

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20172

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌のテロメラーゼ逆転写酵素の変異とビタミンA/Dの腫瘍抑制効果

研究課題名(英文) Tumor suppressive effect of vitamin A / D for the mutation of telomerase reverse transcriptase of ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

錦見 恭子(Nishikimi, Kyoko)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00536302

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)：卵巣明細胞腺癌株4種類に、ビタミンAおよびビタミンDの添加による細胞増殖をみたところ、OVISE、OVTOKO、TOV-21Gの細胞株においては細胞増殖抑制効果がみられた。これは、ビタミンAおよびビタミンD受容体が結合してテロメラーゼの転写が抑制され、細胞増殖抑制効果がみられたと考えられた。一方、ES-2の細胞株においては細胞増殖抑制効果がみられなかった。ES-2の細胞株はTERTプロモーター[-129～-154bp]領域に変異のある細胞株であるため、ビタミンA、Dの抑制作用が解除されて、テロメラーゼの転写が亢進すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cell proliferation by addition of vitamin A and vitamin D to ovarian clear cell adenocarcinoma 4 strains showed cytostatic effect in OVISE, OVTOKO and TOV-21G cell lines. It was thought that vitamin A and vitamin D receptor were bound and transcription of telomerase was suppressed, and cell proliferation inhibitory effect was seen. On the other hand, cell proliferation inhibitory effect was not observed in ES-2 cell line. Since ES-2 is a cell line with a mutation in the TERT promoter [-129 to -154 bp] region, it was thought that the inhibition of vitamin A, D was canceled and transcription of telomerase was enhanced. In addition, chromatin immunoprecipitation was performed using the TOV-21 G cell line, which is without TERT promoter mutation, and it was confirmed that the RAR antibody binds to the TERT promoter region. The [-129 to -154 bp] region was shown to have a binding site for the vitamin A receptor.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 TERTプロモーター変異

## 1. 研究開始当初の背景

期の卵巣明細胞癌には予後良好例が多いが、一方で予後不良な症例も存在する。この予後の違いの分子機序は不明であった。

最近、卵巣明細胞癌の一部に、テロメラーゼ逆転写酵素 (telomerase reverse transcriptase:TERT) のプロモーター変異がみられることが報告された (Wu et al. J Pathol 2014)。しかし、発見された変異 (-124bp, -146bp) と予後には関連が認められていない。

申請者らは、新たに I 期卵巣明細胞癌の変異検索を行い、TERT プロモーター [-129 ~ -154bp] 領域に変異を有する例で予後が不良となることを見いだした (図 1)。この領域は、これまでにテロメラーゼの発現を抑制的に制御する領域と推定されていた領域である。この領域は、ビタミン A と D 受容体の結合配列 (RAR/RXR, VDR/RXR) がタンデムに繋がった配列をしている (in silico 解析, 図 2)。正常アリルではビタミン A, D 受容体が結合してテロメラーゼの転写が抑制され、変異アリルではビタミン A, D の抑制作用が解除されて、テロメラーゼの転写が亢進すると予想される。

図 1 TERT プロモーター変異部位と予後

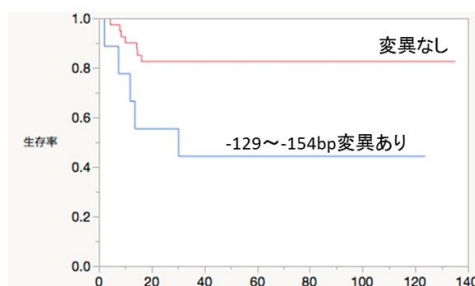
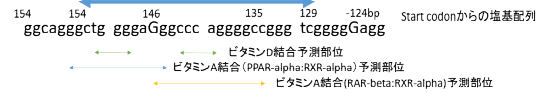


図 2 TERT プロモーターの配列と

ビタミン A・ビタミン D の結合予測部位



ビタミン A は古くから白血病の治療に使用されており、また、ビタミン D は前立腺がんでも臨床試験が行われている。ビタミン A およびビタミン D のテロメラーゼに対する効果は、卵巣明細胞癌以外にも見られる可能性がある。ビタミン剤は、抗がん剤や分子標的薬と作用機序が異なり、薬剤費が安く、副作用も比較的少ない。したがって、ビタミン剤は他の治療薬の新たな補助療法となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

卵巣明細胞癌において、TERT プロモーター [-129 ~ -154bp] 領域の変異の有無によって細胞増殖に違いがあるかを検討する。また、TERT プロモーター [-129 ~ -154bp] 領域にビタミン A あるいは D が結合し、細胞増殖を抑制する効果があるかを検討する。これにより、ビタミン A・D が卵巣明細胞癌の治療に有用である可能性を示す。また TERT 変異株であっても高濃度投与に反応するのであれば、予後不良腺癌に対する新たな補助療法となる。TERT は他の癌腫にも重要であることから、本研究成果は他の癌腫への展開も期待できる。

### 3. 研究の方法

卵巣明細胞腺癌株 4 種類 (ES-2、OVISE、OVTOKO、TOV-21G、図 3) について、生理食塩水、ビタミン A およびビタミン D を添加し、添加後 24 時間後、48 時間後、72 時間後の細胞数をカウントし、増殖の変化を調べた。TERT プロモーター [-129~-154bp] 領域の変異の有無によって細胞増殖に違いがあるかを調べた。

図 3 卵巣明細胞腺癌細胞株パネル

cell line	TERT Promoter Mutation	ARID1A Mutation	PIK3CA Mutation	KRAS Mutation
ES-2	-138C>T;-139C>T	none	none	N/E
RMG1	124G>A	none	none	none
OVISE	none	mutant	none	none
OVTOKO	none	mutant	none	none
TOV21G	none	mutant	c.3139C>T	N/E

さらに、TERT プロモーター [-129~-154bp] 領域の変異のない細胞株を用いて、クロマチン免疫沈降をおこない、ビタミン A が結合するかを調べた。

### 4. 研究成果

卵巣明細胞腺癌株 4 種類 (ES-2、OVISE、OVTOKO、TOV-21G) について、ビタミン A およびビタミン D の添加による細胞増殖をみたところ、OVISE、OVTOKO、TOV-21G の細胞株においては細胞増殖抑制効果がみられた。これは、ビタミン A およびビタミン D 受容体が結合してテロメラーゼの転写が抑制され、細胞増殖抑制効果がみられたと考えられる。一

方、ES-2 の細胞株においては細胞増殖抑制効果がみられなかった。ES-2 の細胞株は TERT プロモーター [-129~-154bp] 領域に変異のある細胞株であるため、ビタミン A、D の抑制作用が解除されて、テロメラーゼの転写が亢進すると考えられた。

次に、TERT プロモーター変異のない TOV-21G 細胞株を用いて、クロマチン免疫沈降をおこなったところ、RAR 抗体が TERT プロモーター領域に結合することが確認された。つまり、[-129~-154bp] 領域にはビタミン A 受容体の結合部位があることが示された。

以上の結果より、TERT プロモーター変異のない卵巣明細胞癌に、ビタミン A は他の治療薬の新たな補助療法となる可能性があることが示唆された。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Uncommon Human Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Mutations Are Associated With Poor Survival in Ovarian Clear Cell Carcinoma.

Nishikimi K, Nakagawa K, Tate S, Matsuoka A, Iwamoto M, Kiyokawa T, Shozu M.

Am J Clin Pathol. 2018 Mar

7;149(4):352-361

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

錦見 恭子 (Nishikimi Kyoko)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00536302