

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791700

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌におけるメタボローム解析とオートファジーの役割

研究課題名(英文) Matabolome and Autophagy in Ovarian Clear Cell Carcinoma

研究代表者

山口 建 (Yamaguchi, Ken)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20378772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円、(間接経費) 570,000円

研究成果の概要(和文)： HNF1 遺伝子を抑制した卵巣明細胞腺癌株を用いてメタボローム解析を行ったところ、HNF1 は酸化ストレス発生を抑えながらエネルギーを産生する嫌氣的糖代謝(ワーブルグ効果)を促進し、酸化ストレス耐性に寄与する細胞内グルタチオンが増えることがわかった。マイクロアレイ遺伝子発現解析ではグルタチオンの材料となるシステインを細胞内に取り込む遺伝子SLC3A1の発現が減少していた。SLC3A1遺伝子抑制した細胞株では細胞内グルタチオン濃度が減少し、細胞内の活性酸素種が増加した。

卵巣明細胞腺癌ではHNF1 はワーブルグ効果とグルタチオン濃度を制御することで酸化ストレス耐性に関与することがわかった。

研究成果の概要(英文)： To elucidate HNF1B induces metabolic activities in ovarian clear cell carcinoma (CCC) cells, we assessed comprehensive metabolomic analyses using CE-TOFMS(capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry) between HNF1B knockdown CCC cell line and control cell line. HNF1B changed glu cose metabolism and caused aerobic glucolysis that was well known as the Warburg effect in CCC cells. HNF1 B also increased intracellular glutathione levels through a cystine transporter, SLC3A1, expression. Intra cellular glutathione levels and reactive oxygen species (ROS) were significantly decreased in SLC3A1 knock down cells.

These results suggest that HNF1B contribute to resistance to anti-oxidative stress through the Warburg effect and intracellular glutathione in ovarian clear cell carcinoma.

研究分野：医歯薬学

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：卵巣明細胞腺癌 代謝 アミノ酸トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣明細胞腺癌は細胞内にグリコゲンを貯留するという特異な形態をとり、日本人に多い卵巣癌として知られている。また、生物学的には、子宮内膜症から発生することが多いため他の卵巣癌よりも若年で発症し、抗癌剤耐性や血栓症合併により予後が不良である。臨床的には、その特性から取り扱いが困難な疾患で、他の卵巣癌と異なる取り扱いを要する。

(2) 我々は、子宮内膜症から卵巣明細胞腺癌が発癌する機序が、その内容液に含まれる鉄由来の酸化ストレスが関与することを明らかにした。また、そのような特異な発癌環境から発生する明細胞腺癌は酸化ストレス環境下に発育することを明らかにした。更に遺伝子解析から、明細胞腺癌の特性は発癌環境により誘導されることが分かり、その遺伝子発現は DNA メチル化により整除されていることを示した。一方で、卵巣明細胞腺癌で高発現している HNF1B は細胞内への糖取り込みを亢進させ、嫌氣的糖代謝(解糖系)を亢進させていることを明らかにした。

(3) 近年、癌に特異的な代謝が注目されている。その代表がワールグ効果やオートファジー(自己貪食作用)である。ワールグ効果は、癌細胞は好氣的環境においても嫌氣的糖代謝である解糖系が亢進していることである。卵巣癌では、ストレス環境内に発育し、糖代謝が異常亢進した卵巣明細胞腺癌において代謝やオートファジーの調整が破綻している可能性が高い。本研究は、「卵巣明細胞腺癌におけるオートファジーの制御や代謝の制御を中心に、明細胞腺癌の形態や酸化ストレス耐性機構の解明のための基礎研究」である。

