

平成 23 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 C
 研究期間：平成 20 年 ～ 22 年度
 課題番号：20591957
 研究課題名（和文） 新規分子標的抗腫瘍薬としてのサリドマイドを用いたオーダーメイド卵巣癌治療戦略

研究課題名（英文） A made-to-order ovarian cancer treatment strategy using thalidomide as the newly molecular target antineoplastic drug

研究代表者
 山田 嘉彦（ YAMADA YOSHIHIKO ）
 奈良県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：80275346

研究成果の概要（和文）：

難治性の卵巣癌である明細胞腺癌に特異的に高発現している HNF-1beta の機能を解析することによって、サリドマイドに類似した抗腫瘍物質を探索しようとした。HNF-1beta は腫瘍の浸潤能、抗アポトーシスおよび抗がん剤抵抗性に関与していることが判明した。さらに細胞周期に関する HNF-1beta の機能を解析した。その結果、HNF-1beta が chk1 のリン酸化を持続させることにより癌細胞の持続的なチェックポイントの活性化を引き起こし、ひいては卵巣明細胞腺癌の抗癌剤抵抗性の要因の一つとなることが判明した。癌細胞の多くは DNA 修復を G2/M チェックポイントに依存しているとされ、G2/M チェックポイントに関与する chk1 は卵巣明細胞腺癌に対する新規治療薬のターゲットとなる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We were going to search for the antitumor material which resembled thalidomide by analyzing a function of HNF-1beta which specifically developed in the clear cell adenocarcinoma which was intractable ovarian cancer high. HNF-1beta was proved to be involved in the invasion ability of the tumor, antiapoptosis and anticancer drug resistance. Furthermore, we analyzed a function of HNF-1beta about the cell cycle. As a result, because HNF-1beta made a phosphorylation of chk1 persist, we caused the activation of the persistent checkpoint of the cancer cell, and it became clear that it was with one of the factors that were the carcinostatic of the ovary clear cell adenocarcinoma-resistant in its turn. It is said that most of cancer cells depend on the G2/M checkpoint for DNA repair, and it is thought that it may be with the target of the new drug for the ovarian clear cell adenocarcinoma in chk1 involved in the G2/M checkpoint.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
21 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
22 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：婦人科腫瘍

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：卵巣がん、分子標的抗腫瘍薬、浸潤、アノイキス、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

癌細胞が浸潤、転移するための細胞外マトリックスや基底膜を酵素学的に破壊する物質としてウロキナーゼがある。ウロキナーゼ活性を抑制すれば、癌細胞の浸潤が抑制されるだけでなく血管新生も抑制され、転移巣の形成が抑制される。そこで、ウロキナーゼ及びその受容体の発現制御は新規の分子標的抗腫瘍薬となり得ると考えられる。そこで我々は、サリドマイドがウロキナーゼ受容体蛋白の発現を低下させ、その結果、細胞増殖・浸潤を抑制することを明らかにした。さらにサリドマイドと同様な作用をもたらす新たな分子を探索すれば、より効果的で副作用の少ない治療薬を開発できる可能性がある。

卵巣がんの中でも明細胞腺癌は特に抗がん剤の感受性が低く、予後の悪い組織型である。最近、転写因子である **HNF1beta** が明細胞腺癌において特異的に高発現していることが報告され、明細胞腺癌の難治性と何らかな関係があると推測される。そこで、パイロット実験として卵巣明細胞腺癌株の **HNF1beta** をノックダウンして細胞浸潤能や細胞遊走能の変化を検討した。その結果、ノックダウンによって細胞浸潤能や細胞遊走能は低下し、**HNF1beta** が細胞浸潤や細胞遊走の関与していることが推察された。そのため、**HNF1beta** の機能を解析することはサリドマイドと同様な作用をもたらす新たな分子を発見することにつながるものと考えられた。

2. 研究の目的

ウロキナーゼ受容体蛋白の発現低下作用をターゲットとした標的分子を、**HNF1beta** の機能解析をおこなうことによって探索し、新たな分子標的抗腫瘍薬の開発をめざす。

3. 研究の方法

(1) 1995年以降に当施設で切除した正常卵巣および卵巣腫瘍症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、**HNF-1beta** の局在および発現頻度を免疫組織学的に検討した。卵巣腫瘍症例の内訳は、チョコレート嚢

