

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18180

研究課題名(和文)術前化学療法後卵巣がんを用いた治療抵抗性をきたす遺伝子メチル化の同定と機序の解明

研究課題名(英文)Molecular profiling of the residual tumor of ovarian cancer after neoadjuvant chemotherapy

研究代表者

江畑 貴大 (EBATA, TAKAHIRO)

星薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：80769620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：術前化学療法を受けた卵巣癌症例において治療感受性に関わる遺伝子を同定するため、30症例において遺伝子変異解析およびDNAメチル化の網羅的解析を行い、治療感受性に関わる候補遺伝子を同定した。そのバリデーションとして、45症例の遺伝子変異解析およびメチル化解析を行い、LRCOL1遺伝子のDNAメチル化($p=0.0028$)を予後因子として同定した。また、付随研究としてBRCA1のメチル化を測定する方法を樹立し、メチル化レベルが変異と同程度に予後と関連することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高悪性度卵巣漿液性腺がんにおける治療効果予測因子の同定は、臨床において患者の予後、治療感受性を推定するうえで重要である。また、LRCOL1のメチル化が卵巣がんにおいてどのような役割を果たしているかを解明することで、新規治療標的の同定につながる可能性がある。また、BRCA1は遺伝子変異が既に確立された予後予測因子であり、既に実臨床で用いられている。遺伝子変異例だけでなくメチル化症例も加えることでより精度の高い予後推定を行える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We performed comprehensive methylation microarray analysis in 30 high-grade serous ovarian cancer samples and identified candidate genes which could affect treatment response. For validation, we performed mutation and methylation analysis in an additional 45 samples and identified LRCOL1 methylation as a prognostic marker ($p=0.0028$). Accompanying with this research, we also focused on BRCA1 methylation and established new method for the evaluation of BRCA1 methylation level. As a result, BRCA1 methylation was an independent prognostic factor in patients with high-grade serous ovarian cancer.

研究分野：Cancer Epigenetics

キーワード：卵巣がん DNAメチル化 LRCOL1 BRCA1

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは治療感受性の良い腫瘍であるが、進行期では7,8割の症例は再発をきたし、予後が悪い。そのため治療抵抗性は重要な問題であるが、その機序は不明確な部分が多い。

治療抵抗性機序の解明を行うためには、感受性、抵抗性細胞がそれぞれ優位に存在する良質な検体を得ることが不可欠である。そのためには、術前化学療法後の残存腫瘍検体が有用であると考えた。手術時の検体では、感受性の場合に感受性細胞がまだ残存しており、抵抗性の場合に抵抗性細胞が優位に残存している症例が含まれると考えられる。一方、診断時の検体では感受性細胞が優位に多く、再発後の検体は期間や他治療の影響により不均一な集団になっている可能性があることからいずれも抵抗性機序の解析は困難であると考えた。また、卵巣がんは遺伝子変異量の少ないがん腫であるため、本研究では遺伝子のメチル化に着目した。

2. 研究の目的

卵巣高悪性度漿液性腺癌において治療抵抗性に関する遺伝子のメチル化を同定し、その機能と化学療法抵抗性に関する機序を明らかにする。その知見を元に新薬の開発につなげる。

3. 研究の方法

3-1. Validation cohort について

申請者は過去に国立がん研究センター中央病院における卵巣がん症例のうち術前化学療法を受けた高悪性度卵巣漿液性腺癌30例の症例を用いて、screening cohortとして遺伝子変異および、網羅的DNAメチル化解析を行い5つの遺伝子のメチル化を候補として同定した。

これらの候補から真に重要な遺伝子を同定するため、Validation cohortとして別の45例を用いて解析を行う。

3-2. DNAメチル化解析

BRCA1, *TP53* などの高悪性度卵巣漿液性腺癌において頻度の高い遺伝子変異解析、およびscreening cohortにて同定した候補遺伝子を pyrosequencing 法によるメチル化解析を行い、再現性のある遺伝子を同定する。