2. 研究の目的

(1) 卵巣明細胞腺癌におけるオートファジー制御因子の検討。

ストレスがない環境では、抗酸化ストレス作用を持つ転写因子 Nrf2 にユビキチンリガーゼ Keap1 が結合し、Nrf2 を恒常的に分解するが、ストレス環境では Keap1 が構造変化を起こして Nrf2 と結合することができず、Nrf2 が恒常的に安定化することで、抗酸化ストレス遺伝子発現を上昇させることが知られている(ストレス応答性)。また、オートファジーにより選択的に分解されるタンパク質である p62 は、オートファジーの抑制により p62 タンパク質が過剰になると、Keap1 による Nrf2 のユビキチン化を競合阻害して Nrf2 を安定化させることが肝臓癌において知られている(p62 依存性)。つまり、酸化ストレス耐性シグナルである Nrf2 転写活性は、ストレス応答性に活性化される場合と p62 依存性に活性化される場合とがある。

まず、卵巣明細胞腺癌において Nrf2 発現や転写活性が亢進しているか確認し、Nrf2 転写因子が LC3 (オートファジー活動性マーカー) や p62 (オートファジーにより制御された NRF2 を活性化する制御因子) と関連があるか検討する。

(2) 卵巣明細胞腺癌における代謝の制御と酸化ストレス耐性制御機構の解析。

卵巣明細胞腺癌において高発現している HNF1B の発現を抑制した卵巣明細胞腺癌細胞株を用いた発現マイクロアレイ解析により、HNF1B は代謝を制御することがわかった。また、アミノ酸輸送体関連遺伝子を多く制御することがわかり、特に HNF1B はアミノ酸輸送体である SLC3A1 遺伝子を制御することがわかった。

HNF1B 発現を抑制した卵巣明細胞腺癌細胞株を用いた網羅的メタボローム解析により、HNF1B が代謝を制御するか検討する。

HNF1B 発現抑制株と SLC3A1 発現抑制株を用いて、細胞内グルタチオン測定、酸化ストレス耐性を行い、酸化ストレス耐性に寄与するか検討する。

3. 研究の方法

(1) 卵巣明細胞腺癌におけるオートファジー制御因子の検討。

卵巣明細胞腺癌における NRF2、LC3、p62 の免疫染色。細胞株における LC3 のウェスタンブロット。

(2) 卵巣明細胞腺癌における代謝の制御と酸化ストレス耐性制御機構の解析。

HNF1B 発現を抑制した卵巣明細胞腺癌細胞株を用いた網羅的メタボローム解析

HNF1B 発現抑制株と SLC3A1 発現抑制株を用いた細胞内グルタチオン測定、酸化ストレス耐性実験。

4. 研究成果

(1) 卵巣明細胞腺癌におけるオートファジー制御因子の検討。

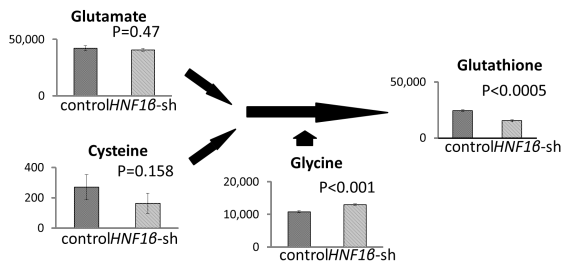
卵巣明細胞腺癌において NRF2 は高発現していたが、LC3、p62 は高発現しておらず、NRF2 との関連は認めなかった。

(2) 卵巣明細胞腺癌における代謝の制御と酸化ストレス耐性制御機構の解析。

網羅的メタボローム解析

HNF1B 発現を抑制した細胞では嫌氣的糖代謝最終産物である乳酸の産生が低下し、好氣的糖代謝の代謝産物であるクエン酸が増加していた。これは HNF1B が嫌氣的糖代謝を促進することを示唆し、ワールグ効果を促進していることになる。また、酸化ストレス耐性に寄与するグルタチオン量が増量していた。グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペ

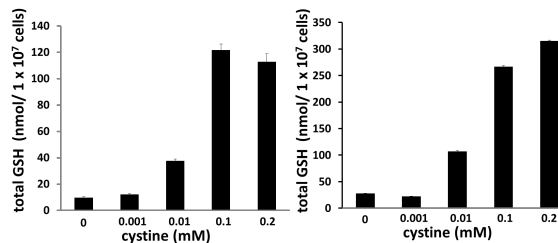
プロドであるが、HNF1B 発現を抑制した細胞ではシスチン量が減っていた。



また、発現マイクロアレイ解析では、HNF1B 発現を抑制した細胞株ではグルタチオン合成酵素遺伝子 (GSS, GCLM, GCLC) の発現に変化はないが、アミノ酸輸送体遺伝子である SLC3A1 遺伝子の発現が有意に減っていた。SLC3A1 はシスチンを細胞内に輸送する分子であり、細胞内に取り込まれたシスチンはシステインとなり、グルタチオンの材料となる。

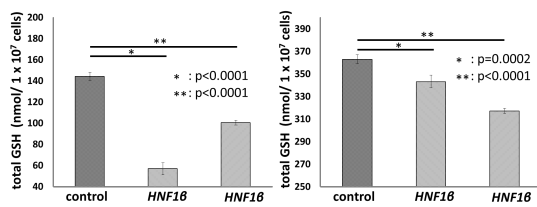
細胞培養液中のシスチン濃度と細胞内グルタチオン濃度。

シスチン濃度依存性にグルタチオン濃度が変化し、グルタチオンはシスチン (システイン) が律速物質となっていることがわかった。



HNF1B 発現抑制細胞株を用いた酸化ストレス実験。

HNF1B 発現抑制細胞株はコントロール株と比較して有意に細胞内のグルタチオン濃度が減り、活性酸素種が増えていた。

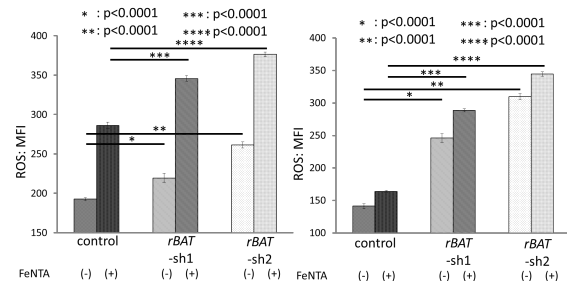


また、鉄による酸化ストレス (FeNTA) を負荷すると HNF1B 発現抑制細胞株はコントロールと比較すると有意に細胞死に至った。これらの結果は、HNF1B は細胞内の活性酸素種を減らし、酸化ストレス耐性に寄与すること

を示唆する。

SLC3A1 発現抑制細胞株を用いた酸化ストレス実験。

SLC3A1 発現抑制細胞株はコントロール株と比較して有意に細胞内のグルタチオン濃度が減り、活性酸素種が増えていた。



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5件)

Epigenetic determinants of ovarian clear cell carcinoma biology.

Yamaguchi K, Huang Z, Matsumura N, Mandai M, Okamoto T, Baba T, Konishi I, Berchuck A, Murphy SK.

Int J Cancer. 2014 Aug 1;135(3):585-97. doi: 10.1002/ijc.28701.

Hepatocyte nuclear factor-1 (HNF-1) promotes glucose uptake and glycolytic activity in ovarian clear cell carcinoma.

Okamoto T, Mandai M, Matsumura N, Yamaguchi K, Kondoh H, Amano Y, Baba T, Hamanishi J, Abiko K, Kosaka K, Murphy SK, Mori S, Konishi I.

