

[ワークショップ1 / 子宮内膜症の癌化 Update (1) (疫学・自然史・病理・分子メカニズム)]

## 卵巣明細胞腺癌における転写因子 HNF-1 beta のターゲット遺伝子の網羅的検索

- 1) 奈良県立医科大学産科婦人科教室
- 2) 同・病理病態学教室
- 3) 兵庫県立がんセンター産婦人科

重富 洋志<sup>1)</sup>, 吉澤 順子<sup>1)</sup>, 山田 嘉彦<sup>1)</sup>, 川口 龍二<sup>1)</sup>, 吉田 昭三<sup>1)</sup>  
古川 直人<sup>1)</sup>, 大井 豪一<sup>1)</sup>, 小林 浩<sup>1)</sup>, 島田 啓司<sup>2)</sup>, 金山 清二<sup>3)</sup>

### 緒 言

卵巣癌とくに明細胞腺癌および類内膜腺癌には高頻度に卵巣チョコレート嚢胞病変が合併していることが報告されており, 卵巣チョコレート嚢胞がこれらの卵巣癌の発生源地になりうると思われる [1-9]. 卵巣チョコレート嚢胞から卵巣類内膜腺癌の発生に関与する遺伝子異常として, 癌抑制遺伝子 PTEN 遺伝子や p53 遺伝子変異が報告されている [10, 11]. 一方, 卵巣チョコレート嚢胞から明細胞腺癌への発癌に関与する遺伝子異常に関しては, 現在までのところ一定した見解はない. 近年, Tsuchiya らにより, 4 種類の明細胞腺癌細胞株を用いた DNA マイクロアレイ解析から, 転写因子 Hepatocyte nuclear factor-1 beta (以下 HNF-1 beta) が明細胞腺癌に特異的に高発現していることが報告された [12]. HNF-1 beta は, 肝臓, 腎臓, 胃, 小腸などに特異的に発現する転写因子であり, 器官形成, 発生に関与していることが示されている [13]. また, IGFBP1, GLUT-2, G6Pase などの糖代謝に関連する遺伝子群の発現制御に関与しており, 若年性糖尿病 MODY5 型, maturity onset diabetes of the young の責任遺伝子でもある [14]. Tsuchiya らによると, HNF-1 beta をノックダウンするとアポトーシスが促進されることから, 同遺伝子が明細胞腺癌の発達進展に関与している可能性が示されている [12]. しかし, 転写因子である HNF-1 beta によって制御され

る遺伝子や, その機能については十分に解明されていない.

そこで今回, 卵巣明細胞腺癌株に発現する HNF-1 beta を siRNA によってノックダウンし, その結果発現量が変化する遺伝子をマイクロアレイにて網羅的に検索した. また, ノックダウンした卵巣明細胞腺癌株のアノキス抵抗性の変化, 浸潤能の変化, CPT-11 感受性の変化を調べることにより, HNF-1 beta の卵巣明細胞腺癌における機能を検討した.

### 方 法

卵巣腺癌株における HNF-1 beta 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-1 beta 発現量を Real-time quantitative RT-PCR によって検討した.

ノックダウンについては, リバーストランスフェクション法で行った. トランスフェクション試薬として QIAGEN 社の HiPerfect Transfection Reagent を使用し, siRNA も同様に QIAGEN 社のものを使用した. ノックダウンの効率については RT-PCR, ウェスタンブロット法により RNA レベル, タンパクレベルでも確認した. マイクロアレイは Affymetrix 社の GeneChip Expression Array で解析した. HNF-1 beta の対象遺伝子について, 文献・マイクロアレイの結果を考慮して次の候補遺伝子を絞り込んだ. 細胞接着・遊走活性亢進作用: SPP1, 薬剤耐性: UGT1A1・ANXA

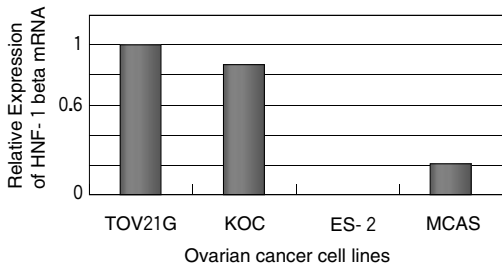


図1 各細胞株における HNF-1 beta の発現量 (Real-time quantitative RT-PCR)  
TOV21G, KOC, ES-2 : clear cell carcinoma  
MCAS : mucinous cyst adenocarcinoma

