

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：24601
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012 ～ 2012
 課題番号：22591861
 研究課題名（和文） プロテオソーム解析による子宮内膜症からの卵巣癌発生機序の解明

研究課題名（英文） Investigation into multiple pathways involved in the malignant transformation of endometriosis

研究代表者

川口 龍二 (KAWAGUCHI RYUJI)
 奈良県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号：50382289

研究成果の概要（和文）：卵巣子宮内膜症嚢胞は日本国内で 50～100 万人の若年女性患者が潜在的に存在し、そのうち 1%前後が悪性化するといわれている。しかし、卵巣子宮内膜症嚢胞の悪性化に関するメカニズムについては、未だ不明な点が多い。今回の研究では、明細胞腺癌に特異的に高発現している転写因子 HNF-1beta が DNA チェックポイント機構の主要因子である chk1 タンパクのリン酸化を持続させていることが明らかとなった。またその制御にはプロテアソーム系が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Among the ovarian cancers, clear cell adenocarcinoma (CCC) has been recognized as a distinct clinicopathological entity because of its frequent concurrence with endometriotic lesions and its high chemoresistance, resulting in a poor prognosis of high stage tumors. However, the mechanism of resistance in CCC has remained unclear. Hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) was significantly up-regulated in CCC. Cell cycle arrest induced by DNA damage was maintained by sustained activation of ATM-Chk1 pathway and suppression of cell death in HNF-1beta-overexpressing cells. Chemoresistance of CCC may be the result of aberrant retention of the G2 checkpoint through overexpression of HNF-1 beta. Anticancer agents combined with Chk1 inhibitors may improve the chemosensitivity of CCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：卵巣明細胞腺癌 HNF-1beta マイクロアレイ 細胞周期 卵巣子宮内膜症性嚢胞 癌化 チェックポイント機構

1. 研究開始当初の背景

我々の17年間に及ぶprospective studyでは、6,398人の卵巣子宮内膜症患者のうち、46人の卵巣癌患者が発生した。すなわち発生頻度は0.72%になることが明らかにし、日本人の卵巣癌の発生率は約0.01%であることから、卵巣子宮内膜症は、極めて高率に悪性化が起こることを我々は初めて証明した。さらに、卵巣子宮内膜症性嚢胞から卵巣癌になる年齢は平均45歳と若く、閉経前が75%、明細胞腺癌が70%を占め、癌化するまでには平均5.3年の歳月を要していたことも報告した。また卵巣子宮内膜症性嚢胞が悪性化した場合、その病理組織型は明細胞腺癌と類内膜腺癌が大半を占める。

卵巣子宮内膜症性嚢胞から癌が発生する場合、なぜ同一の組織でなく明細胞腺癌と類内膜腺癌に分かれるのであろうか。卵巣子宮内膜症性嚢胞の発生原因は現在のところ内膜移植説と化生説が言われているので、明細胞腺癌と類内膜腺癌を発生する卵巣子宮内膜症性嚢胞の発生原因は異なっているのではないかと考えた。そこで予備実験として、卵巣明細胞腺癌、卵巣子宮内膜症性嚢胞、正所性非腫瘍性子宮内膜（増殖期、分泌期、閉経後、妊娠期）、正常卵巣（卵巣表層上皮と封入嚢胞）でのHNF1beta、EMA（上皮マーカー）、calretinin（中皮マーカー）の発現頻度を免疫組織染色で検討した。その結果、卵巣明細胞腺癌、卵巣子宮内膜症性嚢胞、両者の移行病変では共にHNF1betaが高発現し、正常卵巣では発現を認めなかった。また分泌期内膜にもHNF1betaが高発現していることから分泌期内膜のtransplantationにより生じた卵巣子宮内膜症性嚢胞から卵巣明細胞腺癌が発生していると考えた。以上の結果から、卵巣子宮内膜症性嚢胞の悪性化へのメカニズムの仮説をたてた。

