

令和 4 年 9 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15092

研究課題名（和文）ALK関連卵巣癌の同定、その生物学的特性の解明、そして新規治療戦略への展開

研究課題名（英文）Identification of ALK-related ovarian cancer

研究代表者

井上 久子（Inoue, Hisako）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：20813504

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣漿液癌（HGSC）において未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）発現は、他の卵巣癌に比べてHGSCで有意に高く、予後不良因子であった。ALK過剰発現するHGSC細胞株は、細胞増殖の増加、癌幹細胞の特徴の増強、細胞移動の加速を示した。また、神経系関連遺伝子、ELAVL3（一般にHuC）、Sox2およびSox3の発現が増加した。Sox2またはSox3の過剰発現は、ALKとELAVL3の両方のプロモーター活性を増強した。更に、ALKの過剰発現は神経内分泌マーカーの発現を誘導した。以上から、ALKの過剰発現が、神経内分泌因子と協力して、HGSCの攻撃的な表現型特性の確立と維持につながることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌を「ALK遺伝子関連情報伝達異常」という観点からその生物学的特性、特にEMT/癌幹細胞化機構との関連性を分子病理学的に解析し、ALK関連卵巣癌という新たなカテゴリーを提唱する。卵巣癌のALK発現と臨床病理学的因子との関連性から新たな予後予測システムを構築する。ALK阻害剤などの分子標的薬や小化学化合物によるALK陽性卵巣癌の新規治療法開発の基盤を築く。

研究成果の概要（英文）：ALK immunoreactivity was significantly higher in high-grade serous carcinoma(HGSC) and was significantly associated with several unfavorable clinicopathological factors. HGSC cell lines stably overexpressing ALK exhibited increased cell proliferation, enhanced cancer stem cell features, and accelerated cell mobility, whereas these phenotypes were abrogated in ALK-knockdown (KD) cells. Expression of ELAVL3(HuC), as well as Sox2 and Sox3, were significantly increased in cells overexpressing ALK. Overexpression of Sox2 or Sox3 also enhanced both ALK and ELAVL3 promoter activities. Finally, ALK overexpression was due to increased expression of neuroendocrine markers including synaptophysin, CD56, and BCL2 in HGSC tissues. These findings suggest that overexpression of full-length ALK may influence the biological behavior of HGSC through cooperation with ELAVL3 and Sox factors, leading to establishment and maintenance of the aggressive phenotypic characteristics of HGSC.

研究分野：分子病理学

キーワード：ALK 卵巣がん 神経内分泌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、すべての婦人科悪性腫瘍の中で最も死亡率が高い。また、卵巣癌の症例の19%のみが限局性の段階で診断され、74%の癌が腹腔内に広がった後に発見される。進行期の患者の約80%は手術後に残存病変があり、初回治療として、プラチナベースの併用化学療法を受けたが、治療に対する腫瘍の抵抗性は再発のリスクを高めるため、高い死亡率をもたらす。高悪性漿液性癌(HGSC)は、臨床的に最も頻度の高い組織型と診断されたサブタイプであり、卵巣癌での死亡数の70~80%を占めている。したがって、HGSCの腫瘍形成に重要な役割を果たすドライバー遺伝子を特定することが、今後の卵巣癌治療にとって不可欠である。

ALK(*anaplastic lymphoma kinase*) 遺伝子は、大きな細胞外ドメイン、脂溶性の膜貫通セグメント、および細胞質チロシンキナーゼドメインを有し、受容体型チロシンキナーゼ(RTK)のインスリン受容体(IR)スーパーファミリーに属する。全長型ALKは、胚発生時に発達中の中枢神経系および末梢神経系で特異的に発現し、そのシグナル伝達は細胞の増殖と分化のバランスを調節するとされている。最近、いくつかの原発性固形腫瘍で全長型ALKの過剰発現、およびリンパ腫と肺癌のサブセットで観察された染色体再配列によって生成されるALK融合遺伝子が確認された。我々は、全長型ALKの過剰発現は、子宮癌肉腫の癌成分から肉腫分化が起こる際の、初期シグナル伝達に関与していることを報告した。また、この研究過程で癌成分におけるALK陽性癌の多くは漿液性癌であることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、漿液性癌の多い卵巣癌にも全長型ALKが過剰発現していると仮定し、その実証に着手した。その結果、他の組織型の卵巣癌と比較して、HGSCで全長型ALKの有意な過剰発現を示した。

