

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861324

研究課題名(和文) 卵巣がん関連遺伝子の網羅的メタボローム解析

研究課題名(英文) Comprehensive metabolomics among tumor-related genes

研究代表者

山口 建 (Yamaguchi, Ken)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20378772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞癌は子宮内膜症という酸化ストレスの中から発生するが、抗癌剤耐性で予後不良の疾患である。明細胞癌に高発現するHNF1Bはストレス環境においても増殖を促し、抗癌剤耐性に関わることが明らかとなった。また、発癌に関わるARID1AはSWI/SNF複合体に含まれる因子である。ARID1A因子のみでは予後とに相関を認めなかったが、SWI/SNF複合体全体の発現を検討すると予後とに相関を認めた。

研究成果の概要(英文)：Ovarian clear cell carcinoma (CCC) is a histologic subtype of epithelial ovarian cancer (EOC) with unique characteristics including chemoresistance and carcinogenic origins from endometriotic cysts. We identified that HNF1B which is expressing highly in CCC contributes to proliferation in the stress environment. HNF1B also affects the chemoresistance through Warburg effect and glutathione synthesis. ARID1A is a subunit of SWI/SNF complex. Although ARID1A expression was not related to poor prognosis, the SWI/SNF-negative group exhibited significantly shorter progression-free and overall survival ($p < 0.05$). Multivariate analysis suggested that SWI/SNF complex expression status was an independent prognostic factor.

研究分野：卵巣癌

キーワード：卵巣癌 エピジェネティック 代謝

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は組織学的に多様であり、予後不良の疾患である。近年、癌関連遺伝子と癌に特有な代謝異常（癌代謝）との関係が、汎用性の高い治療標的として注目されている。その代表が Warburg 効果である。癌細胞は有酸素下である好气的環境でも、好气的代謝であるミトコンドリアの酸化的リン酸化だけではなく、嫌气的代謝である糖代謝（解糖系）により ATP を産生してエネルギーとしている。その目的は癌が発育する低酸素や酸化ストレス環境のような過酷な環境でもエネルギーを産生できるように順応したという説がある。また、癌細胞は Warburg 効果による ATP 産生のみならず、急速に増殖をするために核酸、タンパク質、脂質などの材料であるヌクレオチド、アミノ酸、脂肪酸などが代謝により大量に生合成されると考えられている (Matthew; Science, 2009)。

各卵巣癌組織型における発癌に関連する遺伝子は異なり、漿液性癌では TP53 遺伝子、KRAS 遺伝子、明細胞癌では ARID1A 遺伝子、PIK3CA 遺伝子、類内膜癌では PTEN 遺伝子、CTNNB1 遺伝子、粘液性癌では KRAS 遺伝子に変異が多いとされる。しかし、これらの癌関連遺伝子と癌代謝との関係は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、卵巣癌の癌関連遺伝子がそれぞれどのような代謝異常を示すのかを検討し、汎用性の高い治療標的を開発することを目的とした「卵巣癌関連遺伝子において網羅的メタボローム解析（メタボロミクス）をする基礎研究」である。

3. 研究の方法

卵巣癌で既知の癌関連遺伝子が代謝に及ぼす影響ならびにそのメカニズムを解明するため、当初は不死化ヒト卵巣表層上皮細胞 (HOSE 細胞) へ癌関連遺伝子の導入を行い、以下のことを明らかにする予定であった。

- (1) 遺伝子改変 HOSE 細胞における発癌に関わる表現型の確認
- (2) 遺伝子改変 HOSE 細胞の発現マイクロアレイ解析（バイオインフォマティクス）により、各遺伝子シグネチャーの作成とパスウェイ解析
- (3) 遺伝子改変 HOSE 細胞を用いた網羅的メタボローム解析（メタボロミクス）により、各遺伝子の代謝への影響を解明
- (4) 新規治療標的物質や遺伝子の治療実験、ヒトサンプルを用いた早期診断法の開発

しかし、遺伝子改変 HOSE 細胞への遺伝子導入ができず、また、発癌に関わる表現型が予想されたがんの表現型にならなかった。一方で HNF1B は Warburg 効果、アミノ酸代謝、グルタチオン代謝を変化させること

