

北里大学大学院医療系研究科博士課程学位論文

Transcriptional upregulation of HNF-1 β by NF- κ B in ovarian clear cell carcinoma modulates susceptibility to apoptosis through alteration in bcl-2 expression

(NF- κ B/HNF-1 β シグナル系は、bcl-2 発現誘導を介して卵巣明細胞腺癌細胞のアポトーシスを抑制する)

DM12013 鈴木 エリ奈

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
生体構造医科学群分子病理学
指導教授 三枝 信

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨(和文)

卵巣明細胞腺癌(OCCC)は婦人科領域で最も予後の不良な悪性腫瘍である。Hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β)とは、胎生期の臓器形成に関与する転写因子である。HNF-1 β は細胞周期、アポトーシス、および糖代謝といった遺伝子群の発現制御により、endometriosis-carcinoma sequence に影響を及ぼしていると推測されている。しかし、OCCCにおけるHNF-1 β 発現調節機構や、HNF-1 β の詳細な機能は多くが未だ不明瞭である。そのため、本研究の目的は卵巣子宮内膜症性嚢胞とOCCCにおけるHNF-1 β の上流及び下流経路の解明とそれによる機能解析である。

臨床検体においてHNF-1 β の発現は活性化NF- κ B/p65の発現と相関していた。組織学的に核グレードの低い群及び非充実性増殖パターン(乳頭状または腺管状)群に有意に高いIHCスコアがみられた。

次に培養細胞株を用いた実験系を行った。TNF- α で処理された卵巣明細胞腺癌細胞株(TOV21G)において核内p65とHNF1 β の発現増加がみられた。さらにp65遺伝子を外因性に導入した類内膜腺癌細胞株(Hec251)ではHNF1 β が増加した。ルシフェラーゼアッセイとChIPアッセイの結果から、HNF1 β プロモーター領域中の κ B配列(5-GGRNNYYCC-3)中にNF κ B結合部位はみられないものの、+89~+179の範囲にp65の結合部位の存在が示唆された。以上より、p65はHNF-1 β プロモーター活性上昇により発現増加をもたらすものと推測した。

HNF1 β ノックダウンTOV21Gはアポトーシスが増加した。さらに、シスプラチン処理下で、ノックダウン株ではアポトーシスが増加するとともにCleaved caspase3蛋白発現の増加と、bcl-2/bax比の低下を認めた。HNF1 β を恒常的発現させたHec251ではアポトーシスの減少とbcl-2/bax比の上昇がみられた。次にTOV-21GにHNF1 β とルシフェラーゼ連結bcl-2プロモーター段階的欠損コンストラクトを重導入すると、外因性HNF1 β 下でbcl-2のプロモーター活性が増強することは確認できたがHNF1 β の結合部位は認めなかった。さらに手術標本免疫染色においても、HNF1 β スコアとbcl-2スコアに正の相関関係を確認した。

以上の結果から、OCCCでは炎症や低酸素により活性化したNF- κ B/p65やその他の細胞障害シグナルによりHNF-1 β 遺伝子の転写活性化と発現増加をきたし、発現誘導されたHNF-1 β はbcl-2遺伝子の転写を促進し、ミトコンドリア依存性アポトーシス経路を抑制することでendometriosis-carcinoma sequenceの一翼を担うことが示唆された。

目次

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 1. 背景 | 1 |
| 2. 目的 | 1 |
| 3. 材料と方法..... | 1 |
| 3-1. 臨床検体 | 1 |
| 3-2. 使用した抗体、試薬..... | 2 |
| 3-3. 免疫染色(IHC) | 2 |
| 3-4. アポトーシスと TUNEL(TdT-Mediated dUTP-Biotin Nick-End Labeling)法 | 2 |
| 3-5. プラスミドと培養細胞株 | 3 |
| 3-6. Transfection | 3 |
| 3-7. RT-PCR 法と Western blot 法、フローサイトメトリー..... | 3 |
| 3-8. ChIP(クロマチン免疫沈澱法) | 3 |
| 3-9. 統計処理..... | 3 |
| 4. 結果 | 3 |
| 4-1. OCCC 及び関連疾患の免疫組織学的検討..... | 3 |
| 4-2. p65 の HNF-1 β の転写活性化作用 | 4 |
| (1)p65 による HNF1 β 転写活性促進機構： | 4 |
| (2)HNF-1 β プロモーター領域内の p65 結合部位同定： | 4 |
| 4-3. アポトーシスと HNF-1 β の関連： | 4 |
| (1)組織型とアポトーシスの関連： | 4 |
| (2)HNF-1 β のアポトーシス抑制作用： | 5 |
| (3)HNF-1 β の bcl-2 転写増加作用： | 5 |
| 4-4. その他の作用 | 5 |
| 5. 考察 | 6 |
| 6. 結語 | 7 |
| 7. 謝辞 | 7 |
| 8. 引用文献 | 7 |
| 9. 業績目録 | 10 |
| 10. 図表 | 12 |

1. 背景

上皮性卵巢悪性腫瘍は、漿液性腺癌、粘液性腺癌、類内膜腺癌、および明細胞腺癌の4つの組織型に大別される。その内、明細胞腺癌(ovarian clear cell carcinoma: OCCC)は、婦人科悪性腫瘍のうち最も予後が悪い組織型である¹。OCCCは上皮性卵巢悪性腫瘍と異なる独特の腫瘍病態を構築しており²、他の卵巢通常の化学療法に対して抵抗性を示すことに加え、血栓塞栓症の合併の頻度が高い。そのため、腫瘍の発育速度は緩徐であるものの、進行期症例ではしばしば治療困難である³⁻⁵。

OCCCの発生母地として卵巢の子宮内膜症性嚢胞が指摘されている^{6,7}(endometriosis-carcinoma sequence)。このため、40歳代で6cm以上の子宮内膜症性嚢胞、閉経後は大きさによらず全て摘出することが推奨されている。しかし、その発癌の分子機構については未解決な部分が数多く残されている。

Hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β)は、ホメオドメインを有する転写因子であり、ホメオドメインのアミノ酸配列は80%以上HNF-1 α のホメオドメインと相同である⁸。

HNF-1 β とHNF-1 α はホモ二量体またはヘテロ二量体を形成し転写を調節している。

細胞周期、アポトーシス、および糖代謝など様々な遺伝子群の発現制御に関与する⁹⁻¹¹。これまでに、卵巢子宮内膜症性嚢胞やOCCCで、HNF-1 β の過剰発現が報告されている。その発現機序の1つとしてプロモーター領域CpGアイランドのhypomethylationが指摘されているが、その転写・翻訳レベルでの発現調節機構は殆ど解明されていない¹²⁻¹⁴。

卵巢子宮内膜症性嚢胞では、月経周期に伴う出血・炎症による高濃度の鉄イオンの遊出は、酸化的ストレスとDNA傷害による発癌の原因となる^{11,15}。

さらに、鉄イオンの遊出により誘導された活性酸素種(ROS)が、HNF-1 β 発現を介して抗アポトーシス経路や解毒作用を示し、結果内膜症細胞の生存に寄与すると推測されている^{16,17}。

同時に、様々な炎症性サイトカインの発現増加が生じ、嚢胞性上皮の増生や悪性転化などの病態形成に関与する。これらのサイトカインの1つであるNF- κ Bは様々な遺伝子の転写調節を司るが、HNF-1 β との関連性については手付かずのまま残されている。また、HNF-1 β が、卵巢子宮内膜症性嚢胞やOCCCにおけるアポトーシスや細胞増殖を含む細胞動態機構にどのように関与しているかも不明である。

2. 目的

卵巢子宮内膜症性嚢胞とOCCCにおけるHNF-1 β の機能解析を、NF- κ Bシグナル系および細胞増殖・アポトーシス制御機構との関連性の観点から検索し、endometriosis-carcinoma sequenceにおけるその意義を解明する。また、HNF-4 α 、Glut-1発現といった機能的に関連する分子についても検索する。

3. 材料と方法

3-1. 臨床検体

2002~2012年までに北里大学病院で外科的切除され、WHO分類(2003)に基づいて組織診断さ

れた OCCC 症例計 94 例を対象とした。平均年齢は 54.8 歳(33-75 歳)。FIGO 進行期分類によると、60 例が I 期であり、残り 34 例は II 期から IV 期の症例であった。リンパ節転移陽性例は 8 例、70 例は転移陰性であった。

腫瘍は細胞核の形態により段階的に分類した(Vera らの基準より¹⁹⁾。Nuclear grade 1(NG1), 核形不整がない小型円形核に小型核小体を伴う。Nuclear grade 2(NG2), 核腫大と核小体の腫大を伴う。Nuclear grade 3(NG3), 多形核に粗いクロマチンと大型核小体を伴う。組織構造は二種に分別した(Figure 1) (solid: 充実性増殖、non-solid: 乳頭状～腺管嚢胞状増殖)。NG と組織構造はそれぞれ、腫瘍の 30%以上を占める成分のうち最も異型度の強いものとした。さらに、NG と組織構造の組み合わせで以下のようなサブグループを作った。Group A, NG1-non-solid; Group B, NG1-solid, NG2-solid, NG2-non-solid, NG3-non-solid; Group C, NG3-solid

病理組織学的検討として、核異型判定するために核グレード (NG) と組織構造 (solid: 充実性増殖、non-solid: 乳頭状～腺管嚢胞状増殖)。NG と組織構造はそれぞれ、腫瘍の 30%以上を占める成分のうち最も異型度の強いものとした。対照例として、39 例の子宮内膜症性嚢胞、19 例の異型子宮内膜症(Vera らの¹⁹⁾の基準により)。漿液性腺癌、粘液性腺癌、類内膜腺癌をそれぞれ 10 例ずつ検索した。用いた全ての標本は 10%ホルマリン固定後、パラフィン包埋された。

3-2. 使用した抗体、試薬

以下の抗体を用いた。

抗 HNF-1 β 抗体、抗 NF- κ B/p65 抗体、抗 HIF-1 α 抗体、抗 p27 抗体、抗 Rb 抗体、抗 bax 抗体; BD Biosciences (San Jose, CA, USA)。抗 HNF-4 α 抗体、抗 β -actin 抗体; Sigma-Aldrich Chemicals (St Louis, MO, USA)。抗 phospho-p65, Ser275(pp65)抗体、抗 phospho-Rb, Ser807/811 (pRb)抗体、抗 cleaved caspase 3 抗体; Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)。抗 bcl-2 抗体、抗 p21 抗体、抗 CyclinD1 抗体、抗 ki-67 抗体; Dako (Copenhagen, Denmark)。抗 Glut-1 抗体、抗 survivin 抗体; Millipore(Billerica, MA, USA) and R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)。抗 HA 抗体; Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)。

TNF- α 、シスプラチン、ドキソルビシンは Sigma 社の製品を用いた。

3-3. 免疫染色(IHC)

