

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10717

研究課題名(和文) ARID1A遺伝子変異を基盤とした卵巣明細胞腺癌発生機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of in vitro carcinogenesis model of endometriosis related ovarian carcinoma

研究代表者

中山 健太郎 (Nakayama, Kentaro)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：70346401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Endometriosis related ovarian neoplasms (ERONs) はエンドメトリオーシスから発生する卵巣悪性腫瘍の総称であり、明細胞癌、類内膜癌、Seromucinous borderline tumorが含まれる。以前、我々はp53変異を基盤とした子宮内膜症の発癌モデルを構築したがマウス移植実験では想定外の結果であった。そこで、新たに子宮内膜症の間質細胞の混入を完全に除外した子宮内膜症不死化細胞EMOsis-CC/TERT10細胞を樹立し、ARID1A変異を基盤としたERONs in vitro発癌モデルを構築した。

研究成果の概要(英文)：To clarify minimal requirement for carcinogenesis, we sought to establish an in vitro stepwise carcinogenesis model using immortalized endometriotic epithelial cells with overexpressed cyclinD1/cdk4 and hTERT, in which we additionally introduced selected genetic elements frequently observed in clinical samples. Mutational analysis using clinical samples of ovarian clear cell and endometrioid adenocarcinomas identified frequent ARID1A mutations (90%) and p53 mutations (20%), but their overlap was relatively rare. Thus, we introduced ARID1A knock out in combination with oncogenic mutant KRAS allele into immortalized cells, exhibit tumorigenic phenotypes. Additional introduction of genetic factors will be attempted to investigate in vitro and in vivo tumorigenicity, and c-Myc overexpression, mutant PIC3CA, or phosphorylated Akt (p-Akt) are going to transfect to immortalized endometriotic epithelial cells.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 明細胞癌 ARID1A 発癌 癌遺伝子

1. 研究開始当初の背景

本邦での卵巣癌における明細胞腺癌の発生頻度は27%(2012年婦人科腫瘍委員会報告)であり、30年間で5倍以上に増加している。FIGOのannual reportによると、世界では明細胞腺癌の発生頻度は8.4%であり、人種間で発生頻度に差があると考えられている。卵巣明細胞腺癌は白金製剤を主体とする現在の化学療法に抵抗性で極めて予後不良であり、特に本邦において急速に増加傾向にある。近年の網羅的遺伝子解析法の普及により、卵巣明細胞腺癌の分子生物学的特徴が明らかにされつつあるが、発癌モデルを用いた検討はなされていない。今後、卵巣明細胞腺癌の治療成績を向上させるためには卵巣明細胞腺癌の発癌モデルを構築し、それを基盤とした創薬が求められる。

2. 研究の目的

本研究では、1. 子宮内膜症上皮不死化細胞におけるARID1Aの遺伝子変異導入と卵巣明細胞腺癌発生(Endometriosis related ovarian neoplasms(ERONs))との関連、2. 子宮内膜症上皮不死化細胞を患者由来チョコレート嚢胞内容液と長期培養することで、ARID1Aにmutationが誘導されるか、さらに全エクソン解析、メチル化解析を行い、包括的な発癌分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

卵巣明細胞腺癌における新規癌抑制遺伝子ARID1Aの遺伝子変異を基盤とした発癌機構解明のために以下の研究項目を予定している。

子宮内膜症上皮不死化細胞におけるZFN(zinc-finger nuclease)を用いたARID1A遺伝子ノックアウト、さらに変異型PIK3CA、変異型KRAS等の遺伝子導入

子宮内膜症上皮不死化細胞を患者由来チョコレート嚢胞内容液で長期培養後にARID1A遺伝子のサンガーシーケンスを行う

4. 研究成果

子宮内膜症性嚢胞の手術検体を初代培養し、上皮成分だけを分離し、cyclinD1、CDK4、hTERTの遺伝子導入をレンチウイルスベクターにて行い、新たに子宮内膜症の間質細胞の混入を完全に除外した子宮内膜症上皮不死化細胞EMOsis-CC/TERT10細胞を樹立した。この細胞にCRISPR/Cas9システムを用いてARID1Aの遺伝子ノックアウトを行いEMOsis-CC/TERT10ARID1A-/-細胞のクローニングを行った。

