

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670705

研究課題名(和文) 難治性卵巣明細胞腺がんに対するDNA修復異常に着目した薬剤耐性の克服

研究課題名(英文) Overcoming drug resistance to refractory ovarian clear cell adenocarcinoma with focusing on DNA repair abnormality

研究代表者

赤坂 珠理晃 (Akasaka, Juria)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90526724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：明細胞腺癌に発現する転写因子HNF-1 は、DNA損傷チェックポイントで働くChk1の過剰なリン酸化を誘発し抗癌剤耐性を獲得することを発見した。Chk1はDNA損傷部位を認識するATM/ATRからのシグナルで活性化するため、これらをノックダウンしたがChk1の過剰なリン酸化は維持された。Chk1と複合体を形成してその活性化を促進させるClaspinに着目した結果、HNF-1 はClaspinの発現を介してChk1の自己リン酸化を活性化させ、Claspinをノックダウンすると抗癌剤感受性を改善させた。Claspin-Chk1複合体は明細胞腺癌において新たな治療標的になることが示された。

研究成果の概要(英文)：We have found that transcription factor HNF-1 expressed in clear cell adenocarcinoma induced hyperphosphorylation of Chk1 acting on DNA damage checkpoint, leading to acquisition of anticancer drug resistance. Chk1 is activated through the signals from ATM/ATR which recognize damaged DNA sites. Despite knockdown of these proteins, hyperphosphorylation of Chk1 was maintained. With focusing on Claspin, which can form a complex with Chk1 and facilitate its activation, it was found that HNF-1 activated autophosphorylation of Chk1 through the induction of Claspin expression. Accordingly, knockdown of Claspin led to improvement in sensitivity to anticancer drugs. The Claspin-Chk1 complex was shown to be a novel therapeutic target in the clear cell adenocarcinoma.

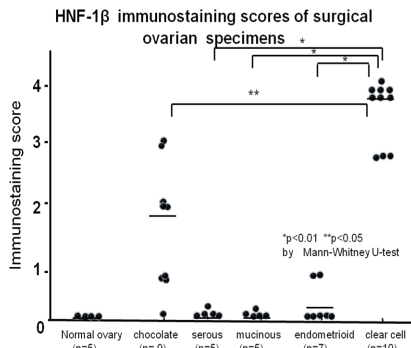
研究分野：産婦人科

キーワード：卵巣明細胞腺癌 HNF-1 Chk1 Claspin チェックポイント 婦人科腫瘍

1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌のうち明細胞腺癌は、早期癌であってもシスプラチンなどの白金製剤を中心とした化学療法に低感受性で、残存・再発病変のコントロールは極めて難しく、予後が不良である。このため明細胞腺癌の薬剤耐性機構を解明して新たな治療戦略を構築することは、今後の治療成績を向上させるために喫緊の課題である。

我々はDNAマイクロアレイによる網羅的解析と免疫染色による予備実験より、卵巣明細胞腺癌において核内に発現する転写因子の一つである **HNF-1β** が他の組織型には発現せず、卵巣明細胞腺癌に特異的であることを発見した(下図、Kajihara H, Kobayashi H. *Int J Gynecol Pathol.* 2012.)。またノックイン・ノックダウン実験の結果、HNF-1β 遺伝子はDNA損傷に対し、センサー・エフェクターとして作用するタンパクのリン酸化・活性化を誘発し、細胞周期停止を持続させ、抗がん剤耐性を獲得することを発見した。



すなわち、DNA損傷を修復するためには、修復部位を認識するため、**ATR-ATRIP-Claspin-Chk1** 複合体が形成されセンサーとして作用し、最終的に Chk1 のリン酸化を起こすことにより細胞周期を停止させ、その間にDNA修復を行う。その後 Chk1 のリン酸化が解除さ

れるため、修復困難と判断され細胞死に至る。しかし、明細胞腺癌では HNF-1β の過剰発現のため、Chk1 タンパクのリン酸化が起こったままとなり、細胞周期停止が持続するため、抗がん剤に耐性を示すことを確認した。しかしその実行タンパクはまだ同定できていない。

2. 研究の目的

卵巣明細胞腺癌において Chk1 の過剰なリン酸化が抗がん剤抵抗性を示す要因であるため、Chk1 の過剰なリン酸化を制御する機序の解明と、これらの機能を修飾することにより細胞周期制御や薬剤耐性克服を引き起こせるかどうかを明確にすることを目的とする。