Mol Carcinog. 2013 Sep 17. doi: 10.1002/mc.22072. [Epub ahead of print]

「遺伝子発現マイクロアレイに基づく卵巣癌の予後予測」

松村謙臣、山口建、小西郁生

予後予測因子の新知見

PROGRESS in Ovarian Cancer Management Vol.1 No.1 2013, p.39-43 メディカルビュー社

次世代の婦人科がん治療を展望する

「ゲノムワイドな解析に基づく卵巣癌の新規治療法の開発」

松村謙臣、山口建、万代昌紀、小西郁生

産婦人科の実際 Vol.62, No.3; 307-313, 2013

万代昌紀、山口建、松村謙臣、岡本尊子、

天野泰彰、馬場長、小西郁生

「卵巣明細胞腺癌における特異的遺伝子発現と分子標的治療への展開」
産科と婦人科 79: 1279-1284、2012

〔学会発表〕(計7件)

「転写因子 HNF1 は、腫瘍代謝を誘導することで、卵巣明細胞腺癌の酸化ストレス耐性に寄与している / HNF1 contributes to the ROS resistance of ovarian clear cell carcinoma cells, modifying its metabolic process」

天野 泰彰、山口 建、万代 昌紀、松村 謙臣、馬場 長、濱西 潤三、吉岡 弓子、安彦 郁、奈倉 道和、Abou-Taleb Hisham、村上 隆介、山ノ井 康二、小西 郁生

第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 3 日～5 日、横浜市、パシフィコ横浜

“ HNF-1 confers resistance to oxidative stress of ovarian clear cell carcinoma. ”

Yasuaki Amano, Ken Yamaguchi, Masaki Mandai, Noriomi Matsumura, Junzo Hamanishi, Tsukasa Baba, Koji Yamanoi, Susan K Murphy, Ikuo Konishi

An AACR Special Conference on Advances in Ovarian Cancer Research, 平成 25 年 9 月 18 日～21 日、フロリダ州マイアミ、J.W. Marriott Marquis Miami

「転写因子 HNF1 は、アミノ酸輸送体 rBAT を介して、卵巣明細胞腺癌の酸化ストレス耐性に寄与する」

天野泰彰、山口建、馬場長、濱西潤三、吉岡弓子、安彦郁、奈倉道和、村上隆介、山ノ井康二、松村謙臣、小西郁生

第 54 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、H25 年 7 月 19 日～21 日、東京、ホテルグランパシフィック LE DAIBA

「卵巣明細胞腺癌において、転写因子 HNF1 はアミノ酸輸送体を介して腫瘍性代謝を制御し、酸化ストレス耐性に寄与する」

天野泰彰、万代昌紀、山口建、松村謙臣、馬場長、濱西潤三、吉岡弓子、安彦郁、奈倉道和、村上隆介、山ノ井康二、小西郁生

第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 25 年 5 月 10 日～12 日、札幌市、ロイトン札幌 / ホテル札幌芸文館 / 札幌プリンスホテル / 札幌市教育文化会館

「卵巣明細胞腺癌における ROS 耐性には、転写因子 HNF1 の発現が関与している」

天野泰彰、万代昌紀、山口建、松村謙臣、馬場長、濱西潤三、吉岡弓子、安彦郁、奈倉道和、小西郁生

第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日～21 日、札幌市、ロイトン札幌 / さっぽろ芸文館 / 札幌市教育文化会館

「卵巣明細胞腺癌の酸化ストレス耐性 ; in vivo における検討」

天野泰彰、万代昌紀、山口建、小阪謙三、松村謙臣、馬場長、濱西潤三、吉岡弓子、安彦郁、奈倉道和、小西郁生

第 52 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会、2012 年 7 月 19 日～21 日、東京、東京グランドプリンスホテル新高輪

「卵巣明細胞腺癌に特異的に発現する HNF1 は、ROS 耐性に関与している」

天野泰彰、万代昌紀、山口建、小阪謙三、松村謙臣、馬場長、濱西潤三、吉岡弓子、安彦郁、Hisham Ahed el-sayed abou-taleb、岡本尊子、小西郁生

第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会、2012 年 4 月 13 日～15 日、神戸市、神戸ポートピアホテル / 神戸国際展示場

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山口 建(YAMAGUCHI KEN))

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 20378772