が我々の研究でわかっている。

そこで、癌代謝が大きく変化した卵巣明細胞癌に着目して癌代謝、HNF1B、癌の表現型について以下について検討した。

(1) 特徴的な明細胞癌細胞における HNF1B の検討

遅い増殖、抗癌剤耐性、血栓合併などの特徴を有する明細胞癌において、癌代謝を大きく変化させる HNF1B の役割を検討する。明細胞癌細胞株の HNF1B 発現抑制株を用いて、増殖、抗癌剤耐性等を検討。

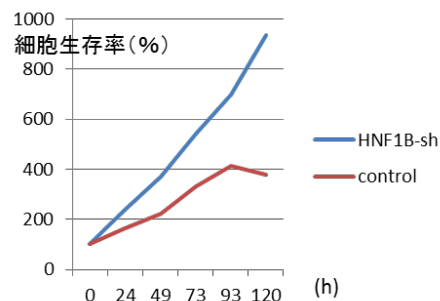
(2) ARID1A が属する SWI/SNF 複合体の検討

癌代謝異常を示す明細胞癌において、遺伝子変異が発癌に関わるとされるがん抑制遺伝子 ARID1A 遺伝子は、それ自体の単一因子では予後などに影響するか知られていない。そこで、ARID1A 遺伝子が属する SWI/SNF 複合体に着目して研究をすすめた。

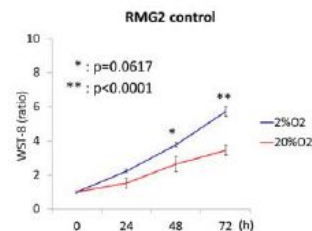
4. 研究成果

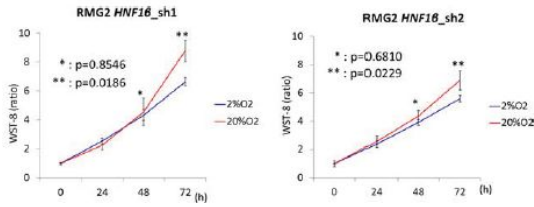
(1) 特徴的な明細胞癌細胞における HNF1B の検討

卵巣明細胞癌細胞株の HNF1B 発現抑制株とコントロール株を用いて、増殖能を検討した。HNF1B 発現抑制株はコントロール株と比較して有意に増殖が速くなった ($p < 0.05$)。

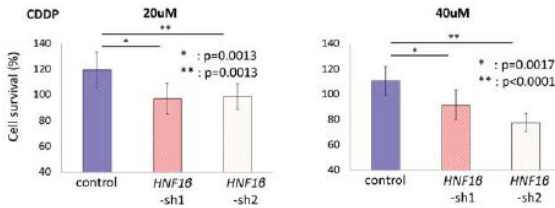


また、20%酸素環境下と低酸素環境（2%酸素）下とで比較すると、HNF1B 発現抑制株では低酸素環境では増殖が遅くなったが ($p < 0.05$) HNF1B 発現抑制株では低酸素環境ではむしろ増殖が速くなった ($p < 0.001$)。





次に抗癌剤感受性を検討した。HNF1B 発現抑制株はコントロール株と比較して有意にシスプラチン感受性が上昇した ($p < 0.01$)

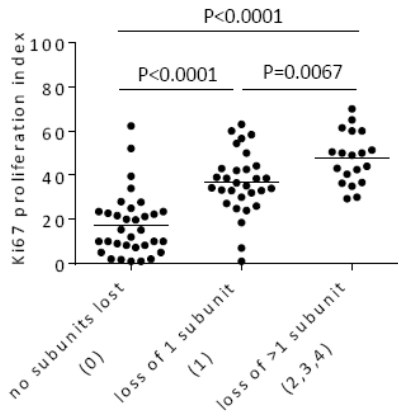


これらの結果は、HNF1B は癌代謝を誘導するが、低酸素ストレス環境下でも増殖し、抗癌剤耐性に寄与することを示唆する。

(2) ARID1A が属する SWI/SNF 複合体の検討

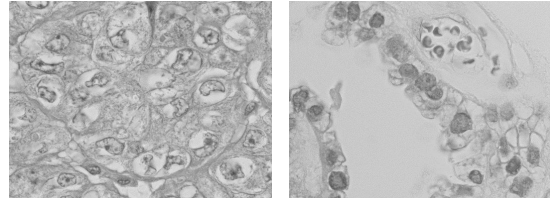
卵巣癌組織における免疫染色

卵巣癌組織 152 検体を用いて SWI/SNF 複合体に属する 9 因子のタンパク発現を免疫組織染色で検討した。9 因子は過去に他癌腫を含め遺伝子変異の報告があるものから選択した。明細胞癌の 46.3% に ARID1A 発現、15.9% に BRM 発現、11% に BRG1 発現の消失を認めた。61.0% に少なくとも 1 因子の発現消失を認め、23.2% に複数の因子の発現消失を認めた。発現消失の因子が増えるほど進行期症例が多かった ($p=0.0094$)。また、Ki67 index は発現消失因子が多いほど高かった ($p < 0.0001$)。



