

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：2010～2012

課題番号：22591862

研究課題名（和文）酸化ストレスとターゲットにした卵巣明細胞腺癌の治療戦略

研究課題名（英文）Oxidative stress in the pathogenesis of clear cell carcinoma of the ovary.

研究代表者

吉田 昭三（YOSHIDA SHOZO）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40347555

研究成果の概要（和文）：子宮内膜症は月経のたびに異所内膜から出血し、ヘモグロビンに含まれる「鉄」が $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^-$ で示される「フェントン反応」により強力な活性酸素種 ROS を放出する。これまでこの過酷な環境下でなぜ異所性子宮内膜細胞が生存できるのか、さらにはなぜ癌化に至るのかは不明であった。本研究では明細胞腺癌に過剰発現している転写因子 Hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) が、chk1 タンパクに働きかけていることを明らかにした。また防御因子である CD44v も関与している可能性がある。

研究成果の概要（英文）：There is a lot of pathological evidence to suggest the theory that carcinoma of the ovary develops from endometrial tissue. Endometrial tissue expands with blood and then sheds the blood during menstruation. Red Blood Cells contain an iron-rich protein, hemoglobin. Iron overload is associated with carcinogenesis. In addition, the Fenton reaction may cause oxidative damage at a specific part of the genome. Hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta), a transcription factor overexpressed in clear cell adenocarcinoma, might sustain chk1 protein phosphorylation to arrest the cell cycle and inhibit cell death induced by an anticancer agent. And, expression of CD44 is an important factor in endometriosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,600,000	480,000	2,080,000
23年度	700,000	210,000	910,000
24年度	500,000	150,000	650,000
総計	280,000	840,000	3,640,000

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、chk1、細胞周期、ノックダウン、Bleomycin、CD44、チェックポイント機構

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、検診法や予防法が確立していないため婦人科癌の中で最も予後不良な癌であり、死亡率は上昇している。食生活の欧米化や少子化が卵巣癌発生の原因の一つでもあるといわれ、生活習慣病として捉えられて

いるが、その詳細な原因は未だに不明である。海外ではピル普及により発生数が年々減少しているのに対して、日本国内ではピル普及が進まないためか漸増している。卵巣癌は主として、漿液性、粘液性、類内膜、明細胞腺癌の4種類の組織型に分類されるが、海外で

は漿液性癌が大多数を占め、明細胞腺癌は6%のみを占めるのに対して、本邦では明細胞腺癌が20%以上発生していることが大きな特徴である。

子宮内膜症は性成熟期女性の約10%を占め、骨盤内の癒着等により月経困難症（生理痛）や不妊症をもたらす重大な疾患として位置づけられ、良性疾患でありながら性成熟期の女性を苦しめる代表的婦人科疾患として認識されている。現在、国内で15万人が通院治療していると予想され、この疾患も漸増している。しかし、子宮内膜症が癌化することは今まで証明されていなかった。近年、国内で漸増している卵巣癌は、特に、子宮内膜症からの癌化の症例が増えたためではないかと考えられる。しかし、その癌化の機序については不明である。

我々は、正常卵巣、子宮内膜症および卵巣明細胞腺癌について、マイクロアレイ、CGH等遺伝子解析を網羅的に探索し、子宮内膜症からの発癌遺伝子および遺伝子産物を発見することを目的とした研究を行っている。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関与する遺伝子群) osteopontin, ACE2, FXSD2, TFPI2, NNMT, LITAF/PIG7, RBPMS, GLRX, ASK1, ANXA4, and UGT1A1 (酸化ストレス、解毒機構、抗癌剤耐性に関与する遺伝子群)を同定した。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上流には転写因子である HNF-1beta の結合部位が存在した。現在までに我々が確認した HNF-1beta 遺伝子の下流遺伝子として機能するのは DPPIV, osteopontin, ACE2, FXSD2, TFPI2, NNMT, LITAF/PIG7, RBPMS, ANXA4 および UGT1A1 であり多くのオーバーラップが確認できた。すなわち、HNF-1beta 遺伝子が子宮内膜症と卵巣癌に強い関連を有していることが推定された。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。