Microwave 法による抗原賦活化と polymer immunocomplex 法の組み合わせで行った。HNF-1 β 、pp65、HNF-4 α 、HIF-1 α 、Glut-1 免疫染色については細胞質の陽性所見を以下のようにスコア化した。

陽性率: 0, 0%; 1, <10%; 2, 10-30%; 3, 30-50%; 4, >50%。

陽性強度: 0, 陰性; 1, 弱陽性; 2, 陽性; 3, 強陽性。

IHC スコア=陽性率×陽性強度

Ki-67 については細胞 1000 個中の陽性細胞のカウントによる labeling index(/100cell)を測定した。

3-4. アポトーシスと TUNEL(TdT-Mediated dUTP-Biotin Nick-End Labeling)法

HE 標本でアポトーシス細胞(Kerr ら²²⁾をカウントした。20 視野中のアポトーシス細胞をカウントし、10 視野数の平均値とした。また、*In Situ* Cell Death Detection Kit(Roche)で検出した

アポトーシス細胞をカウントした。700 細胞中のアポトーシス細胞をカウントし、100 細胞の平均値とした。

3-5. プラスミドと培養細胞株

HNF-1 β 発現プラスミドと HNF-1 β 、bcl-2 および Glut-1 プロモーター領域を含む reporter constructs を作製した。OCCC 培養細胞株として TOV-21G、OVISE、OVTOKO、および子宮内膜癌細胞株 Hec251 を用いた。また、Hec251 細胞で HA-HNF-1 β 恒常発現細胞を作製した。

3-6. Transfection

LipofectAMINE PLUS (Invitrogen) で各種プラスミドを Transfection した。ルシフェラーゼアッセイでプロモーター活性を測定した。HNF-1 β の siRNA2 種は siPORT NeoFX transfection agent (Ambion, Austin, TX, USA) を用いて導入された。

3-7. RT-PCR 法と Western blot 法、フローサイトメトリー

型通りに行った。

3-8. ChIP(クロマチン免疫沈澱法)

EpiXplore ChIP assay kit (Clontech Laboratory, Mountain View, CA, USA) で行った。

3-9. 統計処理

得られたデータは、Mann-Whitney U 検定、 χ^2 検定、ピアソンの積率相関係数を用いて検定した。カットオフ値は $p < 0.05$ とした。

4. 結果

4-1. OCCC 及び関連疾患の免疫組織学的検討

HNF-1 β と関連分子の免疫染色所見を示した (Figure 2)。HNF-1 β 、pp65、HNF-4 α 、HIF-1 α は上皮性細胞の核に陽性所見を認めた。また、Glut-1 は上皮性細胞及び赤血球の細胞膜に陽性所見を認めた。

平均 IHC スコアでは、HNF-1 β と pp65 の両 IHC スコアは NG3OCCC と比較して、NG1OCCC と異型内膜症性嚢胞上皮において有意に高かった。

一方で、HNF-4 α 、Glut-1、Ki-67 LI は、内膜症性嚢胞上皮 \rightarrow NG1 \rightarrow NG3 と段階的にスコアの上昇がみられた (Figure 3a)。

HNF-1 β と pp65 の IHC スコアは、non-solid pattern OCCC が solid pattern OCCC と比較して有意に高かった。反対に Glut-1、Ki-67 LI のスコアは solid pattern OCCC の方が有意に高くなった (Figure 3b)。

NG と組織構造の組み合わせによるサブグループでの比較では、Group A (NG1-non-solid) は

Group C(NG3-solid) より HNF-1 β 及び pp65 の両スコアが高いことが判明した。HNF-4 α 、Glut-1、Ki-67 LI はその反対の傾向を示した(Figure 3c)。

NG と組織構築には有意な相関関係があった(Supplementary Table S1)が、臨床病理因子(臨床病期、リンパ節転移の有無)は NG、組織構築、今回のいずれの IHC スコアにも関連がなかった(Supplementary Table S2)。

OCCC において HNF-1 β 平均スコアは pp65 のみと正の相関関係にあり、Ki-67 LI は HNF-1 β と弱い負の相関関係にあった(Supplementary Table S3,4)。また、HNF-4 α 、HIF-1 α 、Glut-1 は他の免疫染色スコアのいずれにも有意な相関を示さなかった。

卵巣癌組織型ごとに比較すると、OCCC は他の 3 つの組織(漿液性、粘液性、類内膜腺癌)と比較して HNF1 β と pp65 の IHC スコアが有意に高かった。また、HNF-4 α スコアは粘液性腺癌が最も高値を示した(Supplementary Figure S1)。

4-2. p65 の HNF-1 β の転写活性化作用

(1)p65 による HNF1 β 転写活性促進機構 :

上で得られた免疫染色結果から、NF- κ B シグナル系と HNF-1 β の関連が窺われた。

培養細胞 TOV-21G 及び Hec251 に、TNF- α (NF- κ B 活性化因子²⁴⁻²⁶)20ng/ml を投与した。TOV-21G は 1 時間(h) 経過後に核内 p65 タンパクの増加がみられ、HNF-1 β mRNA は弱く増加したが、内因性 HNF-1 β タンパク質が多く、刺激に伴う HNF-1 β のタンパク質レベルでの増加は不明瞭だった。一方 Hec251(内因性 HNF-1 β 発現が弱い)は 0.5h 経過後に HNF-1 β mRNA 発現増加を示した。Western blot 法でも 1h 経過後より HNF-1 β のタンパクレベルでの増加が確認された(Figure 4a)。

NF- κ B シグナル系の HNF-1 β 転写作用について検討するため、TOV-21G へ p65 遺伝子の一過性導入を行った。p65 の過剰発現下で、転写レベル及びタンパク質レベルで HNF-1 β の発現増加を認めた(Figure 4b left)。また、ルシフェラーゼアッセイによると、p65 は用量依存性に、HNF-1 β のプロモーター活性を増強することがわかった(Figure 4b right)。

(2)HNF-1 β プロモーター領域内の p65 結合部位同定 :

上記のように、外因性に p65 遺伝子導入すると HNF-1 β プロモーター活性の上昇が認められた。そこで、HNF-1 β プロモーター領域を解析すると、転写開始位置より上流の 1517bp 内には、2 箇所の κ B 配列(5'-GGRNNYYCC-3')が存在した(Figure 4c)。しかし、HNF-1 β プロモーター段階的欠損コンストラクトを用いた検索で、 κ B 配列を含まない最短長のコンストラクト(+86 bp~216 bp)が最も高いプロモーター活性を示した(Figure 4d)。さらに、ChIP アッセイで p65 結合部位は+89 bp~+179 bp 間に存在することを確認した(Figure 4e)。

4-3. アポトーシスと HNF-1 β の関連 :

(1)組織型とアポトーシスの関連 :

過去の報告では、HNF-1 β の OCCC 細胞生存能への関与が示唆されている⁹⁻¹¹。従って、HNF-1 β とアポトーシスとの関連を検討するため、臨床検体標本を用いた。HE 標本上のアポトーシス

細胞数を基準²²に則り測定した。その結果は、TUNEL 法によるアポトーシス細胞測定結果と相関が確認された(Figure 5a)。

平均アポトーシス数 NG、組織構造、サブグループ間で比較すると、OCCC において、アポトーシスと組織型に関連が認められた(それぞれ NG1、Non-solid pattern、Group A が有意に高い $p < 0.003$) (Figure 5b)。一方で、HNF-1 β IHC スコアとアポトーシスとの有意な相関は確認できなかった(Supplementary Table S3,4)。

(2)HNF-1 β のアポトーシス抑制作用：

HNF-1 β がアポトーシス経路に作用しているかを調べるため、培養細胞株での実験を行った。siRNA を導入し内因性 HNF-1 β をノックダウンした TOV-21G 株を作成し(Figure 6a)、フローサイトメトリーを用いてアポトーシス細胞を検出したところ、48h 経過後アポトーシス細胞が明らかに増加した(48h 経過後 コントロール群 2.1%/ノックダウン群 4.1%、72 h 経過後 コントロール群 3.8%/ノックダウン群 6.8%)。一方で、Western blot 上、survivin、bcl-2、bax といったアポトーシス関連タンパクに明らかな変化は確認できなかった(Figure 6b)。

次に、HNF-1 β ノックダウン群及びコントロール群に 0.2 μ M シスプラチン(CDDP)を投与し、アポトーシス細胞及びアポトーシス関連タンパクを検出することとした。TOV-21G 細胞に CDDP 処理を行うと、アポトーシス細胞の増加や活性型カスパーゼ 3 は、CDDP 用量依存性に増加していた(Supplementary Figure S2)。

HNF-1 β ノックダウン下では、さらにアポトーシス細胞の増加がするとともに、Western blot 上活性型カスパーゼ 3 の増加、bcl-2/bax 比の減少もみられた(Figure 6c)。

Hec251 細胞で恒久的 HA-HNF1 β 過剰発現細胞を作製した。mock 細胞群と HA-HNF1 β 過剰発現細胞群にそれぞれドキシソルビシン(Dox)1 μ g/ml を投与すると、48 h 経過後、アポトーシス細胞の減少及び、survivin 発現の増加と bcl-2/bax 比の上昇がみられた。さらに、Dox 刺激により HNF-1 β 発現の亢進が生じた(Figure 7a)。

(3)HNF-1 β の bcl-2 転写増加作用：

TOV-21G では、外因性 HNF-1 β の過剰発現下、HNF-4 α と bcl-2 のプロモーター活性が増強したが、survivin にはプロモーター活性に変化がみられなかった(Supplementary Figure S3A)。HA-HNF-1 β の過剰発現下で、bcl-2 の mRNA レベル、タンパクレベルでの発現増加が確認された。

bcl-2 転写開始位置より上流の 1600bp の配列には、一箇所 HNF-1 β 結合配列(ATTAAC)が存在したが、bcl-2 プロモーター段階的欠損コンストラクトによるプロモーターアッセイは、結合配列への HNF-1 β の結合を示唆する所見がみられなかった(Figure 7b)。

以上の結果を踏まえて、OCCC 手術標本で bcl-2 免疫染色を行った。その結果 HNF1 β スコアと bcl-2 スコアに正の相関関係があった($r=0.51, p < 0.001$)。組織学的因子として bcl-2 スコアは NG1 > NG3, Non-solid > solid を示した(Figure 7c, Supplementary Figure S3B)。

4-4. その他の作用

HNF-1 β の細胞周期回転または静止への関与を調べるため、3 種の OCCC 培養細胞株

(TOV-21G、OVISE、OVTOKO)を用いて血清飢餓、血清再刺激実験を行ったが、細胞増殖に伴う HNF-1 β の変化はみられなかった(Supplementary Figure S4A)。また、Hec251 の分離したクローン 2 株に HNF-1 β の恒久的導入を行ったが、細胞増殖率に有意な違いは指摘できなかった(Supplementary Figure S4B)。

