

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592409

研究課題名(和文) 発現タンパクの機能制御に基づいた婦人がんの分子標的治療戦略

研究課題名(英文) investigation of molecular targeted therapy in gynecologic malignancies

研究代表者

古川 直人 (furukawa, naoto)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50347556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞腺癌でHNF-1betaが過剰発現している点から治療戦略を検討した。明細胞腺癌細胞にHNF-1beta遺伝子をアデノ随伴ウイルスベクターを用いて遺伝子導入した結果、HNF-1beta遺伝子導入によりG2期における細胞周期停止を確認した。プレオマイシン添加によりDNA障害が起こるとATRが活性化され、その下流のChk1がリン酸化されたが、持続的にリン酸化され、細胞周期がG2停止したままになった。またHNF-1betaはClaspinの発現を制御していること、これによりChk1のリン酸化が持続することが判明した。以上のことが、明細胞腺癌の抗癌剤抵抗性の機序の一つであることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular targeted therapy in a viewpoint of Hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in clear cell carcinoma of ovary. We found that G2 cell-cycle arrest is induced through adenoviral transfer of HNF-1beta. CHK1 kinase acts downstream of ATM/ATR kinase and plays an important role in the G2 checkpoint. G2 arrest of HNF-1beta (+) cells results from sustained CHK1 activation. Furthermore, HNF-1beta controls claspin expression, sustaining CHK1 protein phosphorylation. These data indicated that the anticancer drug resistance of CCA may be caused by aberrant G2 arrest due to HNF-1A overexpression.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巣癌 転写因子 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学的・病理学的研究により、発癌機構・予後因子・病態解明がされ、また、分子標的薬の登場により症例の個別化が計られるようになった。Gefitinib や imatinib はその代表である。しかし、現実的には既存の分子標的薬では十分な成果が得られないことや有害事象発生のため、新たな分子標的薬の開発が必要である。そのためには、癌化あるいは悪性度を規定する因子を解明し、新たな分子標的を選定することが必要である。胎盤性ロイシンアミノペプチダーゼ (以下 P-LAP) は、胎盤に豊富に存在するオキシトシンを分解する酵素である。このオキシトシンは、妊娠・出産に関連するホルモンである一方、癌の増殖を抑制している。P-LAP は子宮内膜や卵巣においても発現していることが確認されている。我々は、予後不良の子宮内膜癌や卵巣癌では P-LAP が過剰発現していること、P-LAP 高値は極めて予後不良であることを報告している。このように、P-LAP は癌化や癌の悪性度に関与すると考えられる。卵巣明細胞腺癌は婦人科癌の中で、治療抵抗性と位置付けられている。卵巣癌の中で明細胞腺癌の占める割合は、欧米での 5% に対して本邦では 23% である。さらに、明細胞腺癌において、HNF-1beta が過剰発現していることが多く、我々も HNF-1beta の観点より様々な研究を行っている。以上のことより、今回の検討においては、卵巣明細胞腺癌をターゲットとして検討を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では P-LAP を主要な卵巣明細胞腺癌に対する治療の標的分子として位置づけ、先端的な手法を駆使して P-LAP に関連した新たな分子標的を探索する。同定された有望な因子の発現を制御することにより、癌増殖や転移を制御して予後改善に寄与できるかどうかの基礎検討を行い、難治性婦人科癌の分子生物学的特徴からみた治療戦略を提供可能にすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 卵巣明細胞腺癌検体の遺伝子解析を実施し、過剰発現する遺伝子群の抽出を行う。これらの遺伝子群 (P-LAP およびその下流遺伝子群を含む) の関連性をインシリコ実験によりコンピュータ上で仮想組み立て実験を行い、遺伝子発現動態などを予測して、転写因子として作用するターゲット遺伝子を抽出する。

2) 卵巣明細胞腺癌培養細胞を用い、P-LAP を含めた候補遺伝子をノックアウトおよびノックインした時の、シグナル伝達リン酸化活性・解毒遺伝子導入時の抗癌剤耐性・アポトーシス遺伝子導入時の細胞増殖への影響を解明する。

3) 卵巣明細胞腺癌培養細胞 (HNF-1beta+/-) にさまざまな細胞周期阻害剤を添加して、DNA チェックポイントがどのように変化するかについて比較検討した。

4) 新たな分子標的薬が卵巣明細胞腺癌に効果があるかについて、HNF-1beta+卵巣明細胞腺癌培養細胞への添加実験を行った。

4. 研究成果

1) 卵巣明細胞腺癌の遺伝子解析
酸化ストレス関連遺伝子の過剰発現を認め、また、P-LAP の下流遺伝子には GLUT など等の取り込みに関する遺伝子群の作用が関連していること、糖代謝に関連して HNF 転写因子が過剰発現することにより、P-LAP の発現変化は HNF-1beta の変化と密接に関連することを発見した。

