

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11310

研究課題名（和文）ARID1A欠失型卵巣明細胞がんにおける患者モデルの確立-新規治療法有効性の検討

研究課題名（英文）Efficacy of molecular targeting therapy and establishment of patient derived model in ARID1A-deficient ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

加藤 友康（Tomoyasu, Katoh）

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・科長

研究者番号：50224522

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣明細胞がんは卵巣がんのなかでも難治性がんであり、半数の患者ではARID1A遺伝子の異常がみられる。これまでに我々は、ARID1A遺伝子が欠損したがんに有望な治療薬APR-246を同定した。そこで本研究では、卵巣明細胞がん患者由来モデルや患者検体モデルを樹立および確立し、それらを用いることで、卵巣明細胞がんにおけるARID1A欠損がんに対するAPR-246の最適化がん治療薬としての有望性を検討した。本研究では、卵巣明細胞がん検体では、ARID1Aの欠損により、APR-246の奏功マーカーSLC7A11の発現が減弱し、APR-246の投与によって腫瘍増殖抑制を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞がんは、化学療法の効きにくい難治性がんのため新しい治療薬の開発が求められていた。本研究では、ARID1A欠損がんに有望な新規薬剤が卵巣明細胞がんの半数の患者に対して有望であることを示した。APR-246は臨床試験薬であり、今後ARID1A欠損がんへの有効性を検証することで卵巣明細胞がん患者に対する新規薬剤として臨床応用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Ovarian clear cell carcinoma is refractory cancer. Previously, we found the hopeful drug APR-246 for ARID1A-deficient cancers. In this study, we aim to develop the patient-derived models and investigate the promising of APR-246 for ARID1A-deficient cancers. We revealed that ARID1A deficiency caused decrease of SLC7A11 expression and APR-246 treatment suppressed cells and tumors growth in patient-derived models.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣明細胞がん 婦人科腫瘍 卵巣がん ARID1A 精密医療 合成致死 SLC7A11 グルタチオン

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。

1. 研究開始当初の背景

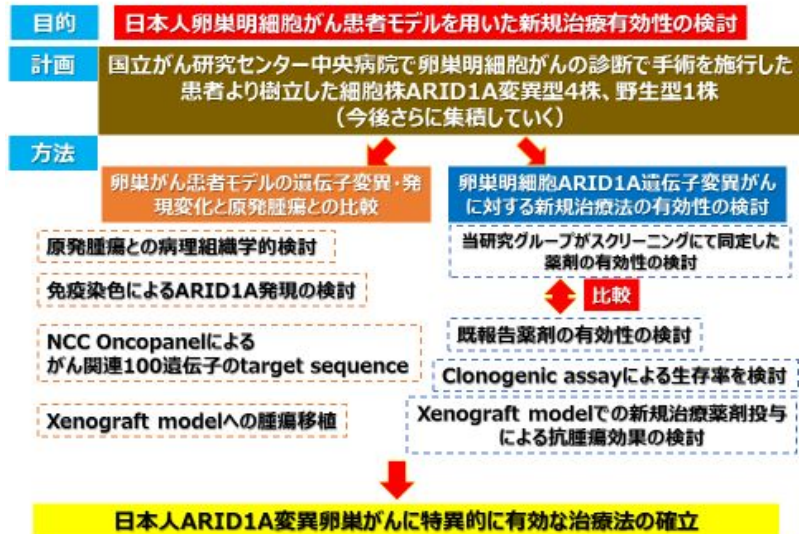
本邦の卵巣がん罹患数は増加傾向にあり、2012年には、9348人と報告されている。卵巣がんによる死亡者数も増加傾向にあり、2014年は4840人であった(国立がん研究センターがん対策情報センターがん情報サービス)。卵巣がんは女性性器悪性腫瘍の中で最も死亡数の多い疾患である。上皮性卵巣

