

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09604

研究課題名(和文) HNF1 -USP28-CLASPIN-Chk1阻害に対する合成致死候補の検索

研究課題名(英文) Search for synthetic lethal candidates for HNF1beta-USP28-CLASPIN-Chk1 inhibition

研究代表者

木村 麻衣 (KIMURA, Mai)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30812333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞癌はHNF-1beta(hepatocyte nuclear factor-1beta)過剰発現が特徴的である。HNF-1beta過剰発現が細胞代謝に与える影響を詳細に評価するために、阻害薬スクリーニングを行った。その結果、HNF-1beta高発現の細胞株特異的に作用する阻害薬Xを同定した。HNF-1betaの干渉下に阻害薬Xを加えると著明に細胞増殖が低下した。HNF-1betaの下流にGSK-3betaが位置していることを以前報告しており、TOV-21Gに対し、GSK-3betaを干渉した後、阻害薬Xを投与したところ、同様に細胞増殖抑制効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、阻害薬X投与が、現在難治性とされている卵巣明細胞癌に対する有効な治療の可能性があると示された。

研究成果の概要(英文)：Ovarian clear cell carcinoma is characterized by overexpression of HNF-1beta (hepatocyte nuclear factor-1beta). To evaluate in detail the effects of HNF-1beta overexpression on cellular metabolism, we performed an inhibitor screening. As a result, we identified an inhibitor X that acts specifically on cell lines with high HNF-1beta expression. Addition of inhibitor X under the interference of HNF-1beta markedly reduced cell proliferation. We have previously reported that GSK-3beta is located downstream of HNF-1beta, and when GSK-3beta was interfered with TOV-21G and then treated with inhibitor X, a similar inhibition of cell proliferation was observed.

研究分野：癌分子生物学

キーワード：HNF-1beta 卵巣明細胞癌 GSK-3beta

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣癌は日本において年に約 14,000人が新規罹患し、約 5,000人が死亡している悪性腫瘍である。その中で卵巣明細胞癌の割合は約 25%であり、欧米の 8%に比して高い。卵巣明細胞癌は化学療法に対して抵抗性であり、進行癌の予後は極めて悪いため、とりわけ本邦においては治療法の開発が急がれる。卵巣癌に対して、古くからはタキサン系抗がん剤（微小管阻害）、白金製剤（DNA複製阻害）、比較的新しいものとして VEGF 阻害薬（血管・脈管新生阻害）、PARP 阻害薬（DNA修復阻害）が抗がん剤として用いられている。PARP 阻害薬は BRCA1/2 変異症例において、合成致死の機序により有効性が高いが、高悪性度漿液性癌では 28.5%、低悪性度漿液性癌の 20.0%に BRCA1/2 変異を認めるのに対し、明細胞癌ではわずか 2.1%しか BRCA1/2 変異を認めない。明細胞癌にとっての合成致死候補遺伝子を同定できれば、治療戦略として有用な可能性があると考えた。

(2) 卵巣明細胞癌は HNF-1beta (hepatocyte nuclear factor1beta) 過剰発現が特徴的であり、HNF-1beta—USP28—CLASPIN 経路が DNA 損傷チェックポイント機構に重要な Chk1 のリン酸化を維持していることを報告した。しかし、HNF-1beta は様々な臓器に発現しているためにこれを阻害することは現実的ではなく、当経路に対する阻害薬も現存しないという問題点があった。さらなる治療標的をみつけるべく HNF-1beta が関わる新たなシグナル伝達経路を検索した。

### 2. 研究の目的

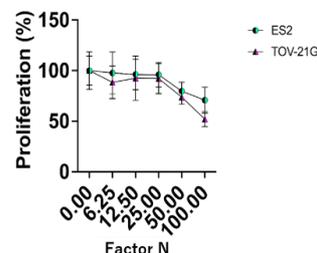
卵巣明細胞癌の HNF1β-USP28-CLASPIN-Chk1 阻害に対する合成致死候補の検索と、そのメカニズムの解明を行う。

