

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670179

研究課題名(和文) HNF-1 による卵巣明細胞腺癌の早期血清診断法確立と新規分子標的薬開発への展開

研究課題名(英文) Transcriptional upregulation of HNF-1beta by NF-kB in ovarian clear cell carcinoma modulates susceptibility to apoptosis through alteration in bcl-2 expression

研究代表者

梶田 咲美乃 (Kajita, Sabine)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60194734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞癌(CCA)臨床検体においてHNF-1の発現は活性化NF- κ B/p65の発現と相関していた。また、癌の低核異型及び非充実性増殖様式と相関した。CCA細胞株においてTNF- α で核内p65とHNF1の発現増加がみられ、HNF1プロモーター領域+89～+179の範囲にp65の結合部位の存在が示唆された。HNF1ノックダウンでアポトーシスが増加しbcl-2/bax比の低下を認めた。外因性HNF1 α でbcl-2のプロモーター活性が増強した。以上の結果から、CCAではNF- κ Bにより誘導されるHNF-1がbcl-2遺伝子の転写を促進し、ミトコンドリア依存性アポトーシス経路を抑制する。

研究成果の概要(英文)：In clinical samples, HNF-1 expression was positively correlated with the active form of NF- κ B/p65 in clear cell carcinomas (CCA), and closely linked with a low nuclear grade and non-solid architecture. In cell lines, transfection of p65 resulted in increased HNF-1 mRNA and protein expression, in line with activation of the promoter. Suppression of HNF-1 expression increased apoptosis in cells, while treatment of cells stably overexpressing exogenous HNF-1 with doxorubicin abrogated apoptosis of the cells, along with increased ratio of bcl-2 relative to bax. Moreover, overexpression of HNF-1 led to upregulation of bcl-2 expression at the transcriptional level in TOV-21G cells. These data, therefore, suggest that association between HNF-1 and NF- κ B signaling may participate in cell survival by alteration of apoptotic events, particularly in mitochondria-mediated pathways, through upregulation of bcl-2 expression in OCCCs.

研究分野：人体病理学

キーワード：HNF-1beta NF- κ B 卵巣明細胞癌 bcl2 アポトーシス 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦における卵巣明細胞腺癌(以下、CCA)発生率は、上皮性卵巣腫瘍の約20%で、欧米の4~6%に比して極めて高い。現在、CCAの前癌病変の1つである子宮内膜症性嚢胞は、40歳代で6cm以上、閉経後は大きさによらず全て摘出することが推奨されているが、手術侵襲や術後後遺症等のリスクを考慮すると、CCA合併を予知する非観血的早期診断法の確立が望まれる。加えて、抗がん剤の低感受性のCCA再発例には効果的な治療法がないため、その新規治療法の開発は急務を要する。

(2) 卵巣癌培養細胞の網羅的な解析から、転写因子であるHepatocyte nuclear factor (HNF)-1が、CCAで高発現することが報告されたが、その機能解析は殆ど進んでいない。申請者は、これまでの先行実験で、高HNF-1発現が、CCAおよび前癌病変である子宮内膜症性嚢胞異型上皮で認められる、CCA内のHNF-1陽性部は、アポトーシス及び細胞増殖能が低値を示す、卵巣癌培養細胞でのsiRNAによる内因性HNF-1遺伝子のノックダウンによりアポトーシス誘導と細胞増殖亢進が生じる、等の所見を見出した。これらの結果から、HNF-1は、endometriosis-CCA sequenceにおいて、アポトーシスおよび細胞増殖の制御に中心的役割を演じる可能性が推測され、本分子の発現・機能解析により、CCAの早期診断法および新規治療法の開発が急速に展開できるとの立案に至った。

2. 研究の目的

(1) HNF-1発現制御系をepigenetic、転写・翻訳レベルで、その機能をアポトーシス・細胞増殖制御機構の観点から解析する。

(2) 血清エクソソームを利用したHNF-1検出によるCCAの血清早期診断法を確立する。

(3) HNF-1に対する分子標的薬の開発を含むCCAの新規治療法の分子基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体材: 2002~2012年までに北里大学病院で外科的切除され、WHO分類(2003)に基づいて組織診断されたOCCC症例計94例を対象とした。腫瘍は細胞核の形態により3つに分類した。組織構造は充実性増殖と乳頭状~腺管嚢胞状増殖に分類した。

対照例として、39例の子宮内膜症性嚢胞、19例の異型子宮内膜症、漿液性腺癌、粘液性腺癌、類内膜腺癌をそれぞれ10例ずつ検索した。

(2) 免疫染色(IHC)

