

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592525

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌におけるDNAチェックポイント機構制御の解明と新規治療戦略の構築

研究課題名(英文) Investigation of the role of Hepatocyte Nuclear Factor-1 beta in the cell cycle checkpoint of clear cell adenocarcinoma in the ovary

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞腺癌の抗癌剤耐性は、その予後が悪い要因となっている。我々は明細胞腺癌に特異的に過剰発現する転写因子HNF-1betaがDNA損傷チェックポイント機構を制御していることを明らかにした。HNF-1betaがchk1タンパクのリン酸化を持続させ、異常な細胞周期の停止をもたらす抗癌剤耐性を獲得していた。持続的なチェックポイント機構の活性化は遺伝子不安定性につながる。これが子宮内膜症からの癌化機序の一つの可能性がある。Claspinはchk1タンパクのリン酸化に關与するタンパクであり、HNF-1betaがその挙動を制御することによりチェックポイント異常をきたしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ovarian clear cell adenocarcinoma shows anticancer drug resistance. However, its detailed mechanism is unknown. We previously reported that hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta), a transcription factor overexpressed in clear cell adenocarcinoma, might sustain chk1 protein phosphorylation to arrest the cell cycle and inhibit cell death induced by an anticancer agent. Claspin is involved in the maintenance of chk1 activation. Claspin expression was increased over time in HNF-1beta (+) cells. HNF-1beta may suppress claspin expression, sustaining chk1 protein phosphorylation. In the future, proteolytic regulation (e.g., ubiquitination) will also be investigated.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣明細胞腺癌 HNF-1beta チェックポイント 卵巣子宮内膜症 癌化

### 1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌は様々な組織型を認めるが、最も一般的な組織型は漿液性腺癌である。そして、その約70%はⅠ期の進行癌であるが、白金製剤を主体とする癌化学療法に対する感受性は比較的良好である。一方、明細胞腺癌は、60%はⅠ期の早期癌であるにも関わらずシスプラチンなどの白金製剤を中心とした化学療法に低感受性で、残存・再発病変のコントロールは極めて難しく、患者の予後やQOLを損なう場合が多い。このため明細胞腺癌の抗癌剤耐性獲得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は喫緊の課題である。

我々はDNAマイクロアレイによる網羅的解析により、卵巣明細胞腺癌においてHNF1beta、Osteopontin (SPP1)、RAB9、PIG7などの遺伝子が過剰発現していることを報告した。中でも核内に発現する転写因子の一つであるHNF1betaは、我々の免疫染色による予備実験においても卵巣子宮内膜症では約40%、明細胞腺癌では100%の陽性率を示すが、他の組織型での発現は陰性である。

HNF1betaの卵巣明細胞腺癌での発現意義をについて解明すれば抗癌剤耐性の機序を明らかにできるのではないかと考えた。我々はまず、卵巣明細胞腺癌株であるTUOC1にプラスミドを導入しHNF-1betaを安定的にノックダウンした細胞株を得た。HNF-1betaの有無による形質の変化を詳細に調べたところ、細胞周期に変化が生じていることを発見した。さらにDNA損傷をきたす抗癌剤を添加したところHNF-1beta(+)細胞ではDNAチェックポイント機構の過剰な活性化と死細胞の減少を認めた。DNAチェックポイント機構に関与するタンパクを網羅的に調べた結果、DNA損傷のセンサーであるATMや遺伝子修復に関与するBRCA、チェックポイントタンパクのchk1、chk2のリン酸化に変化が生じていた。DNA損傷のチェックポイントは発癌から抗癌剤抵抗性まで癌細胞の特性を決める大きな要素である。またchk1 inhibitorを同時に添加することにより抗癌剤感受性を高めることができた。

チェックポイント機構とは、細胞が正しく細胞周期を進行させているかどうかを監視し、異常やや不具合がある場合には細胞周期進行を停止させる制御機構である。この機構は正確な遺伝情報を娘細胞、ひいては子孫に伝達するための、生命にとって根源的な役割を果たしていると考えられており、この機構の破綻は癌化の主要な原因のひとつといわれる。チェックポイント機構で重要なことは、チェックポイント機構が働きcell cycleを停止させるだけでなく、停止中に細胞修復を行うか、細胞死を誘導するかの決定を行い、その後チェックポイントが解除されることである。チェックポイントの解除による細胞

死誘導が抗腫瘍治療の重要なメカニズムとなっている。一方、停止状態の持続は細胞死の誘導を阻害し、ゲノムの不安定性や抗癌剤抵抗性につながると考えられる。

HNF-1betaによるDNA損傷チェックポイント機構の異常を明らかにすることにより、明細胞腺癌の子宮内膜症からの発癌機序の解明、さらには抗癌剤耐性獲得機構を解明して新たな治療戦略を構築できる。