がんの中で卵巣明細胞がんは本邦で、発生頻度が欧米(上皮性卵巣がんの27%(本邦) > 12%(欧米))に比べて多い(Heintz et al. Int J Gynecol Obstet 2006. 日本産婦人科学会婦人科腫瘍委員会報告. 日産婦誌 2014.)。また、卵巣明細胞がんは卵巣がんの標準治療であるパクリタキセル、カルボプラチンによる抗がん剤の感受性が低いという特徴がある(Pectasides D et al. Gynecol Oncol 2006)。そうした中で、近年の次世代シーケンサーを用いたゲノム網羅的解析で SWI/SNF クロマチン制御遺伝子のサブユニットのひとつ *ARID1A* 遺伝子が卵巣明細胞がんの約50%と高頻度に変異を認めていることが明らかとなった(Kimberly et al, N Engl J Med, 2010. Sian Jones et al, Science, 2010)。SWI/SNF 複合体は、転写・DNA複製・DNA修復の調節をするクロマチン制御関連遺伝子であり、その不活性化はがん化の原因となると考えられている。(Garraway LA et al. Cell 2013. Wilson.B.G et al. Nat Rev Cancer.2011.) このように特定の遺伝子を欠損したがんでは「合成致死」に基づいた創薬が期待されている。

特に婦人科領域では、BRCA 遺伝子を欠損した卵巣がんでは、PARP 阻害剤が注目されている(Hannah F et al. Nature 2005)。また、研究段階ではあるが *ARID1A* 変異がんの特異的に有効な治療法の報告もされ始めている。研究分担者らは、世界に先駆けて BRG1 欠損がん(Oike et al, Cancer Research 2013)や CBP 欠損がん(Ogiwara et al, Cancer Discovery 2016)に対する合成致死遺伝子を同定した業績がある。現在、これらの研究を基に国内企業と阻害剤の探索を行っている。更に我々は、*ARID1A* 変異がんの治療標的の探索を目指し解析を行った。*ARID1A* 遺伝子人工ノックアウト細胞と親細胞に対して、標的分子が解明している化合物ライブラリーを用いて網羅的なスクリーニングを行った。その結果、***ARID1A* 遺伝子人工ノックアウト細胞に特異的に有効な阻害剤を同定した。**

一方で、卵巣がんの樹立された細胞株は、遺伝子変異や発現変化の特徴がもとの腫瘍とは異なる場合があることが報告されている(Domcke S, et al, Nat Commun 2013)。病態の理解と治療法の開発にはがん患者の元の腫瘍を反映した細胞株、Xenograft model の作成が重要である。現在報告されている *ARID1A* 変異卵巣がんの特異的に有効だとされている阻害剤や我々の同定した阻害剤が日本人卵巣明細胞がんの治療に有効であるかの検討は今後、臨床応用していく上で重要な情報となる。

研究概要



2. 研究の目的

ARID1A 遺伝子は、SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体を構成する遺伝子のひとつで、卵巣明細胞がんの 50%程度と高頻度に変異を認めている。我々は、ARID1A 変異がんの治療標的の探索を目指し、ARID1A 遺伝子人工ノックアウト細胞と親細胞に対して、標的既知の分子標的薬ライブラリーを用いた網羅的スクリーニングを行った。その結果、ARID1A 遺伝子人工ノックアウト細胞に特異的に有効な化合物を同定した。一方で、卵巣がんの樹立された細胞株は、病理学的、分子生物学的な特徴がもとの腫瘍とは異なる部分が多い(Domcke S, et al, Nat Commun 2013)。そのため、病態の理解と治療法の開発には患者の元の腫瘍を反映した細胞株、PDX の作成が重要である。そこで本研究では、国立がんセンター中央病院婦人腫瘍科で手術を施行された卵巣がん患者由来のモデルを用いて病理組織学的、ターゲットシーケンスによる遺伝子検索を行う。さらに、我々の同定した ARID1A 変異がんの特異的に有効な阻害剤の有効性について検討する。

3. 研究の方法

1. 卵巣明細胞がん患者モデルと原発卵巣がん組織との比較

卵巣明細胞がん患者モデルが原発卵巣がんの病理学的、分子生物学的特長を有しているかを確認する。具体的には以下の通りである。

- ・病理組織学的検討は樹立細胞のセルブロック標本を HE 染色により形態学的に比較する。
- ・がんに関連する 100 遺伝子(*ARID1A* 含む)のターゲットシーケンスを行い体細胞変異、融合遺伝子を比較する。
- ・免疫染色、Western Blot にて *ARID1A* タンパクの発現を比較する。

2. 卵巣明細胞 *ARID1A* 変異がんに対する新規治療法の有効性の検討

- ・卵巣明細胞がん患者由来の細胞を用いて *ARID1A* 変異の有無による阻害剤感受性を Clonogenic survival assay によって調べる。
- ・樹立した細胞を皮下に移植し、腫瘍径、腫瘍重量を *ARID1A* 変異の有無による阻害剤による抗腫瘍効果を明らかにする。

