

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09775

研究課題名(和文) 卵巣明細胞癌におけるヒストン修飾とmiRNA間のエピゲノムネットワークの解明

研究課題名(英文) Epigenetic network between histon modification and miRNA in ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

鶴賀 哲史 (Tsuruga, Tetsushi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70570448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： 卵巣類内膜癌におけるヒストンメチル化酵素EHMT2の治療標的の可能性。卵巣類内膜癌におけるEHMT2の発現上昇が認められ、ノックダウン、EHMT2阻害剤を卵巣類内膜癌に添加すると炎症性マーカーが上昇してアポトーシス誘導性の細胞増殖抑制が認められた。子宮体癌におけるヒストンメチル化酵素PRMT6の検討：子宮体癌はPRMT6のmRNA発現量が高値で、予後と負の相関を示した( $p < 0.01$ )。ChIP-seqではヒストン修飾を介して複数の癌関連転写因子やインターフェロン因子を調節していることが明らかになった。またヒストンH3R2メチル化とヒストンH3K27 アセチル化の関連が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までフォーカスされていなかった卵巣類内膜癌に治療標的の可能性、そのメカニズムについて同定した。また子宮体癌に対するPRMT6の治療標的の可能性も追求し、エピゲノムを用いた網羅的解析により様々な新規遺伝子を同定する事ができた。また子宮体癌におけるヒストン修飾間のエピゲノムネットワークも明らかにされ、今後の子宮体癌の治療標的の同定に貢献する研究と考える。

研究成果の概要(英文)： Therapeutic target of histone methylase EHMT2 in ovarian endometrioid carcinoma was investigated. Increased expression of EHMT2 was observed in ovarian endometrioid carcinoma, and addition of siRNA for EHMT2 and EHMT2 inhibitors to ovarian endometrioid carcinoma suppressed cell proliferation with increasing inflammatory markers and inducing apoptosis. (2) Examination of histone methyl-transferases PRMT6 in endometrial cancer: The mRNA expression level of PRMT6 was high in endometrial cancer, showing a negative correlation with prognosis ( $p < 0.01$ ). ChIP-seq analysis showed PRMT6 regulate multiple cancer-related transcription factors and interferon factors through histone modification. And, there was the relation of histone H3R2 methylation and histone H3K 27 acetylation.

研究分野：エピゲノム

キーワード：ヒストン修飾 エピゲノムj 卵巣類内膜癌 子宮体癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノムの異常だけでなくエピゲノムの異常も癌化において重要である事が報告され、癌研究の Hot topic である。エピゲノムの分子生物学的メカニズムは DNA メチル化、ヒストン修飾、miRNA の 3 因子が主要因子であると考えられている。ヒストン修飾はアセチル化、メチル化、リン酸化等からなり、ヒストンアセチル化酵素/脱アセチル化酵素やメチル化酵素/脱メチル化酵素等の修飾酵素・脱修飾酵素によって修飾される。その多様な部位、種類の修飾によってクロマチンの構造を立体的に変化させる事により、多層的に遺伝子発現を制御している。microRNA(miRNA)は、約 22 塩基程度の小分子 non-coding RNA で遺伝子発現調節を行っている。これまで 2000 種類程度の miRNA が同定されており、1 種類の miRNA が約 100 種類の遺伝子を標的にしていることから、相当数の遺伝子が miRNA からの制御を受けていることが知られている。