3. 研究の方法

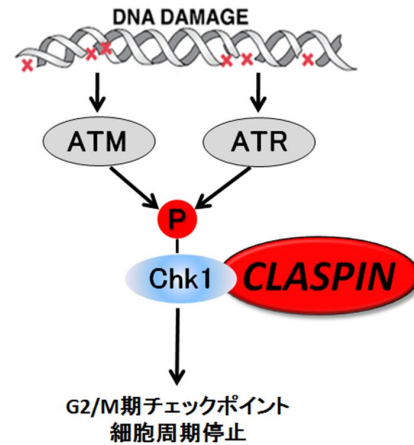
(1)卵巣明細胞腺癌(初発・再発)の臨床検

体を用いたチェックポイント関与因子の検討

集積された卵巣明細胞癌症例の組織検体(初発例および転移再発例、また化学療法に感受性を示した症例と抵抗性を示した症例)を対象に、細胞周期とチェックポイントに關与する遺伝子および遺伝子産物を調べる。ホルマリン包埋切片組織標本の HNF-1β と関連因子の多重免疫組織染色を行う。ターゲットはチェックポイントシグナルセンサー ATR-ATRIP キナーゼ、トランスドューサー Chk1・Chk2、エフェクター Cdc25A、そしてメディエーター Claspinなどを予定した。

(2)明細胞腺癌培養細胞を用いた研究

HNF-1β がDNA損傷に対する Chk1 の過剰なリン酸化を引き起こす機序を解明するために、DNA損傷チェックポイント機構において Chk1 活性化に関わるタンパク(ATM,ATR, Claspin:下図)の発現をそれぞれ評価した。



ATM/ATR の発現とノックダウン実験

DNA 損傷刺激に対して、HNF-1β の有無によって ATM/ATR の発現が異なるかをウェスタンブロットで評価した。また、ATM/ATR をノックダウンして Chk1 の過剰なリン酸化が解除され、細胞周期停止がおこらないかをフローサイトメトリーを用いて評価した。

Claspin の発現とノックダウン実験

Chk1 と複合体を形成し、Chk1 の自己リン酸化を促進させ細胞周期を停止させる Claspin の発現に着目した。DNA 損傷に対して、HNF-1β の有無により Claspin の発現に差があるのかをウェスタンブロットを用いて評価した。また、Claspin をノックダウンすることで、Chk1 の過剰なリン酸化が解除され、細胞死を誘導できるかを評価した。

4. 研究成果

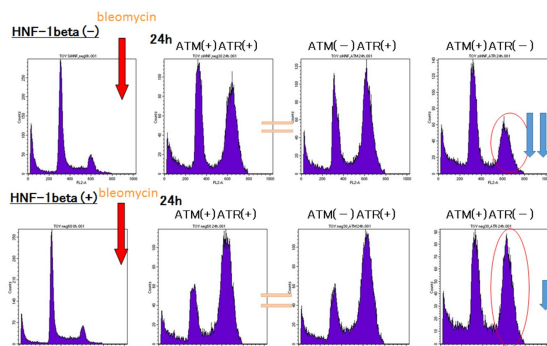
(1)明細胞腺癌の臨床検体を用いて HNF-1β は良好に核内に染まり、DNA 酸化損傷マーカーである 8OHdG や H2A も染まった。しかし、市販されている免疫組織染色が可能な

Claspin 抗体は種類が少なく、様々な条件検討を行って検討を重ねたが、非特異的な染まりが多く評価が困難であった。今後も臨床検体においては、検討を継続していく必要がある。

(2)HNF-18 を発現している卵巣明細胞腺癌株 TOV21G を用いて以下の実験を行った。プレオマイシンは金属イオンを補因子としてキレートし、分子状酸素を活性化することフリーラジカルを作って DNA を損傷すると考えられている。卵巣内膜症性嚢胞内の過剰鉄による DNA 損傷のモデルになり得ると考え、DNA 損傷刺激としてプレオマイシンを用いた。

HNF-18 を一過性ノックダウンし、プレオマイシンを添加した際の AMT と ATR の発現をウェスタンブロットで評価した。結果、両者とも差はなかった。ATM と ATR のリン酸化活性も評価したが差はなかった。

