

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462604

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌の細胞周期チェックポイント機構修飾による新規治療法の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the new treatment by modification of cell cycle checkpoint mechanism for ovarian clear cell adenocarcinoma

研究代表者

吉田 昭三 (YOSHIDA, SHOZO)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40347555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：難治性卵巣明細胞腺癌において転写因子HNF-1betaがDNA損傷チェックポイント機構に重要なChk1のリン酸化活性を維持させ、細胞死の誘導を阻害し抗がん剤抵抗性を示すこと明らかとした。その機序として、HNF-1betaは脱ユビキチン化酵素であるUsp28の過剰発現を介してClaspinの分解を抑制することで、Chk1の自己リン酸化を促進させることが示された。Claspin,Usp28の一過性ノックダウンやChk1阻害剤の併用で、抗がん剤抵抗性が改善されたため、Usp28,Claspin,Chk1は、難治性卵巣明細胞腺癌の新たな治療戦略のターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： Ovarian clear cell adenocarcinoma (OCCA) shows anticancer drug resistance. We reported that HNF-1beta might sustain Chk1 protein phosphorylation to arrest the cell cycle and inhibit cell death induced by an anticancer agent. As the mechanism of sustained Chk1 phosphorylation, we showed that HNF-1beta inhibited the ubiquitylation of Claspin through the overexpresses Usp28 which was a deubiquitinating enzyme. Transient knocking-down of Claspin or Usp28 in HNF-1beta expressing cells increased cell death and improved chemoresistance after the addition of bleomycin which oxidatively cleaved DNA. Combination anticancer drugs with Chk1 inhibitors also induced cell death and increased chemosensitivity. Usp28, Claspin and Chk1 may be new targets of treatment in OCCA.

研究分野：産婦人科

キーワード：卵巣明細胞腺癌 HNF-1beta チェックポイント機構 Chk1 Claspin Usp28

1. 研究開始当初の背景

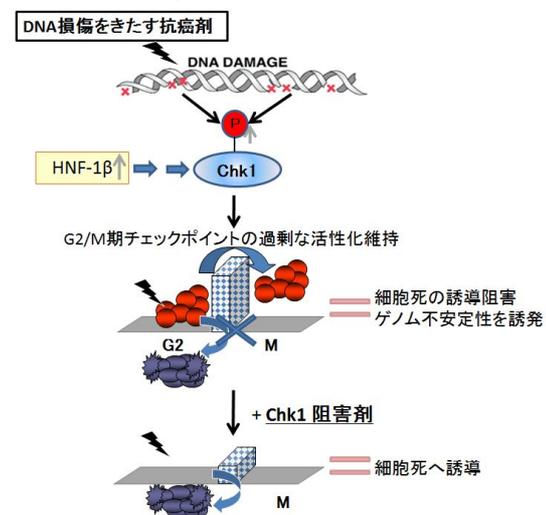
上皮性卵巣癌の一般的な組織型は漿液性腺癌で、その約70%は、中期の進行癌であるが、白金製剤を主体とする癌化学療法に対する感受性は比較的良好である。一方、明細胞腺癌は、約60%は、早期癌であるにも関わらずシスプラチンなどの白金製剤を中心とした化学療法に低感受性で、残存・再発病変のコントロールは極めて難しく、患者の予後やQOLを損なうことが多い。この明細胞腺癌特有の性質には、癌の発生に至るプロセスが重要な役割を担っている可能性がある。明細胞腺癌の発生には子宮内膜症内で起こる継続的な出血が重要な因子であることが示唆されている。従って明細胞腺癌の過剰鉄による発癌機構を明らかにすることは、新しい治療戦略、さらには予防方法の確立のために極めて意義深いと考えられる。

これまで我々は、鉄の活性酸素による明細胞腺癌の発癌という仮説を確かめるために、明細胞腺癌に特異的に発現する遺伝子群をマイクロアレイにより網羅的に検索した。その結果、卵巣明細胞腺癌で過剰発現している遺伝子として HNF-1beta (hepatocyte nuclear factor-1beta), DPPIV, G6Pase, GLUT2, GK (グリコーゲン蓄積に關与する遺伝子群) osteopontin, ACE2, FXD2, TFPI2, NNMT, LITAF/PIG7, RBPM5, GLRX, ASK1, ANXA4, and UGT1A1 (酸化ストレス、解毒機構、抗癌剤耐性に關与する遺伝子群)を同定した。(Yoshida S. et al. 2009)

これらの遺伝子のプロモータ領域を調べると、そのほとんどの遺伝子の5'には転写因子である HNF-1beta の結合部位が存在した。HNF-1beta の下流には酸化ストレス遺伝子、グリコーゲン代謝遺伝子、抗アポトーシス関連遺伝子、薬剤解毒遺伝子が存在し、卵巣明細胞腺癌の臨床病理学的性格を反映しているものと思われる。そこで HNF-1beta がいかにして明細胞腺癌の発癌、抗癌剤耐性をもたらすのかを検討した。