また、我々のこれまで研究で癌化に関与すると推定された酸化ストレス関連遺伝子の過剰発現は「アスベスト」中皮腫と類似していることがわかった。「アスベスト」による悪性中皮腫への癌化の機序を調べたところ、「アスベスト」に含まれる「鉄」に原因があると報告されている。すなわち、長期間アスベストが沈着した中皮細胞が「鉄 Fe²⁺」のフェントン反応により活性酸素を放出し、小胞体や細胞の酸化ストレスを起し、細胞および DNA 破壊に繋がるということが証明されている。これを制御するために多量の解毒機構遺

伝子が過剰発現されることも知られている。

これを子宮内膜症に当てはめて考えると、卵巣の中に出血した血腫が10年以上もの長期間宿主と接触したため、血液が溶血しヘモグロビンが分解されてヘムが産生され、このヘムは鉄と一酸化炭素とビリベルジンに分解され、最終的にビリルビンに変換される。子宮内膜症の血腫の中には多量のヘムが含まれているので、大量の鉄が含まれている。子宮内膜症から明細胞腺癌への癌化機序を解明することにより最近国内で増えている卵巣癌の早期発見、早期治療あるいは予防に大きく貢献でき、日本の卵巣癌発生、特に卵巣内膜症性嚢胞のがん化を食い止めることができる。

2. 研究の目的

本邦における年間発生卵巣がんは約8千人であり明細胞腺癌はその20%とすると1600人いることになる。子宮内膜症患者は国内で15万人が通院治療しているのでその0.72%にあたる1000人が発がんすると予想される。子宮内膜症性嚢胞の癌化が、ヘム鉄による酸化ストレスの結果もたらされるものと判明すれば、鉄のキレート剤（すでに市販化されている）などにより、子宮内膜症のがん化の予防が可能となる。したがって、明細胞腺癌の2/3の患者は発がんを予防できる可能性がある。最近国内で増えている卵巣癌の早期発見、早期治療あるいは予防に大きく貢献でき、日本の卵巣癌発生、特に卵巣内膜症性嚢胞のがん化を食い止めることができる。研究機関内に下記を明らかにすることを目的とした。

(1) HNF-1beta を過剰発現する遺伝子あるいは酸化ストレスをもたらす原因物質を詳細に特定すること

(2) 酸化ストレスの原因物質として鉄に注目し、子宮内膜症の癌化の機序への関与を明らかにすること。

3. 研究の方法

以下の実験を通じて、子宮内膜症の癌化、特に酸化ストレスの関与を明らかにする。

(1) HNF-1beta の過剰発現・ノックアウトによる癌細胞の性格の変化：培養ヒト卵巣明細胞腺癌に対して、HNF-1beta 遺伝子導入実験および siRNA による抑制実験を行う。細胞増殖能、浸潤能、接着能、グリコーゲン蓄積、酸化ストレス（小胞体ストレスを含む）、抗癌剤抵抗性について比較。

(2) HNF-1beta の過剰発現・ノックアウトによる下流遺伝子群の変化：培養ヒト卵巣明細胞腺癌に対して、HNF-1beta 遺伝子導入実験および siRNA による抑制実験を行う。これらの培養細胞と無処理コントロール細胞を比較し、グリコーゲン蓄積に関与する遺伝子群、酸化ストレス、解毒機構、抗癌剤耐性に

関与する遺伝子群の変化を調べる。最も大きく変動した遺伝子群についてその作用機序を詳細に検討。

(3) 発癌により変化する蛋白質群の同定：卵巣内膜症性嚢胞より発症した卵巣癌の臨床検体を用い、酸化ストレスに関与する因子の発現を比較検討する

(4) 酸化ストレスによる発癌機序を明らかにし、治療・予防への新規戦略につながる因子を同定する。

4. 研究成果

(1) 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。遺伝子解析では、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。これらの遺伝子のうち酸化ストレスに関与する遺伝子群は過剰発現した遺伝子全体の 87% であり、また全体の 40% が HNF1beta のターゲット候補遺伝子である。つまり、明細胞腺癌の遺伝的特性を決める因子として、酸化ストレスと HNF1beta が重要な役割を担っていると考えられた (図 1)。