2) 卵巣明細胞腺癌培養細胞を用いた候補遺伝子をノックアウトおよびノックイン
HNF-1beta 遺伝子ノックアウト実験により抗アポトーシス経路、解毒酵素経路、細胞生存、グリコーゲン産生酵素群の著明な変化を確認することができた。また、HNF-1beta 遺伝子導入により G2 期における細胞周期停止を確認した。

3) DNA チェックポイント

S 期や M 期で停止させても、HNF-1beta+/-細胞間での差異は見られなかったが、G2 期で停止させた場合、HNF-1beta-細胞は死に至るが、HNF-1beta+細胞は G2 期で停止したままで細胞死には至らなかった。DNA 障害が起こると ATR が活性化され、その下流の Chk1 がリン酸化されたが、持続的にリン酸化され細胞周期が G2 期で停止したままになった。この時点で遺伝子不安定性が上昇し、細胞の悪性度が増した。Chk1 のリン酸化が抑制されない理由として Claspin が挙げられた。Claspin をノックダウンすると、HNF-1beta+細胞においても、細胞死に至った。

4) 分子標的薬の添加実験

HNF-1beta+卵巣明細胞腺癌培養細胞に G2 期で停止させるプレオマイシンと Chk1 阻害剤を添加した結果、Chk1 のリン酸化が抑制され細胞死に至った。

以上より、HNF-1beta 発現による G2 期停止および恒常的な Chk1 のリン酸化によって、卵巣明細胞腺癌が抗癌剤抵抗性、ひいては難治性を獲得していることが判明した。

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 16 件)

1. Yamada Y, Shigetomi H, Onogi A, Haruta S, Kawaguchi R, Yoshida S, Furukawa N, Nagai A, Tanase Y, Tsunemi T, Oi H, Kobayashi H. Redox-active iron-induced oxidative stress in the pathogenesis of clear cell carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 Oct;21(7):1200-7.
2. Yoshizawa Y, Yamada Y, Kanayama S, Shigetomi H, Kawaguchi R, Yoshida S, Nagai A, Furukawa N, Oi H, Kobayashi H. Signaling pathway involved in cyclooxygenase-2 up-regulation by hepatocyte growth factor in endometrial cancer cells. *Oncol Rep*. 2011 Oct;26(4):957-64.
3. Haruta S, Furukawa N, Yoshizawa Y, Tsunemi T, Nagai A, Kawaguchi R, Tanase Y, Yoshida S, Kobayashi H. Molecular genetics and epidemiology of epithelial ovarian cancer (Review). *Oncol Rep*. 2011 Dec;26(6):1347-56.
4. Furukawa N, Kawaguchi R, Kajihara H, Kobayashi H. Evaluation of the vessels of the cardinal ligament by transrectal ultrasonography with color Doppler imaging. *J Clin Ultrasound*. 2011 Nov-Dec;39(9):502-5.
5. Kawaguchi R, Furukawa N, Yamada Y, Ooi H, Kobayashi H. Carcinosarcoma of the uterine corpus with alpha-fetoprotein-producing hepatoid adenocarcinoma: a report of two cases. *Case Rep Oncol*. 2011;4(2):358-62.
6. Tanase Y, Yamada Y, Shigetomi H, Kajihara H, Oonogi A, Yoshizawa Y, Furukawa N, Haruta S, Yoshida S, Sado T, Oi H, Kobayashi H. Modulation of estrogenic action in clear cell carcinoma of the ovary (Review). *Exp Ther Med*. 2012 Jan;3(1):18-24.
7. Shigetomi H, Tsunemi T, Haruta S, Kajihara H, Yoshizawa Y, Tanase Y, Furukawa N, Yoshida S, Sado T, Kobayashi H. Molecular mechanisms linking endometriosis under oxidative stress with ovarian tumorigenesis and therapeutic modalities. *Cancer Invest*. 2012 Jul;30(6):473-80.
8. Takekuma M, Hirashima Y, Ito K, Tsubamoto H, Tabata T, Arakawa A, Itani Y, Furukawa N, Murakoshi H, Takeuchi S. Phase II trial of paclitaxel and nedaplatin in patients with advanced/recurrent uterine cervical cancer: a Kansai Clinical Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2012 Sep;126(3):341-5.
9. Kawaguchi R, Furukawa N, Kobayashi H. Cut-off value of D-dimer for prediction of deep venous thrombosis before treatment in ovarian cancer. *J Gynecol Oncol*. 2012 Apr;23(2):98-102.
10. Furukawa N, Kawaguchi R, Kobayashi H. Use of high-dose cisplatin with aprepitant in an outpatient setting. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2012 Jul;21(4):436-41.
11. Akasaka J, Furukawa N, Shigemitsu A, Kanayama S, Kawaguchi R, Kobayashi H. Risk factors for wound complications after surgery for gynecologic malignancies. *Int J Gynecol Cancer*. 2013 Oct;23(8):1501-5.
12. Furukawa N, Akasaka J, Shigemitsu A, Sasaki Y, Nagai A, Kawaguchi R, Kobayashi H. Evaluation of the relation between patient characteristics and the state of chemotherapy-induced nausea and vomiting in patients with gynecologic cancer receiving paclitaxel and carboplatin. *Arch Gynecol Obstet*. 2014 Apr;289(4):859-64.
13. Uekuri C, Shigetomi H, Ono S, Sasaki Y, Matsuura M, Kobayashi H. Toward an understanding of the pathophysiology of clear cell carcinoma of the ovary (Review). *Oncol Lett*. 2013 Nov;6(5):1163-1173.
14. Kawaguchi R, Furukawa N, Kobayashi H, Asakawa I. Posttreatment cut-off levels of squamous cell carcinoma antigen as a prognostic factor in patients with locally advanced cervical cancer treated with radiotherapy. *J Gynecol Oncol*. 2013 Oct;24(4):313-20.
15. Furukawa N, Sasaki Y, Shigemitsu A, Akasaka J, Kanayama S, Kawaguchi R, Kobayashi H. CA-125 cut-off value

