

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09235

研究課題名(和文)細胞周期監視機構を標的とした難治卵巣明細胞癌の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for refractory ovarian clear cell carcinoma by targeting cell cycle monitoring mechanism

研究代表者

棚瀬 康仁 (Tanase, Yasuhiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医師

研究者番号：20423915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞癌に特異的に過剰発現しているHepatocyte Nuclear Factor-1 (HNF-1)はUSP28を介して、Claspinのコヒキチン化を抑制することでCheckpoint kinase1 (Chk1)を活性化させ細胞周期の停止を誘導する。HNF-1 -USP28-Claspin-Chk1経路を阻害することで細胞周期を回復させると、卵巣明細胞癌のプレオマイシンに対する薬剤感受性が増幅することを示した。これによりHNF-1 -USP28-Claspin-Chk1経路の阻害は卵巣明細胞癌における新たな治療戦略となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞癌は細胞周期監視機構の異常によって抗癌剤に対する治療抵抗性を獲得していることが示唆されている。本研究により、細胞周期監視機構に異常を誘発する原因の1つとされるHNF-1 -USP28-Claspin-Chk1経路を阻害することで、卵巣明細胞癌の抗癌剤への感受性が増幅することが示された。細胞周期監視機構を標的とした治療法が確立されることにより、従来、予後不良とされていた卵巣明細胞癌に対する化学療法の治療成績の向上が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor hepatocyte nuclear factor 1-beta (HNF-1) enhances checkpoint kinase 1 (Chk1) activation and promotes G2/M cell cycle progression in ovarian clear cell carcinoma (CCC) following exposure to diverse genotoxic agents including bleomycin. Loss-of-function studies using RNAi-mediated gene silencing indicated that HNF-1 facilitated the Claspin expression after treatment with a genotoxic agent bleomycin, resulting in accumulation of phosphorylated Chk1 (p-Chk1) and promotion of survival in CCC cell lines. This study showed for the first time that USP28, a de-ubiquitinase crucial for Claspin expression, is one target gene of HNF-1. Knockdown of endogenous USP28 suppressed the Claspin expression and p-Chk1 activation and cell viability. Our findings identify a novel pathway of the HNF-1 USP28 Claspin Chk1 axis in checkpoint signal amplification in response to DNA damage. Targeting this pathway may represent a putative, novel, anticancer strategy in ovarian CCC.

研究分野：腹腔鏡下手術

キーワード：細胞周期監視機構 HNF-1beta USP28 Claspin Chk1 DNA damage response

1. 研究開始当初の背景

卵巣明細胞癌は、本邦の上皮性卵巣癌の内 25%以上を占め早期癌でも化学療法に抵抗性で、残存・再発病変のコントロールは難しく予後不良である。このため、本邦において卵巣明細胞癌の薬剤耐性機構を解明して新たな治療戦略を構築することは、今後の治療成績を向上させるために喫緊の課題である。正常細胞には、生じた DNA 損傷を感知し、細胞周期を一旦停止させる細胞周期チェックポイント機構が存在する。細胞周期が停止している間に損傷が修復・除去されると、チェックポイントの働きが解除され、再開される。一方、修復不能であった細胞は細胞死に誘導される。卵巣明細胞癌に特異的に発現する転写因子である *HNF-1B* は細胞周期チェックポイント機構を破綻させる。つまり、細胞周期が停止した状態であるために DNA 損傷が修復されない細胞が増殖し、結果的に悪性度が高まり、抗癌剤抵抗性を獲得すると考えられている。

HNF-1B は臨床応用する上で有望な標的遺伝子産物であるが、転写因子である *HNF-1B* の発現自体を操作する遺伝子治療の開発は困難を伴う。そこで、*HNF-1B* の下流遺伝子を探索した結果、Claspin-Chk1 複合体が DNA 修復遺伝子の制御ならびに細胞周期調節に関与することが判明した。Claspin は複合体形成後、Chk1 の活性化を増強・安定化し細胞周期を停止させる蛋白として近年同定された。生体内に存在する蛋白分解機構(ユビキチン-プロテアソームシステム)によって分解され Chk1 が減弱し、チェックポイントが解除され細胞周期は正常に復する。卵巣明細胞癌では *HNF-1B* が Claspin の発現を介して Chk1 の持続的リン酸化をもたらし、チェックポイント解除を抑制することで抗癌剤耐性・発癌に関与している可能性が明らかにされてきた。また、クラスピンの発現は、USP28 の過剰発現によりユビキチンが分解されることで維持されることも明らかになった。しかし、どの因子を抑制すれば最も効果的なのかは定かでない。

