

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16861

研究課題名（和文）漿液性卵巣がんの早期再発バイオマーカーとなるDNAメチル化遺伝子の同定

研究課題名（英文）ZNF671 DNA Methylation as a Molecular Predictor for the Early Recurrence of Serous Ovarian Cancer

研究代表者

間瀬 聖子（MASE, SHOKO）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：30793608

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣がんは高率に再発し中でも早期再発は非常に予後不良である。我々は高異型度漿液性卵巣がんの早期再発バイオマーカーとなるDNAメチル化遺伝子として、公共データベースを用いて解析を行いZNF671を同定した。計78例の自施設症例の卵巣がん検体でZNF671のDNAメチル化を測定したところ早期再発群で優位に高メチルであった。早期再発の予測に対するZNF671のメチル化の感度は82%であった。卵巣がん細胞株におけるZNF671ノックダウン実験では、細胞増殖能、浸潤能、遊走能が有意に増加することを見いだした。特に浸潤能および遊走能への影響は大きく、再発に関与する遺伝子として機能していることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで卵巣癌患者のうちどのような患者が早期再発をきたすか不明であったが、本研究によりZNF671遺伝子のDNAメチル化のプロファイルが異なることが分かった。再発にかかわる遺伝子の特性が今後さらに判明することにより、再発治療や個別化医療への発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Despite the use of surgery and platinum-based chemotherapy, many patients with serous ovarian cancer (SOC) suffer from recurrence. To identify an effective biomarker for early recurrence, we analyzed the genome-wide DNA methylation status characteristic of early recurrence. The patients in TCGA dataset who showed a complete response after the first therapy were categorized into 2 groups: early recurrence SOC and late recurrence SOC. Among the 12 differently methylated probes identified between the 2 groups, we found that ZNF671 was the most significantly methylated gene in the early recurrence group. A validation cohort of 78 serous ovarian cancers showed that patients with ZNF671 DNA methylation had a worse prognosis. The multivariate analysis revealed that the methylation status of ZNF671 was an independent factor for predicting the recurrence. Our data indicate that the DNA methylation status of ZNF671 might be an effective biomarker for the recurrence of SOCs

研究分野：産婦人科

キーワード：ZNF671 卵巣癌 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは婦人科腫瘍の中で最も予後が悪い疾患である。その主な理由は約 6 割が期以上で発見され早期診断が難しいこと、初回化学療法が奏功するも高率に再発することである。中でも早期再発の症例は特に予後不良で、病態解明や新規治療の開発が急がれている。卵巣がんの再発を予測する有効なマーカーは未だなく、再発高リスク患者と低リスク患者を予測する因子を見出すことによって、早期の追加治療の開始、フォローアップの方法の変更、病態解明につながる可能性がある。

卵巣がんの中で漿液性腺がんは最も多い組織型である。2011 年に The Cancer Genome Atlas (TCGA) により High-grade 漿液性卵巣がんの網羅的ゲノム解析が報告されたが、有意なドライバー遺伝子変異は見つからなかった。ゲノム異常以外にエピゲノムの異常によって遺伝子発現が変化するが、その中でもプロモーター領域の DNA メチル化は遺伝子発現を低下させる。DNA メチル化は、安定した修飾であること、がん特異的な DNA メチル化変化があること、高感度なアッセイ法が確立されていることから、がんの病態診断マーカーに適している。これらのことから、DNA メチル化は漿液性卵巣がんの早期再発という重要な問題の予測マーカーになると考えられる。

2. 研究の目的

漿液性卵巣がんの早期再発患者の予後は非常に不良であり、有効な予測マーカーの確立や病態解明が急がれている。われわれはこれまで、公共データベースの解析を行い、早期再発卵巣がんに特異的な DNA メチル化遺伝子を 11 個 (12 プローブ) 同定した。これらは早期再発の有効な予測マーカーになると考えられる。さらにこの 11 個のうち、ZNF671 は早期再発群と晩期再発群での DNA メチル化レベルの差が最も大きく、唯一 DNA メチル化による発現低下が報告されている遺伝子であった。これらの結果から、ZNF671 は漿液性卵巣がんの早期再発において非常に重要な機能を持つ可能性がある。本研究では、漿液性卵巣がんの早期再発の病態解明を目指し、卵巣がん細胞株を用いた ZNF671 の機能の解析と、多数の患者検体を用いた再発予測マーカーの確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 漿液性卵巣がん検体での DNA メチル化解析