胞、明細胞腺癌、類内膜腺癌、漿液性腺癌、粘液性腺癌である。

(2) 卵巣腺癌株における **HNF-1beta** の発現量を調べるために、卵巣明細胞腺癌株

(TOV21G、KOC、ES2)、卵巣粘液性嚢胞腺癌株 (MCAS) における **HNF-1beta** 発現量を Real-time quantitative RT-PCR によって検討した。

(3) 卵巣明細胞腺癌株に発現する **HNF-1beta** をリバーストランスフェクションクシオン法でノックダウンした。ノックダウンの効率については RT-PCR、ウェスタンブロット法で確認した。

(4) **HNF-1beta** をノックダウンして変化する遺伝子群をマイクロアレイで網羅的に解析した。**HNF-1beta** の対象遺伝子について、文献・マイクロアレイの結果を考慮して次の候補遺伝子を絞り込んだ。細胞接着・遊走活性亢進作用：SPP1、薬剤耐性：UGT1A1・ANXA4、抗アポトーシス：BCL2L1・CFLAR、細胞周期：CCND1。これらの遺伝子について **HNF-1beta** のノックダウンによる変化を Real-time quantitative RT-PCR によって検討した。

(5) **HNF-1beta** をノックダウンしておこる細胞の性質変化を、アノイキス抵抗性、浸潤能、アポトーシスおよび薬剤耐性に関して検討した。

(6) 卵巣明細胞腺癌株である TUOC1 に、plasmid ベースの shRNA 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。cell cycle については、Propidium iodide

(PI) により DNA を染色し、細胞に含まれる G0/G1 期、G2 期、S 期細胞の割合を、フローサイトメトリーを使用して測定した。G2 期作動薬として bleomycin を $42 \mu\text{M}$ 添加し、cell cycle の変化を継時的に観察した。また S 期作動薬として CPT-11 (sn38) を $0.1 \mu\text{g/ml}$ 添加し、同様にフローサイトにて cell cycle の変化を観察した。DNA 損傷によるチェックポイント機構の活性化について、chk1 の Ser296 のリン酸化をウェスタンブロット法にて調べた。

4. 研究成果

(1) 各群における HNF-1beta の染色スコアを図 1 に示す。正常卵巣と比較し、チョコレート嚢胞では HNF-1beta の発現は有意に高かった。また明細胞腺癌では、チョコレート嚢胞や他の上皮性卵巣癌症例と比較し、HNF-1beta の発現は有意に高かった。

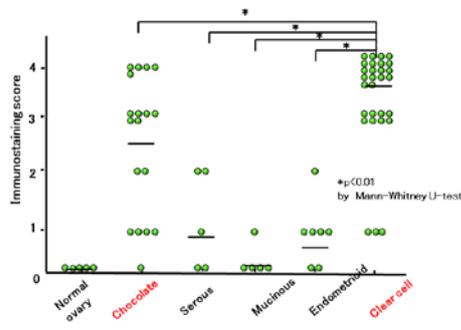


図 1. HNF1-beta の発現強度の比較

(2) 卵巣腺癌株における HNF-1beta の発現量を Real-time quantitative RT-PCR で比較したところ、明細胞腺癌株の TOV21G、KOC で高く、卵巣粘液性嚢胞腺癌株の MCAS の約 5 倍認められた。また、ES2 では発現を認めなかった (図 2)。

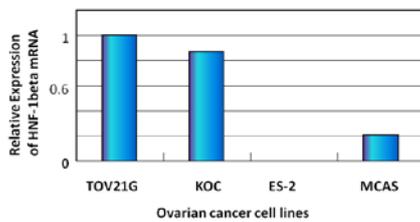


図 2 各細胞株における HNF-1beta の発現量 (Real-time quantitative RT-PCR)
TOV21G, KOC, ES-2 : clear cell carcinoma
MCAS : mucinous cyst adenocarcinoma

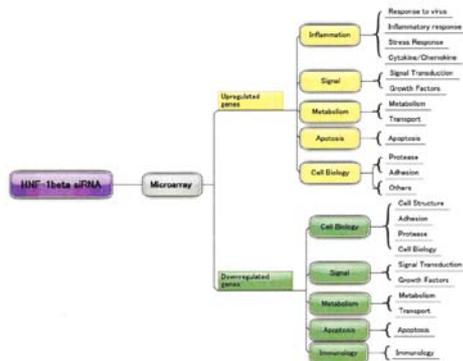


図 3 マイクロアレイの結果

(3) HNF-1beta のノックダウン効率は、TOV21G では 6 割近く認められたが、KOC は 3 割弱

であった。我々の条件では TOV21G の方がノックダウン効率は高かったので、今後の実験にはこちらを使用している。ノックダウン効果について、RT-PCR、ウェスタンブロット法にても確認した。