4. 研究成果

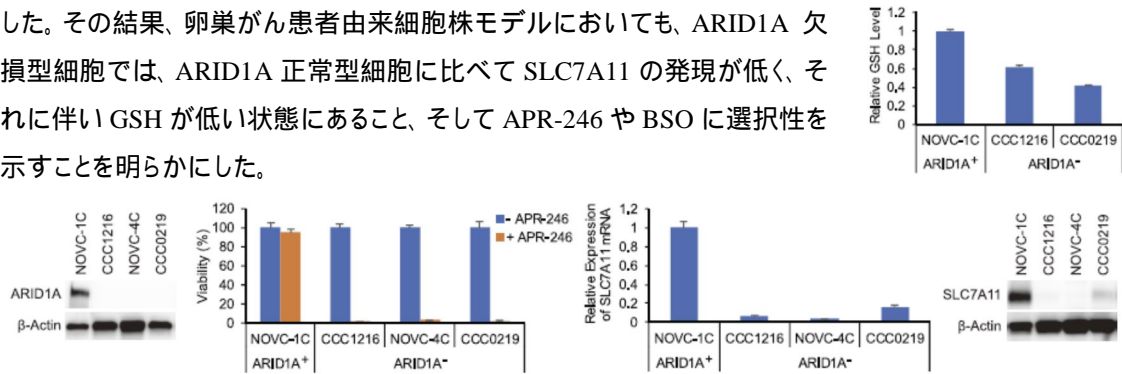
(1) 国立がんセンター中央病院婦人腫瘍科で手術を施行された卵巣がん患者由来の検体を用いて、卵巣がん患者由来細胞株モデルの確立と、その確立された卵巣がん患者由来モデルが元の卵巣がん腫瘍の特徴の比較および遺伝子変異検索を検討した。

卵巣がん患者由来細胞株モデルの確立において、以下の2つの方法で検討した。A: 腹水および腫瘍内容液に含まれる腫瘍細胞を密度勾配遠心し EpCAM 抗体による上皮由来の腫瘍細胞を抽出しプレートに播種する。B: 手術で摘出した腫瘍を細かく裁断しプレートに播種する。培地は、DMEM + F-12 Medium および Conditioning Medium (Liu et al. Am J Pathol 2012. Sato and Clevers, Cell 2015.)の2種を用いた。上記の検討の結果、A: DMEM+F12 では2種、A: Conditioning では3種の安定的に培養できる卵巣がん患者由来細胞株を樹立することができた。

明細胞卵巣がん患者細胞株が元の卵巣がん腫瘍の特徴を比較するために病理組織学的に検討するために、組織免疫染色法により *ARID1A*、*HNF1-* (明細胞卵巣がんのバイオマーカー)、H&E 染色を行った結果、原発巣由来組織と細胞株では同等の形態学的特徴を有することを明らかにした。さらに、がんに関連する 100 遺伝子(*ARID1A* 含む)のターゲットシーケンスを行った結果、5 種中 4 種で *ARID1A* の欠損型変異を有することが明らかとなった。

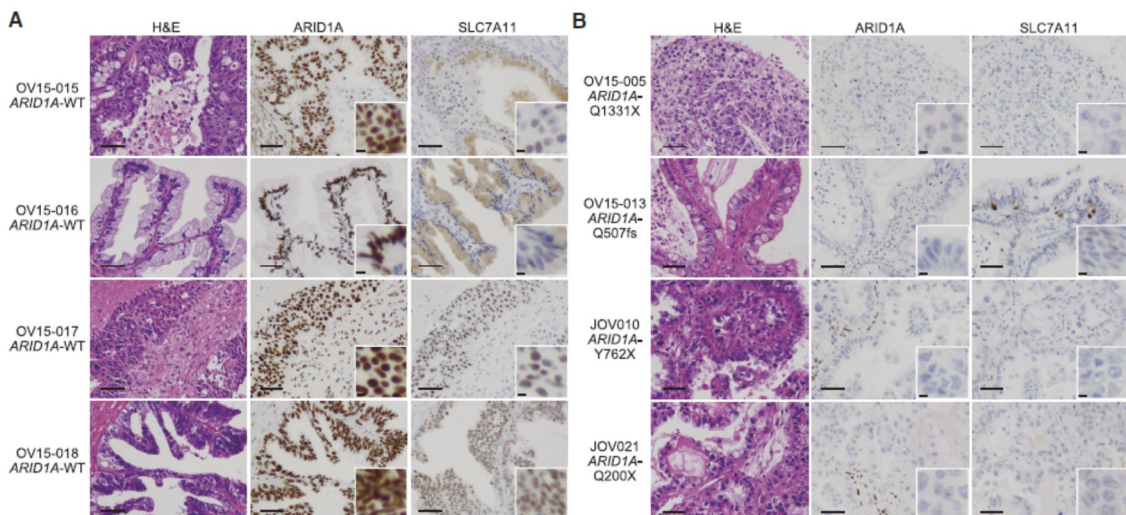
(2) 本研究で構築した卵巣がん患者由来細胞株モデルを用いて、これまでに我々が同定した ARID1A 欠損がん選択的阻害剤の有効性について検討した。

