

令和元年6月6日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20166

研究課題名(和文) 上皮性卵巣癌におけるARID1Aの細胞競合現象を介したがん抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of tumor suppression mechanism via cell competition of ARID1A in epithelial ovarian cancer

研究代表者

上川 篤志(Uekawa, Atsushi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：60534253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：多くのヒトがんでは、がん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の機能欠損が細胞のがん化を引き起こしている。卵巣明細胞癌では、がん抑制遺伝子であるARID1Aが高い頻度で遺伝子変異を起こしており機能が欠損している。本研究は、ARID1Aのがん抑制機能の中でも、細胞増殖制御と細胞競合という新たな概念に基づいた研究を行った。その結果、ARID1A遺伝子を欠損した細胞では、欠損していない細胞に比べて優位に増殖することがわかった。さらにARID1A遺伝子が欠損した細胞内で起こる遺伝子発現の変化を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌の中の一つのタイプである卵巣明細胞癌は、既存の抗癌剤に抵抗性を示す難治性の疾患である。日本における卵巣明細胞癌の発生頻度は、卵巣癌全体の25%を占め、欧米の8%と比べても極めて高く、近年急速に増加している。そのため、卵巣明細胞癌に対する新たな治療法開発のための基礎研究が、特に日本において重要な研究課題である。本研究は、卵巣明細胞癌の発症メカニズムの一端を解析したものであり、このメカニズムの理解は、新たな治療薬、予防薬の開発に繋がる可能性があることから臨床的に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In many human cancers, activation of oncogenes and loss of function of tumor suppressor genes cause tumorigenesis of cells. In clear cell ovarian cancer, the tumor suppressor gene ARID1A is frequently mutated to a defective function. Among the cancer suppression functions of ARID1A, this research was conducted based on the new concepts of cell growth control and cell competition. As a result, it was found that cells deficient in the ARID1A gene proliferate more dominantly than non-deficient cells. Furthermore, we identified changes in gene expression that occur in cells deficient in the ARID1A gene.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：ARID1A

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

無秩序なクロマチン構造が、がんを含む多くの疾患と関連することが知られている。最近のがんゲノム研究における最も刺激的な発見の一つは、エピゲノム状態を制御する因子群の体細胞変異の多さである。なかでも SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体因子群には多くの変異が確認されており、様々ながんにおける変異率は 20%にもおよびことから、腫瘍の発生と重大な関連があることが考えられている。2010年に SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の構成因子である ARID1A 遺伝子が卵巣明細胞腺癌、卵巣類内膜腺癌、子宮類内膜腺癌で高頻度に変異していることが報告された (Science. 330:228-30, 2010., NEJM. 363:1532-43, 2010.)。ARID1A 体細胞変異の大部分は、癌抑制遺伝子の典型的な機能喪失型の変異すなわちフレームシフトやナンセンス変異であり、発現が消失していることが多い。その後の研究では多くのがんにおいても不活性化型変異を起こしていることが報告されてきた。SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体は、正常な発生と分化、遺伝子の活性化や細胞増殖の抑制に重要な役割を持つ。クロマチンリモデリング因子などのエピゲノム修飾因子の変異は、下流の遺伝子発現を一挙に変えることができることから、がん化にとって有利な経路であると同時に有効な治療標的となりうる。しかし、クロマチンタンパク質の高頻度な変異が確認されているものの、我々は未だこれらの真の標的についてほとんど何も知らない。

研究代表者はこれまで H25-26 年度における科研費の助成により ARID1A のがん抑制機構の解析を行ってきた。その成果として、卵巣がん細胞株 (ARID1A 発現株、ARID1A 欠損株) を用いた ARID1A の過剰発現とノックダウンによる実験系から ARID1A は細胞増殖と細胞周期を負に制御しており、ARID1A の発現状態はいくつかの化学療法剤の感受性を変えることを発見した。また、ARID1A は DNA 損傷に応答した細胞周期抑制因子 p21 の転写活性の上昇において p53 と協調的に働くことを明らかにした。さらに ARID1A は、正常細胞では c-Myc の転写を抑制しており、実際に ARID1A をノックダウンすると c-Myc の発現が上昇することを確認した。従って ARID1A は、がん遺伝子 c-Myc の抑制と細胞周期抑制因子 p21 の転写誘導能を介して、細胞増殖と細胞周期の制御に重要な役割をもっていると考えられた。

2. 研究の目的

Myc は転写因子として機能するがん遺伝子産物であるが、細胞あたりの発現量が増えることにより細胞増殖に関わる遺伝子を調節し、多くのがんに関与している。これまで Ras などと並び代表的ながん遺伝子として研究され尽くしたと思われた Myc だが、2012年に2つの研究から新たな見解が示された。これらの報告によると、Myc の主要な役割は、特定の遺伝子と選択的に相互作用するわけではなく、細胞内で発現しているほぼ全ての遺伝子へ移動してポリユームのように作用し、遺伝子発現を増幅させることであるとわかった。つまり、Myc によるがん化は細胞内のほぼ全ての遺伝子発現の増幅による細胞機能の増強であり、このことは「がん抑制遺伝子である ARID1A の欠損によるがん化は、がん遺伝子 Myc の発現上昇を介したメカニズム」である可能性を示唆していた。