卵巣子宮内膜症性嚢胞は日本国内で50~100万人の若年女性患者が潜在的に存在し、そのうち1%前後が悪性化するといわれている。しかし、卵巣子宮内膜症性嚢胞の悪性化に関するメカニズムについては、未だ不明な点が多い。今回、内膜症性嚢胞より悪性化した卵巣明細胞腺癌の検体を用いたマイクロアレイおよびプロテオーム解析を検討することにより、卵巣子宮内膜症性嚢胞の悪性化に関する原因物質を特定し、悪性化のメカニズムを解明する。

DNAマイクロアレイによる網羅的解析により、卵巣明細胞腺癌においてHNF1beta遺伝子が過剰発現していることが明らかとなっている。核内に発現する転写因子の一つであるHNF1betaは、我々の免疫染色による予備実験においても卵巣子宮内膜症性嚢胞では約40%、明細胞腺癌では100%の陽性率を

示すが、他の組織型での発現は陰性であった。しかし、転写因子HNF1betaが明細胞腺癌の抗癌剤耐性や癌化にどのように関与しているかは報告がない。我々はこのHNF1betaが卵巣明細胞腺癌の腫瘍的特性を決定付けていると考え、その生物学的機能の解明に取り組んでいる。

2. 研究の目的

卵巣明細胞腺癌は化学療法に抵抗性を示し予後が悪い。近年、明細胞腺癌に転写因子のHNF1betaが特異的に発現することが証明され、抗癌剤耐性機序に関与する可能性が出てきた。明細胞腺癌の子宮内膜症からの発癌機序の解明、さらには抗癌剤耐性獲得機構を解明して新たな治療戦略を構築する。

3. 研究の方法

(1) 卵巣子宮内膜症性嚢胞の悪性化に関与する原因遺伝子の特定

①臨床検体を用いた卵巣子宮内膜症性嚢胞の悪性化に関与する原因遺伝子の特定
我々の施設あるいはその関連施設から得られた卵巣子宮内膜症性嚢胞が悪性化したと考えられる64症例の組織検体からDNAアレイ、蛋白アレイ、リン酸化蛋白アレイなどの生物学的手法を用いて候補となる悪性化に関与する遺伝子・蛋白およびシグナル伝達の網羅的探索を行う。

②培養細胞を用いた卵巣子宮内膜症性嚢胞の悪性化に関与する原因遺伝子の特定
卵巣明細胞腺癌細胞株および類内膜腺癌細胞株を用いて、同様にDNAアレイ、蛋白アレイ、リン酸化蛋白アレイを行い、悪性化に関与する遺伝子・蛋白およびシグナル伝達の網羅的探索を行う。

(2) 臨床検体を用いた免疫組織学的手法による卵巣子宮内膜症性嚢胞の悪性化の証明
当院および関連施設から得られた病理組織学的に卵巣子宮内膜症性嚢胞から卵巣癌への移行帯を認める症例（卵巣明細胞腺癌；14例、類内膜腺癌；7例）を用いて、免疫組織染色を行い卵巣癌の子宮内膜症悪性化説を証明する。

(3) プロテオミクス解析による卵巣明細胞腺癌および類内膜腺癌特異的蛋白発現解析
多数例の明細胞腺癌と類内膜腺癌を用いてプロテオミクス技術を駆使して疾患特異的発現蛋白の解析を実施し、マイクロアレイの結果を参考にして、さらにターゲットとなる候補蛋白を絞り込む。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌培養細胞のマイクロアレイによ

る遺伝子解析により、明細胞腺癌で発現が変化している遺伝子群を抽出すると、Detoxification、Protease、Adhesion、Transcription factor、Metabolism、Cell cycle などに関与する遺伝子が過剰発現していることが明らかになった。これらの過剰発現した遺伝子全体の40%がHNF-1betaのターゲット候補遺伝子であることが判明した。つまり、明細胞腺癌の遺伝的特性を決める因子として、HNF-1beta が重要な役割を担っていると考えられた。(図1)