そこで、HGSC細胞株を用いてALKの過剰発現またはノックダウン(KD)を作製し、細胞増殖、遊走、および癌幹細胞(CSC)化を解明し、さらに、次世代シーケンシング(NGS)アッセイを用いて、ALKの過剰発現に関連する分子を特定し、ALKの過剰発現、腫瘍の表現型の特徴、およびHGSCの予後的意義を元に、発現に差がみられた分子間の関連を調べた。

3. 研究の方法

3-1. 臨床例

2000年から2019年の間に北里大学病院で外科的に切除された合計135例の卵巣癌は、2014年のWHO分類の基準に従って診断された患者の臨床病理学的データから選択した。腫瘍症例は、92例のHGSC、8例の低悪性度卵巣漿液性癌(LGSC)、10例のCCC、10例の卵巣類内膜癌(EMC)、および15例の卵巣粘液性癌(MC)で構成している。16例は外科的治療の前にパクリタキセル/カルボプラチンベースの化学療法を受けていたが、ほとんどの患者は外科的切除後に化学療法によって治療されていた。79例は腫瘍の完全切除を示し、23例は腫瘍減量手術後に腫瘍が残存している。使用した135例の組織はホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)病理組織ブロックを用いた。

さらに、卵巣癌組織47例(21例のHGSC、2例のLGSC、9例のCCC、9例のEMC、および6例のMC)の新鮮凍結材料はRT-PCRに使用した。本研究は、北里大学医学部・病院倫理委員会(B18-048)によって承諾された。

3-2. 免疫組織化学(IHC)

IHCは、電子レンジ加熱とポリマー免疫複合体(Envision、Dako)法の組み合わせを使用して行った。ALKの免疫組織化学的検出には、ALK iAEPキット(Nichirei Biosciences、Tokyo、Japan)を使用した。免疫染色のスコアリングは、IHC scoreを用いて評価を行った。染色強度を0~3の4段階、染色範囲を0~4の5段階に分け、その2つの値の乗算をスコア化させた。

3-3. プラスミドと細胞株

2321~+77 bpを含むヒト*ELAVL3*プロモーターをPCR法によって増幅し、pGL-3Bベクターにサブクローニングした。pGL3B(-2056/+30)ALK、pcDNA3.1-全長型ALK、pcDNA3.1-Sox2、pcDNA3.1-Sox3、pcDNA3.1-Sox4、pcDNA-Sox5、pcDNA3.1-Sox6、pcDNA3.1-Sox7、pcDNA3.1-Sox9、pcDNA3.1-Sox11、pcDNA3.1-Sox17、pCMV-p53野生型(p53wt)、p53変異型(R248Q)(p53mt)、およびpSIREN-RetroQ-short hairpin(sh)ALKは以前報告した。

3つのHGSC細胞株、OVSAHO、OVKATE、OVCAR-3、および5つの卵巣明細胞癌(CCC)細胞株、OVISE、ES-2、OVTOKO、KOC7C、TOV-21Gを使用した。全長型ALK発現プラス

ミドを OVCAR-3 細胞に導入し、安定した過剰発現クローン (CA-ALK) を確立した。ALK ノックダウン (AKL-KD) は、OVSAHO 細胞と *ALK* 遺伝子を標的とする shRNA を使用して生成した (SA-shALK)。

3-4. 抗体と試薬

抗 ALK、抗リン酸化(p)ALK(Try1604)、抗 pRb(serine807/811)、抗 CD56、抗 Synaptophysin、および抗 vimentin 抗体は、Cell Signaling (Danvers, MA, USA) から入手した。抗 Sox4、抗 Sox5、抗 Sox6、抗 Sox7、抗 Sox9、抗 Sox11、抗 ZEB1、抗 β -actin 抗体は、Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA) から入手した。抗 CD44v6、抗 Twist1、抗 Snail、抗 Sox2 抗体は、Abcam(Cambridge, MA, USA) から入手した。抗 Rb、抗 p27^{kip1}、抗 aldehyde dehydrogenase (ALDH)1 抗体は、BD Biosciences(San Jose, CA, USA) から入手した。抗 Ki-67、抗 p21waf1、抗 cyclin D1、抗 p53、抗 CD44s 抗体は、Dako (Glostrup, Denmark) から入手した。Anti-Sox3、anti-Sox17 は、R & D Systems (Minneapolis, MN, USA) から入手した。抗 cyclin A2、抗 CD133、抗 HuC 抗体は、それぞれ Novocastra(Newcastle, UK)、Miltenyi Biotechnology(Bergish Gladbach, Germany)、Proteintech (Rosemont, IL, USA)、シスプラチン(CDDP ; P4394)は Sigma-Aldrich Chemicals から入手した。

