

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18211

研究課題名（和文）エピゲノム遺伝子を標的としたSWI/SNF変異婦人科癌に対する新規併用療法の確立

研究課題名（英文）Targeting epigenetic regulators as a novel combination therapy for gynecologic malignancies harboring SWI/SNF alteration.

研究代表者

重田 昌吾（Shigeta, Shogo）

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：90842633

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）：婦人科悪性腫瘍の領域では、卵巣明細胞癌などを中心にSWI/SNFと呼ばれる複合体に関連する遺伝子異常が高頻度に検出される。SWI/SNF複合体関連の遺伝子異常をもつ悪性腫瘍ではEZH2と呼ばれるタンパク質の阻害剤が有効である可能性が先行研究で示されている。この研究では、SWI/SNF複合体関連遺伝子異常を持つ卵巣癌細胞と異常のない卵巣癌細胞を用いた比較検証により、BAZ2Aと呼ばれるタンパク質に対する阻害剤を併用することにより卵巣癌においてEZH2阻害剤の腫瘍増殖抑制効果が増強されることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EZH2阻害剤は臨床応用に向けた臨床研究がおこなわれているが、単独の投与では固形癌において有効な効果を得るには十分でない可能性が指摘されている。卵巣癌細胞を用いてBAZ2A阻害剤を併用することでEZH2阻害剤の効果を増強できる可能性を示したこの研究成果は将来卵巣癌に限らずSWI/SNF複合体関連遺伝子の異常を有する悪性腫瘍の治療選択を広げる可能性がある。また、本研究結果はこれまで癌治療領域で注目されることの少なかったBAZ2Aの阻害剤開発の意義を示した点でも重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Genomic alterations related to SWI/SNF complex are frequently observed in gynecologic malignancies such as ovarian clear cell carcinoma. It has been reported in several previous researches that EZH2 inhibitors are effective in cancers harboring SWI/SNF-related gene alteration.

In this study, we found that BAZ2A inhibition suppresses proliferation of ovarian cancer cells harboring ARID1A mutation, one of the major SWI/SNF complex genes. Furthermore, we also clarified that a combination therapy with BAZ2A inhibitor and EZH2 inhibitor leads to synergistic anti-tumor effect on ARID1A-mutated ovarian cancer cells.

This study highlighted the potential of BAZ2A as a novel therapeutic target for ARID1A-mutated ovarian cancer in combination with EZH2 inhibition.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：婦人科悪性腫瘍 EZH2 BAZ2A

### 1. 研究開始当初の背景

*ARID1A* 変異を中心として、クロマチンリモデリング複合体 *SWI/SNF* をコードする遺伝子変異が卵巣明細胞癌や卵巣小細胞癌といった卵巣癌で高頻度に認められる<sup>1,2)</sup>。また子宮体癌においても一定の頻度で *ARID1A* 変異が検出される。*SWI/SNF* 遺伝子変異をバイオマーカーとして合成致死作用をもたらす分子標的治療の研究が進んでいるが、婦人科癌はその恩恵を享受し得る疾患群であるといえる。中でもヒストンメチル化酵素である *EZH2* に対する阻害剤は *SWI/SNF* 遺伝子変異陽性悪性腫瘍に対し特異的な抗腫瘍効果を示すことが示されており臨床試験による検証も行われているが、固形癌を対象とした成績を見る限り現時点では単剤で標準治療となり得るほどのインパクトは得られていない<sup>3,4)</sup>。一方、研究申請者は *ARID1A* 変異を有する卵巣癌は多様なエピジェネティクス制御遺伝子の機能抑制に対し脆弱性を示すことを報告しており、*EZH2* 以外にも *SWI/SNF* 変異を有する婦人科癌に有望な治療標的分子が存在することが示唆される<sup>5)</sup>。エピジェネティクス制御は多様な機構により動的かつ複雑に制御されており、複数の分子・複合体の機能を同時に阻害することにより、より効果的な抗腫瘍効果が得られると想定される。

### 2. 研究の目的

本研究では、*SWI/SNF* 変異陽性婦人科癌における治療標的として有効なエピジェネティクス制御機構分子を探索することを目的とした。特に *EZH2* 阻害剤を軸として *SWI/SNF* 変異陽性婦人科悪性腫瘍に有効なエピジェネティクス関連の多剤併用療法を開発することを目指した。

