

## 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 28 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010-2012

課題番号：22591872

研究課題名（和文） 構造的転写共役因子を分子標的とした婦人科悪性腫瘍治療と薬剤耐性機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of drug resistance and treatment of gynecologic malignant tumor targeting to constitutional transcriptional cofactor

研究代表者 蜂須賀 徹（HACHISUGA TORU）

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：70180891

## 研究成果の概要（和文）：

卵巣漿液性嚢胞腺癌における mtTFA の発現を確認し、生存率との関連について検討した。その結果、mtTFA が直接 Bcl2L1 を制御していることがわかり、mtTFA の機能は抗アポトーシスと関連があり、その結果予後を不良にしていると考えられた。さらに子宮内膜癌症例について核における BAF57、ER、p53 の発現を免疫組織化学染色で評価し検討した。子宮内膜癌の核における BAF57 発現は単変量解析で低発現群のほうが高発現群より予後良好であり、多変量解析では独立した予後因子であった。さらに BAF57 発現と p53 と相関関係を認めた。

## 研究成果の概要（英文）：

The nuclear mtTFA expression in 60 tissue samples of serous ovarian cancer using immunohistochemical analysis was found that 56.7% of serous ovarian cancer patients were positive for mtTFA, whereas 43.3% were negative. Univariate survival analysis showed that the overall 5-year survival rate was significantly worse for patients with mtTFA-positive cancer compared with mtTFA-negative cancer (32%vs 42%, respectively;  $P = 0.021$ ). To elucidate the function of mtTFA in the nucleus, we investigated BCL2L1, a target gene of mtTFA. There was a significant correlation between nuclear mtTFA expression and BCL2L1 expression in seven ovarian cancer cell lines and in specimens of clinical ovarian cancer. Furthermore, we investigated the relationship between the immunohistochemical expression of BAF57 and various clinicopathological variables in 111 endometrial carcinomas. Both univariate and multivariate regression analyses were performed. The BAF57 expression was significantly associated with the surgical stage, grade of the tumor, myometrial invasion, lympho-vascular space invasion (LVSI) and lymph node metastasis. The 10-year overall survival rates of patients with low and high BAF57 expression were 96.9% and 58.2%, respectively ( $p < 0.001$ ). A multivariate analysis identified BAF57 expression as an independent prognostic factor.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

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：HMG 蛋白、mtTFA、BAF57

### 1. 研究開始当初の背景

構造的転写共役因子の一つである HMG (high mobility group) 蛋白質は酸抽出性の非ヒストンクロマチン蛋白質で、HMGA、HMGB、HMGN、HMGX、mtTFA、BAF57 などのサブファミリーが知られている。研究代表者は BAF57 (BRG1-associated factor 57) の蛋白発現が、子宮内膜癌の独立した予後因子であること、また mtTFA (mitochondrial transcription factor A) は、ミトコンドリアを場とした薬剤耐性獲得に重要な役割を果たしていると考えられているが、mtTFA 高発現は子宮内膜癌予後不良因子であることを示した。HMG 蛋白ファミリーは薬剤耐性の観点からも注目されている。特に婦人科悪性腫瘍の key drug と考えられている白金製剤の作用機序は DNA に直接結合し DNA 鎖内や鎖間に架橋を形成し、DNA の複製と転写を阻害し抗腫瘍活性を發揮している。HMG ファミリーはシスプラチン付加体と高い親和性を持っており、p53 と分子会合しアポトーシスを誘導することが知られている。一方では、クロマチン再構築因子、構造的転写因子である HMGB1 などが複合蛋白を構成し DNA 修復因子の活性化を誘導し腫瘍が薬剤耐性を獲得する場合もあると推察されており、HMG 蛋白ファミリーの抗体、阻害剤などを用いた薬剤耐性克服に向けた分子標的治療の可能性が報告されている (Yoshida Y. Cancer Res 63(13);3729-3734, 2003)。婦人科悪性腫瘍はシスプラチンが key drug の一つであるが、その薬剤耐性が大きな問題となっている。HMG 蛋白ファミリーの研究がこの薬剤耐性機構の解明に役立つことを期待している。

### 2. 研究の目的

mtTFA (mitochondrial transcription factor A) は、ミトコンドリアを場とした薬剤耐性獲得に重要な役割を果たしていると考えられているが、mtTFA 高発現は子宮内膜癌予後不良因子であった。これらの研究結果をふまえて、構造的転写共役因子である BAF57 や mtTFA と細胞増殖や細胞死に関係している p53 または ER との関係性を明らかにしてこれら構造的転写共役因子の分子標的薬としての可能性とシスプラチンを中心とした薬剤耐性のマーカーとしての可能性を検討することを目的としている。