2. 研究の目的

HNF-1B—USP28—Claspin—Chk1 経路により細胞周期チェックポイント機構が障害されるが、これらの蛋白をノックダウンし働きを阻害することで、抗癌剤抵抗性を改善できるかを検証する。

3. 研究の方法

HNF-1B が発現している卵巣明細胞癌の細胞株 (TOV21G、RMG-1、RMG-2、TU-OC-1、KOC-7c) と *HNF-1B* が発現していない卵巣明細胞癌の細胞株 (ES2、MCAS、RMUG-L、RMUG-S、SKOV3) をウェスタンブロットで同定し、TOV21G、KOC-7c を *HNF-1B* 陽性細胞として使用した。

HNF-1B、USP28、Claspin をターゲットとした si-RNA を用いてそれぞれの遺伝子をノックダウンした細胞株を作成し、それらのブレオマイシンへの感受性をユビキチン化分析、細胞生存率分析などを用いて測定した。

4. 研究成果

① *HNF-1B* をノックダウンした TOV-21G はコントロール群と比較して p-Chk1、Claspin の発現が低く、*HNF-1B* によって p-Chk1、Claspin が過剰発現していることが示唆された。(図 1)これらの過剰発現により、卵巣明細胞癌細胞の細胞周期チェックポイント機構が破綻されると考えられた。

② Polo-Like-Kinase1(PLK1)は USP ファミリー以外の経路によって Claspin の発現を制御していると考えられているが、TOV21G の *HNF-1B* をノックダウンしても、PLK1 のリン酸化には変化が見られなかった(図 2)。また、TOV21G に対して *HNF-1B* をノックダウンすると、USP28 は発現を抑制されるが、USP29 の発現は影響を受けなかった(図 3)。以上から、*HNF-1B* は USP28 を特異的に発現させることが判明した。

③ TOV-21G の USP28 をノックダウンすることで Claspin、p-Chk1 の発現が抑制された(図 4)。以上から、USP28 は *HNF-1B* 陽性細胞において Claspin、p-Chk1 を発現する際に、主たる働きをすることが分かった。

④ si-*HNF-1B* を導入することで細胞内の Claspin がポリユビキチン化することから、*HNF-1B* は Claspin のポリユビキチンを阻害することで Claspin の安定化させる作用があることが示唆された(図 5)。

⑤ *HNF-1B*、Claspin、USP28 をそれぞれノックダウンした TOV-21G はいずれもブレオマイシンの感受性が増し、細胞生存割合が低下した(図 6)。