### 3. 研究の方法

- ① *SWI/SNF* 関連遺伝子の中でも *ARID1A* は悪性腫瘍において最も高頻度に変異が検出される遺伝子である。そこで、*ARID1A* 変異を有する複数の卵巣癌細胞株を用いて予備的検証および先行研究結果に基づき選択した複数のエピジェネティクス制御分子の機能阻害による腫瘍増殖抑制効果について検証した。さらに *ARID1A* 野生型卵巣癌細胞である *RMG1* に *CRISPR-Cas9* システムで *ARID1A* ノックアウトを導入した *isogenic* な細胞モデルを構築し、*ARID1A* 変異の導入が上記エピジェネティクス制御分子の機能阻害に対して及ぼす影響について追加検証を行った。
- ② ①で有効性が確認された治療標的分子に対する阻害剤を用いて、*EZH2* 阻害剤との同時投与の有効性について *isogenic* 細胞モデルを用いて 14 日間のコロニーフォーメーション試験を中心に検証した。さらに *ARID1A* を含む *SWI/SNF* 関連遺伝子変異を有する卵巣がん細胞を複数用い、*EZH2* 阻害剤との併用療法の可能性について追加検証した。併用療法がもたらす抗腫瘍効果について *RNA-Seq* を中心に検証した。
- ③ 患者由来癌オルガノイドモデルやマウス異種移植モデルを応用して、より生体内の環境に近い状況での有効性、安全性についての検証を試みた。

### 4. 研究成果

- ① *ARID1A* 変異陽性卵巣癌細胞を用いたエピジェネティクス制御分子の機能抑制による抗腫瘍効果の検証

汎用されている卵巣がん細胞株や、新規に開発された卵巣明細胞癌患者由来 *OCI* 細胞<sup>6)</sup> から *ARID1A* 変異を有する卵巣がん細胞株を選択し各種エピジェネティクス制御分子に対する機能阻害による腫瘍増殖効果を検証した。ヒストンアセチル化を認識して転写活性化を誘導するモチーフであるプロモドメインを含む分子 *BAZ2A* の機能阻害や、*ARID1A* と同様にクロマチンリモデリングを制御し遺伝子発現を調節するクロモドメインを含有する分子 *CHD4* に対する機能阻害が有効であることを見出した<sup>7)</sup>。*RMG1* に *ARID1A* ノックアウトを導入した *isogenic* な実験モデルを用いた追加検証では、*siRNA* や *shRNA* により *BAZ2A* 発現を抑制することにより *ARID1A* ノックアウト *RMG1* 選択的な腫瘍増殖抑制効果を観察することができた。(図1) さらに *BAZ2A* の発現抑制により *EZH2* の発現が低下することを明らかとし、*BAZ2A* が *ARID1A* 変異陽性卵巣癌細胞選択的に腫瘍増殖抑制をもたらす一つのメカニズムであると考えられた。

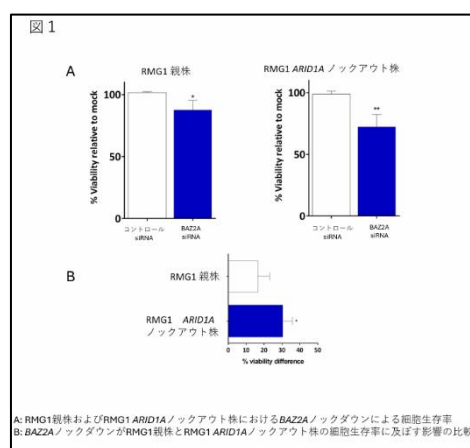
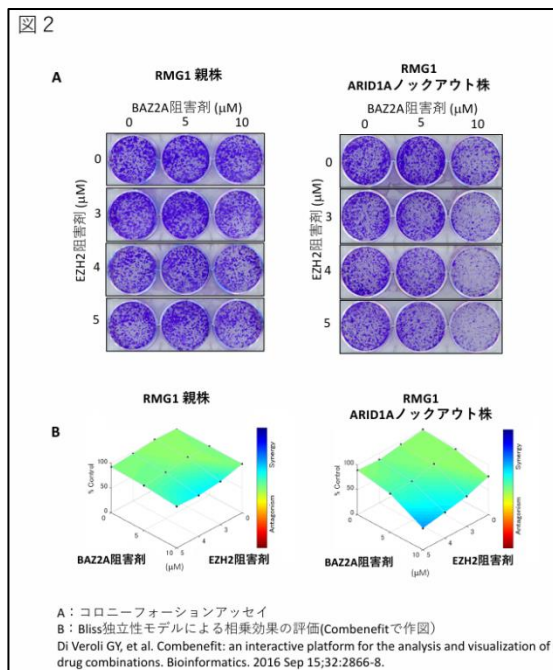


