

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20143

研究課題名(和文)新規増幅癌遺伝子ZNF217を標的とした卵巣明細胞腺癌の治療開発のための基礎研究

研究課題名(英文)Development of of ovarian clear cell adenocarcinoma molecular target therapy against transcriptional factor,ZNF217

研究代表者

片桐 浩(Katagiri, Hiroshi)

島根大学・医学部・特別協力研究員

研究者番号：40609319

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)：卵巣明細胞癌における新規増幅癌遺伝子ZNF217についてオートファジー関連タンパク質であるBeclin-1タンパク質発現、甲状腺癌での予後因子の一つとされるTERT promoter変異との関連を検討した。卵巣明細胞癌症例ではBeclin-1タンパク質未発現群とZNF217遺伝子増幅は有意な相関を認めた。卵巣明細胞癌においてBeclin-1未発現群は有意に無増悪生存率が低下しており、卵巣明細胞腺癌細胞株をBeclin-1 siRNAでknock downしたところ細胞増殖能が有意に亢進していた。TERT promoter変異は日本人の明細胞腺癌では非常に稀であることを確認し報告した。

研究成果の概要(英文)：In previous research of our group, we identified ZNF217, located at chr20q13.2, as the most frequently amplified gene in ovarian clear cell carcinoma(OCCC) and ZNF217 amplification is associated with the most clinically aggressive behavior in OCCCs. Present study aim to examine the association between ZNF217 amplification and other cancer prognostic factors. Loss of autophagy-related protein, Beclin-1 expression was significantly correlated with ZNF217 amplification (P=0.024). Negative expression of Beclin 1 was associated with a shorter progression-free survival in comparison to positive Beclin 1 expression in OCCC (P=0.027). Beclin 1 knockdown using siRNA increased cell growth in OCCC cell line. Telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter mutations were reported as indicators of poor outcome in some type of cancers. The frequency of these mutations in OCCC appears to be very rare in the Japanese population.

研究分野：外科系臨床医学

キーワード：卵巣癌 がん遺伝子

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 24.8% (2007 年婦人科腫瘍委員会報告) であり、30 年間で約 5 倍に増加している。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。卵巣明細胞腺癌の分子生物学的特徴は、ほとんど解明されておらず、分子標的薬剤開発の糸口さえつかめていない。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分子生物学的特徴を解明が必要であると考えられる。

卵巣明細胞腺癌の分子生物学的特徴についての報告は非常に少ないが、2002 年に国内の研究グループより卵巣明細胞腺癌は漿液性腺癌に比べて増殖速度が非常に遅い事が特徴であり、その結果抗腫瘍剤に対して低感受性である可能性が報告されている (Itanochi et al. *Obstetrics & Gynecology*, 2002)。

申請者らの研究グループは Johns Hopkins 大学との共同研究で卵巣明細胞腺癌において chr20q13.2 に 34% の頻度で遺伝子増幅があり、その Driver gene が *ZNF217* である事を同定した。申請者らの研究グループは Johns Hopkins 大学との共同研究で、次世代シーケンサーを用いた、Exome Sequencing (全エクソン解析) で致死性卵巣癌である卵巣明細胞腺癌で新規癌抑制遺伝子 *ARID1A* の mutation が高頻度 (57%) に存在する事を発見した (Jones, Nakayama et al. *Science*, 2010)。また、新規癌抑制遺伝子 *PPP2R1A* (regulatory subunit of serine/threonine phosphatase 2) が 7% に Oncogenic mutation が生じている事も発見した。また、SNP array を用いて、卵巣明細胞腺癌において chr20q13.2 に遺伝子増幅が 37% 存在する事を発見した (Kuo, Nakayama et al. *Clin Cancer Res.*, 2010)。さらに責任増幅遺伝子を絞り込み、chr20q13.2 の遺伝子増幅領域の Driver gene が *ZNF217* (Zinc finger protein 217) である事を同定した (Kuo, Nakayama et al. *Clin Cancer Res.*, 2010)。*ZNF217* は Zinc finger domain をもつ転写因子で HDAC1、HDAC2、RCOR1/CoREST 等とタンパク質複合体を形成し転写調節をしていると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では新規増幅癌抑制遺伝子 *ZNF217* と卵巣明細胞腺癌における他の予後因子との関連について検討を目的とした。