Microwave法による抗原賦活化とpolymer immunocomplex法の組み合わせで行った。免疫染色結果については細胞質の陽性所見をスコア化した。また、細胞1000個中の陽性細胞のカウントによるlabeling index(/100cell)も測定した。

(3) HE標本でアポトーシス細胞をカウントした。また、*In Situ Cell Death Detection Kit*(Roche)で検出したアポトーシス細胞をカウントした。

(4) HNF-1発現プラスミドとHNF-1、bcl-2およびGlut-1プロモーター領域を含むreporter constructsを作製した。CCA培養細胞株としてTOV-21G、OVISe、OVTOKO、および子宮内膜癌細胞株Hec251を用いた。また、Hec251細胞でHA-HNF-1恒常発現細胞を作製した。

(5) LipofectAMINE PLUS (Invitrogen)で各種プラスミドをTransfectionした。ルシフェラーゼアッセイでプロモーター活性を測定した。HNF-1のsiRNA2種はsiPORT NeoFX transfection agent(Ambion, Austin, TX, USA)を用いて導入した。

(6) RT-PCR法とWestern blot法、フローサイトメトリを型通りに行った。

(7) ChIP(クロマチン免疫沈澱法)をEpiXplore ChIP assay kitで行った。

(8) 得られたデータは、Mann-Whitney U検定、 χ^2 検定、ピアソンの積率相関係数を用いて検定した。

4. 研究成果

(1) CCA及び関連疾患の免疫組織学的検討: HNF-1、pp65、HNF-4、HIF-1は上皮性細胞の核に陽性所見を認めた(図1)。また、Glut-1は上皮性細胞及び赤血球の細胞膜に陽性所見を認めた。

平均IHCスコアでは、HNF-1とpp65の両

IHC スコアは低核異型群と異型内膜症性嚢胞上皮において有意に高かった。一方で、HNF-4、Glut-1、Ki-67 LI は、内膜症性嚢胞上皮から核異型の増加とともに段階的に増加した。HNF-1 と pp65 の IHC スコアは、非充実型が s 充実型と比較して有意に高かった。反対に Glut-1、Ki-67 LI のスコアは充実型が有意に高くなった。

CCA において HNF-1 平均スコアは pp65 のみと正の相関関係にあり、Ki-67 LI は HNF-1 と弱い負の相関関係にあった。また、HNF-4、HIF-1、Glut-1 は他の免疫染色スコアのいずれにも有意な相関を示さなかった。

卵巣癌組織型ごとに比較すると、CCA は他の 3 つの組織(漿液性、粘液性、類内膜性嚢胞)と比較して HNF1 と pp65 の IHC スコアが有意に高かった。

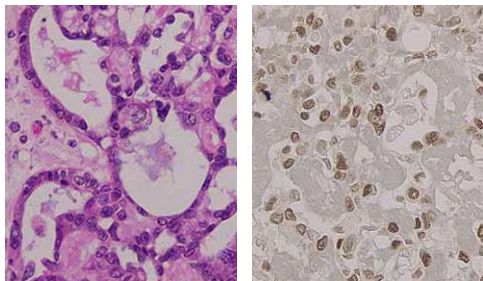


図 1 . CCA における HNF-1 の免疫染色所見

(2) p65 の HNF-1 の転写活性化作用

p65 による HNF1 転写活性促進機構 :

培養細胞 TOV-21G 及び Hec251 を、TNF-20ng/ml で処理した。TOV-21G は 1 時間(h) 経過後に核内 p65 タンパクの増加がみられ、HNF-1 mRNA は弱く増加したが、内因性 HNF-1 タンパク質が多く、刺激に伴う HNF-1 のタンパク質レベルでの増加は不明瞭だった。一方 Hec251(内因性 HNF-1 発現が弱い)は 0.5h 経過後に HNF-1 mRNA 発現増加を示した。Western blot 法でも 1h 経過後より HNF-1 のタンパクレベルでの増加が確認された。NF- κ B シグナル系の HNF-1 転写作用について検討するため、TOV-21G へ p65 遺伝子の一過性導入を行った。p65 の過剰発現下で、転写レベル及びタンパク質レベルで HNF-1 の発現増加を認めた。また、p65 は用量依存性に、HNF-1 のプロモーター活性を増強した。

HNF-1 プロモーター領域内の p65 結合部位同定 : HNF-1 プロモーター領域を解析すると、HNF-1 プロモーター段階的欠損コンストラクトを用いた検索で、 κ B 配列を含ま

ない最短長のコンストラクト(+86 bp ~ 216 bp)が最も高いプロモーター活性を示した。さらに、ChIP アッセイで p65 結合部位は+89 bp ~ +179 bp 間に存在することを確認した。