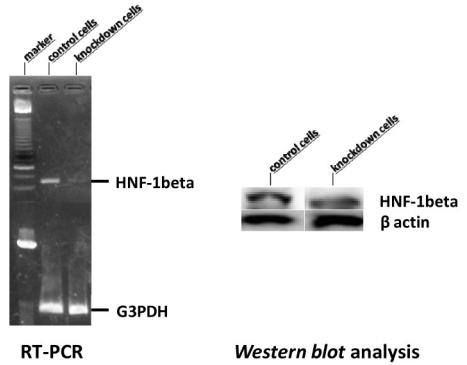


図3 RNA, タンパク質レベルでのノックダウンの確認

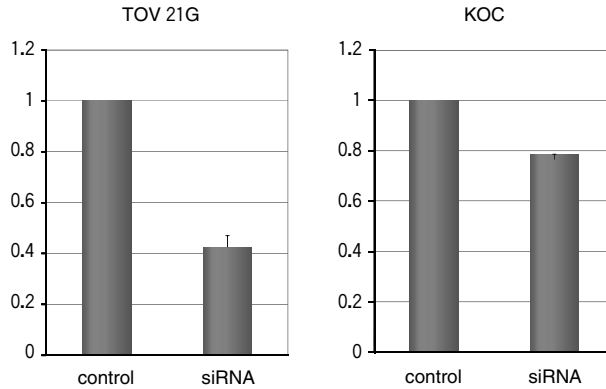


図2 TOV21G, KOC の HNF-1 beta のノックダウン効率の検討 (Real-time quantitative RT-PCR)

4, 抗アポトーシス: BCL2 L1・CFLAR, 細胞周期: CCND1. これらの遺伝子について HNF-1 beta のノックダウンによる変化を Real-time quantitative RT-PCR によって検討した.

また, ノックダウンに伴う性質の変化を調べるためにアノキス抵抗性や, 浸潤能, アポトーシス, 薬剤耐性についても検討した. アノキス抵抗性は, ノックダウンした細胞を poly-HEMA でコートしたディッシュで浮遊状態にして培養し, 24時間後の生細胞数を MTS 法で測定した. Invasion assay については, 細胞を

Matrigel invasion chambers 上で24時間培養し浸潤能の変化を検討した. アポトーシスは TUNEL assay を行い比較した. CPT-11感受性について siRNA を導入3日後に CPT-11 を加え 24h 培養し MTS 法にて生細胞数を計測した.

## 成績

卵巣腺癌株における HNF-1 beta の発現量を Real-time quantitative RT-PCR で比較したところ, 明細胞腺癌株の TOV21G, KOC で高く, 卵巣粘液性嚢胞腺癌株の MCAS の約5倍認めた. また, ES2 では発現を認めなかった (図1).

HNF-1 beta のノックダウン効率は, TOV21G では6割近く認めたが, KOC は3割弱であった (図2). われわれの条件では TOV21G の方がノックダウン効率は高かったため, 今後の実験にはこちらを使用している. ノックダウン効果について, RT-PCR, ウェスタンブロット法にても確認した (図3).

HNF-1 beta の対象遺伝子のノックダウンによる発現量の変化を Real-time quantitative RT

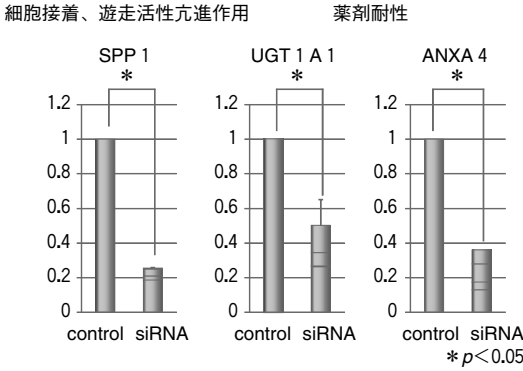


図4 ノックダウンによる発現量の変化 (Real-time quantitative RT-PCR)