ARID1A遺伝子ノックアウトでは100個のクローンを採取し、3クローンがARID1Aホモ変異であった。EMOsis-CC/TERT10ARID1A-/-細胞でARID1Bをノックダウンすると細胞増殖が抑制された。現在、EMOsis-CC/TERT10ARID1A-/-細胞に変異型K-ras、PIK3CA、c-mycの遺伝子導入を行っており、マウス移植実験で組織型を確認中である。

また、リキッドマイクロダイセクション(初代培養+anti-EpiCAM-conjugated beadsとマグネットを用いたセルソーティング)を用いたERONsのmutation解析では19/21(90%)にARID1A変異を認めた。

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15件)

1. Luchini C, Veronese N, Solmi M, Cho H, Kim JH, Chou A, Gill AJ, Faraj SF, Chaux A, Netto GJ, Nakayama K, Kyo S, Lee SY, Kim DW, Yousef GM, Scrilas A, Nelson GS, Köbel M, Kalloger SE, Schaeffer DF, Yan HB, Liu F, Yokoyama Y, Zhang X, Pang D, Lichner Z, Sergi G, Manzato E, Capelli P, Wood LD, Scarpa A, Correll CU: Prognostic role and implications of mutation status of tumor suppressor gene ARID1A in cancer: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget** 36:39088-39097, 2015
2. Katagiri H, Nakayama K, Razia S, Nakamura K, Sato E, Ishibashi T, Ishikawa M, Iida K, Ishikawa N, Otsuki Y, Nakayama S, Kyo S: Loss of autophagy-related protein Beclin 1 may define poor prognosis in ovarian clear cell carcinomas. **Int J Oncol.** 47:2037-2044, 2015
3. Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Nakamura K, Ishikawa M, Katagiri H, Sato E, Ishibashi T, Iida K, Ishikawa N, Kyo S: CCNE1 amplification is associated

