

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03795

研究課題名(和文) 婦人科がん薬物療法後のがんゲノム・RNA解析による薬剤耐性の解明

研究課題名(英文) Comprehensive genomic and transcriptome analyses to clarify molecular mechanisms contributing to chemoresistance in gynecologic cancer

研究代表者

八重樫 伸生 (YAEGASHI, Nobuo)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00241597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)： 抗がん剤治療前後の卵巣がん組織或いは治療抵抗性卵巣がん組織における遺伝子変異を解析することにより卵巣がんの抗がん剤抵抗性に関与する可能性がある遺伝子異常について探索を行った。その結果KEAP1遺伝子の異常が卵巣がんの抗がん剤抵抗性をもたらしている可能性があることを見出した。現在卵巣がん組織中のKEAP1とその関連タンパク質であるNRF2の関係について追加研究を行っている。また卵巣がん及び子宮体がん患者血液中にある約600の代謝物を測定し、それぞれのがん特有の代謝産物の特徴を同定した。特にアミノ酸の1つであるトリプトファン代謝が亢進している卵巣がん症例では治療抵抗性を示すことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行再発卵巣がんでは白金製剤を中心とした抗がん剤治療が重要であり抗がん剤への耐性出現は治療における障壁となる。近年がんの遺伝子異常に応じた新しい治療が展開されているが卵巣がんの治療抵抗性にかかわる遺伝子異常の探索はこれまで十分になされていない。本研究は抗がん剤治療前後、あるいは治療抵抗性卵巣がん組織を応用することで新たに薬剤耐性に関わる遺伝子異常を発見した。さらに遺伝子異常以外に血液中の代謝産物の異常にも着目し、治療抵抗性に関与する代謝異常を同定した。これらは卵巣がんの薬剤耐性獲得の研究に大きく寄与するとともに、耐性克服を目指した新たな治療法の開発につながる結果である。

研究成果の概要(英文)： We investigated the genomic alterations that potentially facilitate primary or acquired resistance to platinum agents in ovarian cancer by comprehensive genome analysis with surgically removed ovarian cancer specimens before and after chemotherapy. We found that KEAP1 mutation is possibly associated with chemoresistance in ovarian cancer. KEAP1 is known to repress the function of NRF2 which regulates chemosensitivity in variable cancer. Additional experiments are ongoing to validate the involvement of KEAP1 and NRF2 in chemoresistance of ovarian cancer.

In addition, approximately 600 metabolites in plasma from the patients with ovarian or endometrial cancer were measured to investigate the association between metabolomic status and chemosensitivity. We clarified several metabolomic profiles characteristic for ovarian and endometrial cancer, respectively. We also identified that increased tryptophan metabolism is significantly associated with chemoresistance in ovarian cancer.

研究分野：産婦人科学

キーワード：卵巣癌 薬剤耐性 バイオマーカー オミックス メタボロミクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

昨今のがんゲノム研究の発展により、がんの治療戦略においては従来の殺細胞性がん薬物療法中心の治療からがんのドライバー変異を治療標的とする分子標的治療へと大きなパラダイムシフトを迎えている。ドライバー変異のみならず、ミスマッチ修復機構の異常を反映するマイクロサテライト不安定性を指標とした免疫チェックポイント阻害剤の使用など広くがんゲノムプロファイルをバイオマーカーとした治療がすでに実臨床において展開されている。しかし婦人科がんにおいては相同組み換え修復異常を有する卵巣癌に対する PARP 阻害剤などを除きがんゲノム情報に基づいて個別化された分子標的治療に乏しいのが現状であり、卵巣癌、子宮体癌などにおけるがん薬物療法の主体は依然として殺細胞性抗がん剤である。

そのような状況下で白金製剤を中心とした多剤併用療法は進行婦人科がんの治療成績を大きく改善してきた。しかしながら初期治療で奏功してもいずれ薬剤耐性を獲得した状態で再発し死に至ることが多い。従って薬剤抵抗克服は婦人科がん治療における重要な研究課題である。がん薬物療法の淘汰圧によりがんのクローン再編成が生じることが薬剤耐性獲得の一つの重要な機序と考えられている。この検証には耐性獲得前、獲得後それぞれの臨床検体を用いた研究が必要であるが、実際に再発腫瘍や残存腫瘍組織を用いた研究は少ない。婦人科領域では再発腫瘍の二次的手術、或いは癌性腹水採取等で経時的な腫瘍組織を得ることも多いため、これらを解析することで抗がん剤耐性獲得に関わる分子機構の解明につながると共に、薬剤耐性に関わる遺伝子異常及びその関連シグナルを治療標的とすることで耐性克服に向けた新規治療戦略の立案に結び付く情報を得ることができると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、がん薬物療法開始前後の患者腫瘍組織中のがんゲノム情報について次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析し、臨床情報と統合することで婦人科がんにおける薬剤耐性に関わる可能性がある遺伝子異常を明らかとすることを目的とする。同定された遺伝子変異の属性情報をがん臨床で活用されているパブリックデータベースと比較突合し、腫瘍再発や薬剤耐性に関わる可能性が高い遺伝子変化、発現変化を抽出する。最終的には同定した遺伝子異常に着目し、耐性獲得の分子機構の解明とそれに基づく治療戦略の立案を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 薬剤耐性にかかわる遺伝子変異探索データ取得