(3) アポトーシスと HNF-1 の関連

組織型とアポトーシスの関連 : 平均アポトーシス数、核異型、および組織構造間で比較すると、CCA において、低核異型、非充実型でアポトーシスが有意に高かった。一方、HNF-1 IHC スコアとアポトーシスとの有意な相関は確認できなかった。

HNF-1 のアポトーシス抑制作用 : siRNA を導入し内因性 HNF-1 をノックダウンした TOV-21G 株を作成し、フローサイトメトリーでアポトーシス細胞を検出したところ、48h 経過後アポトーシス細胞が明らかに増加した(48h 経過後 コントロール群 2.1%/ノックダウン群 4.1%、72 h 経過後 コントロール群 3.8%/ノックダウン群 6.8%)。一方、survivin、bcl-2、bax などのアポトーシス関連タンパク発現に明らかな変化は確認できなかった。次に、HNF-1 ノックダウン群及びコントロール群に 0.2 μ M シスプラチン(CDDP)を投与し、アポトーシス細胞及びアポトーシス関連タンパクを検出したところ、アポトーシス細胞の増加や活性型カスパーゼ 3 は、CDDP 用量依存性に増加し、bcl-2/bax 比の減少もみられた。Hec251 細胞で恒久的 HA-HNF1 過剰発現細胞を作製した。その過剰発現細胞群にドキシソルピシン(Dox)1 μ g/ml を投与すると、アポトーシス細胞の減少及び、survivin 発現の増加と bcl-2/bax 比の上昇がみられた。さらに、Dox 刺激により HNF-1 発現の亢進が生じた。

HNF-1 の bcl-2 転写増加作用 : TOV-21G では、外因性 HNF-1 の過剰発現下、HNF-4 と bcl-2 のプロモーター活性が増強したが、survivin にはプロモーター活性に変化がみられなかった。HA-HNF-1 の過剰発現下で、bcl-2 の mRNA レベル、タンパクレベルでの発現増加が確認された。bcl-2 転写開始位置より上流の 1600bp の配列には、一箇所 HNF-1 結合配列(ATTAAC)が存在したが、bcl-2 プロモーター段階的欠損コンストラクトによるプロモーターアッセイは、結合配列への HNF-1 の結合を示唆する所見がみられなかった。CCA 手術標本で bcl-2 免疫染色を行っ

た結果、HNF1 スコアと bcl-2 スコアに正の相関関係があった($r=0.51, p < 0.001$)。

(4) HNF-1 の細胞周期回転または静止への関与を調べるため、3種のOCCC培養細胞株(TOV-21G、OVISE、OVTOKO)を用いて血清飢餓、血清再刺激実験を行ったが、細胞増殖に伴うHNF-1の変化はみられなかった。また、Hec251の分離したクローン2株にHNF-1の恒久的導入を行ったが、細胞増殖率に有意な違いは指摘できなかった。HNF-1は糖代謝に中心的な役割を果たしていると考えられている。HNF-1の導入によってGlut-1はmRNAレベル、タンパクレベルで有意に増加した。プロモーターアッセイにおいてもHNF-1によるGlut-1プロモーター活性が増強していた。Glut-1プロモーター領域には一箇所のHNF-1結合配列(GTTAAT)を認めた。プロモーター段階的欠損コンストラクトによるプロモーターアッセイでは、-2057bp~-255bpを欠失しても小さな変化がみられたが、さらに-225bp~-63bpの欠失により、プロモーターの増強はほとんどみられなくなった。また、HNF-1結合配列中の4個の塩基配列を変化させてもHNF-1への反応がほとんどみられなくなった。従ってHNF-1がGlut-1プロモーターに作用するためには-152bp~-147bp領域が必要と推測された。しかし、CCA及び子宮内膜症性嚢胞の手術標本免疫染色では、HNF-1とGlut-1間の相関関係は確認できなかった。

(5) 考案：Hec251にTNF- α 刺激を行うと核内p65増加に伴いHNF-1 mRNA及びタンパクの発現増加がみられた。さらに、P65の一過性導入においてもHNF-1 mRNA及びタンパクの発現増加が認められた。p65はHNF-1のトランス活性化因子と考えられ、結合部位は+89 bp~+179 bp間と推定された。免疫組織学的に、OCCC及び内膜症性嚢胞ではHNF-1とpp65のIHCスコアは正の相関関係にあった。一般に、子宮内膜症性嚢胞内は厳しい酸化ストレス下にあることが知られている。この酸化ストレスによりNF- κ B/p65翻訳後活性化に関与するTNF- α やオキサリ酸が産生される。したがって、嚢胞内の繰り返す出血・炎症により生じる酸化ストレスがNF- κ B系を活性化することで、HNF-1発現が誘導されていると推測された。