SWI/SNF 複合体と核異型

明細胞癌は核異型に多様性があることから核異型との関係を検討した。

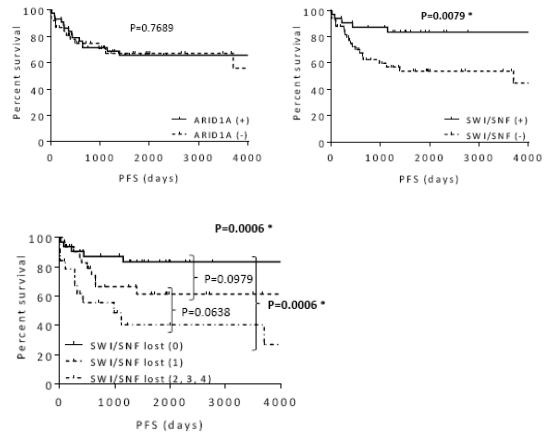


上の左図のように SWI/SNF 複合体の発現消失している症例は、有意に扁平で不整な外郭を有し、断片化された核を認めた。一方で SWI/SNF 複合体の発現が消失していない症例は、円形で整な外郭を有し、目立つ核を認めた (右図)。

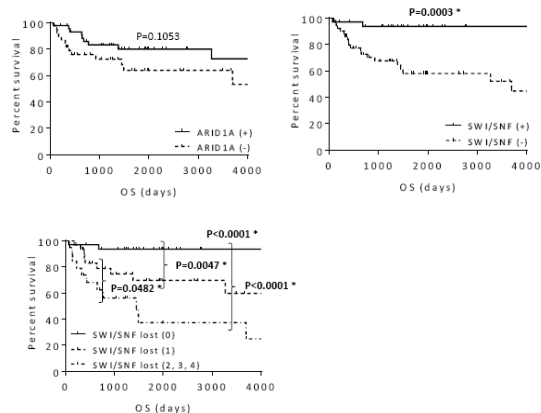
SWI/SNF 複合体と予後

無増悪生存期間、全生存期間について Kaplan-Meier 曲線を描くと、ARID1A 発現の消失の有無は予後とに相関を認めなかったが、SWI/SNF 複合体の発現消失群は有意に発現ある群よりも予後不良であった。更に、発現消失因子が複数の群は一つの群よりも有意に予後不良であった ($p < 0.05$)。

無増悪生存期間



全生存期間



これらの結果は、*ARID1A* 遺伝子変異、祖の発現消失が発癌に關与するのみならず、SWI/SNF 複合体全体が卵巣明細胞癌の悪性度に關与していることを示唆している。

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 13 件)

Mandai M, Amano Y, Yamaguchi K, Matsumura N, Baba T, Konishi I.

Ovarian clear cell carcinoma meets metabolism; HNF-1 β confers survival benefits through the Warburg effect and ROS reduction.

Oncotarget. 2015 Oct 13;6(31):30704-14. Review.

Amano Y, Mandai M, Yamaguchi K, Matsumura N, Kharma B, Baba T, Abiko K, Hamanishi J, Yoshioka Y, Konishi I.

Metabolic alterations caused by HNF1 expression in ovarian clear cell carcinoma contribute to cell survival.

Oncotarget. 2015 Jul 31. [Epub ahead of print] 査読あり

Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Horikawa N, Murakami R, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Baba T, Konishi I, Mandai M.

IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer.

Br J Cancer. 2015 Apr 28;112(9):1501-9. doi: 10.1038/bjc.2015.101. Epub 2015 Mar 31. 査読あり

Peng J, Yoshioka Y, Mandai M, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Hamanishi J, Kharma B, Murakami R, Abiko K, Murphy SK, Konishi I.

The BMP signaling pathway leads to enhanced proliferation in serous ovarian cancer—a potential therapeutic target.