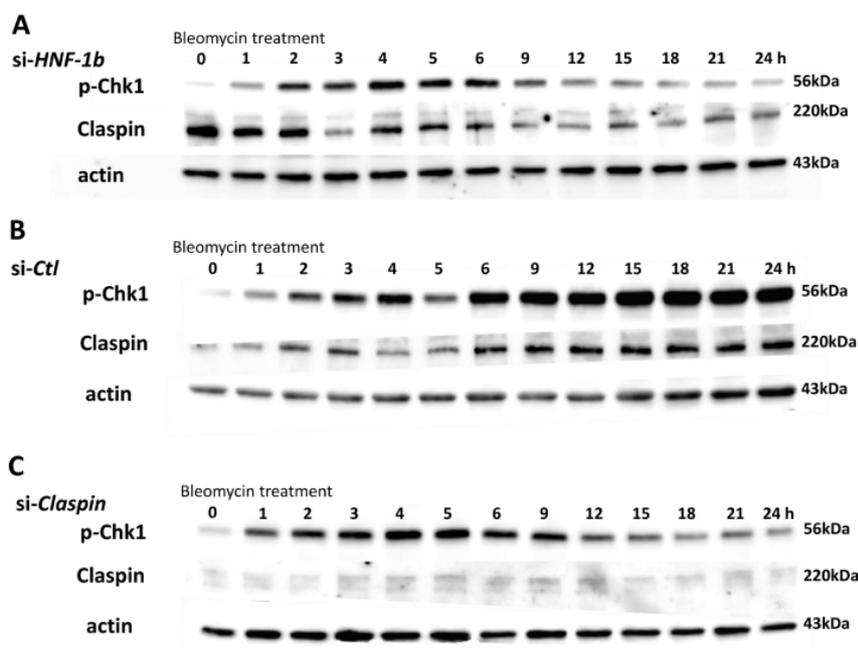
結論：

以前より卵巣明細胞癌は *HNF-1B* を特異的に発現させていることは知られていたが、

*HNF-1B*阻害剤は腎臓、肝臓、膵臓、消化管など多臓器に臓器障害が出現するため、実用性は低いとされてきた。本研究により、*HNF-1B*は *USP28* を特異的に発現させ、*USP28* が主として *Claspin*、*p-Chk1* を過剰発現させることで、細胞周期チェックポイント機構が破綻し、卵巣明細胞癌は治療抵抗性を得ていることが判明した。細胞周期は正常細胞においては複数の経路で制御されているが、*HNF-1B* 陽性細胞においては、*Claspin*、*p-Chk1* の発現は *USP28* に依存しているため、*USP28* を阻害することで正常細胞に影響が少なく *HNF-1B*—*USP28*—*Claspin*—*Chk1* 経路を阻害できる可能性が示唆された。

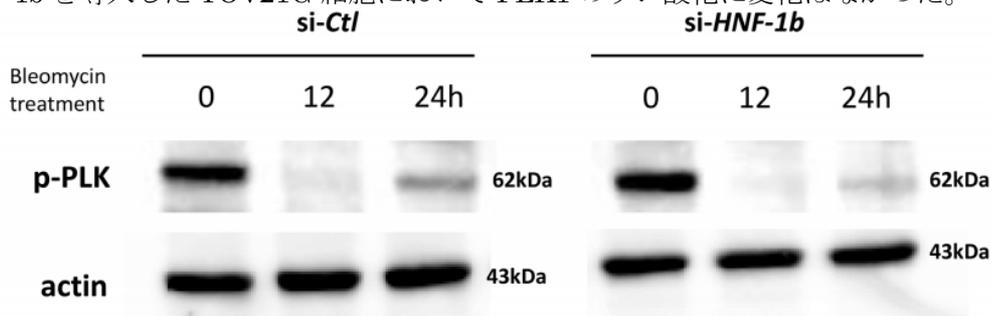
< 引用文献 > Oncotarget. 2018 Apr 3;9(25):17512-17522. doi: 10.18632/oncotarget.24776. The HNF-1B-USP28-Claspin pathway upregulates DNA damage-induced Chk1 activation in ovarian clear cell carcinoma Fuminori Ito et al.

(図1) *HNF-1B*、*Claspin* 遺伝子を阻害することによる *Claspin*、*p-Chk1* 蛋白発現への影響 *HNF-1B* をノックダウンした細胞をブレオマイシンで 24 時間処理した後、*p-Chk1* と *Claspin* を定量した。データには示していないが、ブレオマイシン処理の 24 時間後に *si-HNF1B* によるノックダウン効率は 85% になり、最も高かった。*HNF-1B* の干渉の有無が *p-Chk1* と *Claspin* の発現へどう影響するかを検討した。*HNF-1B* の干渉は *Chk1* の発現総量には影響しない。*HNF-1B* の干渉により *p-Chk1* および *Claspin* の発現が減少した(A, B)。ブレオマイシン処理後の *p-Chk1* タンパク質の発現に対する *Claspin* 干渉の効果。この図は、*si-Claspin* を導入した TOV-21G 細胞と *si-ctl* を導入した TOV-21G 細胞をブレオマイシン処理した際に、時間経過によって *p-Chk1* 蛋白質がどう発現するかを示す(C)。