(4) ノックダウン細胞とコントロール細胞での遺伝子発現の差を網羅的に調べるために Affymetrix 社の GeneChip Expression Array にてマイクロアレイを行った。54675 遺伝子から低発現と Absent Flag を除去し FoldChange 解析を行い 2792 遺伝子まで絞り込んだ。これらは、organogenesis、metabolism、anti-apoptosis、stress response に関与する遺伝子群であった (図 3)。

(5) 今回我々は、細胞接着・遊走活性亢進作用 : SPP1、薬剤耐性 : UGT1A1・ANXA4、抗アポトーシス : BCL2L1・CFLAR、細胞周期 : CCND1 に注目し、発現量の変化を Real-time quantitative RT-PCR にて確認した。その結果、HNF-1beta のノックダウンにより SPP1 は 7 割減少、UGT1A1 は 5 割減少、ANXA4 は 6 割減少した。また、BCL2L1 は 4 割減少し、CFLAR は 4 割減少、CCND1 は 4 割減少した。

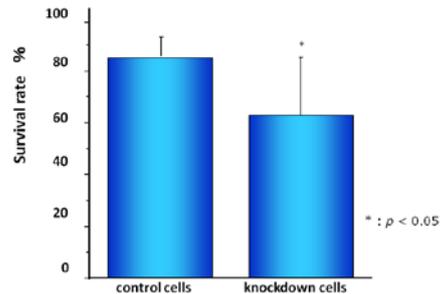


図 4 ノックダウンによるアノキス抵抗性の変化

(6) アノキス抵抗性の変化では、コントロール群に比較して、ノックダウン群では survival rate が減少しており、アノキス抵抗性の減少を認められた (図 4)。invasion assay では、コントロール群と比べてノックダウン群で浸潤細胞数が減少しており、浸潤能の低下を認められた (図 5)。

TUNEL assay では優位にノックアウト群でアポトーシス細胞が増加しており、抗アポトーシス能の低下が認められた。(図 6) CPT-11 感受性試験では、ノックダウン群はコントロール群に比べて生細胞数が減少しており、感受性が増加する傾向を認められた (図 7)。

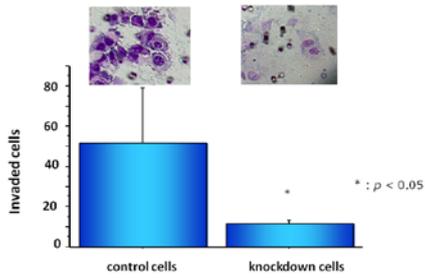


図5 ノックダウンによる浸潤能の変化(Invasion assay)

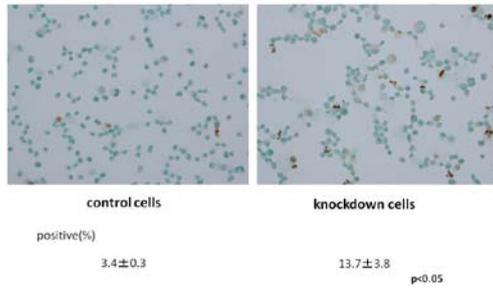


図6 ノックダウンによるアポトーシス誘導(TUNEL assay)

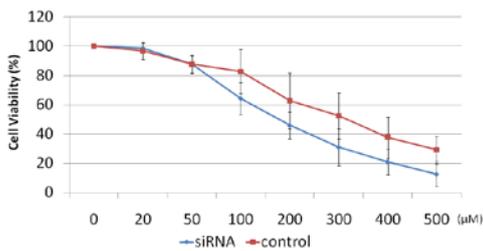


図7 ノックダウンによるCPT-11感受性の変化(MTS法)

(7) 卵巣明細胞腺癌株である TUO1 に、plasmid ベースの shRNA 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(+) であるコントロール株 (HNF-1beta(+) 群) と HNF-1beta をノックダウンした株 (HNF-1beta(-) 群) の無処置での cell cycle を調べた。HNF-1beta(+) 群では常に G2/M 期集団が HNF-1beta(-) 群より多い傾向を認めた。これは HNF-1beta により G2/M 期に留まる細胞数の増加を意味し、G2/M 期チェックポイント機構に HNF-1beta がなんらかの影響を及ぼしている可能性があると考えられた (図 8)。