東北大学病院産婦人科で治療を受けた婦人科癌の患者を対象として初回治療時の腫瘍検体、および再発あるいは化学療法後の残存腫瘍検体いずれも有する症例を選抜し、それぞれ腫瘍組織からの DNA を抽出する。非がん部検体からも DNA を抽出し、生殖細胞変異との比較検証も行う。抽出した DNA は次世代シーケンサーを用いた全エキソーム解析に供し初回手術時検体、再発・残存検体及び非がん部それぞれの遺伝子変異情報を網羅的に解析する。情報解析は GRCh38 へのアライメントを bwa-mem, 変異コールを mutect2 ないし scalpel、lancet などを併用し比較した上で解析パイプラインを作成する。解析に当たっては東北メディカル・メガバンク機構が所有する日本人集団全ゲノムパネル情報も活用する。再発・残存腫瘍で特異的に認められた変異に関しては、Annovar などのアノテーション付与ソフトを活用し生物学的・臨床学的意義を検討する。これらのプロセスにより、薬剤感受性に関連する候補遺伝子変異を決定する。また、エキソーム解析を行った検体のうち RNA 解析が可能な検体に関しては RNA-Seq 解析も行い遺伝子発現制御の観点からも薬剤感受性とのかかわりを検証する。

#### (2) 薬剤耐性獲得関連変異の抽出とその検証

(1) のデータ探索で抽出されたゲノム情報に薬剤感受性や患者予後などの臨床情報を統合し、ToMMo スーパーコンピュータシステムを活用して薬剤耐性の背景にある分子機構の解明を行う。必要に応じて機械学習などの手法を取り入れる。最終的には同定した分子機構を標的として薬剤耐性の克服を目指した新規治療計画の立案を目指す。

### 4. 研究成果

東北大学病院産婦人科で手術を受けた卵巣癌患者を対象に腫瘍組織の全エキソーム解析を行った。東北大学個別化医療センター及び東北大学未来型医療創成センターにおけるクリニカルバイオバンク事業で組織試料を集積した卵巣癌症例を対象とした。当初の研究計画では原発病変、残存腫瘍検体ありの 100 例程度を予定していたが、術前化学療法後の腫瘍減量術で得られた腫瘍中には全エキソーム解析が可能な腫瘍組織が残存していない症例も多く含まれていたため、最終的に原発病変、残存病変いずれも解析可能であった症例は 12 例にとどまった。そのため、治療前後のペア検体は得られていないが臨床経過から薬剤抵抗性であった症例、また、比較的稀な組織型であるが臨床的に化学療法抵抗性であることが知られている明細胞癌、粘液性癌を約 40 症例追加し、腫瘍組織中 DNA の全エキソーム解析を行い包括的に卵巣癌における薬剤耐性にかかわる可能性がある遺伝子変異候補の探索を行った。いくつかの遺伝子群が候補として抽出

されたが、本研究ではペア検体のうち化学療法後の残存腫瘍組織中からのみ検出されてきた *KEAP1* 変異に着目した。*KEAP1* は、転写因子である *NRF2* の機能を抑制的に制御することが知られている。*NRF2* の活性化は各種がんの治療抵抗性に関わることから、*KEAP1* の機能消失変異による *NRF2* の恒常的活性化が卵巣癌の薬剤抵抗性に関わっている可能性が考えられた。本推論を実証するため、さらに 100 例ほどのホルマリン固定された卵巣癌既存検体を用い、サンガーシーケンス法及び免疫染色法を軸とした *KEAP1* 変異と *NRF2* 及びその標的酵素である *NQO1* の発現の相関を確認する追加実験を開始した。本報告書作成現在実験を継続中であり、最終的な結論を得た後に論文を予定している。

また本研究立案当初は RNA-Seq による遺伝子発現情報も用いゲノム変異情報以外の切り口から薬剤耐性機序を補完的に解析することを予定していたが、新規性や臨床応用の可能性を見据えて腫瘍の生物学的活動をより直接的に反映しうる血中代謝産物の網羅的測定を優先的に行う方針とした。検体は全エクソーム解析と同様にクリニカルバイオバンク事業で集積した初回治療導入前の卵巣癌及び子宮体癌の患者血漿とし、MxP® Quant500 kit を用いて約 600 の代謝産物を絶対定量し患者予後や化学療法感受性などの臨床情報と突合し検証した。また、年齢等をマッチさせた健常人コホートとの比較検討も行った。この結果卵巣癌及び子宮体癌それぞれに特徴的な代謝産物プロファイルを明らかとすることに成功し、さらに卵巣癌においてはキヌレイン/トリプトファン比が高い症例ほど予後不良であることを同定した。キヌレイン/トリプトファン比はトリプトファン代謝経路活性を示すマーカーであり、トリプトファン代謝活性亢進が卵巣癌の治療抵抗性に関与する事、同代謝経路の阻害が薬剤耐性の克服に有用である可能性が示された。これまで婦人科癌における血漿代謝産物解析の報告は限られていたが、本研究ではがんゲノム解析だけでなく代謝産物解析も卵巣癌治療のバイオマーカーとなり得ることを示すことに成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計32件（うち査読付論文 32件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 32件）