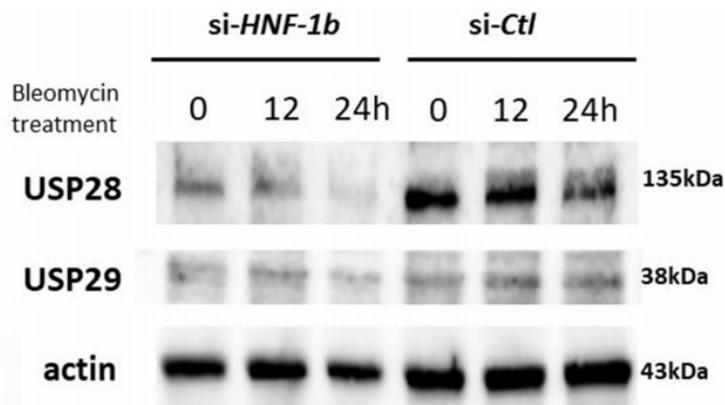
<引用>Oncotarget. 2018 Apr 3;9(25):17512-17522. doi: 10.18632/oncotarget.24776. The HNF-1B-USP28-Claspin pathway upregulates DNA damage-induced Chk1 activation in ovarian clear cell carcinoma Fuminori Ito et al. Figure 2

(図2) *HNF1-B* の *PLK1* 発現に対する影響 *si-HNF-1B* を導入した TOV21G 細胞において *PLK1* のリン酸化に変化はなかった。



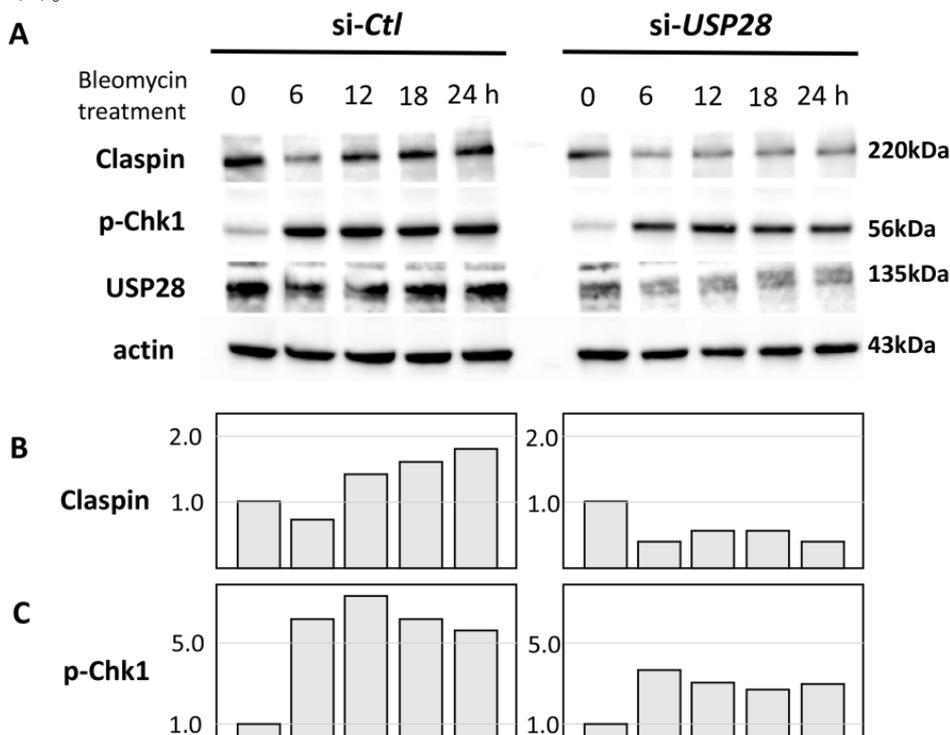
<引用>Oncotarget. 2018 Apr 3;9(25):17512-17522. doi: 10.18632/oncotarget.24776. The HNF-1 β -USP28-Claspin pathway upregulates DNA damage-induced Chk1 activation in ovarian clear cell carcinoma Fuminori Ito et al. Figure 3