HNF-1 β は糖代謝に中心的な役割を果たしているとされている⁹⁻¹¹。HNF-1 β の導入によって Glut-1 は mRNA レベル、タンパクレベルで有意に増加した。プロモーターアッセイにおいても HNF-1 β による Glut-1 プロモーター活性が増強していた(Supplementary Figure S5A)。bcl-2 プロモーター領域には一箇所の HNF-1 β 結合配列(GTTAAT)を認めた。プロモーター段階的欠損コンストラクト(Supplementary Figure S5B)によるプロモーターアッセイでは、-2057bp~-255bp を欠失しても小さな変化がみられたが、さらに-225bp~-63bp の欠失により、プロモーターの増強はほとんどみられなくなった。また、HNF-1 β 結合配列中の 4 個の塩基配列を変化させても HNF-1 β への反応がほとんどみられなくなった(Supplementary Figure S5C)。従って HNF-1 β が Glut-1 プロモーターに作用するためには-152bp~-147bp 領域が必要と推測された。しかし、OCCC 及び子宮内膜症性嚢胞の手術標本免疫染色では、HNF-1 β と Glut-1 間の相関関係は確認できなかった(Supplementary Table S3,4)。

5. 考察

Hec251 に TNF- α 刺激を行うと核内 p65 増加に伴い HNF-1 β mRNA 及びタンパクの発現増加がみられた。さらに、P65 の一過性導入においても HNF-1 β mRNA 及びタンパクの発現増加が認められた。p65 は HNF-1 β のトランス活性化因子と考えられ、結合部位は+89 bp~+179 bp 間と推定された。免疫組織学的に、OCCC 及び内膜症性嚢胞では HNF-1 β と pp65 の IHC スコアは正の相関関係にあった[(OCCC ($r=0.73$, $P<0.0001$) 及び 内膜症性嚢胞 ($r=0.89$, $P<0.0001$))。一般に、子宮内膜症性嚢胞内は厳しい酸化ストレス下にあることが知られている¹⁵。この酸化ストレスにより NF- κ B/p65 翻訳後活性化に関与する TNF- α やオカダ酸が産生される²⁴。したがって、嚢胞内の繰り返す出血・炎症により生じる酸化ストレスが NF- κ B 系を活性化することで、HNF-1 β 発現が誘導されていると推測された。

OCCC の臨床検体の検索において、HNF-1 β スコアは低細胞増殖能と密接な関与を示す低核異型度及び non-solid 組織型と正の関連性を示した。これまでに、HNF-1 β は細胞周期 G1 停止を誘導する CDKN1A や CDKN1B 発現を誘導することが報告されている²⁷。しかし、培養細胞を用いた検討では、HNF-1 β 発現は OCCC 細胞の増殖過程で変化しなかった。さらに、その恒常的発現系細胞でも細胞増殖能は変化しなかった。OCCC の臨床検体で HNF-1 β と細胞増殖能に弱い負の相関があった($r=-0.35$, $P=0.001$)ことも勘案すると、OCCC における HNF-1 β 発現は単純に低悪性度病変を示唆している可能性がある。

本研究で重要な所見は、過去の文献と同様²⁸に OCCC 細胞の HNF-1 β 発現抑制によりアポトーシスが促進したことに加え、HNF-1 β 恒常的発現系では、bcl-2 発現誘導を介して Dox により誘導されるアポトーシスを減少させたことである。さらに、HNF-1 β により bcl-2 発現が転写レベルで亢進したことから、HNF-1 β は内因性アポトーシス機構に関与することが考えられた。

HNF-1 β スコアとアポトーシス細胞数は、ともに NG1OCCC 及び Non-solid OCCC が有意に

高い値を示したが、この両者の直接的な関連は明らかにならなかった。一般に、子宮内膜症性嚢胞では DNA 損傷を示す 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)の上昇がみられ、この DNA 損傷は内因性アポトーシス誘導の原因となる。嚢胞内での繰り返す出血や炎症により炎症性サイトカインである $\text{TNF-}\alpha$ が増加し、これは外因性アポトーシス誘導の原因になる^{30,31}。 $\text{TNF-}\alpha$ により活性化された p65 により HNF-1 β の高発現が誘導される事実を考えると、HNF-1 β は外因性および内因性アポトーシス系の両方に関与することが考えられる。

本研究の副次的な所見としては、一つは過去の文献²⁷の通り外因性 HNF-1 β の導入下で、Glut-1 遺伝子発現は増加したにも関わらず、OCCC 臨床検体では免疫組織学的に HNF-1 β と Glut-1 間に有意な関連がみられなかったことである。これは、腫瘍病態において HIF-1 α 系などの糖代謝を調節する他の経路の異常が並存しているため³²と推測された。

さらに二つ目は HNF-1 β とそのターゲットと考えられている HNF-4 α との間に免疫組織学的に相関がみられなかったことである。

HNF-4 α は粘液性腺癌と OCCC の高異型度病変で高発現を示したことから、卵巣癌の特定の表現型を表している可能性がある。

6. 結語

OCCC では炎症や低酸素により活性化した NF- κ B/p65 やその他の細胞障害シグナルにより HNF-1 β 遺伝子の転写が活性化し発現が増加する。発現誘導された HNF-1 β は bcl-2 遺伝子の転写を促進し、ミトコンドリア依存性アポトーシス経路を抑制することで endometriosis-carcinoma sequence の一翼を担うことが示唆された(Figure 8)。

7. 謝辞

本研究において指導教授である北里大学大学院医療系研究科三枝信教授に深く感謝いたします。また、研究の遂行にあたり多大なるご協力をいただいた北里大学医学部病理学並びに北里大学病院病院病理部スタッフの方々に篤く御礼申し上げます。

8. 引用文献

1. Michael S. Anglesio, Mark S. Carey, Martin Köbel, Helen MacKay, David G. Huntsman , Vancouver Ovarian Clear Cell Symposium Speakers: Clear cell carcinoma of the ovary: A report from the first Ovarian Clear Cell Symposium, June 24th, 2010. Gynecologic Oncology 2011;121:407-415.
2. Ingirídur Skírnisdóttir, Tomas Seidal, Mats G. Karlsson, Bengt Sorbe: Clinical and biological characteristics of clear cell carcinomas of the ovary in FIGO stages I-II. International Journal of Oncology 2005;26:177-183.
3. Toru Sugiyama, Toshiharu Kamura, Junzo Kigawa, Naoki Terakawa, Yoshihiro Kikuchi , Tunekazu Kita, et al: Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. Cancer 2000;88:2584-9.
4. John K. Chan, Deanna Teoh, Jessica M. Hu, Jacob Y. Shin, Kathryn Osann, Daniel S. Kapp: Do clear cell ovarian carcinoma have poorer prognosis compared to other epithelial types? A

- study of 1411 clear cell ovarian cancers..Gynecologic Oncology 2008;109:370-6.
5. Hiroaki Itamochi, Junzo Kigawa, Naoki Terakawa: Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma..Cancer Science 2008;99:653-8.
 6. Edgardo Somigliana, Paola Vigano, Fabio Parazzini, Sandra Stoppelli, Erika Giambattista, Paolo Vercellini: Association between endometriosis and cancer: A comprehensive review and a critical analysis of clinical and epidemiological evidence..Gynecologic Oncology 2006;101:331-41.
 7. Kobayashi H, Sumimoto K, Moniwa N, Imai M, Takakura K, Kuromaki T, et al: Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometria: a cohort study in Shizuoka, Japan..International Journal of Gynecological Cancer 2007;17:37-43.
 8. Ingolf Bach, Marie-Genevieve Mattei, Silvia Cereghini, Moshe Yaniv: Two members of an HNF1 homeoprotein family are expressed in human liver.Nucleic Acids Research 1991;19:3553-9.
 9. Fereshteh Parviz, Christine Matullo, Wendy D Garrison, Laura Savatski, John W Adamson, Gang Ning, et al: Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis..Nature Genetics 2003;34:292-6.
 10. Ying-Hue Lee, Brian Sauer, Frank J. Gonzalez: Laron Dwarfism and Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in the Hnf-1 α Knockout Mouse..Molecular and Cellular Biology 1998;18:3059-68.
 11. Hirotaka Kajihara, Yoshihiko Yamada, Seiji Kanayama, Naoto Furukawa, Taketoshi Noguchi, Shoji Haruta, et al: Clear cell carcinoma of the ovary: potential pathogenic mechanisms (Review)..Oncology Reports 2010;23:1193-203.
 12. Noriko Kato , Gen Tamura, Teiichi Motoyama: Hypomethylation of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) CpG island in clear cell carcinoma of the ovary..Virchows Archiv 2008;452:175-80.
 13. K Terasawa, M Toyota, S Sagae, K Ogi, H Suzuki, T Sonoda,et al: Epigenetic inactivation of TCF2 in ovarian cancer and various cancer cell lines..British Journal of Cancer 2006;94:914-21.
 14. K Yamaguchi, M Mandai, T Oura, N Matsumura, J Hamanishi, T Baba, et al: Identification of an ovarian clear cell carcinoma gene signature that reflects inherent disease biology and the carcinogenic processes..Oncogene 2010;29:1741-52.
 15. Ken Yamaguchi, Masaki Mandai, Shinya Toyokuni, Junzo Hamanishi, Toshihiro Higuchi, Kenji Takakura, et al: Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress..Clinical Cancer Research 2008;14:32-40.
 16. Yoshihiko Yamada, Hiroshi Shigetomi, Akira Onogi, Shoji Haruta, Ryuji Kawaguchi, Shozo Yoshida, et al: Redox-active iron-induced oxidative stress in the pathogenesis of clear