3-5. トランスフェクション

トランスフェクションは、LipofectAMINE PLUS (Invitrogen) を使用した。

3-6. 逆転写 (RT) -PCR

cDNA は 2 μ g の Total RNA し、*ELAVL3*、*ALK*、9 つの *Sox* 因子、および *GAPDH* 遺伝子の mRNA を検索した。定量解析のために Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems、Foster City, CA, USA) を使用してリアルタイム RT-PCR を行った。蛍光シグナルは、ABI 7500 リアルタイム PCR システム SDS ソフトウェア (Applied Biosystems) を使用して検出した。

3-7. ウェスタンブロット法

タンパク質は、RIPA バッファー [20mM Tris-HCl (pH7.2)、1% Nonidet p-40、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム] を使用して単離した。核画分は、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit (Pierce Biotech, Rockford, IL, USA) を使用して調製した。

3-8. フローサイトメトリーおよび Aldefluor assay

70% アルコールを使用して細胞を固定し、細胞周期解析のためにヨウ化プロピジウム (Sigma) で染色した。生存細胞における ALDH1 酵素活性は、抗体染色が不要である Aldefluor (Stem Cell Technologies、Grenoble, France) を製造元のプロトコールに従って使用し、検出した。調製した細胞は、BD FACS Calibur (BD Biosciences) および CellQuest Pro software version 3.3 (BD Biosciences) を使用したフローサイトメトリーで解析した。

3-9. Cell Counting Kit-8 assay

CDDP 処理後の生存細胞数の定量化は、Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Lab, Kumamoto, Japan) の製造元のプロトコールに従って使用した。

3-10. Wound healing assay

細胞を 24well の組織培養プレートに播種し、ほぼ完全にコンフルエントになるまで増殖させた。細胞単層が形成された後、無菌の 200 μ l 用ピペットチップの先端を用いて傷をつけて溝を作った。創傷の領域は、ImageJ ソフトウェアバージョン 1.41 (NIH) を使用し、0 時間での領域の値を 100 に設定して算出した。

3-11. 次世代シーケンシング (NGS) アッセイ

NucleoSpin RNA システム (Takara) を使用して、CA-ALK および CA-mock 細胞から Total RNA を抽出した。RNA の濃度と品質は、Quantus Fluorometer (Promega) と Agilent 2100 Bioanalyzer でそれぞれ検証した。すべてのサンプルで 9 を超える RIN 値を示した。Total RNA (500 ng) は、Quant Seq 3' mRNA-seq library preparation kit (FWD) (Lexogen, Vienna, Austria) のプロトコールに従って、RNA ライブラリー調製に使用した。ライブラリーは 12 サイクル PCR で増幅した。

ライブラリーシーケンス (シングルエンド 75bp 読み取りによる) 解析は、NextSeq500 system

(Illumina, San Diego, USA) で実行した。すべてのデータ解析は、Strand NGS (v3.2, Agilent Technologies) を使用した。アダプター配列をリード (生データ) から除去し、各リードの 3' 末端からベストリミングによって、Q10 未満のクオリティで最小長 25bp までの塩基を削除した。各リードは、デフォルト設定でヒトリファレンスゲノム hg38 にマッピングした。転写産物の発現パターンは、デフォルト設定を使用して DESeq を正規化した後に比較した。

3-12. FISH 法 (Florescence in situ hybridization)

ALK (2p23) 遺伝子座の解析には、Vysis ALK Break Apart FISH プローブキット (Abbott Molecular, Abbott Park, IL, USA) を使用して、ALK 強陽性の 4 つの HGSC 症例を製造元のプロトコールに従って Dual color-FISH を行った。

3-13. ALK および TP53 遺伝子の変異解析

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を製造元のプロトコールに従って使用し、FFPE の切片からゲノム DNA を抽出した。ALK 遺伝子のエクソン 20、23、24、および 25 と TP53 遺伝子のエクソン 5、6、7、8、および 9 の変異解析は、以前に報告したように解析した。

3-14. 統計

比較データは、Mann-Whitney *U* 検定を使用して解析した。全生存期間 (OS) は、手術日から死亡または最後に確認された日付までの期間で計算した。PFS は手術日から再発、疾患の進行、または最後に確認された日付までの期間で計算した。OS と PFS は Kaplan-Meier 法を使用して検定し、統計的比較は Log-rank 検定を使用して行った。また、Cox 比例ハザードモデルを使用して、単変量および多変量解析を実行した。統計的有意性のカットオフは、 $p < 0.05$ に設定した。