Overexpressed genes in ovarian clear cell adenocarcinoma

Detoxification	GLRX, GPx3, TST, ANXA4, SOD2, NNMT, UGT1A1, AKR1C1, ABCC3, ABCF2, SLC16A3
Protease	DPP4, ACE2, Collectrin, TFPI2, TIMP-1, MMP, NP, PTPRM, NEU3
Signal	MAP3K5/ASK1, mTOR, NDRG1, RHOB/ARHB, SCCE/SLPI, Ack1, WWOX
Adhesion	Ephrin-B1, MUC1, Galectin-3, hKIM-1, SP17
Transcription factor	HNF-1beta , Octamer4, PAX8, Plk/Emi1
Metabolism	G6Pase, GK, GLUT2, ALDOB
Cell cycle	Cyclin E, KIFC3, P21
others	OPN, LN-5, COL4A2, FXD2, FGFR4, BRCA1, ERCC1/XPB, <u>β-tubulin cIII</u> , TP52, B7-H4

図1 明細胞腺癌に高発現する遺伝子

(2) 子宮内膜症からの卵巣癌、特に明細胞腺癌の発生に関して転写因子HNF-1betaが重要な役割を担っている可能性が示された。さらに明細胞腺癌の特徴である抗癌剤耐性についてもHNF-1betaの関与が疑われた。HNF-1betaをsiRNAにて一過性ノックダウンしたところ、SPP1、CFLAR、BCL2L1、CCND1、UGT1A1、ANXA4の発現量が、2~5割へと著明に減少した。これらの遺伝子は、癌転移・抗アポトーシス・細胞周期・抗癌剤耐性に関与するとされており、HNF-1betaが転写因子として明細胞腺癌の様々な性質に関わる可能性が示された。また、HNF-1betaのノックダウンによりアノキス抵抗性の低下、浸潤能の低下、抗癌剤抵抗性の低下、抗アポトーシス能の低下を認めた。

(3) 発癌メカニズムの一つとして、cell cycle 関連遺伝子の異常があげられる。マイクロアレイによりHNF-1betaがcell cycle 関連遺伝子を制御していることが明らかとなった。卵巣子宮内膜症性嚢胞におけるHNF-1betaの過剰発現が、cell cycleの異常をきたし悪性化に関与している可能性が考えられた。そこで、卵巣明細胞腺癌培養細胞にHNF-1betaのsiRNAを導入しノックダウンし、cell cycleに対する影響を調べた。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の発現により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

イント機構の異常が示唆された。チェックポイント機構の異常は、遺伝子変異監視機能の低下をきたし、腫瘍発生および進展の原因となりうる。

(4) HNF-1betaがG2チェックポイント機構に関与していることが示唆されたため、さらにそのくわしい機序を調べるために、G2作動薬であるブレオマイシンをHNF-1beta(+)株とHNF-1beta(-)株に加えて、変化のあるタンパクを網羅的に検索したところDNA損傷タンパクの主要因子であるchk1タンパクのリン酸化の挙動に異常を認めた。HNF-1betaがchk1タンパクに作用していることが示された。主要なチェックポイントタンパクであるchk1はリン酸化することにより活性化し細胞周期を停止させる。HNF-1beta(+)細胞株では、DNA障害性薬剤の添加により持続的なchk1タンパクのリン酸化をきたし、細胞周期の停止の延長を認めた。持続的なチェックポイント機構の活性化はアポトーシスへの誘導が阻害されるだけでなく、遺伝子不安定性につながる。これが子宮内膜症からの癌化機序の一つの可能性がある。