卵巣癌は婦人科癌の中で最も予後不良な疾患である。卵巣癌の中では漿液性癌が最多(全体の約 50%)であり、多くの臨床試験が行われているが非漿液性腺癌に有効な分子標的薬は未だ確立されていない。特に明細胞腺癌 (Ovarian Clear Cell Carcinoma : OCCC)は欧米で 5%と低頻度であるのに対し、日本では卵巣癌の約 24%を占め、抗がん剤等の治療に抵抗性であり予後不良である。また OCCC、卵巣類内膜癌と共には内膜症性卵巣嚢胞を発生母地として多段階的に発癌することより、出産年齢の高齢化・子宮内膜症の増加に伴い、本邦では今後さらにそれらの罹患率・死亡者数が増加していくと懸念され、新規治療法の開発が必要と考えられている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はまず、OCCC において発現が亢進・低下しているヒストン修飾酵素/脱修飾酵素と miRNA 同定する。それを元に OCCC におけるヒストン修飾、miRNA の複雑なエピゲノムネットワークの解明を行い、そのネットワークが及ぼす OCCC における癌化メカニズムを解明する。上記で得られたエピゲノムネットワークから抗腫瘍効果の高い薬剤を同定し、本邦発の OCCC 治療薬を開発すると共に、治療効果の予測ができるような新しいエピゲノムバイオマーカーを同定する。もし関連が認められなかったら、同じく子宮内膜症関連卵巣癌である卵巣類内膜癌及び子宮体癌のヒストン修飾について検討する。

### 3. 研究の方法

まず OCCC における miRNA の発現を検討した所、コントロールと比較して有意な差が得られなかった。そこで対象を同じく子宮内膜症関連卵巣癌である卵巣類内膜癌、また婦人科癌において子宮体癌に変更し、ヒストンメチル化酵素の発現、またヒストン修飾同士のネットワークを検討する事にした。以下の 2 つのプロジェクトについて検討を行った。卵巣類内膜癌におけるヒストンメチル化酵素 EHMT2 の治療標的の可能性について。EHMT2 は主にヒストン H3 のメチル化を担うヒストンメチル化酵素である。EHMT2 は子宮内膜癌を始め、多くの癌種において高発現となり、発癌、進展に関与する可能性が報告されているが、卵巣癌における報告は少ないのが現状である。今回我々は卵巣癌のうち卵巣類内膜癌を対象として EHMT2 発現解析や選択的阻害剤の抗腫瘍効果について検討した。また ARID1A の変異によって EHMT2 選択的阻害剤の効果が層別化されるかも併せて検討した。②子宮体癌におけるヒストンメチル化酵素 PRMT6 の治療標的の可能性について。ヒストンメチル化酵素 PRMT6 は H3R2 メチル化を触媒し、周辺のヒストン修飾を介して遺伝子の発現を調節している。本研究では子宮体癌における PRMT6 の治療標的としての検討に加え、癌化や進展のメカニズムとしてヒストン修飾の調節機構及びヒストン修飾間のネットワークを ATAC-seq や ChIP-seq 等のエピゲノム解析を用いて検討した。当院子宮体癌 52 例と正常子宮内膜 4 例の PRMT6 の mRNA 発現量を q-PCR により評価し、TCGA データベース上の子宮体癌 508 例の mRNA 発現量と予後の相関を検討した。子宮体癌細胞株を siRNA により PRMT6 を knockdown (KD)し、細胞増殖抑制能、アポトーシス誘導能、ヒストンメチル化を検討した。続いて ATAC-seq、ChIP-seq によりクロマチン構造の変化やヒストン修飾の調節機構を評価した。

### 4. 研究成果

臨床凍結検体において、EHMT2 の発現量は正常卵巣と比較し卵巣類内膜癌の組織で統計学的有意に上昇していた。卵巣類内膜癌の細胞株で EHMT2 の siRNA knockdown を施行した結果、ヒストンメチル化の減少を伴う細胞増殖抑制を認めた。EHMT2 阻害剤においても有意に細胞増殖が抑制された。抗腫瘍メカニズムとしては炎症のマーカーである NF- $\kappa$ B の発現上昇に伴うアポトーシス誘導が認められた。さらに ARID1A 変異の有無によって感受性群と抵抗性群が層別化された。②子宮体癌は正常子宮内膜に比して有意に PRMT6 の mRNA 発現量が高値で、予後と負の相関を示した(p < 0.01)。PRMT6-KD により H3R2 メチル化の減少を伴うアポトーシス誘導型の細胞増殖抑制効果を認めた。ATAC-seq では PRMT6-KD により 3850 領域のクロマチン構造が変化し、ChIP-seq

