

令和 6 年 9 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16819

研究課題名(和文) 卵巣明細胞癌におけるARID1A変異に対するCCNE1の合成致死メカニズムの解明

研究課題名(英文) The investigation in synthetic lethal effect of CCNE1 for ARID1A mutation in ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

河原 直紀 (Kawahara, Naoki)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70623495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ARID1A変異に対する合成致死候補を同定するためにsiRNAスクリーニングを行い、合成致死候補としてCyclin-E1 (CCNE1)を同定した。CCNE1の干渉は、TOV-21GおよびKOC7c (ARID1A変異株)の増殖を低下させたが、RMG-1およびES2 (ARID1A野生株)の増殖は低下させなかった。さらに、in vivoでのCCNE1干渉は、異種移植マウスモデルにおいて腫瘍細胞の増殖を抑制した。本研究により、CCNE1がARID1A変異OCCCの合成致死標的遺伝子であることが初めて示された。この遺伝子を標的とすることは、OCCC治療における新規の抗がん戦略であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞癌は既存の化学療法に抵抗性であり予後不良という特徴がある。今日、合成致死戦略に基づきPARP阻害剤が開発され、高異型度漿液性癌に特徴的な相同組換修復異常を持つ卵巣癌の場合には高い治癒率を誇るが、卵巣明細胞癌においては効果が乏しいのが現状である。更に上皮性卵巣癌に占める明細胞癌の割合は欧米では6-8%と低いものの、本邦では25%以上と高い割合を占めており、本邦においては卵巣明細胞癌を標的とした新たな治療戦略の構築が求められている。我々は卵巣明細胞癌の約半数が変異していると報告されているARID1A遺伝子変異に特異的に効果を発揮する治療ターゲットを同定し効果とメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ovarian clear cell carcinoma (OCCC) is resistant to platinum chemotherapy and is characterized by poor prognosis. We conducted siRNA screening to identify synthetic lethal candidates for the ARID1A mutation; as a result, we identified Cyclin-E1 (CCNE1) as a potential target that affects cell viability. To further clarify the effects of CCNE1, human OCCC cell lines, namely TOV-21G and KOC7c (ARID1A mutant lines), and RMG-1 and ES2 (ARID1A wild type lines) were transfected with siRNA targeting CCNE1 or a control vector. Loss of CCNE1 reduced proliferation of the TOV-21G and KOC7c cells but not of the RMG-1 and ES2 cells. Furthermore, in vivo interference of CCNE1 effectively inhibited tumor cell proliferation in a xenograft mouse model. This study showed for the first time that CCNE1 is a synthetic lethal target gene to ARID1A-mutated OCCC. Targeting this gene may represent a putative, novel, anticancer strategy in OCCC treatment.

研究分野：卵巣癌

キーワード：卵巣癌 明細胞癌 合成致死 ARID1A遺伝子変異 Cyclin-E1 CCNE1

1. 研究開始当初の背景

卵巣明細胞癌は白金製剤を主体とする化学療法に対して抵抗性を示し、予後不良な疾患である。上皮性卵巣癌に占める明細胞癌の割合は欧米では6-8%と低いものの、本邦では25%以上と高い割合を占めている。卵巣癌の治療成績をさらに向上させるには、とりわけ本邦においては、卵巣明細胞癌を標的とした新たな治療戦略の構築が求められる。近年、分子標的薬が次々と開発され、実際に血管新生阻害薬(ベバシズマブ)やPARP阻害薬(オラパリブ)などが卵巣癌治療において保険適応を得て使用されている。とりわけPARP阻害薬は合成致死というユニークな治療戦略に基づいている。BRCA変異を有する細胞はDNAの二本鎖切断に対する相同組み換え修復機構が欠損していて、DNAの一本鎖切断修復酵素のPARPを特異的に阻害することによって修復不可能となり細胞死に陥る。卵巣癌におけるPARP阻害薬の効果は組織型によって異なり、高異型度漿液性癌においては半数程度と高い変異率であるのに対して、卵巣明細胞癌では数%とほとんど認められないために効果が限定的である。これを克服すべく卵巣明細胞癌の約半数が変異を起こしていると考えられるARID1A遺伝子変異に着目した合成致死候補を検索した。ARID1Aとはクロマチンリモデリング因子の1つであるSWI/SNF複合体の構成成分であり、遺伝子の転写制御だけでなく、複製、修復、細胞周期の停止においても重要な機能を果たす癌抑制遺伝子とされている。ARID1A遺伝子変異は様々な癌腫で報告されており、胃癌では27%、肝細胞癌では13%、膀胱癌では13%、食道癌では15%、パーキットリンパ腫では17%と報告されている。とりわけ卵巣癌での変異率は高く、上皮性卵巣癌においては30%程度、明細胞癌に至っては50%程度と極めて高い確率で変異を起こしている。このようにARID1A遺伝子変異特異的に奏功する治療ターゲットを見出すことは卵巣明細胞癌に限らず癌横断的に治療できる可能性も秘めている。

2. 研究の目的

近年、ARID1A遺伝子変異に対する合成致死研究について様々な報告がなされている。例えばPI3K、AKT (Eleftherios P. et. al. Oncotarget 2014 14; 5295-303)、EZH2 (Benjamin G et.al. Nat med 2015 21; 231-8)、HDAC6 (Benjamin G et.al. Nat cell Biol 2017 19; 962-973)、およびSCL7A11 (Ogiwara et.al. Cancer cell 2019 35; 177-190)が報告されているが、ARID1A遺伝子変異に対する合成致死メカニズムは完全には解明されていない。ARID1A遺伝子変異に対する合成致死候補を同定し、ARID1A遺伝子変異下において如何にして合成致死メカニズムを発揮するのかについて明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