- cell carcinoma of the ovary..International Journal of Gynecological Cancer 2011;21:1200-7.
17. Hiroshi Shigetomi, Yumi Higashiura, Hiroataka Kajihara, Hiroshi Kobayashi: A potential link of oxidative stress and cell cycle regulation for development of endometriosis.Gynecological Endocrinology 2012;28:897-902.
 18. JL Benedet, NF Hacker, HYS Ngan, H Bender, H Jones III, J Kavanagh, et al: FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers..International Journal of Gynecology & Obstetrics 2000;70:209-62.
 19. Emanuela Veras, Tsui-Lien Mao, Ayse Ayhan, Stefanie M Ueda, Hong Lai, Mutlu Hayran: Cystic and adenofibromatous clear cell carcinomas of the ovary: distinctive tumors that differ in their pathogenesis and behavior: a clinicopathologic analysis of 122 cases..The American journal of surgical pathology 2009;33:844-53.
 20. Makoto Saegusa, Miki Hashimura, Takeshi Kuwata, Isao Okayasu: Requirement of the Akt/ β - catenin pathway for uterine carcinosarcoma genesis, modulating E-cadherin expression through the transactivation of slug..The American Journal of Pathology 2009;174:2107-15.
 21. Makoto Saegusa, Miki Hashimura, Erina Suzuki, Tsutomu Yoshida, Takeshi Kuwata: Transcriptional up-regulation of Sox9 by NF- κ B in endometrial carcinoma cells,modulating cell proliferation through alteration in the p14(ARF)/p53/p21(WAF1) pathway..The American Journal of Pathology 2012;181:684-92.
 22. John F. R. Kerr, Clay M. Winterford, Brian V. Harmon: Apoptosis:Its Significance in Cancer and Cancer Therapy..CANCER 1994;73:2013-26.
 23. Yuki Tazo, Atsuko Hara, Takashi Onda, Makoto Saegusa: Bifunctional roles of survivin- Δ Ex3 and survivin-2B for susceptibility to apoptosis in endometrial carcinomas..Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2014;140:2027-37.
 24. Kerstin N. Schmidt, Paul Amstad, Peter Cerutti, Patrick A. Baeuerle: The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B..Chemistry & Biology 1995;2:13-22.
 25. Steve Bonello, Christian Zähringer, Rachida S. BelAiba, Taliya Djordjevic, John Hess, Carine Michiels, et al: Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NFkappaB site..Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 2007;27:755-61.
 26. Tsutomu Yoshida, Miki Hashimura, Toshihide Mastumoto, Yuki Tazo, Hisako Inoue, Takeshi Kuwata,et al: Transcriptional upregulation of HIF-1 α by NF- κ B/p65 and its associations with β -catenin/p300 complexes in endometrial carcinoma cells.Laboratory Investigation 2013;93:1184-93.
 27. Takako Okamoto, Masaki Mandai, Noriomi Matsumura,Ken Yamaguchi,Hiroshi Kondoh,Yasuaki Amano, et al: Hepatocyte Nuclear Factor-1b(HNF-1b) PromotesGlucose

Uptake and Glycolytic Activity in Ovarian Clear Cell Carcinoma..Molecular Carcinogenesis 2013;54:35-49.

28. Akira Tsuchiya, Michiie Sakamoto, Jun Yasuda, Makoto Chuma, Tsutomu Ohta, Misao Ohki, et al: Expression Profiling in Ovarian Clear Cell Carcinoma: Identification of Hepatocyte Nuclear Factor-1 β as a Molecular Marker and a Possible Molecular Target for Therapy of Ovarian Clear Cell Carcinoma. American Journal of Pathology 2003;163:2503-12.
29. Xiang Ling, Qiuying Cheng, Jennifer D. Black, Fengzhi Li: Forced expression of survivin-2B abrogates mitotic cells and induces mitochondria-dependent apoptosis by blockade of tubulin polymerization and modulation of Bcl-2, Bax, and survivin..Journal of Biological Chemistry 2007;282:27204-14.
30. Ronan J Kelly, Ariel Lopez-Chavez, Deborah Citrin, John E Janik, John C Morris: Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin..Molecular Cancer 2011;10:35.
31. Miura K, Fujibuchi W, Unno M: Splice variants in apoptotic pathway..Experimental oncology 2012;34:212-7.
32. Changhu Chen, Nabendu Pore, Alireza Behrooz, Faramarz Ismail-Beigi, Amit Maity: Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia..Journal of Biological Chemistry 2012;276:9519-25.
33. Taku Tanaka, Yasuhiro Tomaru, Yuki Nomura, Hisashi Miura, Masanori Suzuki, Yoshihide Hayashizaki: Comprehensive search for HNF-1 β -regulated genes in mouse hepatoma cells perturbed by transcription regulatory factor-targeted RNAi..Nucleic Acids Research 2004;32:2740-50.
34. Sandra Rebouissou, Viorel Vasiliu, Cristel Thomas, Christine Bellanné-Chantelot, Hung Bui, Yves Chrétien, et al: Germline hepatocyte nuclear factor 1alpha and 1beta mutations in renal cell carcinomas..Human Molecular Genetics 2005;14:603-14.

9. 業績目録

【原著論文】

1. Erina Suzuki, Sabine Kajita, Hiroyuki Takahashi, Toshihide Matsumoto, Tomoko Tsuruta and Makoto Saegusa. Transcriptional upregulation of HNF-1 β by NF- κ B in ovarian clear cell carcinoma modulates susceptibility to apoptosis through alteration in bcl-2 expression. Laboratory Investigation 2015;95:962-72.
2. Tsutomu Yoshida, Miki Hashimura, Takeshi Kuwata, Toshihide Matsumoto, Erina Suzuki, Yuki Tazo, et al: Transcriptional regulation of the alpha-1 type II collagen gene by nuclear factor B/p65 and Sox9 in the chondrocytic phenotype of uterine carcinosarcomas. Human Pathology 2013;44:1780-8.

3. Makoto Saegusa, Miki Hashimura, Erina Suzuki, Tsutomu Yoshida, Takeshi Kuwata:Transcriptional Up-Regulation of Sox9 by NF- κ B in Endometrial Carcinoma Cells, Modulating Cell Proliferation Through Alteration in the p14ARF/p53/p21WAF1 Pathway. The American Journal of Pathology 2012;181:684–92.

10. 图表

Table 1 Primer sequences used in this study

| Gene | | Sequence | |
|--------------------------------|----------|-----------------|-------------------------------|
| <i>HNF-1β</i> | Promoter | (-1470) Forward | 5'-AACTGGCTTCCCGTCTTCTCAG-3' |
| | | (-140) Forward | 5'-AGTACAATGGACCCTGGCAAAG-3' |
| | | (-14) Forward | 5'-ACCATCATTTCATCCAGCCGA-3' |
| | | (+216) Reverse | 5'-AAGGACGGAAAAAGAAGGGGGT-3' |
| | | (+47) Reverse | 5'-CTAACTTGCCATGATCGCCACC-3' |
| | mRNA | (187) Forward | 5'-AAATGGTGTCCAAGCTCACGT-3' |
| | | (388) Reverse | 5'-TTGGTGAGAGTATGGAAGACC-3' |
| | ChIP | E1 forward | 5'-GGAGTAACAGGTGTCTGGAGG-3' |
| | | E1 reverse | 5'-GTGCGAGAGAGGAGGGTGA-3' |
| | | E2 forward | 5'-AGTTGCCGGGACTACAGGCG-3' |
| | | E2 reverse | 5'-ACCATCCTGGCTAACACAGT-3' |
| <i>bcl-2</i> | Promoter | (-1650) Forward | 5'-CCTTTAACCCGGGCCAGGGA-3' |
| | | (-429) Forward | 5'-GTAAATTTAATTTCCAGGCA-3' |
| | | (-229) Forward | 5'-AATAATAACGTGCCTCATGA-3' |
| | | (-160) Forward | 5'-AAGTGTTCCGCGTGATTGAA-3' |
| | | (-67) Reverse | 5'-CCCAGAGAAAGAAGAGGAGT-3' |
| | mRNA | (382) Forward | 5'-TGGGAAGGATGGCGCACG-3' |
| | | (820) Reverse | 5'-CAGTTCACCCCGTCCCTG-3' |
| <i>Glut-1</i> | Promoter | (-2057) Forward | 5'-TGGAAGTATCAGCAGGACGGACT-3' |
| | | (-255) Forward | 5'-AGGGAAGGGAGAAGTCAATC-3' |
| | | (-63) Forward | 5'-TCCAGTCCAGCTTTCCACC-3' |
| | | (+425) Reverse | 5'-ACTCCCACTGCGACTCTGA-3' |
| | | (+18) Reverse | 5'-TCTCTAGCAAAATGGTGGAGCCG-3' |
| | mRNA | (1711) Forward | 5'-AGCCAGGGTCCACGTCCAGCT-3' |
| | | (2011) Reverse | 5'-GGGCGACTCACACTTGGGAATC-3' |

Supplementary Table S1. Relationship between nuclear grade and growth pattern in OCCCs

| | Growth pattern | | p-value |
|------------------------|--------------------|------------------|--------------|
| | Non-solid n (%) | Solid n (%) | |
| Nuclear grade 1 | 50 (46.7) | 9 (8.4) | 0.002 |
| Nuclear grade 2 | 14 (13.1) | 12 (11.2) | |
| Nuclear grade 3 | 12 (11.2) | 10 (9.3) | |

n, number of cases

Supplementary Table S2. Relationships of clinicopathological factors with nuclear grade and growth pattern in OCCCS

| | FIGO stage | | p-value | LN metastasis | | p-value |
|---------------------------|------------------|--------------------------|---------|-------------------|-------------------|---------|
| | Stage I n (%) | Stage II/III/IV n (%) | | Positive n (%) | Negative n (%) | |
| Nuclear grade (NG) | | | | | | |
| NG1 | 33 (37.5) | 15 (17.1) | 0.19 | 5 (8.8) | 38 (50) | 0.41 |
| NG2 | 15 (17.1) | 6 (6.8) | | 2 (2.6) | 17 (22.4) | |
| NG3 | 9 (10.2) | 10 (11.4) | | 0 | 14 (18.4) | |
| Growth pattern | | | | | | |
| Solid | 40 (45.5) | 25 (28.4) | 0.28 | 5 (6.8) | 2 (2.6) | 0.88 |
| Non-solid | 17 (19.3) | 6 (6.8) | | 51 (67.1) | 18 (23.7) | |

n, number of cases; LN, lymph node

Supplementary Table S3. Correlations among several IHC markers investigated in OCCCs

| | HNF-1 β r (p) | pp65 r (p) | HNF-4 α r (p) | HIF-1 α r (p) | Glut-1 r (p) | Ki-67 r (p) |
|----------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|------------------|
| pp65 | 0.73 (<0.0001) | * | * | * | * | * |
| HNF-4 α | 0.04 (0.71) | 0.04 (0.68) | * | * | * | * |
| HIF-1 α | 0.28 (0.004) | 0.29 (0.003) | 0.16 (0.1) | * | * | * |
| Glut-1 | -0.14 (0.15) | 0.03 (0.76) | 0.03 (0.87) | 0.1 (0.32) | * | * |
| Ki-67 | -0.35 (0.001) | -0.32 (0.002) | 0.23 (0.04) | -0.08 (0.57) | 0.09 (0.4) | * |
| Apoptosis | 0.14 (0.17) | 0.02 (<0.0001) | -0.23 (0.02) | -0.13 (0.22) | -0.12 (0.22) | 0.02 (0.93) |

r : Pearson's correlation coefficient; IHC, immunohistochemistry

Supplementary Table S4. Correlations among several IHC markers investigated in endometriotic cysts

| | HNF-1 β <i>r</i> (p) | pp65 <i>r</i> (p) | HNF-4 α <i>r</i> (p) | HIF-1 α <i>r</i> (p) | Glut-1 <i>r</i> (p) | Ki-67 <i>r</i> (p) |
|----------------|-------------------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------|-----------------------|
| pp65 | 0.89 (<0.0001) | * | * | * | * | * |
| HNF-4 α | 0.32 (0.07) | -0.2 (0.25) | * | * | * | * |
| HIF-1 α | 0.08 (0.63) | 0.09 (0.6) | 0.02 (0.92) | * | * | * |
| Glut-1 | 0.12 (0.46) | 0.21 (0.24) | 0.18 (0.31) | 0.12 (0.52) | * | * |
| Ki-67 | -0.47 (0.001) | -0.5 (0.005) | 0.07 (0.7) | 0.04 (0.83) | 0.13 (0.4) | * |
| Apoptosis | 0.26 (0.17) | 0.28 (0.14) | -0.1 (0.63) | -0.14 (0.48) | 0.05 (0.79) | 0.08 (0.67) |

r , Pearson's correlation coefficient; IHC, immunohistochemistry

Figure legends

Figure 1. Nuclear grade and tumor growth pattern in ovarian clear cell carcinomas (OCCCs).