(8) G2/M 期作動薬である Bleomycin をこれらの培養細胞に添加し G2/M 期チェックポイント機構を作動させて、cell cycle にどのような変化が起こるかを調べた。Bleomycin を 42 μM 添加し、フローサイトにて G0/G1 期、G2 期、S 期細胞の割合の変化を継時的に観察

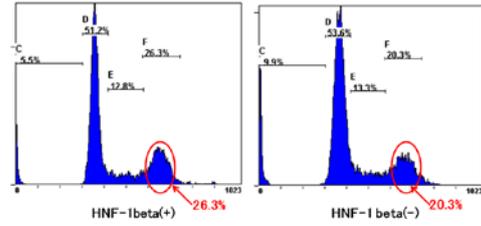


図8 無処置でのG0/G1期、G2期、S期細胞の割合

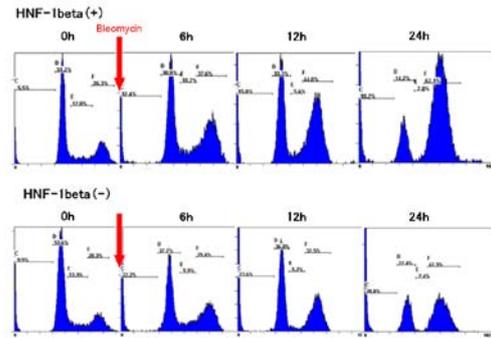


図9 Bleomycin添加後のcell cycleの変化

した (図 9)。HNF-1beta(+) 群では、継時的に G2/M 期の細胞集団が増加して G2/M arrest を引き起こしているのが明らかとなった。一方、HNF-1beta(-) 群では、Bleomycin の添加により 12h 後までは G2/M 期の細胞数が増加するが、24h 後では HNF-1beta(+) 群と比べて G2/M 期細胞の割合が減少し死細胞の増加を認めた。また、すべての経過時間で HNF-1beta(-) 群の方が死細胞の割合が多い傾向を認めた。

(9) HNF-1beta による G2/M arrest の持続が TUO1 株のみで観察されないことを確認するために、明細胞腺癌株である TOV-21G に siRNA を導入して HNF-1beta を一過性にノックダウンした系でも同様の実験を行った。結果は TUO1 と同じく、Bleomycin の添加により HNF-1beta(+) 群では G2/M arrest の持続が、HNF-1beta(-) 群では死細胞数の増加が観察された。

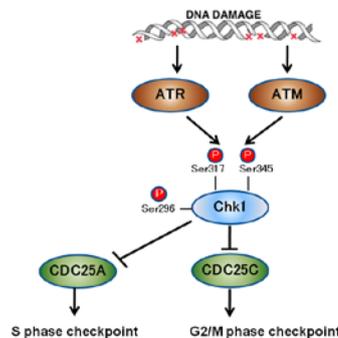


図10 DNAダメージに対するチェックポイント機構

(10) G2/M 期のチェックポイントに関与するタンパクの一つとして chk1 がある。DNA の

損傷はセンサーである ATM/ATR で感知され、これらのタンパクは chk1 タンパクのリン酸化を引き起こすことにより cell cycle を止めるようにシグナルが伝達される (図 10)。今回、chk1 の自己リン酸化部位である S296 のリン酸化をウエスタンブロット法にて Bleomycin 添加からの時間経過で観察した。HNF-1beta(+) 群では時間経過とともに chk1 タンパクのリン酸化の蓄積を認めた。一方、HNF-1beta(-) 群では Bleomycin 添加後 6h でピークとなりその後はリン酸化タンパクが減少する傾向を示した。HNF-1beta が chk1 のリン酸化を持続させることにより持続的な G2/M arrest を引き起こしている可能性が考えられた。

(11) chk1 は CDC25c に作用し、G2/M arrest を引き起こすだけでなく、CDC25A にも作用し S arrest も引き起こす。I 型トポイソメラーゼ阻害剤である CPT-11 (sn38) は DNA 合成を阻害し抗腫瘍効果をもたらすと考えられている。この S 期に特異的に作用する sn38 を添加し、同様に cell cycle の変化を時間経過とともに観察した。HNF-1beta(+) 群では、G2/M 期細胞集団の減少と、G1 期と S 期での停止を認めた。HNF-1beta(-) 群では時間経過とともに S 期の細胞数が減少し、死細胞の増加を認めた。

(12) chk1 のリン酸化の変移をウエスタンブロット法にて観察したところ、Bleomycin と同様に HNF-1beta(+) 群では chk1 タンパクのリン酸化の持続が、HNF-1beta(-) 群では薬剤添加 6 時間後をピークとするリン酸化の減少を認めた。