近年、発現低下が抗腫瘍剤耐性に働くことが他の癌種で認められているオートファジー関連タンパク質 Beclin-1 と、プロモーター変異により活性上昇し甲状腺癌などで予後不良因子とされている Telomerase reverse transcriptase (TERT) プロモーターについて日本人における卵巣明細胞癌症例での検討を行った。

3. 研究の方法

オートファジー関連タンパク質 Beclin-1 との関連についての検討

卵巣明細胞腺癌症例において免疫染色で Beclin-1 タンパク質未発現群、発現群の 2 群に分けて、*ZNF217* を含む既知の遺伝子変異についての関連性、 Kaplan-Meier により無増悪生存率について検討を行った。

明細胞腺癌細胞株に Beclin-1 siRNA を導入した Beclin-1 knock down 細胞株について増殖能、浸潤能について MTT アッセイ、マトリゲルアッセイを用いて wild type との比較を行った。

TERT プロモーター変異について検討

日本人における明細胞腺癌症例において、DNA シーケンシングにより既知の変異 (-128C>T、-144C>T) 症例を検討した。

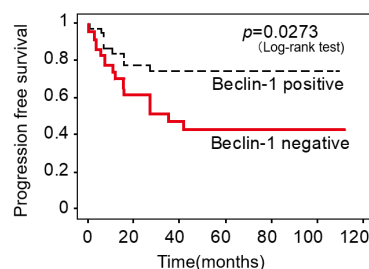
4. 研究成果

卵巣明細胞腺癌において *ZNF217* 遺伝子増幅群とオートファジー関連タンパク質 Beclin-1 の未発現群の間に有意な相関を認めた。

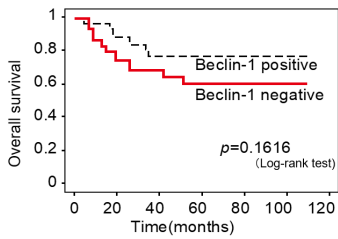
Factors	Patients	Beclin 1 expression		P-value
		Negative	Positive	
<i>ARID1A</i>				
Negative	9	6	3	0.0579
Positive	51	17	34	
<i>K-ras</i>				
Wild-type	35	11	24	0.3443
Mutant	2	0	2	
<i>PIK3CA</i>				
Wild-type	40	14	26	0.5412
Mutant	16	7	9	
<i>ZNF217</i>				
Normal	48	15	33	0.024
Amplification	12	8	4	

卵巣明細胞腺癌において、Beclin-1 タンパク質未発現群は無増悪生存率の有意な低下を認めた。全生存率について有意差を認めなかったが、Beclin-1 タンパク質未発現群において低下傾向であった。

Beclin-1 タンパク質発現と無増悪生存率



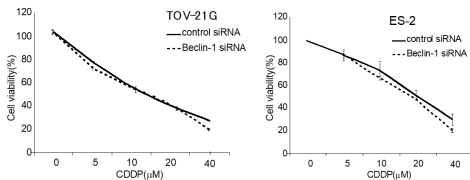
Beclin-1タンパク質発現と全生存率



Beclin-1未発現群で全生存率の低下傾向を認めた

卵巣明細胞腺癌細胞株を用いた検討において、Beclin-1 ノックダウン細胞における抗がん剤シスプラチンに対する感受性は変化を認めなかった。

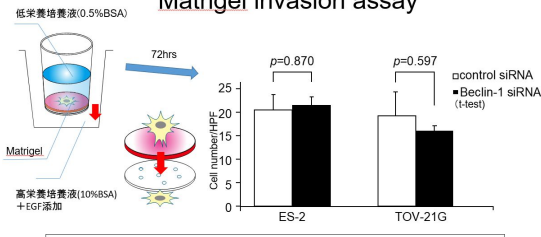
薬剤感受性試験 (Beclin-1 knock down)