Upper: nuclear grade (NG)1 (left), NG2 (middle), and NG3(right). Original magnification, $\times 400$. Lower: tumor growth patterns: non-solid (left) and solid features (right). Original magnification, $\times 100$.

Figure 2. Immunohistochemistry (IHC) findings in serial sections of ovarian endometriotic cysts with or without atypia and ovarian clear cell carcinomas

(OCCCs). Staining is by hematoxylin and eosin (HE) and by IHC for HNF-1 β , pp65, HNF-4 α , HIF-1 α , Glut-1, and Ki-67 in ovarian endometriotic cysts (Cyst), atypical endometriotic cysts (Atypical cyst), and OCCCs. Note the nuclear features (indicated by arrows and magnified in the insets) in cystic and tumor lesions. Original magnification, $\times 200$ and $\times 400$ (inset).

Figure 3. Relationship of the immunohistochemistry (IHC) markers with nuclear grade and growth pattern in ovarian clear cell carcinomas (OCCCs). (A) Relation between nuclear grade and IHC scores (left), as well as Ki-67 labeling indices (LIs) (right). Cy, endometriotic cyst; A, atypical endometriotic cyst; G, nuclear grade. (B) Relation between tumor growth patterns and IHC scores (left), as well as Ki-67 LIs (right). NSo, non-solid pattern; So, solid pattern. (C)

Relation of a combination of nuclear grade and growth patterns with IHC scores (left), as well as Ki-67 LIs (right). The data shown are means \pm s.d.

Figure 4. Transcriptional upregulation of HNF-1 β by NF- κ B/p65. (A) Conventional reverse transcription-PCR (RT-PCR; upper) and real-time RT-PCR (middle) analyses of HNF-1 β mRNA expression, and western blot analysis (lower) of HNF-1 β , as well as nuclear p65 (N-p65), expression in TOV-21G (left) and Hec251 cells (right) for the time shown after exposure to 20 ng/ml TNF- α . (B) Left: analyses of mRNA and protein expression levels of HNF-1 β using total RNA or protein extracted from p65-transfected TOV-21G cells by RT-PCR (left) and western blot assays (right), respectively. Note the exogenous p65 (indicated by asterisk) in the middle panel of the western blot assay. Right: TOV-21G cells were transfected with HNF-1 β reporter constructs, together with p65. Relative activity was determined based on arbitrary light units of luciferase activity normalized to pRL-TK activity. The activities of the reporter plus the effector relative to that of the reporter plus empty vector are shown as means \pm s.d. The experiment was performed in duplicate. (C) Upper: the HNF-1 β promoter sequence containing two putative NF- κ B-binding sites including κ B1 and κ B2 sites. Lower: various promoter constructs were used for evaluating transcriptional regulation of the HNF-1 β promoter by p65. (D) TOV-21G cells were transfected with various constructs of the HNF-1 β promoter, along with p65 expression plasmids. The experiment was performed in triplicate. (E) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay data showing that p65 is bound to the proximal (element (E1)), but not distal (E2), region of the HNF-1 β promoter

Figure 5. Frequent apoptotic findings in ovarian clear cell carcinomas (OCCCs) with NG1 and non-solid features. (A) Upper: detection of apoptotic cells (indicated by arrows) by hematoxylin and eosin (HE) sections (upper) and TUNEL (TdT-Mediated dUTP-Biotin Nick-End Labeling) assay (lower). The enclosed boxes magnified in the insets. Original magnification, \times 200 and \times 400 (inset). Lower: correlation for detection of apoptotic cells between HE sections and TUNEL assay. (B) Upper: apoptotic cells detected by HE sections in endometriotic cysts (Cy), atypical endometriotic cysts (a), and OCCCs. G, nuclear grade. Lower: relationship of apoptotic cells detected by HE sections with tumor growth pattern (left) and a combination of nuclear grade and growth patterns (right). The data shown are means \pm s.d. NSo, non-solid; So, solid.

Figure 6. Inhibition of apoptosis by HNF-1 β . (A) Suppression of endogenous HNF-1 β expression by transfection of two siRNAs (#1 and #2) in TOV-21G cells. (B) Left: after transfection of siRNA#1 for HNF-1 β into TOV-21G cells for the time shown, cells undergoing apoptosis (sub-G1) were detected by flow cytometry. These experiments were performed in

triplicate, using independent samples. Right: analysis of protein expression levels by western blot assay in TOV-21G cells after transfection of HNF-1 β siRNA for the time shown. **(C)** Left: after treatment of TOV-21G cells with or without transfection of siRNA#1 for HNF-1 β with 0.2 μ M cisplatin (CDDP) for the time shown, cells undergoing apoptosis (sub-G1) were detected by flow cytometry. These experiments were performed in triplicate, using independent samples. Middle: analysis of protein expression levels by western blot assay in the TOV-21G cells with or without transfection of siRNA#1 for HNF-1 β after treatment with 0.2 μ M CDDP for the time shown. Right: values of endogenous bcl-2 relative to bax protein in the TOV-21G cells with or without transfection of siRNA#1 for HNF-1 β after treatment with 0.2 μ M CDDP were calculated by normalization to β -actin using the NIH ImageJ software. Expression level in the absence of transfection (0 h) is set as 1.

Figure 7. Transcriptional upregulation of bcl-2 by HNF-1 β . **(A)** Left: after treatment of two independent Hec251 cell lines stably overexpressing exogenous HA-HNF-1 β with 1 μ g/ml doxorubicin (Dox) for the time shown, cells undergoing apoptosis (sub-G1) were detected by flow cytometry. These experiments were performed in triplicate, using independent samples. Middle: analysis of protein expression levels by western blot assay in the two stable cell lines after treatment with 1 μ g/ml doxorubicin for the time shown. HA-HNF-1 β protein was detected by an anti-HA antibody. Right: values of endogenous bcl-2 relative to bax protein after treatment with 1 μ g/ml doxorubicin were calculated by normalization to β -actin, using the NIH ImageJ software. Expression level in the absence of transfection (0 h) is set as 1. **(B)** Left: analyses of mRNA and protein expression levels of bcl-2 using total RNA or protein extracted from HA-HNF-1 β -transfected TOV-21G cells by reverse transcription PCR (RT-PCR; left) and western blot (right) assays, respectively. HA-HNF-1 β mRNA was detected using a combination of HA-5' forward (5' -TACCCATACGATGTTCCAGATTACGC-3') and HNF-1 β (388) reverse primers (Table 1), while HA-HNF-1 β protein was detected by an anti-HA antibody. Right upper: various bcl-2 promoter constructs were used for evaluating the transcriptional regulation by HNF-1 β . Note the putative HNF-1 β -binding site (5' -ATTAAC-3'). Right lower: TOV-21G cells were transfected with various constructs of the bcl-2 promoter, along with the HNF-1 β expression plasmid. The experiment was performed in triplicate. **(C)** Left: staining is by IHC for bcl-2 in ovarian clear cell carcinomas (OCCCs). Note the lack of bcl-2 immunoreactivity in OCCCs with solid features, in contrast to the bcl-2-positive infiltrating lymphocytes (indicated by arrows). Right: relationship between HNF-1 β and bcl-2 scores in OCCCs.

Figure 8. Schematic representation of associations among HNF-1 β , NF- κ B, and bcl-2 in response to microenvironment factors in ovarian clear cell carcinoma (OCCC) cells.

Supplementary Figure S1. IHC findings of four histological subtypes of ovarian carcinomas.

(A) Staining is by hematoxylin and eosin (HE) and by IHC for HNF-1 β , pp65, HNF-4 α , HIF-1 α , Glut-1, and Ki-67 in ovarian endometrioid, mucinous, and serous adenocarcinomas. Original magnification, x200. **(B)** IHC scores for HNF-1 α , pp65, HNF-4 α , HIF-1 α , and Glut-1 and Ki-67 labeling indices (LIs) in clear cell (C), endometrioid (E), mucinous (M), and serous (S) adenocarcinomas. The data shown are means \pm SDs.

Supplementary Figure S2. Induction of apoptosis in TOV-21G cells treated with cisplatin

(CDDP). **(A)** Analysis of protein expression levels by western blot assay in TOV-21G cells after treatment with 0.2, 0.5, and 1.0 μ M cisplatin for the time shown. **(B)** After treatment of TOV-21G cells with 0.2, 0.5, and 1.0 μ g/ml cisplatin for the time shown, cells undergoing apoptosis (sub-G1) were detected by flow cytometry. These experiments were performed in triplicate, using independent samples.

Supplementary Figure S3. (A) TOV-21G cells were transfected with survivin, bcl-2, and HNF-4 α reporter constructs together with HNF-1 β . Relative activity was determined based on arbitrary light units of luciferase activity normalized to pRL-TK activity. The activities of the reporter plus the effector relative to that of the reporter plus empty vector are shown as means \pm SDs. The experiment was performed in duplicate. **(B)** Relationship of bcl-2 scores with nuclear grade (left), growth pattern (middle), and a combination of nuclear grade and growth pattern (right). G, nuclear grade; NSo, non-solid; So, solid. The data shown are means \pm SDs.

Supplementary Figure S4. Changes in HNF-1 β expression during cell growth. **(A)** Analysis of protein expression levels by western blot assay in TOV-21G, OVISe, and OVTOKO cells after serum-stimulation for the time shown. **(B)** Two independent Hec251 cell lines stably overexpressing exogenous HA-HNF-1 β were seeded at low density and monitored for growth. The cell numbers presented are means \pm SDs. P0, P3, P6, and P9: 0, 3, 6, and 9 days after cell passage.