卵巣明細胞腺癌において HNF-1beta が過剰発現していることは報告されている。しかし、卵巣腫瘍における HNF-1beta の生理学的な発現意義はまだ明確にはされていない。卵巣明細胞腺癌における HNF-1beta の発現意義を調べるために、卵巣明細胞腺癌株に発現する HNF-1beta を siRNA によってノックダウンした。その結果、アノキス抵抗性、浸潤能、抗アポトーシス、薬剤抵抗性がともに低下した。それ故、HNF-1beta は細胞浸潤能や抗アポトーシス能に密接に関与していると考えられる。サリドマイドによる血管新生阻害作用も MMP やウロキナーゼが関与しており、HNF-1beta と何らかの関連がある可能性があると考えた。HNF-1beta をターゲットとした抗腫瘍効果を検討するため、HNF-1beta をノックダウンした明細胞腺癌培養細胞における cell cycle と抗腫瘍剤感受性の変化を調べた。その結果、HNF-1beta が chk1 のリン酸化を持続させることにより癌細胞の持続的なチェックポイント活性化を引き起こし、この

異常が、卵巣明細胞腺癌の抗腫瘍剤抵抗性の要因のひとつと考えられた。卵巣明細胞腺癌と chk1 との関係を我々は初めて明らかにした。癌細胞の多くは DNA 修復を G2/M チェックポイントに依存しているとされる。そのため、G2/M チェックポイントに関与する chk1 は新規治療薬のターゲットとなると考えられている。今後、抗腫瘍剤投与時の chk1 inhibitor の併用など、卵巣明細胞腺癌に対する新しい治療戦略の可能性が本研究で示された。

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)

- ① Kajihara H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Sado T, Oi H, Kobayashi H. New insights into the pathophysiology of endometriosis: from chronic inflammation to danger signal. Gynecol Endocrinol. 査読あり 27, 2011, 73-79.
- ② Yamada Y, Shigetomi H, Onogi A, Haruta S, Kawaguchi R, Yoshida S, Furukawa N, Nagai A, Tanase Y, Tsunemi T, Oi H, Kobayashi H. New insights into pattern recognition receptors and their ligands in gynecologic pathologies. Hum Immunol. 査読あり 72, 2011, 213-218.
- ③ Kajihara H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Sado T, Oi H, Kobayashi H. Clear cell carcinoma of the ovary: potential pathogenic mechanisms . Oncol Rep. 査読あり 23, 2010, 1193-203.
- ④ Yoshida S, Furukawa N, Haruta S, Tanase Y, Kanayama S, Noguchi T, Sakata M, Yamada Y, Oi H, Kobayashi H. Theoretical model of treatment strategies for clear cell carcinoma of the ovary: focus on perspectives. Cancer Treat Rev. 査読あり 35, 2009, 608-615.
- ⑤ Kobayashi H, Kajiwara H, Kanayama S, Yamada Y, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Sakata M, Sado T, Oi H. Molecular pathogenesis of endometriosis-associated clear cell carcinoma of the ovary (review). Oncol Rep. 査読あり 22, 2009, 233-40.
- ⑥ Kobayashi H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S,

Yoshida S, Sakata M, Sado T, Oi H. The role of hepatocyte nuclear factor-1beta in the pathogenesis of clear cell carcinoma of the ovary. Int J Gynecol Cancer. 査読あり 19, 2009 471-479.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 重富洋志、山田嘉彦、小林 浩 卵巣明細胞腺癌における転写因子 HNF-1beta のターゲット遺伝子の網羅的検索 第19回日本がん転移学会 2010年6月16日~17日 金沢
- ② Shigetomi H, Yamada Y, Kobayashi H et al. Investigation into the biological functions of Hepatocyte Nuclear Factor-1 beta in the clear cell adenocarcinoma of ovary. The First Asia Conference on Endometriosis. October 15-17, 2010, Shanghai
- ③ 山田嘉彦、小林 浩 他 卵巣明細胞腺癌における Hepatocyte nuclear factor-1 beta 発現の生物学的意義 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1日 横浜
- ④ 山田 嘉彦、小林 浩 他 卵巣明細胞腺癌における Hepatocyte nuclear factor-1 beta 発現の生物学的意義 第61回日本産科婦人科学会学術集会 2009年4月3日 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 嘉彦 (YAMADA YOSHIHIKO)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：80275346

(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