### 3. 研究の方法

本研究では、産婦人科研究生 2 名が研究代表者の補助をする。

#### 平成 22 年度計画

平成 22 年度は子宮内膜癌、卵巣癌について、当大学分子生物学教室にて作成されている HMG 蛋白質ファミリーに対する多数の抗体をさらに免疫組織学的検討し婦人科悪性腫瘍における発現態度を検討する。子宮内膜癌・卵巣癌培養細胞に対しては BAF57 並びに mtTFA 発現を siRNA で knock down して、増殖能・抗癌剤耐性について検討する。さらに凍結材料を用いて BAF57 と mtTFA の蛋白定量の検討を予定している。平成 23 年度以降は HMG 蛋白質ファミリーの中でターゲットとなる蛋白質を絞り、ヌードマウスを用いた検討で HMG 蛋白質ファミリーを分子標的とした婦人科悪性腫瘍 (特に子宮内膜癌と卵巣明細胞癌) 治療の可能性の検討、またシスプラチンを中心とした薬剤耐性獲得機序解析を目的としている。

## 平成 23 年度以降の計画

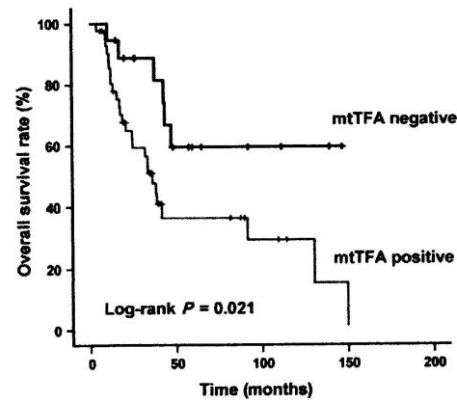
培養細胞では、BAF57 や mtTFA が分子治療の標的であることの妥当性を検討するため、卵巣癌細胞株 SKOV3 (漿液性腺癌)、RMG1 (明細胞癌) を用いて、BAF57, mtTFA 過剰発現株、または siRNA を用いた発現抑制株の樹立を試み、それぞれの細胞株の増殖能、生化学的特徴を明らかにする。さらにヌードマウス上での腫瘍形成能を確認し、アポトーシスなどを含めた腫瘍の病理組織学的形態を明らかにする。また中和抗体、阻害剤を用いた抗腫瘍効果について検討する。

### 4. 研究成果 卵巣がんについて

1995 年 1 月から 2008 年 12 月までに当科で初回治療した卵巣漿液性嚢胞腺癌 60 例を対象として免疫組織化学染色を行い、mtTFA の発現と生存期間との関連を Kaplan-Meier 曲線と log-rank test で解析した。また、卵巣癌培養細胞株 A2780 と OVK18#108 を核と細胞質に分離し、同量における mtTFA の発現をウエスタンブロットで確認した。さらに、mtTFA の標的遺伝子をクロマチン免疫沈降法およびレポーター解析で同定した。

補足として、免疫組織化学染色で Bcl2L-1 の発現と mtTFA の発現の関連、Bcl2L-1 の発現と生存期間との関連も検討した。

その結果、(1) mtTFA 陽性は 34 例、陰性例は 26 例で、mtTFA の発現と組織分化度に関連が認められた。また mtTFA 陽性群の 5 年生存率は 35.9%、陰性群は 59.0%で、陽性群は有意に予後不良であった。



(2) mtTFA は細胞質だけでなく核にも存在しており、細胞質内よりも核内に多く存在していた。

(3) mtTFA の発現と関係のある抗アポトーシス関連因子のうち、Bcl2L1 と BIRC5 との関連に着目した。7 種類の卵巣癌培養細胞株中の mtTFA と Bcl2L1 の発現は同等で、ピアソンの相関係数は 0.785 と、有意に強い正の相関関係を認めた。しかし、mtTFA と BIRC5 の発現に関連は認められなかった。

次に、卵巣癌培養細胞株 OVK18#102 と A2780 を 2 種類の siRNA で knockdown したところ、mtTFA の発現の低下と共に Bcl2L1 の発現も抑制された。

そこで、クロマチン免疫沈降反応を行うと、mtTFA は Bcl2L1 のプロモーターに結合していた。リポーターアッセイでは、mtTFA の容量増加に伴いルシフェラーゼ活性は増加 (Bcl2L1 の転写が亢進) し、siRNA で mtTFA を抑制するルシフェラーゼ活性が低下 (Bcl2L1 の転写が低下) した。