### 2. 研究の目的

卵巣明細胞腺癌に関する自然、獲得薬剤抵抗性の研究は行われてはいるが未だその耐性機序の詳細は断片的で詳細は不明である。集積されたゲノム情報や飛躍的な進展をみせている生命科学の解析手法を駆使することにより網羅的な分子機序の解明を行うことで、「卵巣明細胞腺癌の抗癌剤耐性獲得機構」の分子標的治療の確立が可能になり得る。その結果、癌の克服に向けて、卵巣癌、なかでも難治性である明細胞腺癌の治療成績、予後改善に貢献することができる。HNF1beta遺伝子によるチェックポイント機構の制御を詳細に検討して抗癌剤耐性機序を明らかにし、新たな卵巣明細胞腺癌の治療を考案することを目的とする。

### 3. 研究の方法

HNF-1betaを安定的にノックダウンした明細胞癌培養細胞TUOC1と、HNF-1betaを過剰発現させた明細胞癌培養細胞ES2に抗癌剤、紫外線、放射線など様々なDNA損傷をあたえ、DNAアレイ、蛋白アレイ、リン酸化蛋白アレイを行い遺伝子の発現比較解析を行う。これによりHNF-1betaによるDNA損傷チェックポイントの制御遺伝子を特定する。さらに明細胞腺癌の新たな治療戦略となりうるchk1 inhibitor併用による薬剤抵抗性の改善を証明する。

(1) 転写因子HNF-1betaが制御するDNA損傷チェックポイントの制御遺伝子の特定

明細胞癌培養細胞においてHNF-1betaの有無により変動する遺伝子群の網羅的解析  
卵巣明細胞腺癌株のHNF-1betaをノックダウンし、HNF-1betaの有無により発現が有意に変化する遺伝子群を調べる。ノックダウンした細胞からDNAおよび蛋白を抽出してDNAアレイ、蛋白アレイ、リン酸化蛋白アレイなどの生物学的手法を用いてチェックポイント関連遺伝子・蛋白の網羅的な発現比較解析を行う。HNF-1betaを過剰発現させた明細胞癌培養細胞株でも同様の発現比較解析を行う。

明細胞癌培養細胞にDNA損傷を与えHNF-1betaの発現有無により変動する遺伝子群の網羅的解析  
HNF-1betaを安定的にノックダウンした明細胞癌培養細胞TUOC1と、HNF-1betaを過剰発

現させた明細胞癌培養細胞 ES2 に抗癌剤、紫外線、放射線など様々な DNA 損傷をあたえ、DNA アレイ、蛋白アレイ、リン酸化蛋白アレイを行い、HNF-1beta ターゲット遺伝子群の発現比較解析を行う。特に、チェックポイント関連タンパクの中で、ATM・ATR・Chk1・Chk2・p53・BRCA1・cdc25C・cdc2 のリン酸化の動態を調べるにより HNF-1beta がチェックポイント機構にどのように作用しているかを明らかにする。

#### (2) HNF-1beta 発現低下による抗癌剤耐性克服への影響について

HNF-1beta 過剰発現およびノックダウンした細胞株に白金製剤やタキサン系を添加し、抗癌剤耐性克服を確認する。HNF-1beta の有無による抗癌剤添加後の死細胞の増加を flow cytometry 解析によって客観的に調べる。また細胞周期解析も行い、HNF-1beta がどの細胞周期に関与しているかも明らかにする。

#### (3) HNF-1beta による遺伝子修復機構への影響について

DNA 損傷によりチェックポイント機構が働き、細胞はアポトーシスへの誘導や遺伝子修復が行われる。これまでの実験で HNF-1beta がチェックポイント機構を過剰に活性化することが明らかになった。この過剰なチェックポイント機構の活性化により細胞周期は停止し、抗癌剤による細胞死への誘導が阻害されていた。しかし、細胞周期が停止している間に遺伝子修復が行われているかについては調べられていない。DNA 損傷のマーカーである H2AX を指標として HNF-1beta の遺伝子修復能への影響を明らかにする。

#### (4) inhibitor 併用による薬剤抵抗性改善の証明

明細胞癌培養細胞を用いて上記実験の結果同定された HNF1beta が制御するチェックポイント遺伝子の inhibitor を使用し、MTT 法および CD-DST 法による in vitro 試験法により抗癌剤感受性比較試験を行い、抗癌剤の感受性が改善されていることを実証実験する。具体的には明細胞腺癌における標準治療薬である CDDP、CBDCA などのプラチナ製剤、PTX、TXL などのタキサン製剤およびトポイソメラーゼ I 阻害剤 CPT-11 による抗癌剤感受性比較試験を行いその感受性改善効果を証明する。また flow cytometry を使用し、抗癌剤添加後の経時的な細胞周期の変化を解析し、inhibitor の至適添加時期を決定する。

### 4. 研究成果

(1) 卵巣癌培養細胞において HNF-1beta を siRNA でノックダウンすると抗アポトーシスに関与する BCL2L1、CFLAR でも HNF-1beta のノックダウンにより発現量が優位に低下していることがあきらかとなった。その他にも HNF-1beta は細胞接着、遊走活性亢進作用、

薬剤耐性に関与する遺伝子を制御している可能性が示唆された。(図1)