(図3) ブレオマイシン投与後の *HNF-1 β* による USP28, USP29 の蛋白発現
 si-HNF-1 β または si-ctl を導入した TOV-21G 細胞における USP28 および USP29 のタンパク質発現量を示す。内在性の *HNF-1 β* をノックダウンすると、USP28 の蛋白発現は減少したが USP29 の蛋白発現は減少しなかった。



<引用>Oncotarget. 2018 Apr 3;9(25):17512-17522. doi: 10.18632/oncotarget.24776. The HNF-1 β -USP28-Claspin pathway upregulates DNA damage-induced Chk1 activation in ovarian clear cell carcinoma Fuminori Ito et al. Figure 5

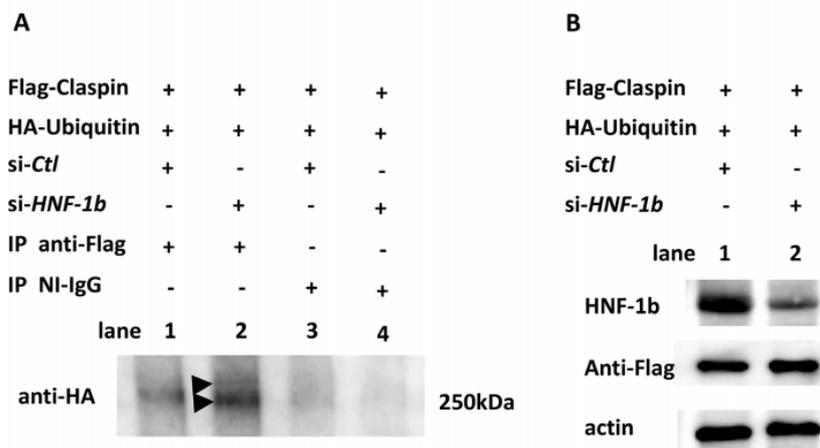
(図4) ブレオマイシン処理後の USP28 が Claspin、p-Chk1 蛋白発現に与える影響
 ウェスタンブロットによる si-USP28 または si-ctl を導入した TOV-21G 細胞における Claspin と p-Chk1 の蛋白発現レベルを示す。ブレオマイシン処置後に内在性 *USP28* をノックダウンすることで Claspin と p-Chk1 の発現は減少した(A)。Claspin に対する免疫ブロットの濃度比較の結果である(B)。p-Chk1 に対する免疫ブロットの濃度比較の結果である(C)。



<引用>Oncotarget. 2018 Apr 3;9(25):17512-17522. doi: 10.18632/oncotarget.24776. The HNF-1 β -USP28-Claspin pathway upregulates DNA damage-induced Chk1 activation in ovarian clear cell carcinoma Fuminori Ito et al. Figure 6

(図 5) *HNF1-β*による Claspin 蛋白の安定化

TOV-21G si-ctl 細胞 (レーン 1 およびレーン 3) および TOV-21G si-HNF-1β 細胞 (レーン 2 およびレーン 4) に Flag-Claspin と HA-Ubiquitin を 48 時間導入し、ブレオマイシンで 24 時間処理した。細胞回収の 2 時間前にプロテアソーム阻害剤である M132 を添加し、ユビキチン化した Claspin を抗 Flag 抗体 (レーン 1 およびレーン 2) もしくはコントロール IgG (レーン 3 およびレーン 4) で免疫沈降させ、抗 HA で免疫ブロッティングを行った。免疫沈降分析にて、si-HNF-1β を導入した群では、コントロールと比較して、Claspin がポリユビキチン化し、高分子量 (>250 kDa) となることが明らかになった(A)。 *HNF-1β* が効率よく抑制されていることを確認した(B)。