Supplementary Figure S5. Transcriptional upregulation of Glut-1 gene by HNF-1 β . **(A)** Left: analyses of mRNA and protein expression levels of Glut-1 using total RNA or protein extracted from HNF-1 β -transfected TOV-21G cells by RT-PCR (left) and western blot (right) assays, respectively. HA-HNF-1 β mRNA was detected using a combination of HA-5' forward (5'-TACCCATACGATGTTCCAGATTACGC-3') and HNF-1 β (388) reverse primers (Supplementary Table S1), while HA-HNF-1 β protein was detected by an anti-HA antibody. Right: TOV-21G cells were transfected with Glut-1 reporter constructs together with HNF-1 β .

Relative activity was determined based on arbitrary light units of luciferase activity normalized to pRL-TK activity. The activities of the reporter plus the effector relative to that of the reporter plus empty vector are shown as means \pm SDs. The experiment was performed in duplicate. **(B)** Upper: the Glut-1 promoter sequence containing a putative HNF-1 α -binding site. Lower: various Glut-1 promoter constructs were used for evaluating transcriptional regulation of the promoter by HNF-1 β . **(C)** TOV-21G cells were transfected with various constructs of the Glut-1 promoter along with the HNF-1 β expression plasmid. The experiment was performed in triplicate.