4. 研究成果

4-1. ALK の過剰発現は、HGSC の予後不良と関連する

LGSC、MC、CCC、および EMC の弱い細胞膜発現とは対照的に、HGSC では主に細胞質に強い ALK 発現を観察した。平均 ALK score、および陽性例は、他の組織学的表現型と比較して HGSC で有意に高かった。ALK mRNA 発現においても、非 HGSC と比較して HGSC で有意に高く、ALK score と正の相関関連を示した。

FISH 法では、ALK 発現が強い 4 症例の HGSC で、ALK 遺伝子座の再配列または増幅はみられなかった。さらに、OVCAR-3 または OVSAHO 細胞のイントロン 20 および 25 の点突然変異を除き、3 つの HGSC 細胞株 (OVCAR-3、OVSAHO、OVKATE 細胞) のいずれも、ALK 遺伝子のエクソン 20、23、24、25 に突然変異はみられなかった。

HGSC の症例では、ALK score は悪性度の高い臨床病理学的因子と有意に関連を示した (表 1)。この Kaplan-Meier 曲線から、ALK score が高い患者は、ALK score が低い患者と比較して OS と PFS が低いことを示した。単変量解析 (Cox 比例ハザードモデル) は、ALK score、FIGO stage、リンパ節転移、T 因子、遠隔転移、腹膜播種、および、ネオアジュバンド療法が OS および PFS の重要な予後因子であることを示した。また、多変量解析 (Cox 比例ハザードモデル) では、リンパ節転移、FIGO stage、およびネオアジュバンド療法を示したが、ALK score は示さず、独立した予後因子であった。

これらの結果は、染色体再配列および遺伝子変化を伴わない ALK 過剰発現が、浸潤的な特性を有する HGSC で頻繁に観察されたことを示した。

4-2. ALK の過剰発現は、HGSC 細胞における細胞増殖の増加、CSC 化の促進、および細胞移動の加速に関連する。

p53mt は、3 つの HGSC 細胞株 (OVCAR-3、OVSAHO、OVKATE 細胞) において、5 つの CCC 細胞株での発現の欠如とは対照的に、全長型 ALK mRNA およびタンパク質の発現を示した。

HGSC における ALK の機能的役割を調べるために、まず全長型 ALK を安定して過剰発現する 2 つの独立した OVCAR-3 細胞株クローン (CA-ALK # 21、# 28) と、ALK 発現が ALK 特異的 shRNA によってブロックされた 2 つの独立した OVSAHO 細胞株クローン (SA-shALK # 1、# 11) を作製した。

CA-ALK 細胞は、CA-mock 細胞と比較して、弱い恒常性 pALK と p53mt 発現の増加を示したが、SA-shALK 細胞は、p53mt の発現に変化がなく、ALK と pALK の発現の減少を示した。

ALK プロモーター活性は p53wt によって抑制されたが、p53mt 効果は消失した (Sap 図 2D)。

ただし、HGSCにおいて、免疫染色では ALK score は p53 score および *TP53* 遺伝子の両方に相関はみられなかったが、*TP53* 遺伝子の変異は p53 score が高いまたは存在しない(p53 score;0、6-12) 92 例のうち 69 例 (75%) で観察された。

ALK が細胞増殖に影響を与えるか調べるために、2 つの独立した CA-ALK または SA-shALK 細胞をそれぞれ 6cm dish、 1×10^5 cell で播種した。CA-ALK 細胞は、CA-mock 細胞と比較して Rb および cyclin D1 の発現が増加するとともに、特に 6~9 日目にかけて高い増殖率を示す傾向を示したが (図 2A)、SA-shALK 細胞ではよりゆっくりと増殖する傾向があり、Rb は減少し、pRb と cyclin D1 の発現が増加した (図 2B)。対照的に、CDDP 処理に反応したアポトーシスに対する感受性は、両方の細胞株で影響を示さなかった。

次に、ALK 発現は、上皮間葉転換 (EMT; epithelial-mesenchymal transition) の誘導を通じて、CSC 化を促進するため、ALK 発現と HGSC における CSC の特性との関連を調べた。CA-ALK 細胞は、CA-mock 細胞と比較した場合、CD133、CD44、Sox2、Snail などの CSC および EMT マーカーの発現が増加した。Aldefluor assay では、CA-ALK 細胞に ALDH1 high の有意な集団が見られ、直径が $50 \mu\text{m}$ を超える丸いスフェロイドの数が大幅に増加した (図 2C) が、SA-shALK 細胞ではそのような集団は観察されなかった。