さらにそれぞれを一過性ノックダウンした。結果、ATM をノックダウンしても Chk1 のリン酸化に変化はほとんど認めなかった(下図)。ATR を一過性ノックダウンした際、Chk1 のリン酸化は減少したが、それでもなお HNF-18 陽性の場合には陰性と比較し、Chk1 の過剰なリン酸化活性によって細胞周期の停止が引き起こされていた(下図)。以上の結果から、HNF-18 は ATM/ATR を介さずに Chk1 の過剰なリン酸化を引き起こしている可能性が示された。



HNF-18 を一過性ノックダウンし、プレオマイシンを添加した際の Claspin の発現をウェスタンブロットで評価した。結果、HNF-18 は Claspin の過剰な発現を介して Chk1 の自己リン酸化を促進していることが示された。また、HNF-18 陽性細胞に Claspin を一過性ノックダウンしたところ、Chk1 の過剰な自己リン酸化は解除され、HNF-18 陰性細胞と同様の挙動を示した。

HNF-18 陽性細胞は Chk1 のリン酸化が維持されるため細胞周期停止が持続し、抗がん剤抵抗性を示すため、プレオマイシン添加後 48 時間後の生存率は、HNF-18 陰性細胞と比較し有意に高い。次に、HNF-18 陽性細胞に Claspin をノックダウンし、プレオマイシンを添加した結果、48 時間後の生存率は HNF-18 陰性細胞と同レベルまで有意に低下

した。従って、Chk1-Claspin 複合体は卵巣明細胞腺癌の抗がん剤抵抗性を改善させる新たな治療標的となる可能性が示唆された。

現在、HNF-18 は Claspin の発現を転写レベルで制御しているのか、分解系(ユビキチン化)を抑制しているのかを検証中である。また、Chk1-Claspin 複合体を修飾する薬剤として、Chk1 阻害剤などと様々な抗がん剤との併用療法も検討中である。

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 3 件)

Akasaka J, Uekuri C, Shigetomi H, Koike M, Kobayashi H. Hepatocyte nuclear factor (HNF)-18 and its physiological importance in endometriosis. *Biomed Rep.* 1(1):13-17. 2013 Jan.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3956682/>

Shigetomi H, Sudo T, Shimada K, Uekuri C, Kobayashi H, (他 5 名). Inhibition of cell death and induction of G2 arrest accumulation in human ovarian clear cells by HNF-18 transcription factor: chemosensitivity is regulated by checkpoint kinase CHK1. *Int J Gynecol Cancer.* 24(5):838-43, 2014 Jun. doi: 10.1097/IGC.000000000000136.

Uekuri C, Shigetomi H, Ono S, Sasaki Y, Matsuura M, Kobayashi H. Toward an understanding of the pathophysiology of clear cell carcinoma of the ovary. *Oncol Lett.* 6(5):1163-1173. 2013 Nov.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813717/>

[学会発表](計 3 件)

Uekuri C, Shigetomi H, Kanayama S, Kawaguchi R, Yoshida S, Furukawa N, Oi H, Kobayashi H. Investigation of the role of Hepatocyte Nuclear Factor-1 beta (HNF-1) in the cell cycle checkpoint of clear cell adenocarcinoma in the ovary. 2014 Annual Congress of Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology. March 8-9, 2014. Taipei, Taiwan.

Uekuri C, Shigetomi H, Kanayama S, Kawaguchi R, Yoshida S, Furukawa N, Oi H, Kobayashi H, Sudo T. HNF-1beta controls claspin expression, sustaining chk1 protein phosphorylation in clear cell adenocarcinoma of ovary. 第 66 回日本産婦人科学会学術講演会. 2014 年 4 月 18 日-20 日、東京

重富洋志, 他. 転写因子 HNF-1beta は卵巣明細胞腺癌において Claspin の発現を制御し、chk1 タンパクのリン酸化を維持させる. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 3 日-5 日、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤坂 珠理晃 (Akasaka Juria)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：90526724

(2) 研究分担者

吉元 千陽 (Yoshimoto Chiharu)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：00526725

大井 豪一 (Oi Hidekazu)
近畿大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：10283368

吉田 昭三 (Yoshida Shozo)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：40347555

古川 直人 (Furukawa Naoto)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：50347556