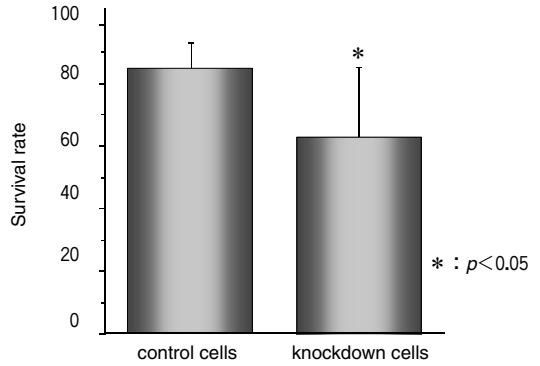


図6 ノックダウンによるアノキス抵抗性の変化

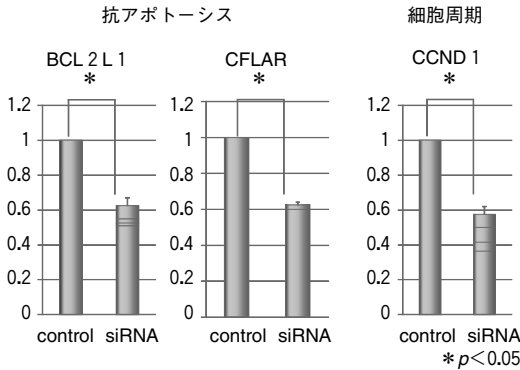


図5 ノックダウンによる発現量の変化 (Real-time quantitative RT-PCR)

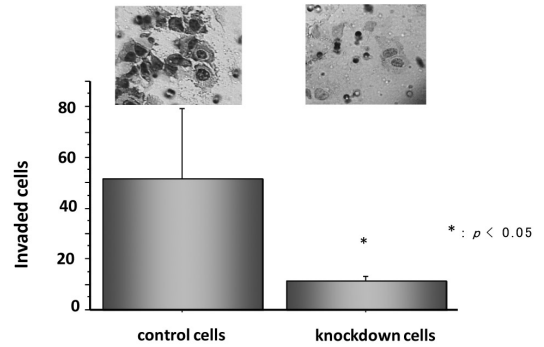


図7 ノックダウンによる浸潤能の変化 (Invasion assay)

-PCRにて調べた。その結果、SPP 1は7割減少、UGT 1 A 1は5割減少、ANXA 4は6割減少した(図4)。また、BCL 2 L 1は4割減少し、CFLARは4割減少、CCND 1は4割減少した(図5)。

アノキス抵抗性の変化では、コントロール群に比較して、ノックダウン群では survival rate が減少しており、アノキス抵抗性の減少を認めた(図6)。

invasion assay では、コントロール群と比べてノックダウン群で浸潤細胞数が減少しており、浸潤能の低下を認めた(図7)。

TUNEL assay では優位にノックアウト群でアポトーシス細胞が増加しており、抗アポトーシス能の低下が認められた(図8)。

CPT-11感受性試験では、ノックダウン群はコントロール群に比べて生細胞数が減少しており、感受性が増加する傾向を認めた(図9)。

考 察

HNF-1 beta は肝臓、腎臓、胃、小腸などに特異的に発現する転写因子で、主に器官形成、発生に関与する遺伝子である[13]。また IGFBP 1, GLUT-2, G 6 Pase などの糖代謝に関連する遺伝子群の発現制御に関与することが報告されている[14]。近年、卵巣明細胞腺癌において HNF-1 beta が過剰発現していることが報告された[12]。しかし、卵巣腫瘍における HNF-1 beta の生理学的な発現意義はまだ明確にはされていない。Tsuchiya らによると、HNF-1 beta 高発現明細胞腺癌細胞株の HNF-1 beta

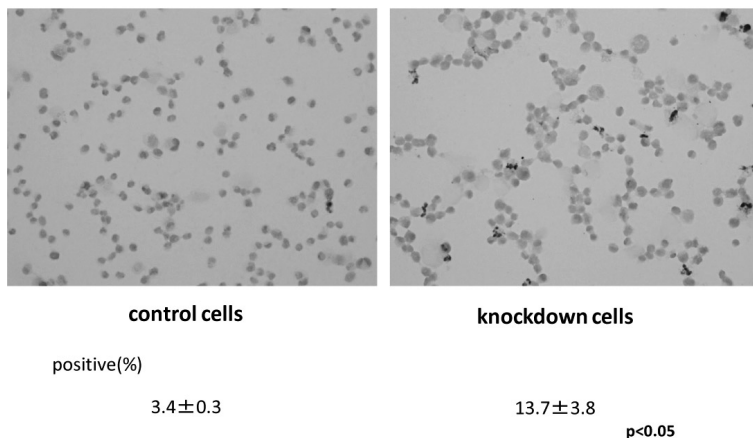


図8 ノックダウンによるアポトーシス誘導 (TUNEL assay)

遺伝子を siRNA を導入してノックダウンするとアポトーシスが促進することを報告していることから [12], HNF-1 beta の過剰発現は明細胞腺癌細胞の抗腫瘍薬耐性獲得機序にも関与している可能性が考えられる。