1. 著者名 Hishinuma E, Shimada M, Matsukawa N, Saigusa D, Li B, Kudo K, Tsuji K, Shigeta S, Tokunaga H, Kumada K, Komine K, Shirota H, Aoki Y, Motoike IN, Yasuda J, Kinoshita K, Yamamoto M, Koshiba S, Yaegashi N.	4. 巻 13(7)
2. 論文標題 Wide-Targeted Metabolome Analysis Identifies Potential Biomarkers for Prognosis Prediction of Epithelial Ovarian Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxins (Basel).	6. 最初と最後の頁 461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins13070461.	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 -

1. 著者名 Oyama Y, Shigeta S, Tokunaga H, Tsuji K, Ishibashi M, Shibuya Y, Shimada M, Yasuda J, Yaegashi N.	4. 巻 16(6)
2. 論文標題 CHD4 regulates platinum sensitivity through MDR1 expression in ovarian cancer: A potential role of CHD4 inhibition as a combination therapy with platinum agents.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0251079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0251079	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 -

1. 著者名 Minato T, Ito S, Li B, Fujimori H, Mochizuki M, Yamaguchi K, Tamai K, Shimada M, Tokunaga H, Shigeta S, Sato I, Shima H, Yamada H, Yaegashi N, Yasuda J.	4. 巻 38
2. 論文標題 Liquid biopsy with droplet digital PCR targeted to specific mutations in plasma cell-free tumor DNA can detect ovarian cancer recurrence earlier than CA125.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gynecol Oncol Rep.	6. 最初と最後の頁 100847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gore.2021.100847.	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 -

1. 著者名 Shigeta S, Watanabe Y, Suzuki F, Nagase S, Shibuya Y, Ishibashi M, Nagai T, Shiga N, Toyoshima M, Tokunaga H, Shimada M, Yaegashi N.	4. 巻 256(3)
2. 論文標題 MicroRNA-152 Regulates Endometrial Serous Carcinoma Cell Motility by Suppressing Matrix Metalloproteinase 10 Expression.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tohoku J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 249-258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.256.249.	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 -

1. 著者名 Tokunaga Hideki, Iida Keita, Hozawa Atsushi, Ogishima Soichi, Watanabe Yoh, Shigeta Shogo, Shimada Muneaki, Yamaguchi-Kabata Yumi, Tadaka Shu, Katsuoka Fumiki, Ito Shin, Kumada Kazuki, Hamanaka Yohei, Fuse Nobuo, Kinoshita Kengo, Yamamoto Masayuki, Yaegashi Nobuo, Yasuda Jun	4. 巻 16
2. 論文標題 Novel candidates of pathogenic variants of the BRCA1 and BRCA2 genes from a dataset of 3,552 Japanese whole genomes (3.5KJPNv2)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0236907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0236907	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 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shogo Shigeta, Muneaki Shimada, Hideki Tokunaga, Keita Tsuji, Bin Li, Shuko Miyahara, Kei Kudo, Asami Toki, Nobuo Yaegashi
2. 発表標題 A metabolomic approach to identify novel biomarkers in plasma from ovarian cancer patients
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 工藤 敬、島田宗昭、菱沼英史、重田昌吾、李 實、宮原周子、土岐麻実、辻 圭太、徳永英樹、小柴生造、木下賢吾、山本雅之、八重樫伸生
2. 発表標題 がん代謝を標的とした卵巣癌におけるバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第62回婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻 圭太、島田宗昭、菱沼英史、重田昌吾、李 實、宮原周子、土岐麻実、工藤 敬、徳永英樹、小柴生造、木下賢吾、山本雅之、八重樫伸生
2. 発表標題 子宮体癌における血漿メタボローム解析によるバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第62回婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021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
研究分担者	安田 純  (YASUDA Jun)  (00281684)	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・発がん制御研究部・部長   (81303)	
研究分担者	島田 宗昭  (SHIMADA Muneaki)  (40362892)	東北大学・医学系研究科・准教授   (11301)	
研究分担者	徳永 英樹  (TOKUNAGA Hideki)  (30595559)	東北大学・大学病院・准教授   (11301)	
研究分担者	石橋 ますみ  (ISHIBASHI Masumi)  (20821383)	東北大学・大学病院・助教   (11301)	

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