

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592526

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌の抗癌剤耐性克服による新規治療法の開発

研究課題名(英文) development by overcoming resistance to anticancer drugs against ovarian clear cell adenocarcinoma

研究代表者

金山 清二 (KANAYAMA, Seiji)

近畿大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10423914

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)：卵巣明細胞腺癌に特異的に発現する遺伝子として、HNF1-betaを同定し、HNF1-betaとDNA損傷チェック機構との関連について検討したところ、HNF1-beta陽性細胞ではチェックポイント機構の主要制御因子であるchk1タンパクが持続的にリン酸化していることが確認された。さらにchk1の自己リン酸化にはclaspinタンパクの関与があきらかとなった。これまでのわれわれの検討から、卵巣明細胞腺癌では、HNF1-betaは何らかの機序でclaspinを分解抑制、発現維持を介してchk1の過剰な活性化を誘導し、ブレオマイシンによるアポトーシスが阻害され抗癌剤抵抗性を示していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：As the gene which specifically emerged for an ovarian light cell adenocarcinoma, I identified HNF1-beta. Furthermore, after examining an association between HNF1-beta and DNA damage check mechanism, what the chk1 protein which was a main control factor of the checkpoint mechanism phosphorylated continuously was confirmed with the HNF1-beta-positive cell. Furthermore, participation of the claspin protein became clear in autophosphorylation of chk1. HNF1-beta broke down claspin by some kind of mechanism, and, for the ovarian light cell adenocarcinoma, it restrained it, and it guided the activation that chk1 was superabundant through expression maintenance, and an apoptosis instruction with the action-related bleomycin was inhibited for G2/M period by the examination of conventional us, and it was confirmed to show anticancer agent resistance

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣明細胞腺癌 抗がん剤耐性 HNF1-beta 細胞周期 c h k 1

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮性卵巣癌の好発年齢は50歳台であり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、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 clear cell adenocarcinoma 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難治性であり、依然予後不良な疾患である。

(2) 近年 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 Hepatocyte NuclearFactor-1beta(HNF1beta)、Osteopontin (SPP1)、RAB9、PIG7 などの遺伝子が過剰発現していることが報告された。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%の陽性率を示す一方、他の組織型での発現率は陰性であった。これらに結果より、HNF1beta は子宮内膜症の癌化や明細胞腺癌における抗癌剤耐性機構に深く関与する候補遺伝子の一つであることが推察された。

## 2. 研究の目的

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。そこで明細胞腺癌に特異的に発現する HNF1beta 遺伝子またはその下流で制御される標的遺伝子に着目し、抗癌剤耐性機構を解明し、抗癌剤感受性亢進を実証して明細胞腺癌の治療成績の改善をめざすことが今回の研究の目的である。

## 3. 研究の方法

具体的な研究目的としてはまず、(1) HNF1beta 発現陰性または過剰発現する細胞株の樹立をめざし、HNF1beta の発現の有無に関して卵巣がんに対する抗癌剤感受性の変化が生じるかどうかを確認する。

(2) つぎに、HNF1beta 遺伝子発現の制御により、抗腫瘍効果の差異を検討する。具体的には主な抗癌剤耐性機構つまり細胞周期調節、細胞外排泄促進、解毒機能亢進、アポトーシス阻害、DNA 修復促進などの減少に差異が生じるかを確認する。(3) HNF1beta 遺伝子により制御される、抗癌剤耐性機構に関わる下流遺伝子を同定する。(4) 同定した標的候補遺伝子の発現を就職することで、抗癌剤感受性の改善を立証し、今後の臨床応用に繋げる

## 4. 研究成果

(1) 卵巣明細胞腺癌に特異的に発現する遺伝子として、HNF-1beta を、細胞株を用いた網羅的解析および臨床検体を用いた免疫染色実験より同定した。次に、(2) HNF-1beta 過剰発現細胞株を用いた抗癌剤感受性実験を行ったところ、各種抗癌剤の中でもブレオマイシンによる細胞毒性から、G2 期での細胞周期を停止させアポトーシスを抑制する現象を解明した。つまり、HNF1beta が細胞周期関連タンパクの制御とに何らかの関与があることが推定された。(3) つぎに、HNF1beta と細胞周期関連制御機構、特に DNA 損傷チェック機構との関連について検討した。

HNF1beta 過剰発現細胞株を用いたリン酸化タンパク発現実験では、チェックポイント機構の主要制御因子である chk1 タンパクが持続的にリン酸化していることが証明された。

(5) HNF1beta 陽性と陰性の細胞株に、Chk1 のリン酸化シグナルを伝える ATM, ATR をそれぞれノックダウンしたが、どちらの場合も HNF1beta 陽性の方が、陰性と比較し、Chk1 のリン酸化が過剰であった。

このことから、HNF1beta は ATM, ATR 以外の経路で Chk1 の過剰なリン酸化を維持していると考えられた。そこで、Chk1 と結合し、Chk1 の自己リン酸化を促進したり、ATM/ATR からの Chk1 のリン酸化を効率よく行ったりするタンパクである Claspin に注目した。

HNF1beta 陽性では、ブレオマイシン添加後の Claspin の過剰発現があった。Claspin を一過ノックダウンすると、Chk1 の過剰なリン酸

化も解消した。

以上のこれまでのわれわれの検討から、卵巣明細胞腺癌では、HNF1betaは何らかの機序で claspin を分解抑制、発現維持を介して chk1 の過剰な活性化を誘導し、プレオマイシンによるアポトーシスが阻害され抗癌剤抵抗性を示していることが確認された。

#### 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 1 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-1β transcription factor: chemosensitivity is regulated by checkpoint kinase CHK1.

Int J Gynecol Cancer. 査読有、2014

Jun;24(5):838-43. doi:

10.1097/IGC.0000000000000136.

[学会発表](計 5 件)

**卵巣明細胞腺癌における転写因子 HNF-1β の DNA 損傷チェックポイント機構の**

**制御.** 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 日本産科婦人科学会、2012 年 4 月 京都

吉元千陽、重富洋志、棚瀬康仁、吉田昭三、大井豪一、小林 浩 チョコレート嚢胞の癌化機序の解明と早期発見方法の確立

生殖医学フォーラム、山口 2014 年 5 月 9 日

吉元千陽、重富洋志、森岡佐知子、伊東史学、棚瀬康仁、春田祥治、金山清二、

吉田昭三、古川直人、大井豪一、小林 浩 チョコレート嚢胞の癌化の早期発見方婦人科バイオマーカー研究会、東京、2014 年 7 月 5 日

重富洋志、金山清二、川口龍二、大井豪一、小林 浩

卵巣内膜症性嚢胞の鉄濃度測定による悪性化診断の有用性、日本癌学会、横浜、2014 年 9 月 25 日

明細胞腺癌における DNA 損傷応答と転写因子 HNF 1beta 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 日本内膜症学会、長崎、2012 年 1 月

[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：  
出願年月日：  
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

金山清二 (KANAYAMA Seiji)  
近畿大学医学部付属病院 講師  
研究者番号：10423914

##### (2) 研究分担者

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  
春田祥治 (HARUTA Shouji)  
奈良県立医科大学医学部 助教

研究者番号：30448766  
小林 浩(KOBAYASHI Hiroshi)  
奈良県立医科大学医学部 教授  
研究者番号：40178330

(3)連携研究者

( )

研究者番号：