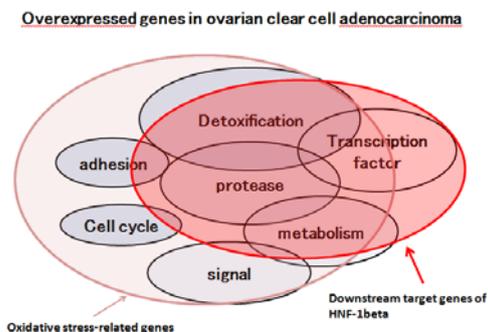


図 1 明細胞腺癌に過剰発現する遺伝子群

(2) 子宮内膜症は月経のたびに異所内膜から出血し、ヘモグロビンに含まれる「鉄」が $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^-$ で示される「フェントン反応」により強力な活性酸素種 ROS を放出する。この ROS による細胞障害に対する明細胞腺癌の応答を調べるため、フリーラジカルを発生させる抗癌剤ブレオマイシンを添加したところ特異な細胞周期像が観察された。ブレオマイシンを添加された細胞は G2 期で細胞周期が停止し、細胞死が誘導されなくなっていた。この現象は転写因子 HNF-1beta をノックダウンすることにより消失した。その機

序について詳細に検討したところ転写因子 HNF-1beta が、DNA 損傷チェックポイント機構の主要な因子である chk1 タンパクの持続的なリン酸化をもたらしていることが明らかとなった。近年、過剰なチェックポイント機構の発現は細胞死が阻害されるだけでなく、遺伝子不安定性をもたらす癌化につながると考えられている。HNF-1beta は明細胞腺癌だけでなく子宮内膜症細胞においても強く発現している。また細胞内でフリーラジカルを発生させ DNA 損傷をもたらすブレオマイシンの添加は、子宮内膜症細胞がおかれている強い酸化ストレス環境と類似している。つまり子宮内膜症細胞は酸化ストレスに対して HNF-1beta を発現することにより細胞死を免れ、遺伝子不安定性を引き起こし癌化するという機序が考えられた。

(3) フリーラジカルに対する細胞側の応答として細胞周期を止めるだけでは生存できる可能性は低いと思われる。CD44 はヒアルロン酸をはじめとする細胞外マトリックスと結合する接着分子で、正常組織において広く発現している。近年、CD44 のバリエーションフォーム (CD44v) はヒトの様々ながん細胞において特異的に高発現し、増殖や浸潤、転移と密接に関係し、単なる接着因子ではなく様々なシグナル伝達に関与することが解明されてきた。子宮内膜症、明細胞腺癌における CD44v の発現を比較した。CD44v9 の陽性率は、子宮内膜症性嚢胞 $68.3 \pm 19.9\%$ 、明細胞腺癌合併内膜症は $16.7 \pm 16.5\%$ であり、後者において有意に低下していた。また、子宮内膜症性嚢胞における CD44v9 の発現は、年齢別、閉経の有無において有意差はなかった (図 2)。子宮内膜症における CD44v9 の発現低下により、ROS 抵抗性が減弱し、発癌リスクが高くなる可能性が示唆された。

	子宮内膜症性嚢胞 (N=28)	明細胞腺癌併発子宮内膜症 (N=8)
年齢(歳)	40.6±10.1	57.0±10.1
閉経(例)	6	6
CA125(単位)	109.1±159.0	113.4±156.5
CD44v9 陽性率(%)	68.3±19.9	16.7±16.5

図 2 CD44v 陽性率の比較

今後、さらに ROS に関与するマーカーの免疫組織学的検討を加え、発癌のメカニズムを明らかにできれば子宮内膜症から明細胞腺癌への癌化を機序を明らかにでき新しい治療・予防へとつながると考えられる。

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5件)

① Shigetomi H, Oonogi A, Tsunemi T, Tanase Y, Yamada Y, Kajihara H, Yoshizawa Y, Furukawa N, Haruta S, Yoshida S, Sado T, Oi H, Kobayashi H. The role of components of the chromatin modification machinery in carcinogenesis of clear cell carcinoma of the ovary. *Oncology letters*. 査読有、2(4)、2012、591-597

<http://www.spandidos-publications.com/ol/>

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. 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)

③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 巻、2011、43 - 48、

<http://www.endometriosis.gr.jp/>

④ 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/>

⑤重富洋志、吉澤順子、山田嘉彦、川口龍二、吉田昭三、大井豪一、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4件)

①重富洋志、吉澤順子、金山清二、山田嘉彦、川口龍二、吉田昭三、古川直人、大井豪一、小林浩、明細胞腺癌における転写因子 HNF-1beta の DNA 損傷チェックポイント機構の制御、第64回日本産科婦人科学会、2012年4月13日、神戸

②Hiroshi 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

③H. 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

④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

吉田 昭三 (YOSHIDA SHOZO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
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

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

大井 豪一 (OI HIDEKAZU)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10283364