### 3. 研究の方法

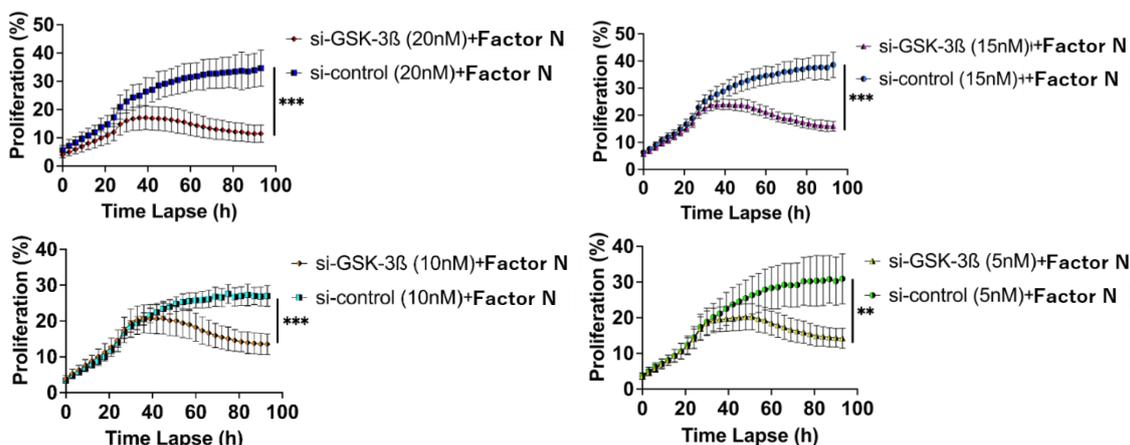
HNF-1beta 過剰発現が細胞代謝に与える影響を詳細に評価するために、384 種類の阻害薬を用いた阻害薬スクリーニングを行った。細胞株は HNF-1beta 過剰発現株である TOV-21G と HNF-1beta 発現を呈していない ES2 を用い、阻害薬添加後 48 時間目に MTS アッセイを用いて細胞増殖度を評価した。コントロールとして阻害薬の溶媒である同量のメタノールを添加した。阻害薬候補としては、HNF-1beta 過剰発現株である TOV-21G には細胞増殖抑制能をもち、且つ HNF-1beta 発現を呈していない ES2 の増殖は抑制しない、あるいは助長するものを抽出した。

### 4. 研究成果

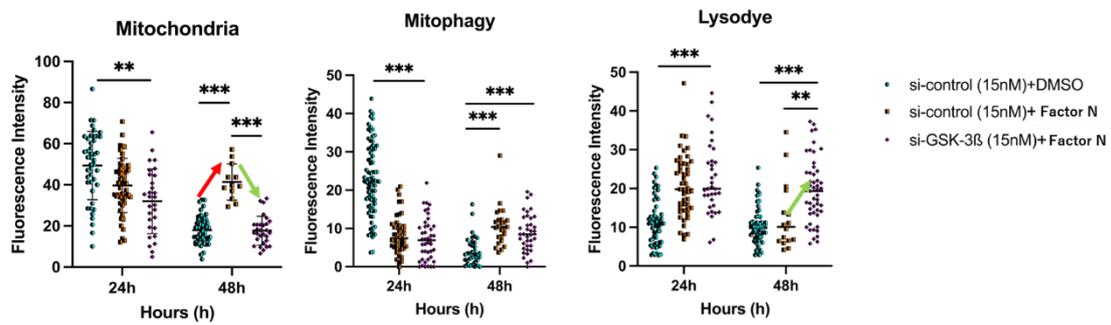
(1) TOV-21G、ES2 の細胞株について、標準阻害剤キットに含まれる 364 種類の阻害薬の効果を検討した所、HNF-1β に関与する阻害薬として 46 種類候補が挙げられた。その中で Mitophagy 誘導作用により、代謝に関与すると推測される薬剤 X を同定し、それについて検討した。HNF-1beta の干渉下に阻害薬 X を加えると著明に細胞増殖が低下した。



(2) HNF-1beta の下流に GSK-3beta が位置していることを以前報告しており、TOV-21G に対し、GSK-3beta を干渉した後、阻害薬 X を投与したところ、有意に細胞増殖抑制効果を認めた。



(3) ミトコンドリア機能のアプローチによる抗腫瘍機序解明を試みた。阻害薬 X を投与することで、Mitochondria 量が増加する。また、GSK-3 $\beta$  干渉を併用することで Mitochondria 量は減少し、Lysosome は増加する。通常、癌細胞のエネルギー産生経路は Warburg 効果により解糖系優位である。GSK-3 $\beta$  は warburg 効果に関与し、その阻害によってエネルギー産生経路は解糖系から酸化的リン酸化にシフトするとされる。一方で、阻害薬 X 単独では mitophagy が生じて影響は少ない。GSK-3 $\beta$  を干渉した後、阻害薬 X を投与することによって Mitophagy が生じ、酸化的リン酸化阻害されて癌細胞のエネルギー産生が不十分となる可能性を考える。



(4) 細胞代謝に着目した癌治療は、現在難治性とされている卵巣明細胞癌に対する有効な治療の可能性はある。GSK-3 $\beta$ 、HNF-1 $\beta$ はその治療戦略において、治療 標的の中心である可能性がある

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawahara Naoki, Mizutani Ayano, Matsubara Sho, Takeda Yoshinori, Kobayashi Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 GSK-3 mediates the effects of HNF-1 overexpression in ovarian clear cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2020.9250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	吉元 千陽 (Yoshimoto Chihiro) (00526725)	奈良県立医科大学・医学部・研究員  (24601)	
研究分担者	小林 浩 (Kobayashi Hiroshi) (40178330)	奈良県立医科大学・医学部・研究員  (24601)	
研究分担者	川口 龍二 (Kawaguchi Ryuji) (50382289)	奈良県立医科大学・医学部・准教授  (24601)	
研究分担者	河原 直紀 (Kawahara Naoki) (70623495)	奈良県立医科大学・医学部・助教  (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------