ではヒストン修飾を介して複数の癌関連転写因子及びインターフェロン関連因子を調節していることが明らかになった。またヒストン修飾間の関連を検討した所、ヒストン H3R2 のメチル化及びヒストン H3K27 のアセチル化の関連が認められた。また PRMT6 ノックダウンにより内因性レトロウィルスの発現上昇が認めれた。PRMT6-KD によりクロマチン構造はゲノムワイドに変化し、ヒストン修飾を介して癌関連転写因子を調節していた。PRMT6 は子宮体癌治療において新たな治療標的となる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wada Miku, Kukita Asako, Sone Kenbun, Hamamoto Ryuji, Kaneko Syuzo, Komatsu Masaaki, Takahashi Yu, Inoue Futaba, Kojima Machiko, Honjoh Harunori, Taguchi Ayumi, Kashiya Tomoko, Miyamoto Yuichiro, Tanikawa Michihiro, Tsuruga Tetsushi, Mori-Uchino Mayuyo, Wada-Hiraike Osamu, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Epigenetic Modifier SETD8 as a Therapeutic Target for High-Grade Serous Ovarian Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1686 ~ 1686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10121686	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 -
1. 著者名 Kojima Machiko, Sone Kenbun, Oda Katsutoshi, Hamamoto Ryuji, Kaneko Syuzo, Oki Shinya, Kukita Asako, Kawata Akira, Honjoh Harunori, Kawata Yoshiko, Kashiya Tomoko, Sato Masakazu, Taguchi Ayumi, Miyamoto Yuichiro, Tanikawa Michihiro, Tsuruga Tetsushi, Nagasaka Kazunori, Wada-Hiraike Osamu, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 The histone methyltransferase SMYD2 is a novel therapeutic target for the induction of apoptosis in ovarian clear cell carcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.12014	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 -
1. 著者名 Kojima M, Sone K, Oda K, Hamamoto R, Kaneko S, Oki S, Kukita A, Machino H, Honjoh H, Kawata Y, Kashiya T, Asada K, Tanikawa M, Mori-Uchino M, Tsuruga T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Wada-Hiraike O, Osuga Y, Fujii T.	4. 巻 19 (1)
2. 論文標題 The histone methyltransferase WHSC1 is regulated by EZH2 and is important for ovarian clear cell carcinoma cell proliferation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer.	6. 最初と最後の頁 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-019-5638-9	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 Tsuruga T, Hirata T, Akiyama I, Matsumoto Y, Oda K, Fujii T, Osuga Y.	4. 巻 45 (8)
2. 論文標題 The histone methyltransferase WHSC1 is regulated by EZH2 and is important for ovarian clear cell carcinoma cell proliferation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 1613-1618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14014	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 -

1. 著者名 Makii C, Ikeda Y, Oda K, Uehara Y, Nishijima A, Koso T, Kawata Y, Kashiyama T, Miyasaka A, Sone K, Tanikawa M, Tsuruga T, Mori-Uchino M, Nagasaka K, Matsumoto Y, Wada-Hiraike O, Kawana K, Hasegawa K, Fujiwara K, Aburatani H, Osuga Y, Fujii T.	4. 巻 155 (2)
2. 論文標題 Anti-tumor activity of dual inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase and MDM2 against clear cell ovarian carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gynecol Oncol.	6. 最初と最後の頁 331-339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygyno.	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 -

1. 著者名 Aotsuka A, Matsumoto Y, Arimoto T, Kawata A, Ogishima J, Taguchi A, Tanikawa M, Sone K, Mori-Uchino M, Tsuruga T, Oda K, Kawana K, Osuga Y, Fujii T.	4. 巻 110 (10)
2. 論文標題 Interleukin-17 is associated with expression of programmed cell death 1 ligand 1 in ovarian carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 3068-3078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14174.	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0件

〔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
---------	---------