一方、Myc は代表的ながん遺伝子として知られているばかりでなく、「細胞競合」と呼ばれる細胞間コミュニケーションを介した細胞の恒常性維持システムに関与している (Nature. 500:39-44, 2013.)。細胞競合とは隣接した細胞間で「適応度が高い細胞」が「適応度の低い細胞」を積極的に排除するという現象である。細胞競合は多細胞生物に保存され、あらゆる生命現象、例えば器官形成や幹細胞ニッチにおける優良細胞の選択、がんの発生やその抑制などに関与すると考えられている。この細胞競合という現象の勝者と敗者を規定している機構の一つに Myc 発現量に関与していることが示された (Cell Metab. 19:470-83, 2014.)。Myc が多い細胞が勝ち、Myc が少ない細胞が負けていたのである。

これらのことから本研究は、ARID1A 欠損細胞がどのように周囲の細胞を排除しながら増殖していくのかを明らかにすることにより、細胞競合という現象に焦点を当てた解析から ARID1A 欠損によるがん化のメカニズムを解明することを目的とする。様々ながんに関わる ARID1A 変異の腫瘍の中でも卵巣明細胞腺癌は特に我が国で近年増加しており、化学療法抵抗性の難治性卵巣癌である。このメカニズムの理解は、正常細胞との相互作用による新しい癌抑制法、治療法の開発に結びつき、変異細胞の出現による変化の同定は新たな診断マーカーに応用できることから臨床的な貢献が期待できる。具体的には、以下の解析から ARID1A による腫瘍抑制メカニズムを解明する。

- (1) ARID1A 欠損細胞を用いた共培養系における細胞増殖解析
- (2) ARID1A 欠損細胞と発現細胞との間で起こる分子変化の解析
- (3) ARID1A 欠損細胞と発現細胞との間で変化する分子の役割

3. 研究の方法

- (1) ARID1A 欠損細胞を用いた共培養系における細胞増殖解析

ARID1A 発現の有無により細胞間で起こる細胞競合現象を介した細胞増殖への影響を解析した。ARID1A を発現している卵巣明細胞癌細胞株を用いてゲノム編集により ARID1A ノックアウト細胞株を作製した。また、ARID1A 発現が欠損している卵巣明細胞癌細胞株を用いてレンチウイルスにより ARID1A 発現細胞を作製した。さらにそれぞれの細胞は別々の蛍光タンパク質 (Venus、tdTomato) を安定発現させた。これらの ARID1A 欠損細胞と発現細胞をそれぞれ単独

あるいは共培養したときの細胞増殖過程を解析した。

(2) ARID1A 欠損細胞と発現細胞との間で起こる分子変化の解析

ARID1A 欠損細胞と発現細胞との間における遺伝子発現の変化を解析した。それぞれの RNA を抽出し、DNA マイクロアレイにより発現変動候補遺伝子群を抽出した。抽出された候補遺伝子はリアルタイム PCR により再現性を確認した。

(3) ARID1A 欠損細胞と発現細胞との接触面で変化する分子の役割

ARID1A 欠損細胞と発現細胞との間で変動した遺伝子の細胞増殖における役割を解析した。同定された発現変動遺伝子のノックダウンや過剰発現を行い、細胞増殖に与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1) ARID1A 欠損細胞を用いた共培養系における細胞増殖解析

ARID1A 遺伝子の有無による細胞増殖の違いを検討するために、ARID1A 遺伝子をノックアウトし、且つ蛍光タンパク質を発現する細胞株を 20 種類作製した。それぞれの細胞株を単独で培養したときの増殖曲線を確認したところ、ARID1A をノックアウトした細胞では細胞増殖が亢進していた。次に、これらの細胞株を共培養したときの細胞増殖過程をタイムラプス顕微鏡にて観察した結果、いくつかの細胞同士の組み合わせにおいて ARID1A を欠いた細胞が ARID1A 発現細胞よりも優位に増殖する様子が観察された。

(2) ARID1A 欠損細胞と発現細胞で起こる分子変化の解析

細胞増殖の制御に関わる ARID1A の標的遺伝子の特定を目的として DNA マイクロアレイ解析を用いて探索し、ARID1A により遺伝子発現が促進または抑制される複数の遺伝子を同定した。

(3) ARID1A 欠損細胞と発現細胞との間で変化する分子の役割

同定された ARID1A 標的遺伝子の細胞増殖への影響を解析した。ARID1A により発現が増加した遺伝子については、ノックダウンを行い、反対に ARID1A により発現が抑制された遺伝子については発現ベクターを構築し過剰発現を行い細胞増殖へ与える影響を解析したところ、いくつかの標的遺伝子については、ARID1A 欠損細胞において細胞増殖を抑制できることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 上川篤志、杉下陽堂、戸澤晃子、鈴木直
卵巣明細胞癌における ARID1A 標的遺伝子の同定
第 71 回日本産科婦人科学会学術講演会
2019 年

(2) 上川篤志、戸澤晃子、鈴木直
ARID1A は DNA ダメージに反応して p53 と協調し p21 の転写を活性化する
第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会
2018 年

(3) 上川篤志、鈴木直
卵巣明細胞腺癌における癌抑制遺伝子 ARID1A の機能解析
第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会
2017 年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。