我々はこれまでの研究で、ARID1A 欠損がんの合成致死標的薬としてグルタチオン (GSH) 阻害薬である APR-246 および GSH 合成酵素 GCLC 阻害薬である BSO (Buthionine Sulfoximine) を同定した。さらに、その分子機序として ARID1A 欠損がんでは、GSH 合成を制御する SLC7A11 の発現が減弱することにより、GSH の基底量が低いことが弱点となり、GSH 阻害薬によって合成致死性を示すことを明らかにした。そこで、上記の卵巣がん患者由来細胞株モデルにおいても検討した。その結果、卵巣がん患者由来細胞株モデルにおいても、ARID1A 欠損型細胞では、ARID1A 正常型細胞に比べて SLC7A11 の発現が低く、それに伴い GSH が低い状態にあること、そして APR-246 や BSO に選択性を示すことを明らかにした。



(3) 国立がんセンター中央病院婦人腫瘍科で手術検体から卵巣明細胞がん患者検体について、遺伝子検索を行い、ARID1A 野生型と ARID1A 変異型を特定し、さらに ARID1A タンパク質と SLC7A11 タンパク質の発現を調べた。

ARID1A 野生型では ARID1A と SLC7A11 タンパク質の発現が認められた。一方で、ARID1A 変異型では、ARID1A タンパク質が欠損した検体では SLC7A11 の発現の消失が認められた。しかし、ARID1A 変異型で、ARID1A タンパク質が認められる検体では SLC7A11 の発現も認められた。これらのことから、ARID1A 変異型でも homozygous 変異の欠損型変異によって ARID1A タンパク質の発現が欠損することで機能が喪失し、SLC7A11 の発現も減弱することが考えられた。



(4) 卵巣明細胞がん細胞株モデルにおいて、APR-246 および PARP 阻害薬等の既存候補薬について ARID1A 欠損がんに対する選択性を調べた。

既存の候補薬は必ずしも ARID1A 欠損がんを選択性を示さなかったが、APR-246 は ARID1A 欠損がんを選択性を示した。よって、ARID1A 欠損がんに対して GSH 阻害薬は有望であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogiwara H, Takahashi K, Sasaki M, Kuroda T, Yoshida H, Watanabe R, Maruyama A, Makinoshima H, Chiwaki F, Sasaki H, Kato T, Okamoto A, Kohno T.	4. 巻 35
2. 論文標題 Targeting the Vulnerability of Glutathione Metabolism in ARID1A-Deficient Cancers.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Cell	6. 最初と最後の頁 177-190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.ccell.2018.12.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hideaki Ogiwara, Mariko Sasaki, Kazuaki Takahashi, Takafumi Kuroda, Takashi Kohno
2. 発表標題 SWI/SNFクロマチンリモデリング欠損がんにおける合成致死標的の探索
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荻原秀明、佐々木麻里子、河野隆志
2. 発表標題 クロマチンリモデリング複合体欠損がんにおける合成致死治療法の開発
3. 学会等名 2018年第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuaki Takahashi, Hideaki Ogiwara, Mariko Sasaki, Takafumi Kuroda, Reiko Watanabe, Hiroshi Yoshida, Tomoyasu Kato, Aikou Okamoto and Takashi Kohno
2. 発表標題 Identification of Synthetic Lethal Targets in ARID1A-Deficient Ovarian Cancers
3. 学会等名 IGCS 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

代謝（メタボローム）を標的とした新たながん治療法を発見
https://www.ncc.go.jp/jp/information/pr_release/2019/20190125/index.html
最適化がん治療の研究
https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/genome_biology/project/020/20190125.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	荻原 秀明 (Ogiwara Hideaki) (40568953)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長 (82606)	