin on non-small cell lung cancer cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 35: 645-52; 2014.
- [56] Kim EL, Wustenberg R, Rubsam A, Schmitz-Salue C, Warnecke G, Bucker EM, Pettkus N, Speidel D, Rohde V, Schulz-Schaeffer W, Deppert W, Giese A. Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro Oncol* 12: 389-400; 2010.
- [57] Lakhter AJ, Sahu RP, Sun Y, Kaufmann WK, Androphy EJ, Travers JB, Naidu SR. Chloroquine promotes apoptosis in melanoma cells by inhibiting BH3 domain-mediated PUMA degradation. *J Invest Dermatol* 133: 2247-54; 2013.
- [58] Geng Y, Kohli L, Klocke BJ, Roth KA. Chloroquine-induced autophagic

vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. *Neuro Oncol* 12: 473-81; 2010.

[59] Sui X, Kong N, Wang X, Fang Y, Hu X, Xu Y, Chen W, Wang K, Li D, Jin W, Lou F, Zheng Y, Hu H, Gong L, Zhou X, Pan H, Han W. JNK confers 5-fluorouracil resistance in p53-deficient and mutant p53-expressing colon cancer cells by inducing survival autophagy. *Sci Rep* 4: 4694; 2014.

[60] Fan C, Wang W, Zhao B, Zhang S, Miao J. Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells. *Bioorg Med Chem* 14: 3218-22; 2006.

[61] Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 81-94; 2014.

[62] Choi J, Jo M, Lee E, Oh YK, Choi D. The role of autophagy in human endometrium. *Biol Reprod* 86: 70; 2012.

[63] Rangwala R, Leone R, Chang YC, Fecher LA, Schuchter LM, Kramer A, Tan KS, Heitjan DF, Rodgers G, Gallagher M, Piao S, Troxel AB, Evans TL, DeMichele

AM, Nathanson KL, O'Dwyer PJ, Kaiser J, Pontiggia L, Davis LE, Amaravadi RK.

Phase I trial of hydroxychloroquine with dose-intense temozolomide in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy* 10: 1369-79; 2014.

[64] Dizon DS. Treatment options for advanced endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 117: 373-81; 2010.

[65] Xu Y, Yu H, Qin H, Kang J, Yu C, Zhong J, Su J, Li H, Sun L. Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells. *Cancer Lett* 314: 232-43; 2012.

[66] Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res* 73: 3-7; 2013.

[67] Zhang ZG, Qin CY. Sirt6 suppresses hepatocellular carcinoma cell growth via inhibiting the extracellular signalregulated kinase signaling pathway. *Mol Med Rep* 9: 882-8; 2014.

[68] Wang RH, Sengupta K, Li C, Kim HS, Cao L, Xiao C, Kim S, Xu X, Zheng Y,



Chilton B, Jia R, Zheng ZM, Appella E, Wang XW, Ried T, Deng CX. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell* 14: 312-23; 2008.

[69] Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107: 149-59; 2001.

[70] Min L, Ji Y, Bakiri L, Qiu Z, Cen J, Chen X, Chen L, Scheuch H, Zheng H, Qin L, Zatloukal K, Hui L, Wagner EF. Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin. *Nat Cell Biol* 14: 1203-11; 2012.

[71] Kanfi Y, Shalman R, Peshti V, Pilosof SN, Gozlan YM, Pearson KJ, Lerrer B, Moazed D, Marine JC, de Cabo R, Cohen HY. Regulation of SIRT6 protein levels by nutrient availability. *FEBS Lett* 582: 543-8; 2008.

[72] Zhao X, Puszyk WM, Lu Z, Ostrov DA, George TJ, Robertson KD, Liu C. Small molecule inhibitor YM155-mediated activation of death receptor 5 is crucial for

chemotherapy-induced apoptosis in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer Ther* 14: 80-9; 2014.

[73] Tang H, Shao H, Yu C, Hou J. Mcl-1 downregulation by YM155 contributes to its synergistic anti-tumor activities with ABT-263. *Biochem Pharmacol* 82: 1066-72; 2011.

[74] Brunner A, Riss P, Heinze G, Brustmann H. pHH3 and surviving are co-expressed in high-risk endometrial cancer and are prognostic relevant. *Br J Cancer* 107: 84-90; 2012.

[75] Pallares J, Martinez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X. Survivin expression in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with correlation with PTEN and STAT-3. *Int J Gynecol Pathol* 24: 247-53; 2005.