4. 研究成果

Validation cohortの結果として *LRCOL1* 遺伝子のメチル化が予後因子として同定された($P=0.0028$) (図1)。*LRCOL1* 遺伝子は脂質代謝の補酵素としての機能を持ち、卵巣がんにおけるメチル化の機能的、臨床的意義は報告がない。今後 *LRCOL1* の発現抑制が卵巣がん細胞株の脂質代謝に与える影響をフラックスアナライザー、メタボローム解析などを用いて解析し、新規治療標的となる可能性を探る。

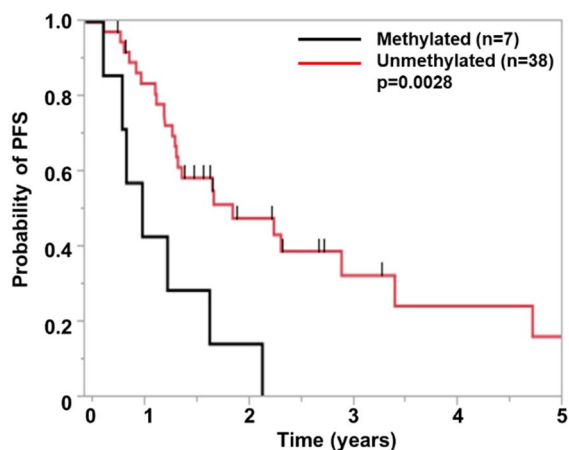


図1 *LRCOL1* のメチル化の有無による予後の比較

また、既に変異が効果予測因子と報告されている *BRCA1* 遺伝子にも着目した。*BRCA1* 遺伝子のメチル化が治療効果予測因子となるかは複数の報告があるが、測定する遺伝子領域、方法、結果が異なっており、見解は統一されていない。そこで、今回は *BRCA1* の真の転写開始点を同定し、定量的な測定方法を用いることで従来の報告で測定されている領域のメチル化レベルとの

比較を行った。その結果として、今回同定した領域(chr17: 43125579)のメチル化レベルは従来の領域(chr17: 43125427)と比較してより明確にメチル化レベルが検体ごとに分かれることが分かった(図2)。

この領域において、低コストで簡便にメチル化レベルを測定するため、pyrosequencing 法による測定方法を確立し、測定を行ったところ、BRCA1のメチル化は、従来報告されているBRCA1/2の遺伝子変異や手術後の残存病変のように独立した予後因子であることを確認し(P=0.025)(図2)、論文として報告した(Ebata et al. Gynecol Oncol 2022;167(3):513-518.)。

BRCA1は卵巣がんにおいて最も注目されている遺伝子の1つであり、本研究により遺伝子変異だけでなく、メチル化によっても機能が抑制されることで治療感受性に影響し得ることは非常に有意義であり、今後臨床において予後因子のバイオマーカーとしての応用が期待できる。

また、付随研究として網羅的DNAメチル化解析によって得られたデータを用いて、付随研究として検体中の腫瘍細胞率を推定するマーカーの探索を行った。その結果として、ZNF154遺伝子のメチル化レベルが病理学的腫瘍細胞率と高度に相関する(R=0.77, P<0.0001)ことを突き止め、論文として報告した(Ebata et al. Med Oncol 2022;23;39(5):78.)。

臨床検体の解析を行う上で、腫瘍細胞率は非常に重要な要素であるが、実際の検体では不明な場合がある。本研究によりそのような検体でも腫瘍細胞率を推定し、解析に役立てることができると考えられる。