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。またチェックポイント機構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。つまり、チェックポイント機構の破綻は癌化につながるだけでなく、抗癌剤耐性をもたらす可能性がある。これまでの研究で HNF-1beta がチェックポイントタンパクである chk1 の過剰なリン酸化をもたらし、抗癌剤耐性やゲノム不安定性を誘発していることを明らかにした(下図)。また抗癌剤と chk1 阻害剤の併用による抗腫瘍効果の増

強も確認した。



2. 研究の目的

卵巣明細胞腺癌は欧米人に比べ日本で多く、化学療法に抵抗性を示すため予後が悪い。これまで我々は、子宮内膜症患者の0.72%が十数年後に明細胞腺癌へがん化することを証明した。そのがん化には異所子宮内膜において長期にわたる出血から生じる活性酸素や慢性炎症が重要な因子であると考えられている。また子宮内膜症と卵巣明細胞腺癌に共通して過剰発現している転写因子 HNF-1beta が DNA 損傷チェックポイント機構の異常をもたらしがん化を促進している可能性を明らかにした。チェックポイント機構は、発癌から抗癌剤耐性まで癌の性質を決定付ける重要な因子である。本研究では、明細胞腺癌へのがん化の機序を、チェックポイント機構から解明し、新たな発癌機序の解明と治療戦略の構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 過剰な chk1 タンパクのリン酸化をもたらす制御遺伝子の特定

明細胞癌培養細胞において DNA 損傷により変動する遺伝子の解析

HNF-1beta を発現している明細胞癌培養細胞 TUOC1 と安定的にノックダウンした細胞を用いて、特にチェックポイント関連タンパクである ATM・ATR・Chk1・Chk2・p53・BRCA1・cdc25C・cdc2 などの動態を調べるにより chk1 タンパクの過剰なリン酸化をもたらす因子について解明する。

明細胞癌培養細胞における ATM、ATR の機能解析

HNF-1beta を発現している明細胞癌培養細胞 TOV21G の ATM、ATR を siRNA を用いて一過性ノックダウンさせ、DNA 損傷に対する挙動の差、chk1 タンパクのリン酸化の程度を比較し過剰な chk1 タンパクのリン酸化をもたらす因子を明らかにする。

(2) Claspin の発現とその制御機構

DNA 損傷に対する Claspin の発現

Chk1 と複合体を形成し、Chk1 の自己リン酸化を促進させる Claspin に着目し、DNA 損傷に対して HNF-1beta の有無により Claspin の発現に差があるのかをウェスタンブロットを用いて評価した。また、Claspin をノックダウンすることで、Chk1 の過剰なリン酸化が解除されるかを評価した。

HNF-1beta による Claspin 制御機構の解明

卵巣明細胞腺癌株 TOV21G に si RNA を用いて HNF-1beta を一過性ノックダウンし、DNA 損傷を与えた際の Claspin の mRNA を評価した。また、Claspin はユビキチン化により分解されるため、DNA 損傷を与えた際のユビキチン化された Claspin の発現を評価した。

(3) 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 Chk1 inhibitor を使用し、MTT 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。また、Claspin、Usp28 を一過性ノックダウンすることで、抗がん剤感受性が改善されるかも検討した。

4. 研究成果

(1) 過剰な chk1 タンパクのリン酸化をもたらす制御遺伝子の特定

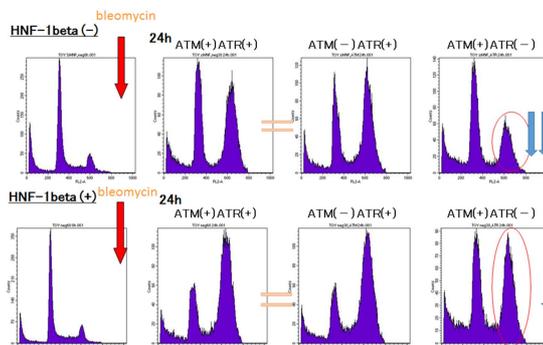
プレオマイシンは金属イオンを補因子としてキレートし、分子状酸素を活性化することフリーラジカルを作って DNA を損傷すると考えられている。卵巣内膜症性嚢胞内の過剰鉄による DNA 損傷のモデルになり得ると考え、DNA 損傷刺激としてプレオマイシンを用いた。

明細胞癌培養細胞において DNA 損傷により変動する遺伝子の解析

プレオマイシンによる DNA 損傷刺激において、HNF-1beta は Chk1 の過剰な自己リン酸化を維持していたが、Chk1 総量やその他のチェックポイント関連タンパクである ATM・ATR・Chk2・p53・BRCA1 などの動態に差は認めなかった。