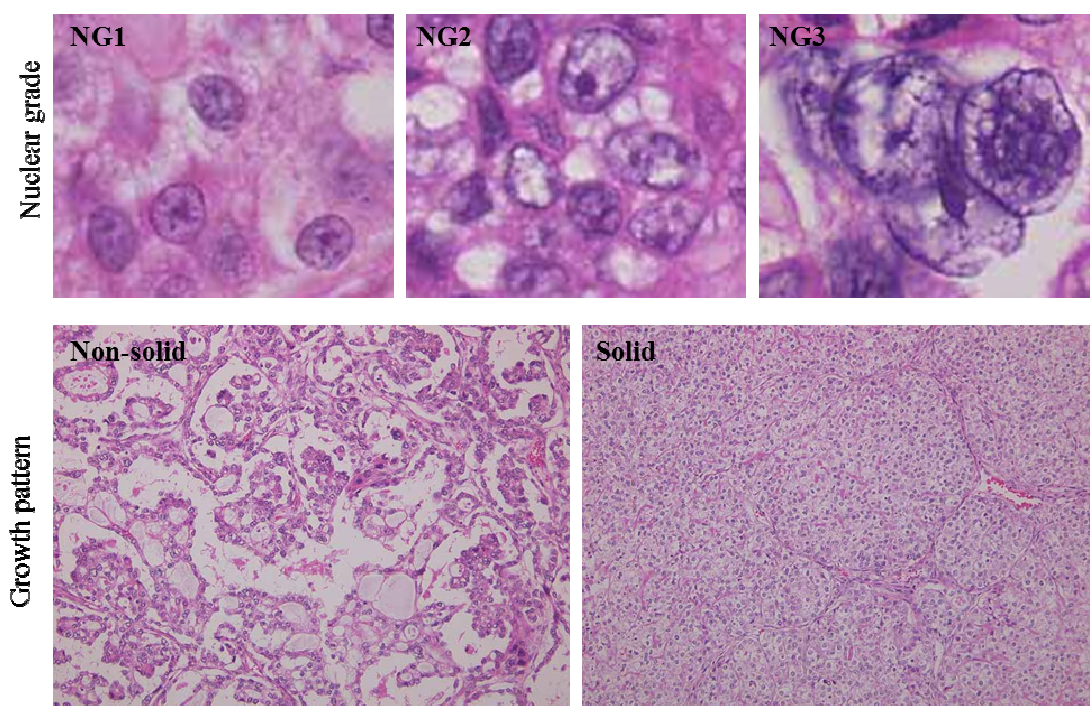


Figure 1 Suzuki

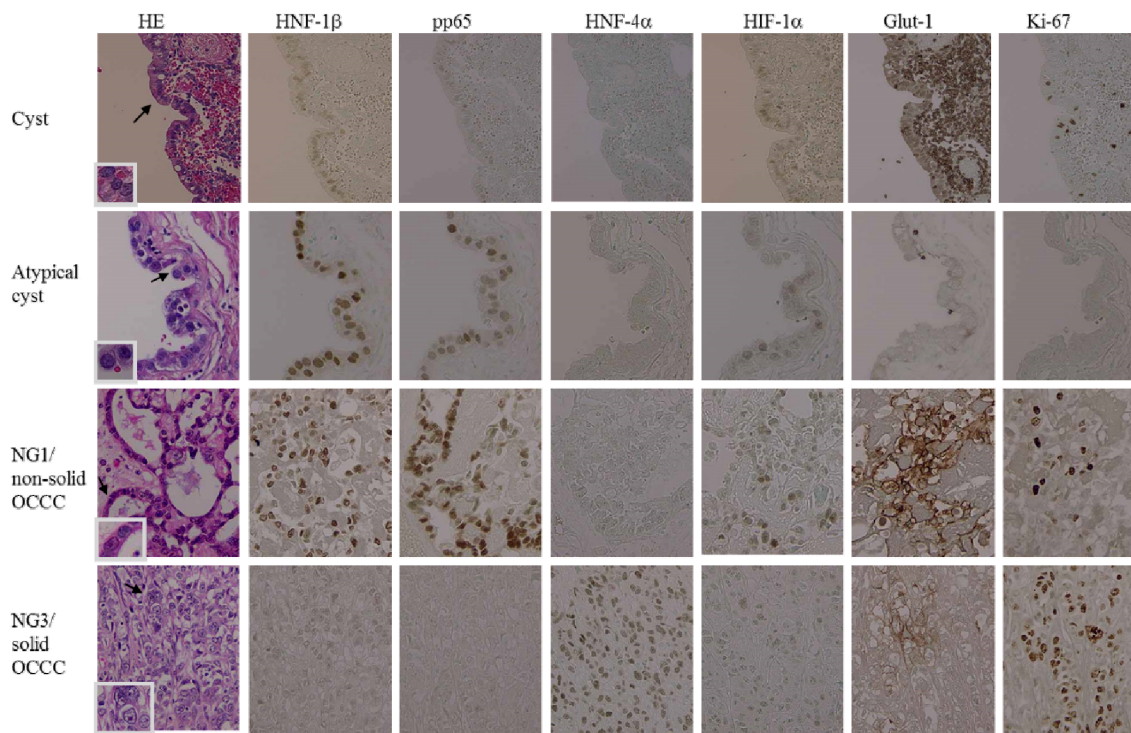


Figure 2 Suzuki

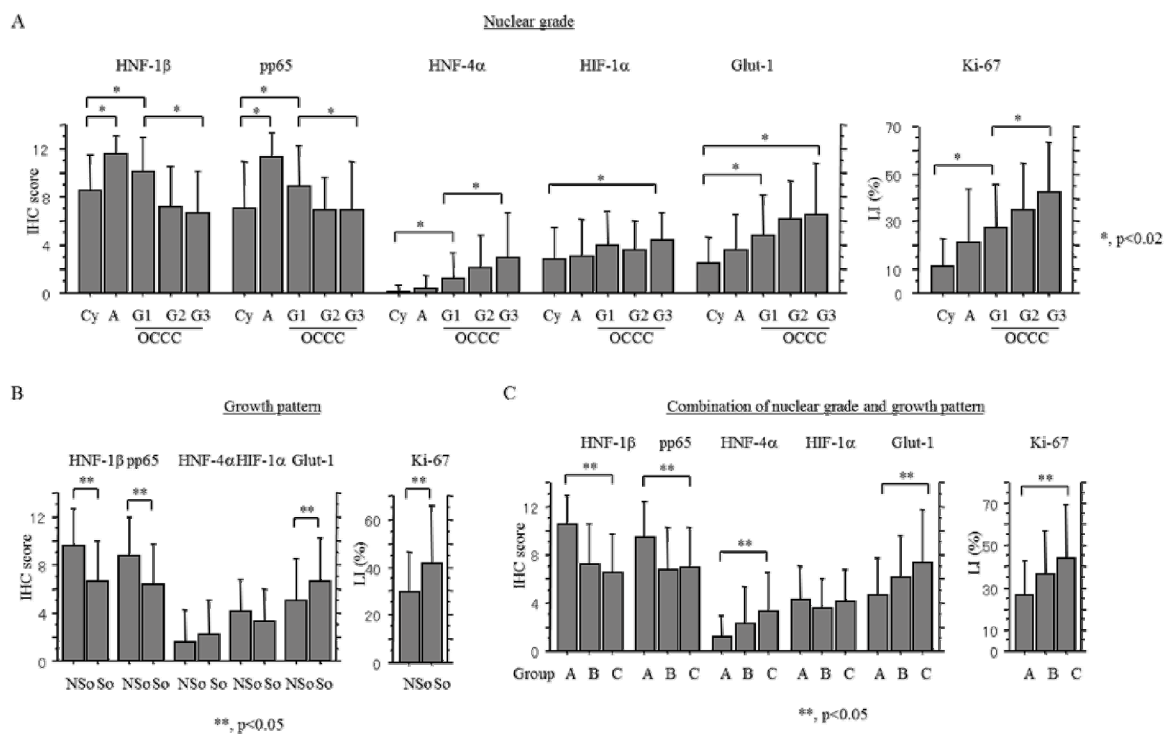


Figure 3 Suzuki

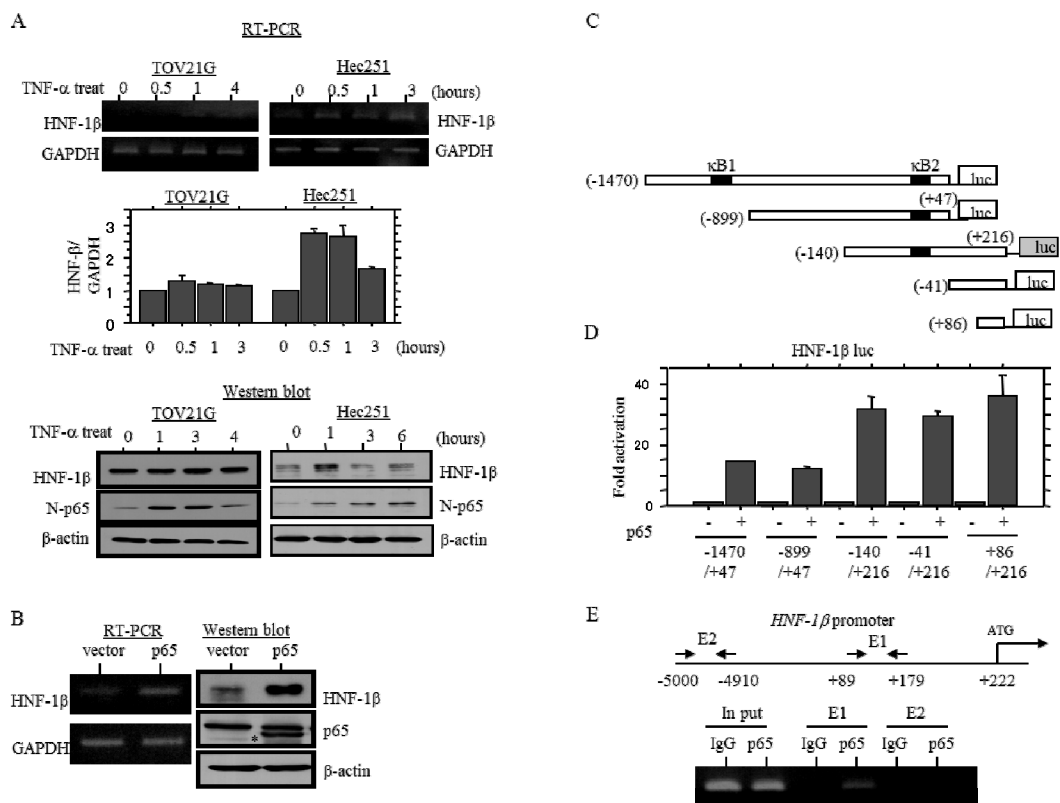
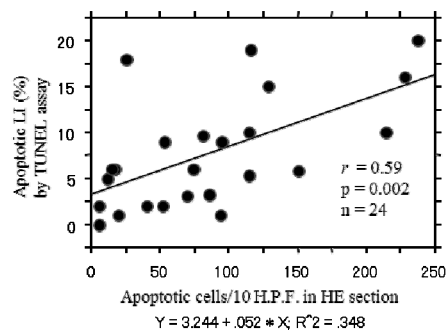
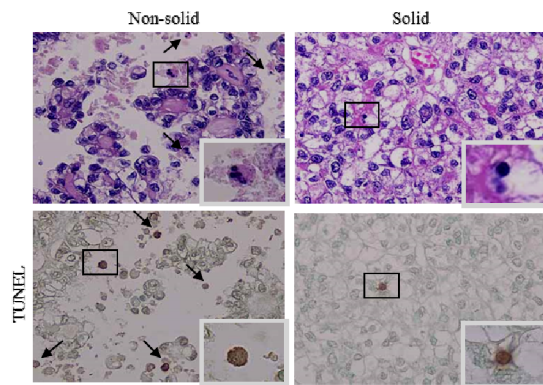


Figure 4 Suzuki

A



B

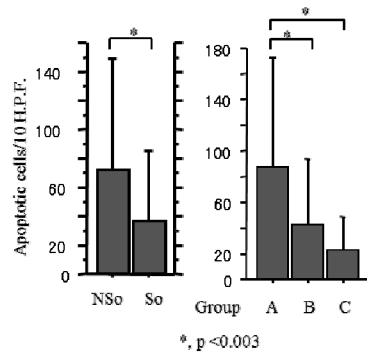
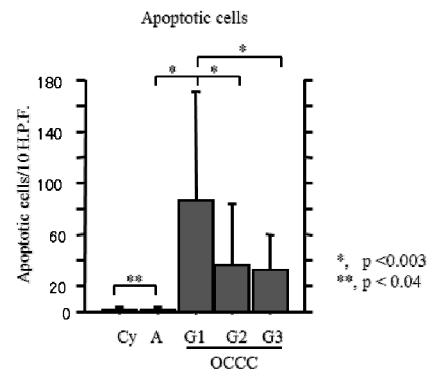