これまでの研究で同定した、漿液性卵巣がん早期再発 (12 ヶ月以内の再発) の予測マーカーの候補遺伝子である ZNF671 の DNA メチル化解析を行った。名古屋市立大学病院および共同研究機関である台湾の国立 Chung Cheng 大学の検体から DNA を抽出したのち、pyrosequence 法を用いて DNA メチル化解析を行った。解析した DNA メチル化レベルと、診療録から抽出した臨床背景 (年齢、ステージ、残存腫瘍、生存期間など) の相関を解析し、これらの遺伝子のメチル化が早期再発予測マーカーとなる妥当性について検討した。

(2) ZNF671 の機能解析

ZNF671 は膀胱がんにおいてがん抑制遺伝子として報告されており、卵巣がんでもがん抑制遺伝子の機能を有すると予測できる。本研究では漿液性卵巣がん細胞株(JHOS-2、JHOS-4、OVCAR3、SKOV3)において、siRNA を用いたノックダウンを行い、それぞれの系の細胞増殖に対する効果を MTT アッセイで解析した。また、基底膜モデルキットを用いて、細胞浸潤アッセイおよび遊走アッセイを行った。

4 . 研究成果

(1) 漿液性卵巣がん検体での DNA メチル化解析

TCGA データベースで漿液性卵巣癌の ZNF671 のメチル化をみると早期再発群は他群（晚期再発群、無再発群）に比べ高メチル化であり、高メチル化群は有意に全生存期間が短いことが分かった。次いで ZNF671 のメチル化で早期再発を予測することが他のコホートでも可能か検討するため、自施設での 78 例の漿液性卵巣癌検体で ZNF671 の DNA メチル化レベルを測定した。正常とがんとのカットオフ値である DNA メチル化レベル 12%を基準とし、陽性・陰性を判定した。自施設検体においても早期再発群は他群より ZNF671 のメチル化が有意に高いことが分かった。また、早期再発の予測に対する ZNF671 のメチル化の感度は 82%であった。ZNF671 のメチル化陽性症例は再発までの期間および全生存期間は有意に不良であった。そして再発に関わる因子として、病期、残存腫瘍、ZNF671 メチル化を多変量解析したところ、ZNF671 の DNA メチル化は TCGA 群でも自施設群でも再発に関わる単独因子であることが分かった。

(2) ZNF671 の機能解析

ZNF671 の機能について解析するため、卵巣がん細胞株を用いて増殖および浸潤・遊走能を解析した。まず 4 種の卵巣がん細胞株を用いて ZNF671 の DNA メチル化と発現レベルを解析すると、逆相関の関係となっており、脱メチル化剤の使用でメチル化が低下し発現が上昇することから、DNA メチル化により発現が抑制されていることが分かった。そして siRNA を用いて ZNF671 の発現を抑制すると、増殖および浸潤・遊走能が有意に増加した。これらのことから、卵巣がんでは ZNF671 の DNA メチル化によってその発現が抑制され、がんの増殖・浸潤・遊走を促進していることが示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shoko Mase	4. 巻 3
2. 論文標題 ZNF671 DNA methylation as a molecular predictor for the early recurrence of serous ovarian cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1105-1116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13936	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 間瀬 聖子
2. 発表標題 Inactivation of ZNF671 by DNA methylation is closely associated with early recurrence of serous ovarian cancer
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shoko Mase
2. 発表標題 Inactivation of ZNF671 by DNA methylation is closely associated with early recurrence of serous ovarian cancer
3. 学会等名 12th asian epigenomics meeting 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----