以上から mtTFA は Bcl2L1 の発現を正に調節している事が判明した。考察として卵巣漿液性嚢胞腺癌において、核内の mtTFA は 55-86% とすでに報告されている前立腺癌での 30-40% と比べ、核内の発現が強く認められた。卵巣漿液性嚢胞腺癌においては mtTFA が核 DNA 発現を強く制御している可能性が示唆された。また前立腺癌で mtTFA のターゲットと

された BIRC5 は、卵巣漿液性嚢胞腺癌においては関連が認められなかった。アポトーシス開始因子である Smac/Diablo の放出は、抗アポトーシス機能を持つ Bcl2L1 に抑制されている。今回の実験で mtTFA が直接 Bcl2L1 を制御していることがわかり、mtTFA の機能は抗アポトーシスと関連があり、その結果予後を不良にしていると考えられた。補足した免疫組織化学染色の結果からも mtTFA と Bcl2L1 の発現には関連があり、培養細胞を用いた実験結果を強く裏づけた。結論として mtTFA は核にも存在し、抗アポトーシス機能をもつ Bcl2L1 の発現を転写レベルで正に制御していた。

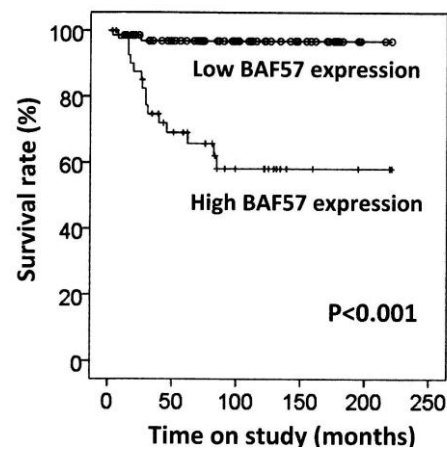
mtTFA は卵巣漿液性嚢胞腺癌の治療に対する新たな分子標的になる可能性を探索していきたい。

子宮内膜癌について

1990年1月から2000年12月の間に産業医科大学産婦人科で初回治療を行った子宮内膜癌 111 例を対象とした。パラフィン切片を用いて免疫組織化学染色を行い、核における BAF57、ER、p53 の発現を検討した。それぞれの labeling index (LI) は最も染色されている部位で 500 細胞中の陽性率 (%) で表した。BAF57 発現は 3 群 (LI: <10%, LI: 10 ≤, ≤50%, LI: 50% <) に分類し、最終的に低発現群 (LI: ≤50%) と高発現群 (LI: 50% <) の 2 群に分類した。

統計解析は SPSS17.0 (SPSS Japan Inc.) を使用した。臨床病理学的因子との関連を Mann-Whitney U-test を用い、10 年累積生存率を Kaplan-Meier 法を用い、予後関連因子との関連については Cox 比例ハザードモデルを用い単変量解析、多変量解析を行い、 $P < 0.05$  で有意とした。BAF57 と ER、p53 との相関は Pearson 相関係数で評価した。核における BAF57 低発現群、高発現群は、69 例

(62.2%) と 42 例 (37.8%) であった。それぞれの 10 年累積生存率は 96.9% と 58.2% で、有意差を認めた ( $P < 0.001$ )。



単変量解析で BAF57 強発現群は予後について有意差を認め ( $P < 0.001$ )、多変量解析でも有意差を認めた ( $P = 0.016$ )。

BAF57 と p53 の相関係数は 0.312 ( $P = 0.001$ )、BAF57 と ER の相関係数は  $-0.141$  ( $P = 0.14$ ) であり、p53 とは有意な正の相関を認めたが、ER との相関関係は見出せなかった。考察としては、子宮内膜癌の核における BAF57 発現は単変量解析で低発現群のほうが高発現群より予後良好であり、多変量解析では独立した予後因子であった。これは BAF57 発現が腫瘍活性に関与している可能性を示唆している。BAF57 は乳癌において ER と、前立腺癌において AR と直接相互作用するとの報告があるが、今回の研究では、BAF57 発現と ER の相関関係は明らかではなかった。

p53 は SWI/SNF 複合体のいくつかのサブユニットに結合すると報告されており、子宮内膜癌においても重要な予後因子であるが、今回の研究では BAF57 発現と p53 と相関関係を認め、悪性度に関連している可能性がある。結論としては、子宮内膜癌において BAF57 高発現群は有意な予後因子であった。