Figure 5 Suzuki

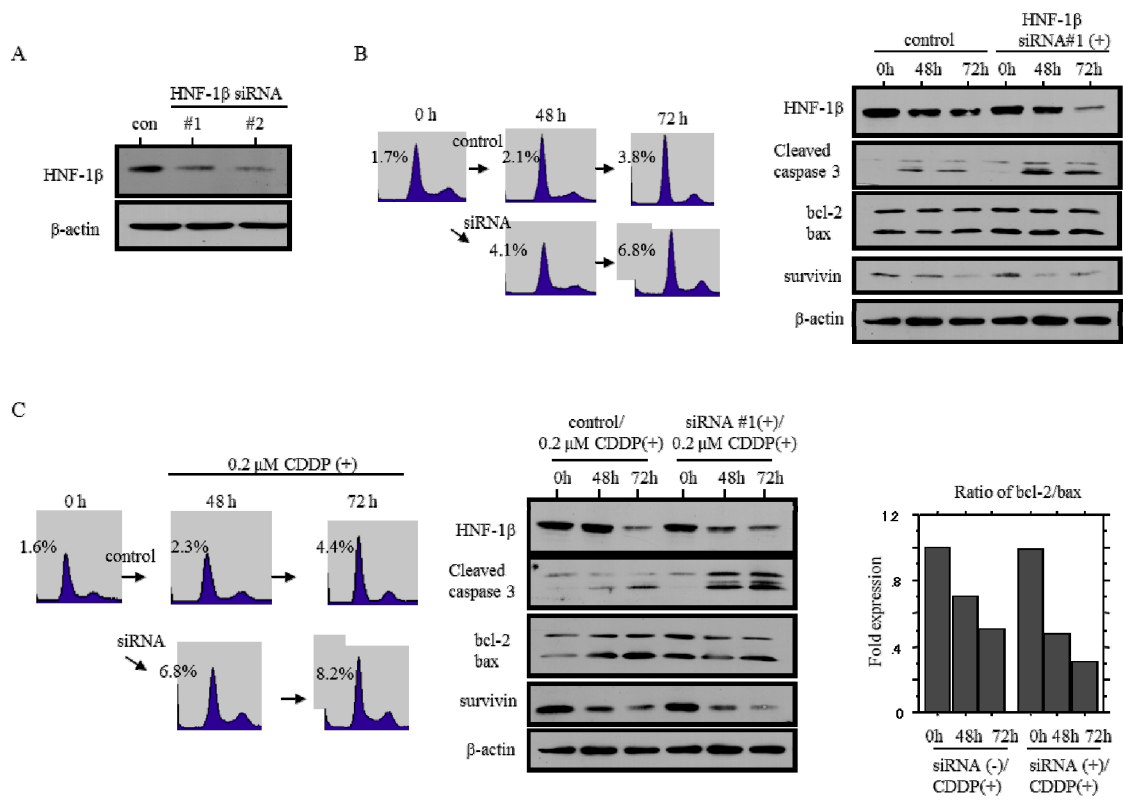


Figure 6 Suzuki

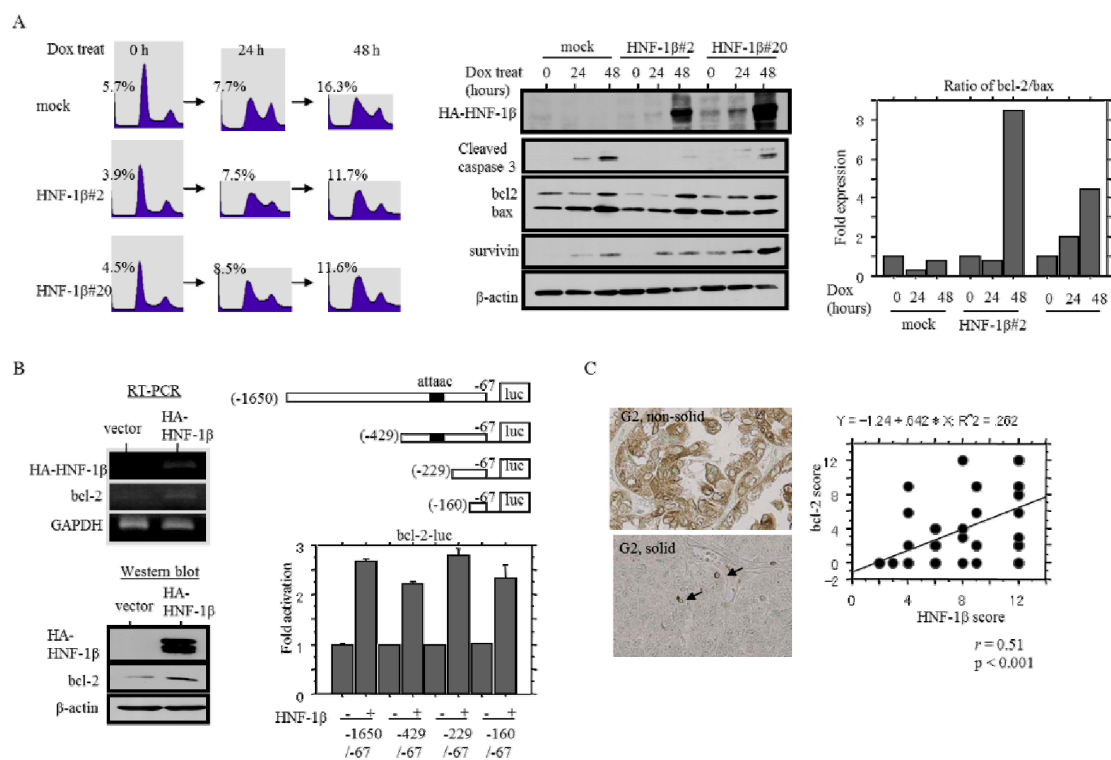


Figure 7 Suzuki

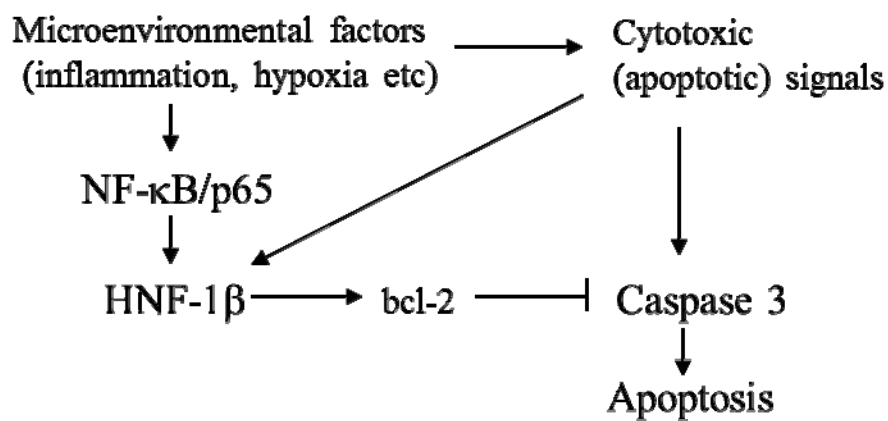
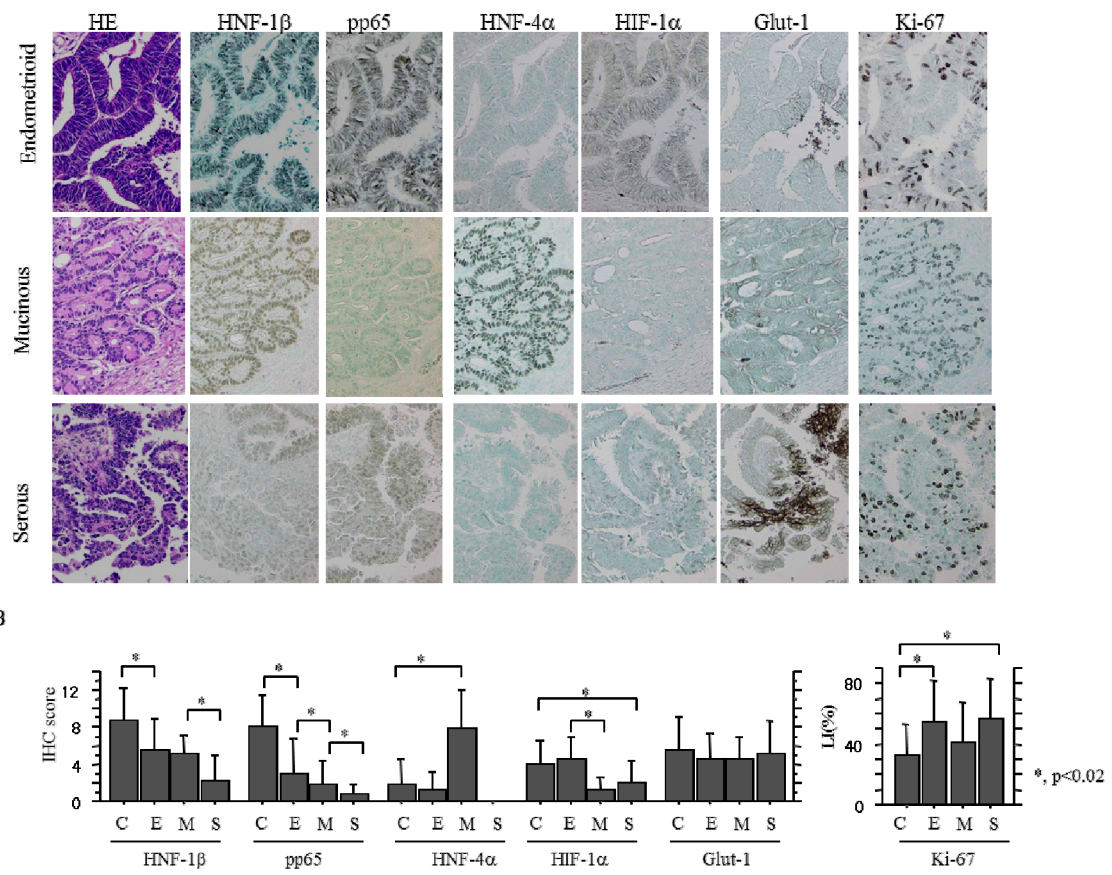
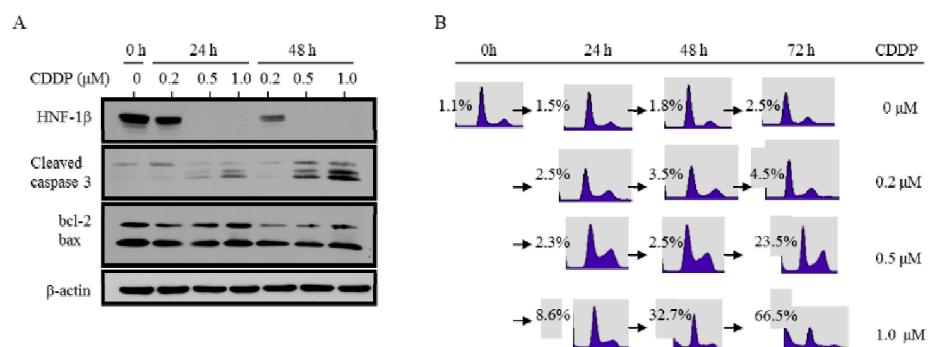


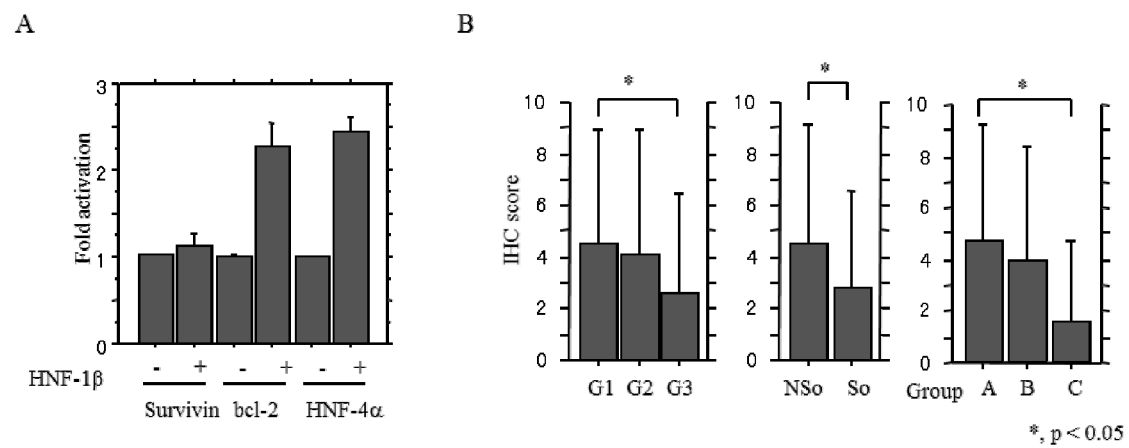
Figure 8 Suzuki



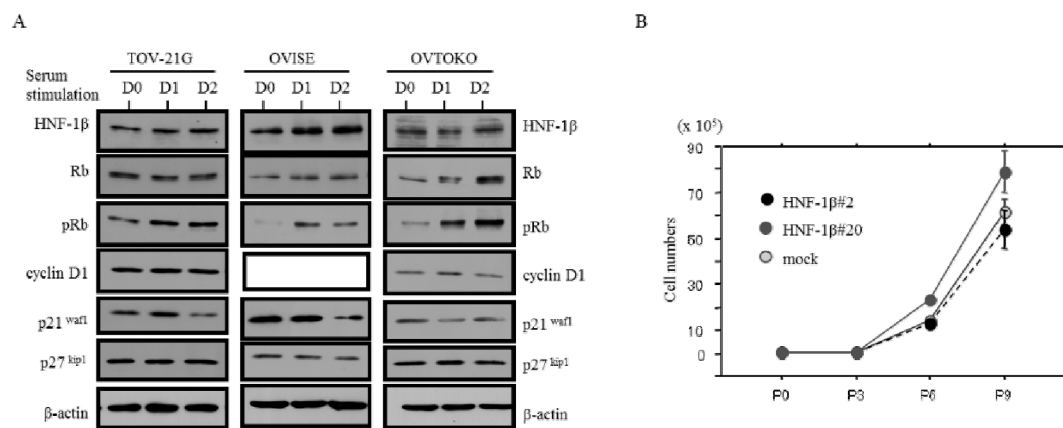
Supplementary Figure S1 Suzuki



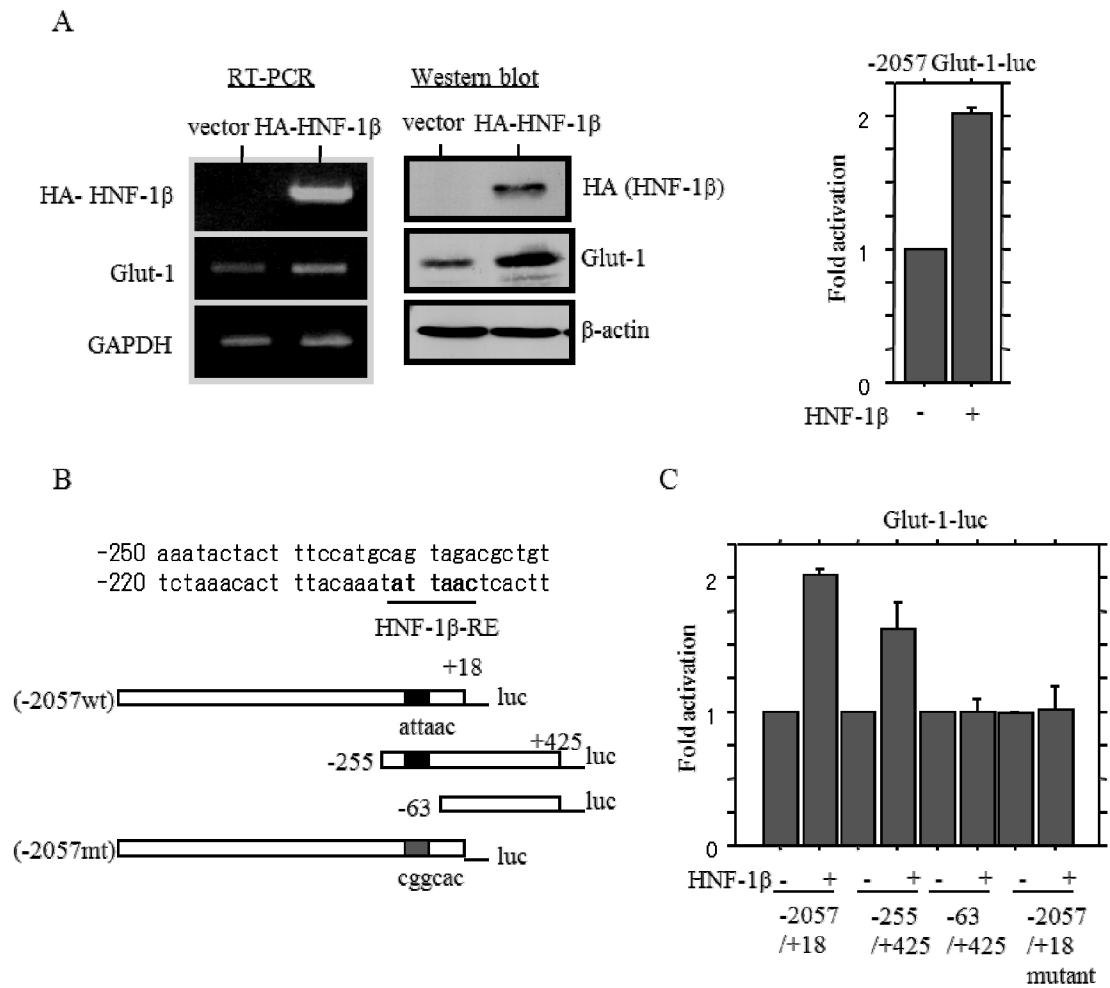
Supplementary Figure S2 Suzuki



Supplementary Figure S3 Suzuki



Supplementary Figure S4 Suzuki



Supplementary Figure S5 Suzuki