ALK 発現が細胞の運動能の変化にも寄与するかどうかをさらに検証するために、Wound healing assay を行った。CA-ALK 細胞は傷のある領域をより迅速に補充したが、SA-shALK 細胞は SA-mock 細胞と比較して傷のある領域の補充に変化を示さなかった。

これらの結果は、ALK の過剰発現が HGSC 細胞の細胞増殖の増加、CSC 化の促進、および移動能の加速を引き起こすことを示唆した。

4-3. HGSC において、*ELAVL3* (HuC) の発現は ALK および Sox 因子によって誘導される

ALK の過剰発現後に特異的に発現する遺伝子を同定するために、CA-ALK 細胞から抽出した Total RNA を使用して NGS 解析を行った。CA-ALK #21 および CA-ALK #28 細胞の合計 2322 および 2294 遺伝子は、それぞれ遺伝子で調節に異常がみられた。これらのうち、140 および 263 の遺伝子は、CA-mock 細胞と比較して、5 倍以上発現亢進または発現抑制された。図 5A に示すように、クラスター分析により、遺伝子は 14 のグループに分類できることを明らかにし、グループ XII で約 50 倍過剰発現した *ELAVL3* (HuC) 遺伝子に焦点を当てた。*ELAVL3* mRNA および HuC の発現は、CA-ALK 細胞では有意に増加したが、SA-shALK 細胞では増減はみられなかった。さらに、HGSC 組織における ALK と *ELAVL3* mRNA の発現の間には有意な正の相関関係があった。

ELAVL3 または ALK の発現が HGSC 細胞の Sox 因子の影響を受けるかどうかを検索した。これらの検索は、一部の Sox 因子が神経幹細胞の誘導因子として作用し [29、30]、*ELAVL3* または ALK が神経系への分化と維持に関与していることに基づいた [17、31、32]。Sox2、Sox3、Sox7、および Sox17 の発現は、mRNA の発現とは無関係に、CA-ALK 細胞では増加したが、SA-shALK 細胞では増減を認めなかった。一方で、ALK および *ELAVL3* のプロモーター活性は、Sox2、Sox3、Sox7、および Sox17 によって大幅に増加した。

これらの結果は、ALK の過剰発現が、いくつかの Sox 因子と連携し、*ELAVL3* (HuC) 発現の転写活性の亢進に寄与することを示唆した。

4-4. ALK の過剰発現は、HGSC の神経内分泌分化に関連する

ALK の発現と HGSC の神経内分泌 (NE) の特性との関連を検索するために、さらに bcl-2、Synaptophysin、CD56 を含む 3 つの NE マーカーを選択した。Synaptophysin の発現は CA-ALK 細胞で増加したが、CD56 の発現は SA-shALK 細胞で減少した。高 ALK score と低 ALK score のカテゴリで分けたとき、bcl-2、Synaptophysin、CD56 の平均 score は、それぞれ ALK の発現に相関し、高 ALK score カテゴリで有意に発現が高かった。さらに、CD56 score では認めなかったが、bcl-2 score および Synaptophysin score は、HGSC のリンパ節転移と有意に関連した。しかし、3 つのマーカーは OS および PFS の予後に影響を与えなかった。

4-5.

我々の結果は、HGSC における ALK 関連シグナルカスケードの新しい機能的役割を示唆した。ALK / SoxB シグナルループの活性化は、*ELAVL3* (HuC) 発現の発現亢進と CSC 化の促進の両方を通じて神経内分泌分化の促進に寄与し、HGSC における高い細胞増殖活性と移動能を持つ腫瘍への分化と維持をもたらすことを明らかにした。

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 Matsumoto T, Inoue H, et al	4. 巻 191
2. 論文標題 Anaplastic lymphoma kinase (ALK) overexpression is associated with aggressive phenotypic characteristics of ovarian high-grade serous carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Pathol	6. 最初と最後の頁 1837-1850
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2021.06.009.	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 0件）

1. 発表者名 小田祐介、松本俊英、三枝 信
2. 発表標題 卵巣癌におけるALK陽性癌の同定とその生物学的特性の解明
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小田祐介、井上久子
2. 発表標題 卵巣漿液癌では全長型ALK発現が予後不良因子になる
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------