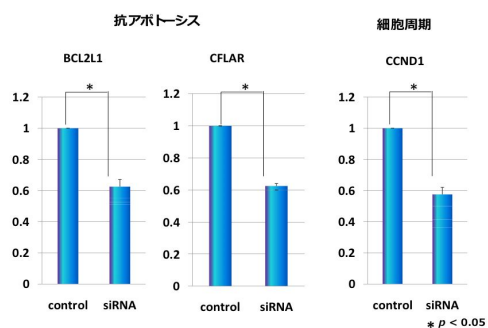


図1 HNF-1beta により変動する遺伝子

(2) HNF-1beta を安定的にノックダウンした明細胞癌培養細胞 TUOC1 を使用し、抗癌剤、紫外線、放射線など様々な DNA 損傷をあたえ HNF-1beta の有無による挙動の差を調べたところ、HNF-1beta(+)細胞では chk1 タンパクのリン酸化に異常を認めた。特に放射線(図2)とプレオマイシン添加によりその差は明らかであった。HNF-1beta(+)では Chk1 のリン酸化の解除がなされていなかった。

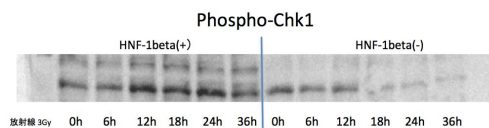


図2 放射線照射による Chk1 リン酸化

持続的な chk1 タンパクのリン酸化、つまり持続的なチェックポイント機構の活性化はアポトーシスへの誘導が阻害されるだけでなく、遺伝子不安定性につながる。これが子宮内膜症からの癌化機序の一つの要因の可能性がある。

(3) Chk1 タンパクの過剰なリン酸化が抗癌剤耐性の要因となっている可能性が示唆されたため、次にリン酸化を解除する inhibitor を使用することにより、抗癌剤の感受性を増加させることができるか検討した。HNF-1beta(+)である卵巣明細胞腺癌株 TUOC1 にプレオマイシンと chk1 inhibitor を同時に添加したところ、FACS では細胞周期が乱れるのみで死細胞の増加を認めなかった。これは抗癌剤添加時から inhibitor を加えるとチェックポイントシステムそのものが働かないため細胞周期が混乱し、また抗癌剤の DNA 損傷に対する細胞死も誘導されなくなったと考えられる。そこでプレオマイシンを添加して6時間後に chk1 inhibitor を添加したところ FACS によりチェックポイントの作動と解除、それに伴う死細胞の増加を認めた。

chk1 inhibitor の添加時間の検討が必要だが、抗癌剤感受性を高める新しい治療戦略についての可能性が見出された。

#### 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 6 件)

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 Jun;24(5):838-43. doi: 10.1097/IGC.000000000000136. 査読有

Kobayashi H, Imanaka S, Nakamura H, Tsuji A. Understanding the role of epigenomic, genomic and genetic alterations in the development of endometriosis (review). *Mol Med Rep*. 2014 May;9(5):1483-505. doi: 10.3892/mmr.2014.2057. 査読有

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.

<http://www.spandidos-publications.com/ol> 査読有

Kobayashi H, Higashiura Y, Shigetomi H, Kajihara H. Pathogenesis of endometriosis: the role of initial infection and subsequent sterile inflammation (Review). *Mol Med Rep*. 2014 Jan;9(1):9-15. doi: 10.3892/mmr.2013.1755. 査読有

Tanase Y, Furukawa N, Kobayashi H, Matsumoto T. Malignant Transformation from Endometriosis to Atypical Endometriosis and Finally to Endometrioid Adenocarcinoma within 10 Years. *Case Rep Oncol*. 2013 Sep 21;6(3):480-4. doi: 10.1159/000355282. 査読有

Kobayashi H, Uekuri C, Shigetomi H. Towards an understanding of the molecular mechanism of endometriosis: unbalancing epithelial-stromal genetic conflict. *Gynecol Endocrinol*. 2014 Jan;30(1):7-15. doi: 10.3109/09513590.2013.831832. 査読有

#### [学会発表](計 3 件)

Hiroshi Shigetomi, Yoriko Yoshizawa, Seiji Kanayama, Ryuji Kawaguchi, Hiroshi Kobayashi, Tamotsu Sudo. Anticancer agents combined with Chk1 inhibitor sensitize HNF-1beta overexpressing clear cell adenocarcinoma of the ovary 第71回日本癌学会、2012年9月19日、札幌  
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 第12回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 2103年7月5日 奈良

Hiroshi Shigetomi, Yoriko Yoshizawa, Seiji Kanayama, Ryuji Kawaguchi, Hiroshi Kobayashi, Tamotsu Sudo, Yoshihiko Yamada HNF-1beta controls claspin expression, sustaining chk1 protein phosphorylation in clear cell carcinoma of ovary. 第72回日本癌学会 2013年10月3日 横浜

#### 6. 研究組織

##### 1) 研究代表者

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

##### (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 SYOZO)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 40347555

川口 龍二 (KAWAGUCHI RYUJI)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 50382289