Beclin-1 knock downによるシスプラチン感受性の変化は認めず

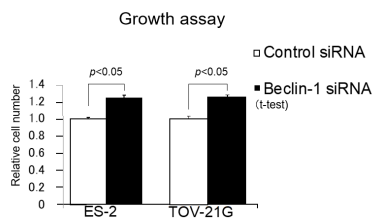
明細胞腺癌細胞株への Beclin-1 ノックダウンにより細胞増殖能の有意な上昇を認め悪性化の原因の一つである可能性が示唆された。浸潤能については変化を認めなかった。

Matrigel invasion assay



Beclin-1 knock downによる浸潤能の変化は認めなかった

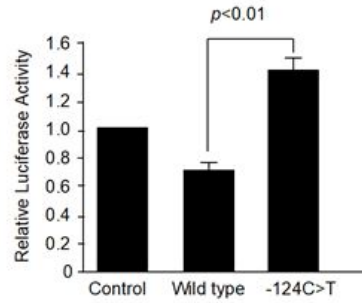
Growth assay



Beclin-1 ノックダウンにより有意に細胞増殖能は亢進した

卵巣明細胞腺癌における TERT プロモーター変異について、明細胞腺癌細胞株に変異 (-124C>T) 導入し、プロモーター活性が上昇することを確認した。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

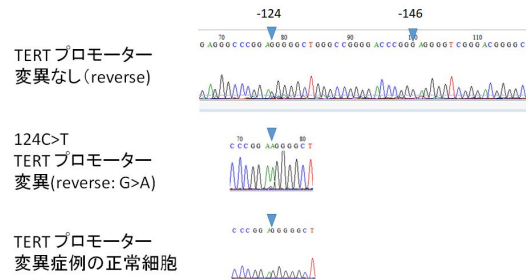


TERT プロモーター変異を導入した明細胞腺癌細胞株では、変異なしの細胞株と比較してプロモーター活性が上昇していた。

卵巣明細胞腺癌臨床検体を用いて TERT プロモーター変異症例を検討したが、変異症例が少ないことから ZNF217 との関連を検討は行えなかった。しかし日本人における卵巣明細胞腺癌では TERT プロモーター変異は非常に稀であることを報告した。

卵巣高悪性度漿液性腺癌、卵巣類内膜腺癌症例について、検討症例数は少ないが TERT プロモーター変異は認めなかった。

卵巣明細胞腺癌でのTERT promoter領域のDNAシーケンス



上皮性卵巣癌におけるTERT promoter 変異の頻度 (-124 C>T, -146 C>T)

組織型	症例数	変異
明細胞腺癌	40	1 -124C>T
類内膜腺癌	11	0
高悪性度漿液性腺癌	12	0

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)

1, 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 for

predicting unfavorable outcomes.
Oncol Lett., 15:1170-1176,2018

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.,47:2037-44,2015

3, H. Katagiri, K. Nakayama, K. Nakamura, S. Razia, E. Sato, T. Ishibashi, M. Ishikawa, T. Minamoto, K. Iida, Y. Otsuki, S. Nakayama, N. Ishikawa, S. Kyo.: Telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter mutation is a rare event in ovarian clear cell carcinomas in the Japanese population

Eur J Gynaecol Oncol., in press.

〔学会発表〕(計 2 件)

1、片桐浩、中山健太郎、中村康平、石橋朋佳、飯田幸司、京哲
本邦における明細胞腺癌での TERT promoter mutation は稀である
2016 年 4 月 21 日
日本産科婦人科学会第 68 回学術講演会
東京国際フォーラム

2、片桐浩、中山健太郎、石川雅子、飯田 幸司、京 哲
卵巣明細胞腺癌における autophagy 関連蛋白質 Beclin-1 の発現と予後の関連についての検討
2013 年 10 月 8 日
第 74 回日本癌学会学術総会
名古屋国際会議場

〔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
片桐 浩 (Katagiri, Hiroshi)
島根大学・医学部・特別研究員
研究者番号：40609319

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()