CCAの臨床検体の検索において、HNF-1ス

コアは低細胞増殖能と密接な関与を示す低核異型度及び非充実型と正の関連性を示した。これまでに、HNF-1は細胞周期G1停止を誘導するCDKN1AやCDKN1B発現を誘導することが報告されている。しかし、培養細胞を用いた検討では、HNF-1発現はCCA細胞の増殖過程で変化しなかった。さらに、その恒常的発現系細胞でも細胞増殖能は変化しなかった。CCAの臨床検体でHNF-1と細胞増殖能に弱い負の相関があったことを勘案すると、HNF-1発現はただ単にCCAの低悪性度に関与する可能性がある。

本研究で重要な所見は、CCA細胞のHNF-1発現抑制によりアポトーシスが促進したことに加え、HNF-1恒常的発現系では、bcl-2発現誘導を介してDoxにより誘導されるアポトーシスを減少させたことである。さらに、HNF-1によりbcl-2発現が転写レベルで亢進したことから、HNF-1は内因性アポトーシス機構に関与することが考えられた。なお、HNF-1スコアとアポトーシス細胞数は、ともに低核異型及び非充実型CCAで有意に高い値を示したが、この両者の直接的な関連は明らかにならなかった。

一般に、子宮内膜症性嚢胞ではDNA損傷を示す8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)の上昇がみられ、このDNA損傷は内因性アポトーシス誘導の原因となる。嚢胞内での繰り返す出血や炎症により炎症性サイトカインであるTNF- α が増加し、これは外因性アポトーシス誘導の原因になる。TNF- α により活性化されたp65によりHNF-1の高発現が誘導される事実を考えると、HNF-1は外因性および内因性アポトーシス系の両方に関与することが考えられる。

外因性HNF-1の導入下で、Glut-1遺伝子発現は増加したにも関わらず、CCA臨床検体では免疫組織学的にHNF-1とGlut-1間に有意な関連がみられなかったことである。これは、腫瘍病態においてHIF-1系などの糖代謝を調節する他の経路の異常が並存しているためと推測された。また、HNF-1とそのターゲットと考えられているHNF-4との間に免疫組織学的に相関がみられなかった。なお、HNF-4は粘液性腺癌とOCCCの高異型度病変で高発現を示したことから、卵巣癌の特定の表現型を表している可能性がある。

(6) 結語：OCCCでは炎症や低酸素により活性化したNF- κ B/p65やその他の細胞障害シ

グナルにより *HNF-1* 遺伝子の転写が活性化し発現が増加する。発現誘導された *HNF-1* は *bcl-2* 遺伝子の転写を促進し、ミトコンドリア依存性アポトーシス経路を抑制することで endometriosis-carcinoma sequence の一翼を担うことが示唆された (図 2)。

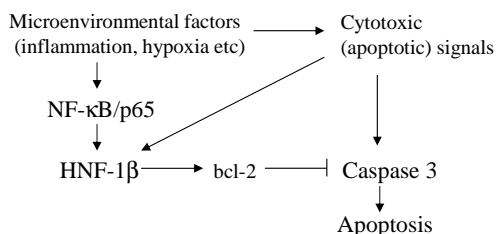


図 2 . CCA における *HNF-1* の機能関連図

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)

Suzuki E, Kajita S, Takahashi H, Matsumoto T, Tsuruta T, Saegusa M.
Transcriptional upregulation of *HNF-1β* by *NF-κB* in ovarian clear cell carcinoma modulates susceptibility to apoptosis through alteration in *bcl-2* expression. *Lab Invest.* 2015 ;95(8):962-72. doi: 10.1038/labinvest.2015.73. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

鈴木エリ奈、鶴田智子、梶田咲美乃、三枝 信 : 卵巣明細胞腺癌における *HNF-1* /*NF-κB* 系の機能解析, 第 103 回病理学会総会, 2014 年 4 月 25 日, 広島国際会議場 (広島県広島市) (日本病理学会会誌, 103:p214, 2014)

鈴木エリ奈、梶田咲美乃、鶴田智子、三枝 信 : 卵巣明細胞腺癌における *HNF-1* 発現の機能解析とその臨床的意義について, 第 102 回病理学会総会, 2013 年 6 月 6 日, ロイトン札幌 (北海道札幌市) (日本病理学会会誌, 102:p318, 2013)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

梶田 咲美乃 (Kajita Sabine)
北里大学・医学部・講師
研究者番号 : 60194734

(2) 研究分担者

三枝 信 (Saegusa Makoto)
北里大学・医学部・教授
研究者番号 : 00265711

(3) 連携研究者

なし