今回、われわれは卵巣明細胞腺癌における HNF-1 beta の発現意義を調べるために、卵巣明細胞腺癌株に発現する HNF-1 beta を siRNA によってノックダウンし、その結果発現量が変化する遺伝子を検索して HNF-1 beta の機能とその対象遺伝子を検討した。また、腫瘍細胞におけるアノキス抵抗性、浸潤能、抗アポトーシス、薬剤抵抗性という性質の変化についても検討した。

HNF-1 beta のノックダウンにより、SPP1, CFLAR, BCL2L1, CCND1, UGT1A1, ANXA4 の発現量が2~5割へと著明に減少していた。これらの遺伝子は、癌転移 [15]・抗アポトーシス [16,17]・細胞周期 [18]・抗癌剤耐性 [19,20] に関与するとされており、HNF-1 beta が転写因子として明細胞腺癌のさまざまな性質に関わる可能性が示された。また、ノックダウン群では、アノキス抵抗性、浸潤能、抗アポトーシス、薬剤抵抗性がともに低下していた。

HNF-1 beta は、卵巣明細胞腺癌に特異的に発現するが、上記の遺伝子の発現を制御するとともにその腫瘍としての性質の形成に関わって

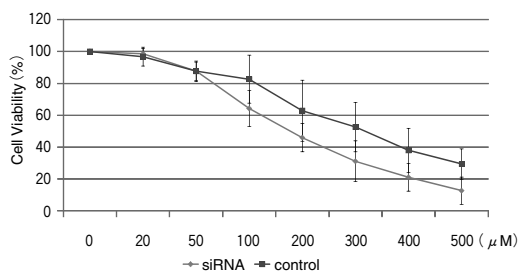


図9 ノックダウンによるCPT-11感受性の変化 (MTS法)

いると考えられる。HNF-1 beta が卵巣明細胞腺癌の予後不良因子として重要な役割を果たし、今後の診断・治療の指標となる可能性が示唆された。

#### 文献

- [1] Vercellini P et al. Endometriosis and ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 181-182
- [2] McMeekin DS et al. Endometrioid adenocarcinoma of the ovary and its relationship to endometriosis. *Gynecol Oncol* 1995; 59: 81-86
- [3] Ogawa S et al. Ovarian endometriosis associated with ovarian carcinoma: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 298-304
- [4] Prowse AH et al. Molecular genetic evidence that endometriosis is a precursor of ovarian cancer. *Int J Cancer* 2006; 119: 556-562
- [5] Jimbo H et al. Prevalence of ovarian endometriosis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 1997; 59: 245-250

- [6] 小畑孝四郎. 子宮内膜症の治療ストラテジー 卵巣子宮内膜症の癌化とその治療. 日本産科婦人科学会雑誌 2003 ; 55 : 890 - 902
- [7] 小林 浩. 子宮内膜症性卵巣嚢胞の腫瘍化と明細胞癌. 産科と婦人科 2005 ; 72 : 557 - 564
- [8] Jiang X et al. Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci. *Cancer Res* 1996 ; 56 : 3534 - 3539
- [9] Jiang X et al. Allotype of endometriosis with adjacent ovarian carcinoma reveals evidence of a common lineage. *Cancer Res* 1998 ; 58 : 1707 - 1712
- [10] Obata K et al. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res* 1998 ; 58 : 2095 - 2097
- [11] Okuda et al. p53 mutations and overexpression affect prognosis of ovarian endometrioid cancer but not clear cell cancer. *Gynecol Oncol* 2003 ; 88 : 318 - 325
- [12] Tsuchiya A et al. Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma. Identification of hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* 2003 ; 163 : 2503 - 2512
- [13] Bach I et al. Two members of an HNF1 homeoprotein family are expressed in human liver. *Nucleic Acids Res* 1991 ; 19 : 3553 - 3559.
- [14] Pontoglio M. Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 2000 ; Suppl 16 : S140 - S143
- [15] O' Regan A. The role of osteopontin in lung disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003 ; 14 : 479 - 488.
- [16] Safa AR et al. Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP) : a novel target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2008 ; 8 : 37 - 46
- [17] Azmi AS et al. Non-peptidic small molecule inhibitors against Bcl-2 for cancer therapy. *J Cell Physiol* 2009 ; 218 : 13 - 21
- [18] Liu N et al. Recent research in selective cyclin-dependent kinase 4 inhibitors for anti-cancer treatment. *Curr Med Chem* 2009 ; 16 : 4869 - 4888
- [19] Gagné JF et al. Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol Pharmacol* 2002 ; 62 : 608 - 617
- [20] Han EK et al. Modulation of paclitaxel resistance by annexin IV in human cancer cell lines. *Br J Cancer* 2000 ; 83 : 83 - 88