as a predictor for complete interval debulking surgery after neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced ovarian cancer. J Gynecol Oncol. 2013 Apr;24(2):141-5.

16. Shigetomi H, Sudo T, Shimada K, Uekuri C, Tsuji Y, Kanayama S, Naruse K, Yamada Y, Konishi N, Kobayashi H. Inhibition of Cell Death and Induction of G2 Arrest Accumulation in Human Ovarian Clear Cells by HNF-1 Transcription Factor: Chemosensitivity Is Regulated by Checkpoint Kinase CHK1. Int J Gynecol Cancer. 2014 May 6. [Epub ahead of print]

[学会発表](計7件)

1. Furukawa N, Shigetomi H, Yoshida S, Kawaguchi R, Komeda S, Tanase Y, Yamada Y, Kobayashi H. CA125 as a predictive marker for optimal interval debulking surgery in advanced ovarian cancer. 2011 American Society of Clinical Oncology(ASCO)annual meeting
2. 重富洋志, 吉澤順子, 梶原宏貴, 山田嘉彦, 川口龍二, 吉田昭三, 古川直人, 大井豪一, 小林 浩, 金山清二. 卵巣明細胞腺癌に強発現する転写因子 HNF-1Beta の生物作用の解明 2011 日産婦
3. Furukawa N, Nagai A, Kasai T, Ohno S, Shigemitsu Y, Tanase Y, Haruta S, Kawaguchi R, Yoshida S, Oi H, Kobayashi H. Evaluation of BRCA1 Gene Expression as a Prognostic Marker Peritoneal Cancer. 2012 Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society
4. 重富洋志, 須藤 保, 吉澤順子, 棚瀬康仁, 春田祥治, 金山清二, 永井景, 川口龍二, 吉田昭三, 古川直人, 大井豪一, 小林 浩. 明細胞腺癌における DNA 損傷応答と転写因子 HNF-1beta 2012 日本エンドメトリオース学会
5. 重富洋志, 須藤保, 吉澤順子, 棚瀬康仁, 春田祥治, 金山清二, 永井景, 川口龍二, 吉田昭三, 古川直人, 大井豪一, 小林 浩. 卵巣明細胞腺癌における転写因子 HNF-1beta の DNA 損傷チェックポイント機構の制御 2012 日産婦
6. 重富洋志, 植栗千陽, 梶原宏貴, 棚瀬康仁, 春田祥治, 金山清二, 川口龍二, 吉田昭三, 古川直人, 大井豪一, 小林 浩, 島田啓司, 須藤 保.

明細胞腺癌における転写因子 HNF-1beta が制御する DNA 損傷チェックポイント機構の解明 2013 日本婦人科がん分子標的研究会学術集会

7. 重富洋志, 須藤 保, 吉澤順子, 金山清二, 川口龍二, 小林 浩, 山田嘉彦. 転写因子 HNF-1beta は卵巣明細胞腺癌において Claspin の発現を制御し、chk1 タンパクのリン酸化を維持させる 2013 日本癌学会学術総会

[図書](計0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 直人(FURUKAWA Naoto)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50347556

(2) 研究分担者

小林 浩 (KOBAYASHI Hiroshi)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40178330

吉田 昭三 (YOSHIDA Shozo)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40347555

成瀬 勝彦 (NARUSE Katsuhiko)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70453165

重富 洋志 (SHIGETOMI Hiroshi)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20433336

(3)連携研究者 ()

研究者番号：