- with aggressive potential in endometrioid endometrial carcinomas.
- Int J Oncol.** 48:506-516, 2016
4. Nakamura K, **Nakayama K**, Ishikawa M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Sato E, Sanuki K, Yamashita H, Komatsu-Fujii T, Kyo S:
High pretreatment plasma D-dimer levels are related to shorter overall survival in endometrial carcinoma.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.
 5. Nakamura K, **Nakayama K**, Ishikawa M, Katagiri H, Minamoto T, Ishibashi T, Ishikawa N, Sato E, Sanuki K, Yamashita H, Komatsu-Fujii T, Kyo S:
High Pre-treatment Plasma D-Dimer Level as a Potential Prognostic Biomarker for Cervical Carcinoma.
 6. **Anticancer Res.** 36:2933-2938, 2016
Ishikawa M, **Nakayama K**, Ishibashi T, Sato E, Nakamura K, Katagiri H, Kyo S:
Case series of cerebral infarction with Trousseau's syndrome incidental to malignant gynecological tumors.
Mol Clin Oncol. 5:138-142, 2016
 7. Nakayama N, Kato H, Sakashita G, Nariai Y, **Nakayama K**, Kyo S, Urano T: Protein complex formation and intranuclear dynamics of NAC1 in cancer cells.
Arch Biochem Biophys.
 8. Rahman M, **Nakayama K**, Rahman MT, Ishikawa M, Katagiri H, Katagiri A, Sato E, Iida K, Miyazaki K: Non-Hodgkin lymphoma of the female genital tract mimicking primary gynecological tumors: A single-center series of 3 cases.
Eur J Gynaecol Oncol. 37:117-121, 2016
 9. Nakamura K, **Nakayama K**, Ishibashi T, Ishikawa N, Ishikawa M, Katagiri H, Minamoto T, Sato E,
Sanuki K, Yamashita H, Iida K, Sultana R, Kyo S:
KRAS/BRAF Analysis in Ovarian Low-Grade Serous Carcinoma Having Synchronous All Pathological Precursor Regions.
Int J Mol Sci. 17(5). E625, 2016
 10. **Nakayama K**, Rahman M, Rahman MT, Nakamura K, Sato E, Katagiri H, Ishibashi T, Ishikawa M, Iida K, Razia S, Ishikawa N, Kyo S:
NAC1/Gadd45GIP1 axis is related to cisplatin resistance through cellular senescence in ovarian cancer.
Oncol Lett. 6: 4713-4719, 2017
 11. Nakamura K, **Nakayama K**, Ishikawa N, Ishikawa M, Sultana R, Kiyono T, Kyo S.
Reconstitution of high-grade serous ovarian carcinoma from primary fallopian tube secretory epithelial cells.
Oncotarget 9:12609-12619, 2017.
 12. Yamashita H, **Nakayama K**, Ishikawa M, Nakamura K, Ishibashi T, Sanuki K, Ono R, Sasamori H, Minamoto T, Iida K, Sultana R, Ishikawa N, Kyo S. Microsatellite instability is a potential biomarker for immune checkpoint inhibitors in endometrial cancer.
Oncotarget 9:5652-5664, 2017
 13. Ishikawa M, **Nakayama K**, Nakamura K, Ono R, Sanuki K, Yamashita H, Ishibashi T, Minamoto T, Razia S, Iida K, Ishikawa N, Kyo S. Affinity purified DNA-based mutation profiles of endometriosis-related ovarian neoplasms in Japanese patients.
Oncotarget. 9:14754-14763, 2018
 14. Minamoto T, **Nakayama K**, Nakamura K, Katagiri H, Sultana R, Ishibashi T, Ishikawa M, Yamashita H,

Sanuki K, Iida K, Nakayama S, Otsuki Y, Ishikawa N, Kyo S:
Loss of beclin 1 expression in ovarian cancer: a potential biomarker to predict unfavorable outcome.

Oncol Lett. 2018 in press

15. Katagiri H, **Nakayama K**, Nakamura K, Sultana R, Sato E, Ishibashi T, Ishikawa M, Minamoto T, Iida K, Otsuki Y, Nakayama S, Ishikawa N, Kyo S:

TERT promoter mutation is rare event in ovarian clear cell carcinomas in Japanese population.

Eur J Gynaecol Oncol. 2018 in press

[学会発表](計3件)

1. ARID1A 変異を基盤とした Endometriosis related ovarian neoplasms(ERONs)の in vitro 発癌モデル

中山健太郎、中村康平、石橋朋佳、石川雅子、佐藤絵美、スルタナラジア、モハメドフセイン、飯田 幸司、山下 瞳、佐貫 薫、小野瑠璃子、皆本敏子、清野 透、京 哲

第 38 回 日本エンドメトリオーシス学会学術講演会 プレナリーセッション

平成 29 年 1 月 21 日 東京

2. 卵巣癌の疫学・診断・治療

中山 健太郎

第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 専攻医教育プログラム

平成 28 年 4 月 21 日~24 日 東京都

3. in vitro 発癌モデルから見えてきた漿液性卵巣癌発生機構

中山 健太郎、中村 康平、石橋 朋佳、石川 雅子、佐藤 絵美、佐貫 薫、山下 瞳、小野 瑠璃子、モハメド・フセイン、スルタナ・ラジア、飯田 幸司、皆本 敏子、草野 透、京 哲

第 48 回日本臨床分子形態学会 シンポジウム

平成 28 年 9 月 23 日 熊本市

[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：
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

中山 健太郎 (Nakayama Kentaro)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：70346401

(2)研究分担者

京 哲 (Kyo Satoru)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50272969

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()