明細胞癌培養細胞における ATM、ATR の機能解析

ATM をノックダウンしても Chk1 のリン酸化に変化はほとんど認めなかった(下図)。ATR を一過性ノックダウンした際、Chk1 のリン酸化は減少したが、それでもなお HNF-18 陽性の場合には陰性と比較し、Chk1 の過剰なリン酸化活性によって細胞周期の停止が引き起こされていた(下図)。以上の結果から、HNF-18 は ATM/ATR を介さずに Chk1 の過剰なリン酸化を引き起こしている可能性が示された。



(2) Claspin の発現とその制御機構

DNA 損傷に対する Claspin の発現

HNF-18 を一過性ノックダウンし、プレオマイシンを添加した際の Claspin の発現をウェスタンブロットで評価した。結果、HNF-18 は Claspin の過剰な発現を介して Chk1 の自己リン酸化を促進していることが示された。また、HNF-18 陽性細胞に Claspin を一過性ノックダウンしたところ、Chk1 の過剰な自己リン酸化は解除され、HNF-18 陰性細胞と同様の挙動を示した。

HNF-1beta による Claspin 制御機構の解明

HNF-1beta の有無で DNA 損傷に対する Claspin の mRNA の発現を検討したところ両者に差を認めなかったため、ユビキチン化による分解系に着目した。その結果、HNF-1beta は DNA 損傷に対し Claspin のユビキチン化を減少させることで、その発現を維持することがわかった。次に Claspin のユビキチン化に参与する Plk、Usp28、Usp29 等の発現をウェスタンブロットで検討した結果、HNF-1beta は脱ユビキチン化酵素である Usp28 を過剰に発現させ、Claspin の分解を抑制し、Chk1 の自己リン酸化を維持させていることが示された。

(3) Inhibitor 併用による薬剤抵抗性改善の証明

HNF-18 陽性の明細胞癌培養細胞は Chk1 のリン酸化が維持されるため細胞周期停止が持続し、抗がん剤抵抗性を示すため、プレオマイシン添加後 48 時間後の生存率は、HNF-18 陰性細胞と比較し有意に高い。

プレオマイシンと Chk1 inhibitor の同時投与では FACS にて細胞周期の変化は認められるものの細胞死の増加はなかったが、プレオマイシン投与 24 時間後に Chk1 inhibitor を併用した場合、FACS にて subG1 が増加し、細胞死が誘導されることが示された。

また、HNF-1beta 陽性の明細胞癌培養細胞において Claspin や Usp28 を一過性ノックダウンすると、プレオマイシン添加後 48 時間後の死細胞が有意に増加し、抗がん剤抵抗性が改善した。

従って、Chk1、Claspin、Usp28 は難治性

卵巣明細胞腺癌の抗がん剤抵抗性を改善させる新たな治療標的となる可能性がある。

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 3件)

Kobayashi H, Shigetomi H, Yoshimoto C. Checkpoint kinase 1 inhibitors as targeted molecular agents for clear cell carcinoma of the ovary. *Oncol Lett.* 10(2):571-576, 2015 Aug. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4508996/>

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.* 24(5):838-43, 2014 Jun. (査読有)
doi: 10.1097/IGC.000000000000136.

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. *Oncol Lett.* 6(5):1163-1173. 2013 Nov. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813717/>

〔学会発表〕(計 4件)

吉元千陽、須藤 保、伊東史学、重富洋志、成瀬勝彦、佐道俊幸、小林 浩。転写因子 HNF-1β は卵巣明細胞腺癌において Usp28 の発現を介して Claspin-Chk1 のリン酸化を維持させる。第 68 回日本産婦人科学会学術講演会。2016 年 4 月 21 日 24 日、東京国際フォーラム

Uekuri C, Shigetomi H, Kanayama S, Kawaguchi R, Yoshida S, Furukawa N, Oi H, Kobayashi H, Sudo T. HNF-1β controls claspin expression, sustaining chk1 protein phosphorylation in clear cell adenocarcinoma of ovary. 第 66 回日本産婦人科学会学術講演会。2014 年 4 月 18 日-20 日、東京国際フォーラム

Uekuri C, Shigetomi H, Kanayama S, Kawaguchi R, Yoshida S, Furukawa N, Oi H, Kobayashi H. Investigation of the role of Hepatocyte Nuclear Factor-1 beta

(HNF-1β) in the cell cycle checkpoint of clear cell adenocarcinoma in the ovary. 2014 Annual Congress of Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology. March 8-9, 2014. Taipei, Taiwan.

4. 重富洋志, 他. 転写因子 HNF-1β は卵巣明細胞腺癌において Claspin の発現を抑制し、chk1 タンパクのリン酸化を維持させる。第 72 回日本癌学会学術総会。2013 年 10 月 3 日-5 日、パシフィコ横浜

〔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

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

(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

大井 豪一 (OI, Hidekazu)
近畿大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 10283368

吉元千陽 (YOSHIMOTO, Chiharu)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00526725