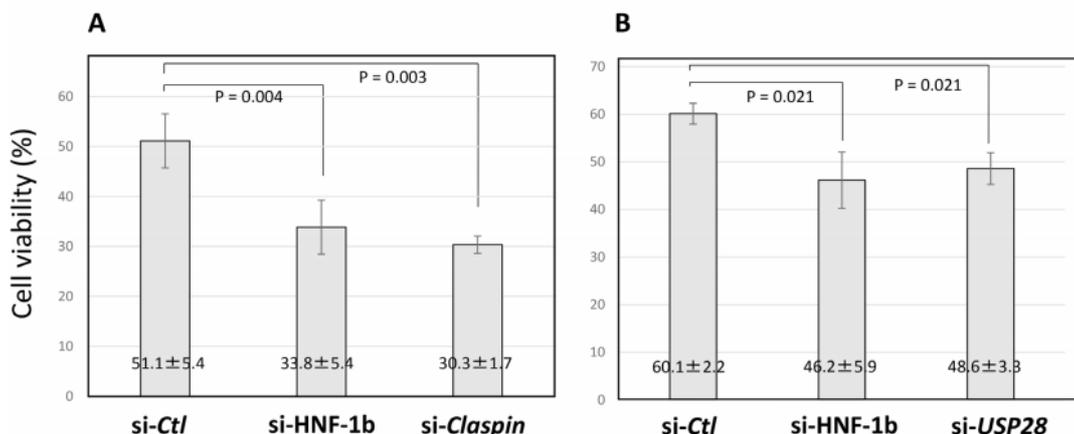


<引用>Oncotarget. 2018 Apr 3;9(25):17512-17522. doi: 10.18632/oncotarget.24776. The HNF-1β-USP28-Claspin pathway upregulates DNA damage-induced Chk1 activation in ovarian clear cell carcinoma Fuminori Ito et al. Figure 7

(図 6) *HNF-1β*、Claspin、USP28 の各 si-RNA を導入することによる TOV-21G の生存率への影響

Claspin、*HNF-1β*、コントロールの siRNA を 2 回(1 日目と 3 日目)導入した後、4 日目に TOV21G 細胞にブレオマイシン(42 μM)を加えてさらに 48 時間培養した(A)。

別の実験において、*USP28*、*HNF1-β*、コントロールの siRNA を 1 日目に導入し、3 日目にブレオマイシンで処理した。48 時間培養し、細胞生存率をトリパンブルー添加試験を行った(B)。細胞生存率(%) = 生存細胞数 / 総細胞数 × 100



<引用>Oncotarget. 2018 Apr 3;9(25):17512-17522. doi: 10.18632/oncotarget.24776. The HNF-1β-USP28-Claspin pathway upregulates DNA damage-induced Chk1 activation in ovarian clear cell carcinoma Fuminori Ito et al. Figure 8

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito F, Yoshimoto C, Yamada Y, Sudo T, Kobayashi H.	4. 巻 9(25)
2. 論文標題 The HNF-1 USP28 Claspin pathway upregulates DNA damage-induced Chk1 activation in ovarian clear cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 17512-17522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 河原直紀, 竹田善紀, 松原 翔, 山田有紀, 小林 浩
2. 発表標題 HNF-1beta 強発現を呈する卵巣明細胞癌に対する合成致死候補の検索
3. 学会等名 第24回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原直紀, 山田有紀, 小川憲二, 佐道俊幸, 小林 浩
2. 発表標題 卵巣明細胞癌において転写因子HNF-1 はUSP28の発現を介するCLASPINの分解抑制によりChk1のリン酸化を維持させる
3. 学会等名 第17回日本婦人科がん分子標的研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河原直紀, 小川憲二, 山田有紀, 吉元千陽, 川口龍二, 小林 浩
2. 発表標題 卵巣明細胞癌におけるリン酸化の維持においてHNF-1beta-USP28-Claspin経路は重要である
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawahara N, Yamada Y, Yoshimoto C, Kawaguchi R, Sado T, Kobayashi H
2. 発表標題 The HNF-1 -USP28-CLASPIN pathway upregulates Chk1 phosphorylation induced by DNA damage in ovarian clear cell carcinoma.
3. 学会等名 The 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 有紀 (Yamada Yuki) (20588537)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	
研究分担者	小林 浩 (Kobayashi Hiroshi) (40178330)	奈良県立医科大学・医学部・研究員 (24601)	
研究分担者	川口 龍二 (Kawaguchi Ryuji) (50382289)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------