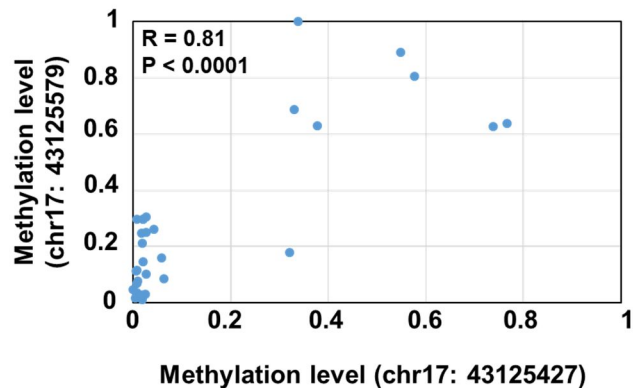


図2 BRCA1の領域ごとのメチル化レベルの比較

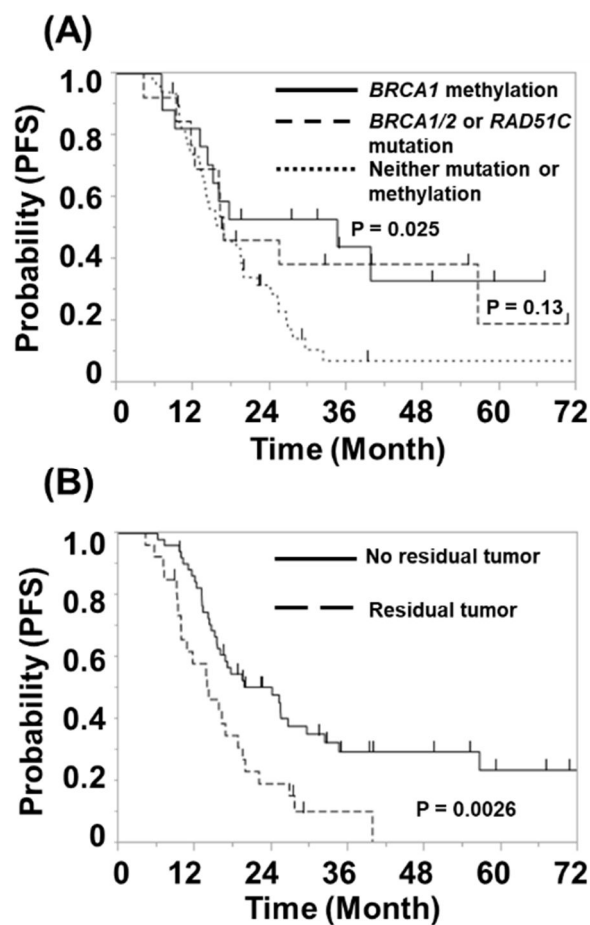


図3 BRCA1/2 status,残存病変の有無における予後

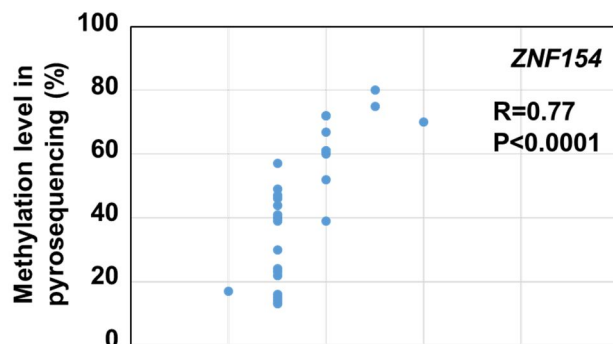


図4 ZNF154のメチル化レベルと病理学的腫瘍細胞率の相関

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 1件）

1. 著者名 Takahiro Ebata, Satoshi Yamashita, Hideyuki Takeshima, Hiroshi Yoshida, Yoshiko Kawata, Nao Kino, Toshiharu Yasugi, Yasuhisa Terao, Kan Yonemori, Tomoyasu Kato, Toshikazu Ushijima	4. 巻 39
2. 論文標題 DNA methylation marker to estimate ovarian cancer cell fraction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12032-022-01679-y.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ebata Takahiro
2. 発表標題 DNA methylation marker to estimate cancer cell fraction
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江畑貴大
2. 発表標題 Identification of Enhancer Methylation Associated with Treatment Resistance of Ovarian Cancer after Neoadjuvant Chemotherapy
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2020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
---------	---------