(4) HNF-1betaがchk1にどのように作用して持続的なリン酸化をもたらしているかは不明であった。我々はchk1タンパクの分解系であるプロテオソームに注目している。細胞内のシグナル伝達は、シグナルを受けてタンパクのリン酸化などの変化を伝えていくだけでなく、そのタンパクが分解するタイミングによっても影響を及ぼし、細胞内の複雑な応答を形成している。chk1はDNA損傷応答の主要なタンパクであるが、その上流のDNA損傷を認識するATR、ATM系とともに、プロテアソーム系による分解からも制御されている。プロテアソーム阻害剤は血液悪性腫瘍でも治療に応用されており、chk1タンパクの持続的なリン酸化がプロテアソーム系で制御されていることが明らかにできれば、明細胞腺癌に対する治療応用の可能性が開ける。プロテアソーム阻害剤であるMG132を明細胞腺癌株に添加したところ、MG132の毒性が非常に強く表れることが明らかとなった。MG132のタンパク阻害活性は10 μ Mからとされているが、我々の実験では2 μ M 24hでほとんど生細胞を認めない状態であった(図2)。

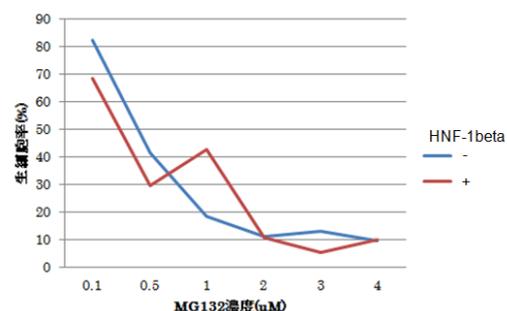


図2 明細胞腺癌株に対するMG132の毒性

これは明細胞腺癌の細胞活性がプロテアソーム系に依存している可能性を示しており、プロテアソーム阻害剤が新しい治療戦略になりうると考えている。今後の展望はこのプロテアソーム阻害剤が明細胞腺癌にどのように作用するかを解明することが重要である。

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4件)

- ① Yamada Y, Shigetomi H, Onogi A, Haruta S, Kawaguchi R, Yoshida S, Furukawa N, Nagai A, Tanase Y, Tsunemi T, Oi H, Kobayashi H. Redox-active iron-induced oxidative stress in the pathogenesis of clear cell carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*, 査読有、21(7)、2011、1200-7、
[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1525-1438/issues](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1525-1438/issues)
- ② 重富洋志、吉澤順子、山田嘉彦、川口龍二、吉田昭三、古川直人、大井豪一、小林浩、卵巣チョコレート嚢胞に合併する明細胞腺癌と類内膜腺癌の発生病理と、その遺伝子特性、*日本エンドメトリオーシス学会会誌*、査読無、32、2011、43 - 48、
<http://www.endometriosis.gr.jp/>
- ③ 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. *Human immunology*, 査読有、72(3)、2011、213-218、
<http://www.journals.elsevier.com/human-immunology/>
- ④ 重富洋志、吉澤順子、山田嘉彦、川口龍二、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、*日本エンドメトリオーシス学会会誌*、査読無、31 巻、2010、70 - 74、
<http://www.endometriosis.gr.jp/>

[学会発表] (計3件)

- ① Hiroshi Shigetomi, Yoriko Yoshizawa, Seiji Kanayama, Ryuji Kawaguchi, Hiroshi Kobayashi, Tamotsu Sudo. Anticancer agents combined with Chk1 inhibitor sensitize HNF-1beta overexpressing clear cell adenocarcinoma of the ovary 第71回日

本癌学会、2012年9月19日、札幌

② H. Shigetomi, Y. Yoshizawa, Y. Yamada, R. Kawaguchi, S. Yoshida, N. Furukawa, H. Oi, H. Kobayashi, S. Kanayama, T. Sudo. Investigation into the biological functions of hepatocyte nuclear factor-1beta in clear cell adenocarcinoma of the ovary. 17th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology (ESGO) SEPTEMBER 14, 2011 Milano, Italy

③ 重富洋志、吉澤順子、山田嘉彦、川口龍二、小林浩、卵巣チョコレート嚢胞に合併する明細胞腺癌と類内膜腺癌の発生病理と、その遺伝子特性、第32回日本エンドメトリオーシス学会シンポジウム、2011年1月22日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 龍二 (KAWAGUCHI RYUJI)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：50382289

(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

吉澤 順子 (YOSHIZAWA YORIKO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80526732