Mol Carcinog. 2015 Feb 7. doi: 10.1002/mc.22283. [Epub ahead of print] 査読あり

Nagura M, Matsumura N, Baba T, Murakami R, Kharma B, Hamanishi J, Yamaguchi K, Abiko K, Koshiyama M, Mandai M, Murata T, Murphy SK, Konishi I.

Invasion of uterine cervical squamous cell carcinoma cells is facilitated by locoregional interaction with cancer-associated fibroblasts via activating transforming growth factor- β .

Gynecol Oncol. 2015 Jan;136(1):104-11. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.11.075. Epub 2014 Nov 28. 査読あり

Okamoto T, Mandai M, Matsumura N, Yamaguchi K, Kondoh H, Amano Y, Baba T, Hamanishi J, Abiko K, Kosaka K, Murphy SK, Mori S, Konishi I.

Hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β) promotes glucose uptake and glycolytic activity in ovarian clear cell carcinoma. Mol Carcinog. 2015 Jan;54(1):35-49. doi: 10.1002/mc.22072. Epub 2013 Sep 17. 査読あり

Nakakita B, Abiko K, Mikami Y, Kido A, Baba T, Yoshioka Y, Yamaguchi K, Matsumura N, Konishi I.

Clear cell carcinoma arising from a uterus-like mass.

Pathol Int. 2014 Nov;64(11):576-80. doi: 10.1111/pin.12218. Epub 2014 Oct 31. 査読あり

Nagura M, Koshiyama M, Matsumura N, Kido A, Baba T, Abiko K, Hamanishi J, Yamaguchi K, Mikami Y, Konishi I.

Clinical approaches to treating papillary squamous cell carcinoma of the uterine cervix.

BMC Cancer. 2014 Oct 27;14:784. doi: 10.1186/1471-2407-14-784. 査読あり

Kharma B, Baba T, Matsumura N, Kang HS, Hamanishi J, Murakami R, McConechy MM, Leung S, Yamaguchi K, Hosoe Y, Yoshioka Y, Murphy SK, Mandai M, Hunstman DG, Konishi I.

STAT1 drives tumor progression in serous papillary endometrial cancer.

Cancer Res. 2014 Nov 15;74(22):6519-30. doi:

10.1158/0008-5472.CAN-14-0847. Epub 2014 Sep 29 査読あり

Yamaguchi K, Matsumura N, Mandai M, Baba T, Konishi I, Murphy SK.

Epigenetic and genetic dispositions of ovarian carcinomas.

Oncoscience. 2014 Sep 22;1(9):574-9. eCollection 2014.

Yamaguchi K, Huang Z, Matsumura N, Mandai M, Okamoto T, Baba T, Konishi I, Berchuck A, Murphy SK.

Epigenetic determinants of ovarian clear cell carcinoma biology.

Int J Cancer. 2014 Aug 1;135(3):585-97. doi: 10.1002/ijc.28701. Epub 2014 Jan 14. 査読あり

Baba T, Kang HS, Hosoe Y, Kharma B, Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Koshiyama M, Mandai M, Murphy SK, Konishi I.

Menstrual cyclic change of metastin/GPR54 in endometrium.

Med Mol Morphol. 2014 Jun 8. [Epub ahead of print] 査読あり
Koshiyama M, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Konishi I.
Two cases of recurrent ovarian clear cell carcinoma treated with sorafenib. Cancer Biol Ther. 2014 Jan;15(1):22-5. doi: 10.4161/cbt.26608. Epub 2013 Oct 21. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

IGCS 15th Biennial Meeting, 2014 年 11 月 8-11 日 Melbourne Convention Center, Melbourne, Australia
Oxidative Stress and Metabolic Regulation in Clear Cell Carcinoma: Ovarian clear cell carcinoma is metabolic disease regulated epigenetically in the stressful carcinogenic environments
Ken Yamaguchi
第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 27 年 4 月 9 日~12 日、パシフィコ横浜、横浜市
卵巣明細胞腺癌における SWI/SNF 複合体の網羅的遺伝子変異解析
山口 建, Abou-Taleb Hisham, 松村 謙臣, 天野 泰彰, 山ノ井 康二, 村上 隆介, 安彦 郁, 吉岡 弓子, 濱西 潤三, 越山 雅文, 馬場 長, 小西 郁生

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

山口 建(YAMAGUCHI Ken)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20378772

(2)研究分担者

(3)連携研究者