図1 A: RMG1親株およびRMG1 ARID1Aノックアウト株におけるBAZ2Aノックダウンによる細胞生存率 B: BAZ2AノックダウンがRMG1親株とRMG1 ARID1Aノックアウト株の細胞生存率に及ぼす影響の比較

## ② SWI/SNF 変異陽性卵巣癌に対する BAZ2A 阻害剤と EZH2 阻害剤併用療法の検証

BAZ2A が EZH2 の発現調節にもかかわることからも SWI/SNF 変異陽性卵巣癌に対して BAZ2A 阻害剤と EZH2 阻害剤の併用療法が有効である可能性が存在すると考え、コロニーフォーメーションアッセイを用いて検証を行った。BAZ2A 阻害剤 GSK2801 および EZH2 阻害剤の相乗効果に関して BLISS 独立性モデルを採用して検証した。RMG1 親株および *ARID1A* ノックアウト株で比較すると、想定された通り *ARID1A* ノックアウト RMG1 細胞において BAZ2A 阻害剤と EZH2 阻害剤併用による顕著な相乗的腫瘍抑制効果が確認された (図 2)。続いて *ARID1A* 変異陽性卵巣癌細胞、野生型卵巣癌細胞をそれぞれ複数用いて同様に併用療法による腫瘍増殖抑制効果を確認したところ、臨床試験で検証が進んでいる EZH2 阻害剤 tazemetostat を含め、*ARID1A* 変異陽性卵巣癌細胞株選択的に BAZ2A 阻害剤と EZH2 阻害剤併用療法による相乗的腫瘍増殖抑制効果を確認することができた。また、SWI/SNF 複合体を構成する *SMARCA4* に変異を有する卵巣癌細胞においても同様に BAZ2A 阻害剤、EZH2 阻害剤併用による相乗的な効果が確認された。以上の結果より BAZ2A 阻害剤、EZH2 阻害剤の併用療法が卵巣癌を中心とした SWI/SNF 変異陽性婦人科悪性腫瘍に対して有効な腫瘍増殖抑制効果をもたらすと考えられた。



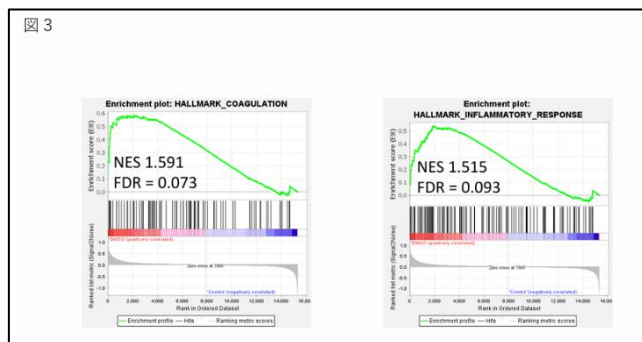
## ③ オルガノイドおよび異種移植マウスモデルを用いた検証の試み

癌本来のフェノタイプを忠実に再現可能な実験モデルでの検証を目的として、患者由来腫瘍組織から卵巣癌オルガノイドの樹立を試みた。一定の割合で初代培養が可能な癌オルガノイドを得ることができたが、継代による長期維持が可能なモデルの作成には至らず詳細な薬剤感受性試験を行うには至らなかった。

また、生体での有効性、安全性評価を目的として異種移植マウスモデルによる BAZ2A, EZH2 阻害剤併用療法の効果を検証した。*ARID1A* 変異陽性卵巣癌細胞 TOV21G を nude マウス皮下に移植し、腫瘍形成が確認できた段階から対照群、BAZ2A 阻害剤 GSK2801 (30mg/kg) 単独投与群、EZH2 阻害剤 GSK343 (10mg/kg) 単独投与群、併用投与群の 4 群に分け、1 日おきに規定の薬剤を腹腔内投与した。予備的検証として各群 3 匹ずつで投与を開始し、投与開始から 50 日までの腫瘍体積の測定を経時的に行った。4 群において腫瘍体積に有意な相違は認められず、この結果を踏まえて匹数を増やしての本検証は見送った。マウスモデルで阻害剤による効果が観察されなかった理由として特に BAZ2A 阻害剤は生物学的利用能の問題などが背景にある可能性も懸念され、今後創薬の視点からの研究開発も必要と考えられた。

## ④ RNA-Seq による BAZ2A 阻害剤と EZH2 阻害剤併用療法による腫瘍増殖抑制メカニズムの検証

*ARID1A* 変異を有する卵巣癌細胞株 TOV21G を用いて EZH2 阻害剤、BAZ2A 阻害剤、および 2 剤の併用が遺伝子発現制御に及ぼす影響を RAN-Seq により検証した。Gene Set Enrichment 解析で EZH2 阻害剤あるいは BAZ2A 阻害剤単独投与群、2 剤併用群をそれぞれ対照群と比較すると、併用群においてのみ炎症系に関連する遺伝子クラスターの発現や、血液凝固に関連する遺伝子クラスターの発現が有意に抑制されていることが明らかとなった。(図 3)。*ARID1A* 変異が高頻度に観察される卵巣癌細胞株では炎症を惹起する IL-6 シグナルや腫瘍微小環境における凝固亢進シグナルが癌の進展増殖に有利に働いていることが報告されていることから、今後これらのパスウェイを中心に抗腫瘍メカニズムについて検証を行っていく予定である。



## References

1. Shibuya Y, Tokunaga H, Saito S, et al. Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinoma with next generation sequencing. Genes

Chromosomes Cancer. 2018;57(2):51-60.

2. Jelinic P, Mueller JJ, Olvera N, et al. Recurrent SMARCA4 mutations in small cell carcinoma of the ovary. *Nat Genet.* 2014;46(5):424-6.

3. Kim KH, Kim W, Howard TP, et al. SWI/SNF-mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nat Med.* 2015;21(12):1491-6.

4. Italiano A, Soria JC, Toulmonde M, Michot JM, Lucchesi C, Varga A, et al. Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol.* 2018;19(5):649-59.

5. Shigeta S, Lui GYL, Shaw R, et al. Targeting BET Proteins BRD2 and BRD3 in Combination with PI3K-AKT Inhibition as a Therapeutic Strategy for Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2021;20(4):691-703.

6. Ince TA, Sousa AD, Jones MA, et al. Characterization of twenty-five ovarian tumour cell lines that phenocopy primary tumours. *Nat Commun.* 2015;6:7419.

7. Oyama Y, Shigeta S, Tokunaga H, et al. CHD4 regulates platinum sensitivity through MDR1 expression in ovarian cancer: A potential role of CHD4 inhibition as a combination therapy with platinum agents. *PLoS One.* 2021;16(6):e0251079.

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 Yoshiko Oyama, Shogo Shigeta, Hideki Tokunaga, Keita Tsuji, Masumi Ishibashi, Yusuke Shibuya, Muneaki Shimada, Jun Yasuda, Nobuo Yaegashi	4. 巻 16
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 251079
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 -

〔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 重田 昌吾
2. 発表標題 プロモドメインを中心とした卵巣明細胞癌に対する新規個別化医療確立に向けた橋渡し研究
3. 学会等名 第63回 日本婦人科腫瘍学会学術講演会 公募シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重田 昌吾
2. 発表標題 多角的研究基盤を統合した探索的研究に基づく卵巣明細胞癌の新規個別化医療開発
3. 学会等名 第76回 日本産科婦人科学会学術講演会 シンポジウム
4. 発表年 2024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
---------	---------