BAF57 発現は、特に p53 過剰発現しているような悪性度の高い子宮体癌における治療の

新たなターゲットになることが示唆された。

#### 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 7 件)

- ① Yahara K, Ohguri T, Imada H, Yamaguchi S, Kawagoe T, Matsuura Y, Hachisuga T, Korogi Y. Epithelial ovarian cancer: definitive radiotherapy for limited recurrence after complete remission had been achieved with aggressive front-line therapy. *J Radiat Res*, 54, 322-329, 2013, 査読有
- ② Honda T, Urabe R, Kurita T, Kagami S, Kawagoe T, Toki N, Matsuura Y, Hachisuga T. Trends in the demographic and clinicopathological characteristics in Japanese patients with endometrial cancer, 1990-2010. , 査読有 *Int J Womens Health*, 4, 207-212, 2012.
- ③ Kagami S, Kurita T, Kawagoe T, Toki N, Matsuura Y, Hachisuga T, Matsuyama A, Hashimoto H, Izumi H, Kohno K. Prognostic significance of BAF57 expression in patients with endometrial carcinoma. *Histol Histopathol* 27, 593-599, 2012. , 査読有
- ④ Kurita T, Izumi H, Kagami S, Kawagoe T, Toki N, Matsuura Y, Hachisuga T, Kohno K. Mitochondrial transcription factor A regulates BCL2L1 gene expression and is a prognostic factor in serous ovarian cancer. *Cncr Sci* 103, 239-244, 2012. , 査読有
- ⑤ Emoto M, Sadamori R, Hachisuga T, Kawarabayashi T, Miyamoto S. Clinical

usefulness of contrast-enhanced color Doppler ultrasonography in invasive and noninvasive gestational trophoblastic diseases: a preliminary study. *J Reprod Med*, 56, 224-234, 2011, 査読有

- ⑥ Tsujioka H, Hachisuga T, Hikita S, Ueda T, Yotsumoto F, Shirota K, Yoshizato T, Kawarabayashi T, Kuroki M, Miyamoto S. Apoptosis as a possible candidate mechanism for removal of tamoxifen-related endometrial cells with KRAS mutations. *Anticancer Res*, 30, 3119-3123, 2010, 査読有
- ⑦ Toki N, Kagami S, Kurita T, Kawagoe T, Matsuura Y, Hachisuga T, Matsuyama A, Hashimoto H, Izumi H, Kohno K. Expression of mitochondrial transcription factor A in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations and prognostic significance. *Virchows Arch* 456, 387-393, 2010, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Hachisuga T, Kawagoe T, Urabe R., Kagami S, Kurita T, Toki N, Clinicopathologic analysis of the p53 signature in the endometrial polyp. 14<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society. Vancouver, Canada, October 15, 2012
- ② 鏡 誠治, 栗田 智子, 卜部 理恵, 川越 俊, 松浦 祐介, 蜂須賀 徹, 和泉 弘人, 河野 公俊 卵巣癌における N-acetylgalactosaminyltransferase-6 (GalNAc-T6) 発現の検討. 第 64 回日本産

科婦人科学会学術講演会 神戸 4月14日 2012年

- ③ 栗田 智子, 鏡 誠治, 卜部 理恵, 川越俊典, 松浦 祐介, 蜂須賀 徹, 和泉弘人, 河野公俊 子宮体癌における N-acetylgalactosaminyltransferase-6 発現の意義. 第64回日本産科婦人科学会学術講演会 神戸 4月13日 2012年
- ④ 鏡 誠治, 栗田智子, 卜部理恵, 川越俊典, 松浦祐介, 蜂須賀 徹, 和泉弘人, 河野 公俊 卵巣癌における N-acetylgalactosaminyltransferase-6 (GalNAc-T6) 発現の検討. 第49回日本癌治療学会 名古屋 10月28日 2011年
- ⑤ Honda T, Urabe R, Kurita T, Kagami S, Kawagoe T, Toki N, Matsuura Y, Hachisuga T Trends in the demographic and clinicopathological characteristics in Japanese patients with endometrial cancer, 1990-2010. 2<sup>nd</sup> Biennial meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology Seoul, Korea, Nov 3, 2011
- ⑥ 栗田 智子, 鏡 誠治, 卜部 理恵, 川越 俊典, 土岐 尚之, 松浦 祐介, 蜂須賀 徹, 和泉 弘人, 河野 公俊 mtTFA は卵巣漿液性嚢胞腺癌の予後不良分子で Bcl-XL の発現を抑制する. 第63回日本産科婦人科学会学術講演会 大阪 8月29日 2011年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

蜂須賀 徹 (HACHISUGA TORU)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：70180891

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし