

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09482

研究課題名（和文）卵巣がんの代謝脆弱性をターゲットする新規治療

研究課題名（英文）Targeting metabolic vulnerability of ovarian cancer

研究代表者

山田 秀和（Yamada, Hidekazu）

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）・がん薬物療法研究部・特任研究員

研究者番号：10254012

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）：がん代謝は卵巣がんの新規創薬標的となる可能性がある。本課題では、網羅的な遺伝子ノックアウトスクリーニングを行った。その結果、卵巣がん細胞の増殖・生存に特に重要な72の代謝関連遺伝子が抽出された。それらのなかから鉄硫黄クラスター生合成に関する遺伝子群に着目し、さらに解析を行った。特に鉄硫黄クラスター生合成コア複合体サブユニットの1つFDX2に関しては、卵巣がん症例における遺伝子増幅を見出すとともに、種々の卵巣がん株において、その重要性を確認できた。さらに、今後のより詳細な解析を可能とするFDX2-iKO細胞を樹立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣がん細胞の生存や増殖にとくに重要な代謝関連遺伝子を網羅的に知ることができた。中でも鉄硫黄クラスター生合成コア複合体FDX2サブユニットに関して、卵巣がん症例における遺伝子増幅が明らかになり、FDX2が卵巣がん細胞の生存や増殖に非常に重要であることを、多くの卵巣がん株にて実証した。さらにFDX2を誘導欠損可能な細胞株を作製した。このように、鉄硫黄クラスター生合成を標的とする新規卵巣がん治療開発に向けて、その基礎となるデータを収集することができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we explored metabolic vulnerability of ovarian cancer as novel therapeutic target. To do so, we undertake CRISPR gene knockout screening in OVC cell lines and identified 72 metabolism-related genes as essential for proliferation/survival of ovarian cancer cells. Among them, we focused on the genes related to iron-sulfur cluster biosynthesis. Further analysis showed that FDX2, a subunit of iron-sulfur cluster core assembly complex, is significantly amplified in patients, and is particularly essential in various ovarian cancer cell lines. We developed FDX2-iKO cells enabling further detailed analysis of FDX2's functions.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣がん 代謝 鉄硫黄クラスター

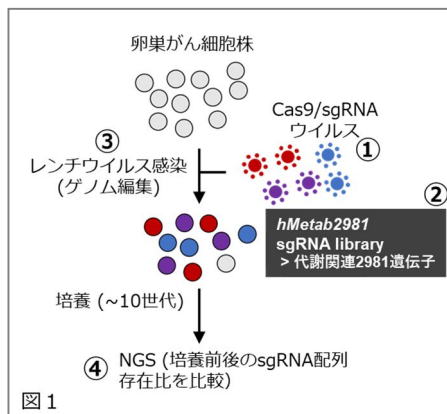
1. 研究開始当初の背景

がんゲノム解析の進展に伴い、卵巣がんにおける遺伝子異常が次々と明らかにされた。同時に、このがんには、どうやら明確で創薬可能なドライバー変異がほとんど無い事が分かってきた。したがって、卵巣がんでは、ドライバー遺伝子以外の治療標的を開拓するアプローチは非常に重要である。申請者らグループは、がんの代謝特性を解明し、新規治療標的として開拓するアプローチをつづけてきた。がん代謝は新たな創薬標的となる可能性があり、多くの治療シーズが眠ると期待されるが、その発掘・開発は十分とはいえない。その一因に、代謝を治療標的とするとして、「どの経路/酵素をターゲットするのがベストなのか？」という極めて重要な問いに対する答えがなかった点あげられる。

2. 研究の目的

前述の問題に取り組むため、我々は、次世代シーケンシング (NGS) とゲノム編集技術を併用する画期的なスクリーニングを採用した (図 1)。この技術を用い、我々は、ヒトゲノム上の全代謝関連遺伝子 (約 3000 遺伝子) を KO できるライブラリーを構築し、卵巣がん細胞株 2 種を用いて、機能的スクリーニングを施行した。そうして我々は、先行スクリーニングとして、es2 細胞の増殖に必須な 119 の代謝遺伝子、CAOV3 細胞の増殖に必須な 42 遺伝子のリストを得ることができた。とても興味深いことに、これら遺伝子リストの一部 (33 遺伝子) はオーバーラップしていた。

以上のような事前検討の結果を踏まえ、本課題では、当該スクリーニングの実施細胞株をさらに追加してデータの拡充を行うとともに、得られたヒット遺伝子について詳細な機能解析を行うことを目的として研究を行った。



3. 研究の方法

既にスクリーニングを実施した CAOV3・es2 細胞に加え、明細胞がん由来細胞株である JHOC5 細胞を用いて同様のスクリーニングを実施した。3 株でのスクリーニングデータを総合し、卵巣がん細胞の増殖・生存にとくに重要な代謝関連遺伝子を選抜した。この遺伝子リストのなかに鉄硫黄クラスター生合成に関与するものが多く含まれていることに着目し、それらのインフォマティクス解析を行った。鉄硫黄クラスター生合成コア複合体サブユニットをコードする FDX2 遺伝子について卵巣がんにおける遺伝子増幅が発覚したため、後半では、卵巣がんの FDX2 要求性についてバリデーション作業をすすめ、さらに遺伝子導入とゲノム編集技術を組み合わせ、FDX2 を誘導欠損させられる細胞の樹立を行った。

4. 研究成果

スクリーニング結果のサマリーを図 2 に示す。先行する CAOV3・es2 細胞での結果に加え、JHOC5 細胞での結果が加わった。JHOC5 細胞では、116 の代謝関連遺伝子が増殖・生存に必須の遺伝子として同定された。3 株での抽出遺伝子の分布・オーバーラップは図 2A のようになっている。2 つ以上の細胞株でオーバーラップが見られたものが 72 遺伝子あり、それらを、MVOC (metabolic vulnerability of ovarian cancer) 72 と命名した。次いで、MVOC72 について STRINGS データベースにてエンリッチメント解析および相互作用マップ作製を行ったところ、図 2B, C に示す結果が得られた。これら解析から、MVOC72 には、いくつかのクラスター (核酸合成、解糖系、電子伝達系、ATPase、鉄硫黄クラスター生合成、メバロン酸経路、糖鎖修飾、等) が存在することが判明した。核酸合成やエネルギー産生系 (解糖系や電子伝達系) が腫瘍細胞の増殖に必須であることは自明であり、本スクリーニング系が正しく機能していることが強く示唆された。また、いずれのクラスターにも属さない多数の遺伝子 (EGLN1, PGP, MOCS3, SLC35B1 等) が、卵巣がん細胞の生存・増殖に必須な遺伝子であることが示唆された。

先行研究の内容も踏まえ、MVOC72 に含まれる機能クラスターのなかから、鉄硫黄クラスター生合成関連因子群に着目した (図 2D)。鉄硫黄クラスターは鉄と硫黄からなる錯体で、種々のタンパク質に配位して重要な補因子としてはたらくことが知られているが、腫瘍生物学上の意義は良く分かっていない。鉄硫黄クラスター生合成を担うコアアッセムブリ複合体の 7 サブユニットのうち、5 サブユニット (NDOR1, FDX2, FDXR, ISCA2, FXN) が MVOC72 に含まれていた。これら 5 遺伝子について、卵巣がん/卵巣上皮腫瘍における遺伝子変異の有無を、TCGA データセットを用いて調べた。5 つの遺伝子のすべてについて、点変異や遺伝子の欠失等は、ほとんどみとめられなかった。一方、FDX2 遺伝子に関しては、卵巣がん症例の約 12% で遺伝子増幅が起きていることが確認された。

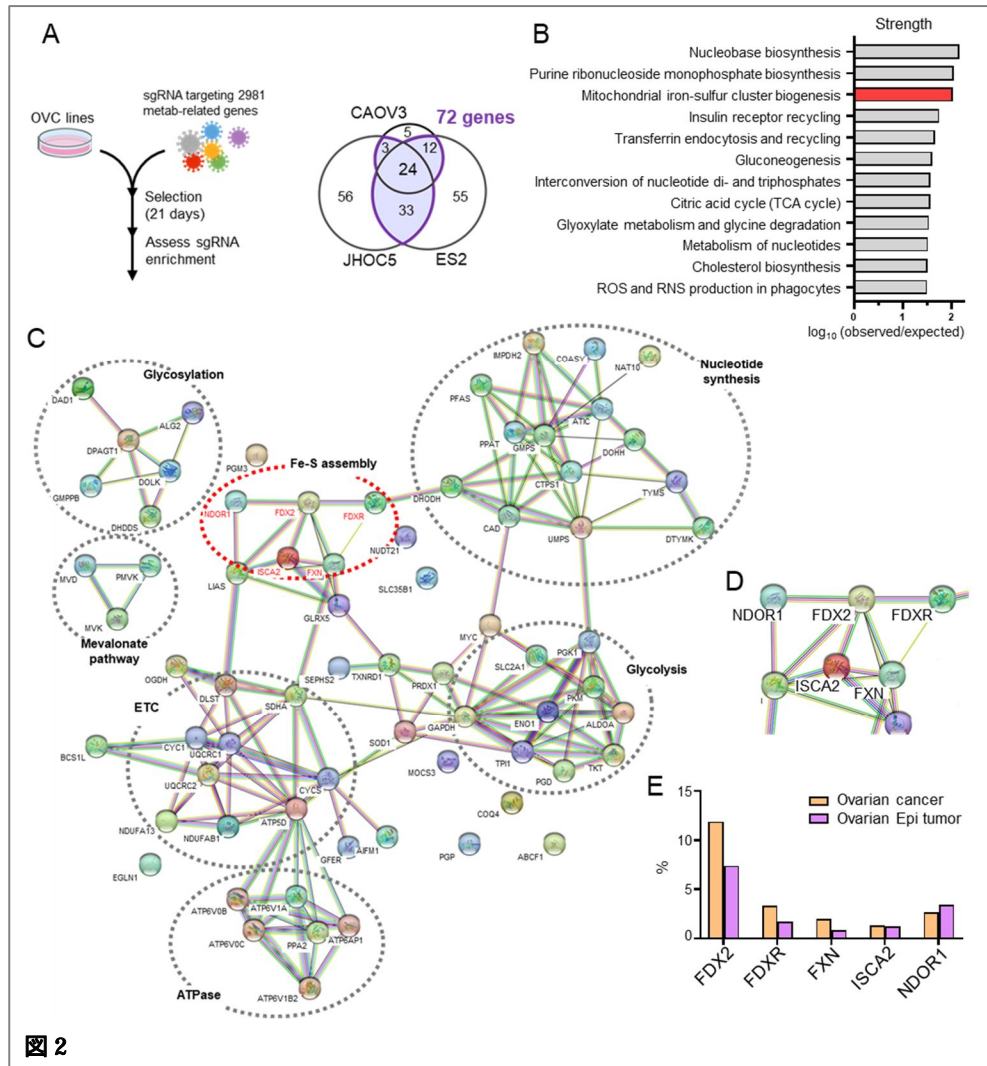


図 2

レンチウイルスベクターを用いた FDX2 遺伝子のゲノム編集(ノックアウト)実験により、FDX2 遺伝子が、JHOC5, CAOV3, es2, A2780, RMG-1, RMG-V 細胞の増殖に必須であることがあらためて確認できた(図 3A)。また、DepMAP データセットを用いた解析から、FDX2 の重要性という点で、特定の組織型との相関はないことが示唆された(図 3B)。

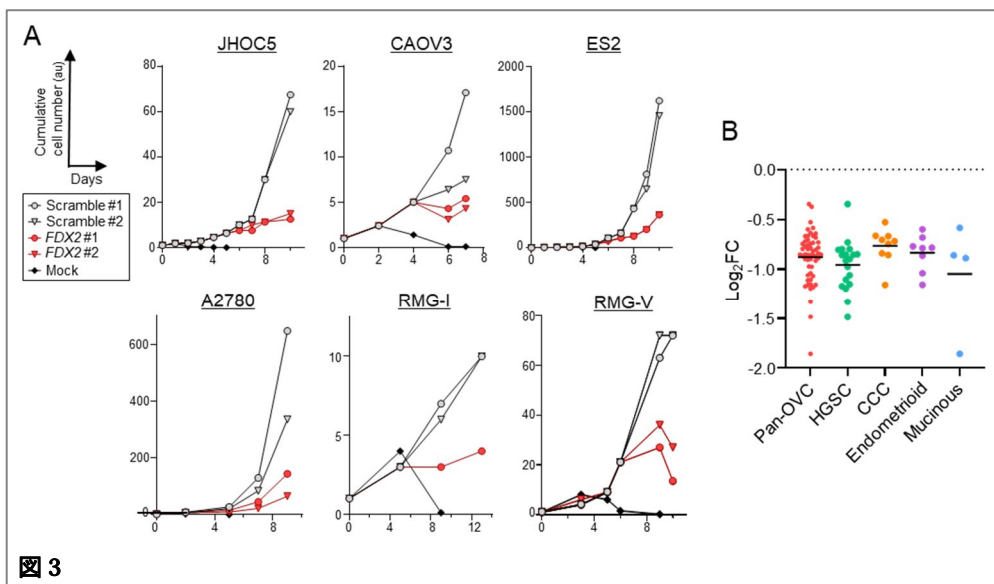


図 3

より詳細な FDX2 機能解析を可能にするため、JHOC5 細胞を親株として、FDX2 の発現を自在に ON/OFF できる細胞の作製を試みた。その目的のため、まず JHOC 細胞に TetON システムを遺伝子導入し JHOC5/TetON 細胞とした。次いでこの細胞に、TRE プロモーターの制御下に外来性 FDX2

を発現できるコンストラクトを遺伝子導入した。このコンストラクトにおける FDX2 cDNA には、次ステップにおけるゲノム編集の標的部位に、FDX2 cDNA にサイレントな塩基置換を導入してある。ドキシサイクリン応答性の外来性 FDX2 発現を確認したのち、ドキシサイクリン存在下で、内在性 FDX2 遺伝子のゲノム編集ノックアウトを行った。その結果、培地からドキシサイクリン除去することによって FDX2 タンパク質の発現が消失する FDX2-inducible KO (iKO)細胞を樹立することが出来た (図 4A)。FDX2-iKO JHOC5 細胞では、ドキシサイクリンの除去により、概ね 4 日以内に FDX2 タンパク質の発現が消失する (図 4B)。この状態で、さらにドキシサイクリンを再添加したところ、FDX2 の発現を回復させることができた (図 4C)。したがって、FDX2-iKO 細胞は、当初の計画通り、ドキシサイクリンの添加有無を通じ FDX2 タンパク質の発現を自在に ON/OFF できる細胞であり、今後の詳細な機能解析において非常に重要なツールとなると考えられた。

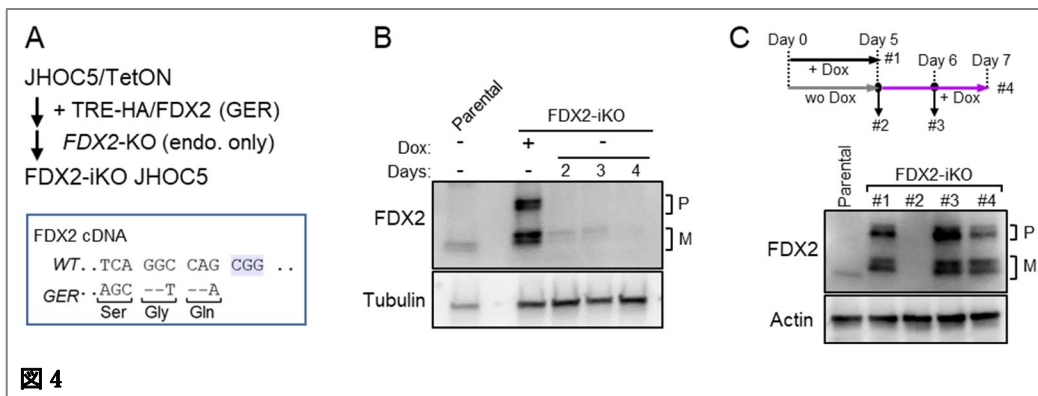


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Minato Takamichi, Ito Shin, Li Bin, Fujimori Haruna, Mochizuki Mai, Yamaguchi Kazunori, Tamai Keiichi, Shimada Muneaki, Tokunaga Hideki, Shigeta Shogo, Sato Ikuro, Shima Hiroshi, Yamada Hidekazu, Yaegashi Nobuo, Yasuda Jun	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 Gynecologic Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 100847 ~ 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 Nomura M, Ohuchi M, Sakamoto Y, Kudo K, Yaku K, Soga T, Sugiura Y, Morita M, Hayashi K, Miyahara S, Sato T, Yamashita Y, Ito S, Kikuchi N, Sato I, Saito R, Yaegashi N, Fukuhara T, Yamada H, Shima H, Nakayama KI, Hirao A, Kawasaki K, Arai Y, Akamatsu S, Tanuma S, Sato T, Nakagawa T and Tanuma N.	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Niacin restriction with NAMPT-inhibition is synthetic lethal to neuroendocrine carcinoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications.	6. 最初と最後の頁 8095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-43630-3	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮原周子、野村美有樹、大内麻衣、山田秀和、田沼延公
2. 発表標題 鉄硫黄クラスター生合成欠損で腫瘍細胞に誘導された、細胞老化様の増殖停止
3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第89回例会・シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮原周子、大内麻衣、野村美有樹、山田秀和、田沼延公
2. 発表標題 鉄硫黄クラスター欠損が卵巣癌細胞株にもたらず、細胞老化様の増殖停止
3. 学会等名 第9回がんと代謝研究会2023 in 松山
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮原周子、徳永英樹、島田宗昭、山田秀和、八重樫伸生、田沼延公
2. 発表標題 CRISPRスクリーニングによる、卵巣癌代謝ターゲットの探索
3. 学会等名 第65回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮原周子、野村美有樹、大内麻衣、林佳代子、山下洋二、徳永英樹、島田宗昭、山田秀和、田沼延公
2. 発表標題 鉄硫黄クラスター生成に異常をきたした細胞の表現型
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮原周子、大内麻衣、野村美有樹、橋本栄文、山下洋二、徳永英樹、島田宗昭、山田秀和、八重樫伸生、田沼延公
2. 発表標題 FDX2欠損は卵巣がん細胞株に細胞老化様の増殖停止または細胞死をもたらす
3. 学会等名 第22回日本婦人科がん分子標的研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nobuhiro Tanuma, Shuko Miya-hara, Miyuki Nomura, Tomoyoshi Soga, Shusuke Akamatsu, Mami Morita, Yoji Yamashita, Hiroshi Shima, Hidekazu Yamada, Taku Sato,
2. 発表標題 NAD dependence of small-cell lung and prostate cancers
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyuki Nomura, Tomoyoshi Soga, Shusuke Akamatsu, Mami Morita, Yoji Yamashita, Hiroshi Shima, Hidekazu Yamada, Taku Sato, Nobuhiro Tanuma
2. 発表標題 Restriction of the dietary niacin enhances NAD-targeting therapy in mice
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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	田沼 延公 (Tanuma Nobuhiro)	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)・がん薬物療法研究部・部長	
	(40333645)	(81303)	

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