卵巣明細胞癌株であり且つARID1A遺伝子野生型株であるRMG-1に対して、5 nMの濃度でARID1A遺伝子干渉を行い、ARID1A遺伝子一過性変異株を作成した。干渉後96時間目にARID1Aタンパクの干渉を確認した(40.8 ± 14.9 vs. 100.0 ± 6.2, p = 0.003)。これを用いてARID1A干渉48時間目を起点としてsi-RNAスクリーニングを行った。スクリーニングにはMTTアッセイを用いて、ARID1Aノックダウン群の細胞生存率がコントロール群よりも有意に低下(p < 0.05)した候補遺伝子を同定した。1回目のスクリーニングで抽出され

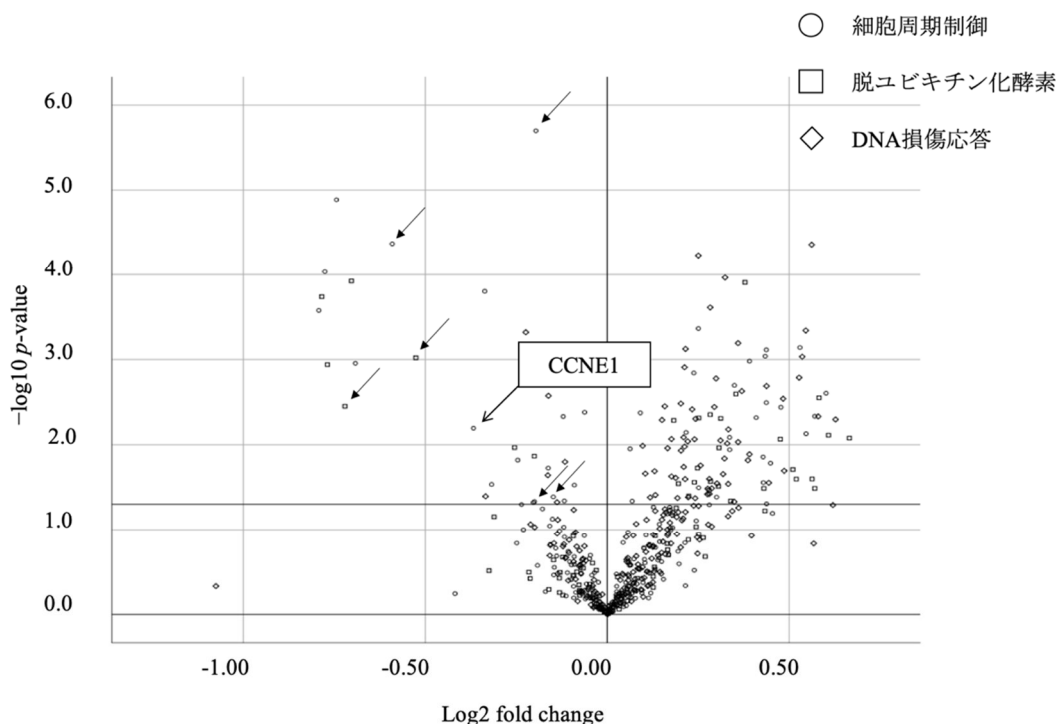


図1. ARID1A干渉下におけるsi-RNAスクリーニング

た候補の中から、さらに確認実験を行い、最終的に7つの候補遺伝子を抽出した(図1)。この中で *Cyclin-E1 (CCNE1)* をターゲットとして、*ARID1A* 遺伝子変異特異的な増殖抑制効果を確認し、細胞周期解析、アポトーシス解析、および動物実験を行った。

4. 研究成果

CCNE1 干渉による ARID1A 遺伝子変異特異的作用

TOV-21G (*ARID1A* 変異型) では、*CCNE1* 干渉 48 時間、72 時間および 96 時間において、対照群と比較して有意に増殖が抑制された (89.5 ± 3.0 vs. 100.0 ± 2.5 , $p < 0.001$; 63.3 ± 3.9 vs. 100.0 ± 5.4 , $p = 0.009$; 62.1 ± 1.3 vs. 100.0 ± 6.6 , $p < 0.001$)。KOC7c (*ARID1A* 変異型) では、*CCNE1* 干渉したものは対照群と比較して、72 時間および 96 時間において時間依存的に増殖の抑制を示した (58.9 ± 4.8 vs. 100.0 ± 4.7 , $p < 0.001$; 56.6 ± 3.1 vs. 100.0 ± 6.6 , $p < 0.001$)。一方、RMG-1 (*ARID1A* 野生型) では、*CCNE1* 干渉したものではコントロール群と比較して細胞増殖の有意な低下は認められなかった。ES2 (*ARID1A* 野生型) では、96 時間目にも、*CCNE1* 干渉群で増殖の減少を示した (92.9 ± 2.1 vs. 100.00 ± 4.6 , $p = 0.014$) (図2)。 *CCNE1* の干渉効果を確認するため、RT-PCR 法によって mRNA 発現レベルを評価した。その結果、*CCNE1* の mRNA レベルは十分に抑制されていることを確認した。次に、*CCNE1* タンパク質発現レベルを評価した。すべての細胞種において *CCNE1* 干渉群は 48 時間および 72 時間において、対照群と比較してタンパク質発現の減少を示した。

ARID1A 遺伝子変異細胞株に対する CCNE1 干渉による細胞周期に対する作用

TOV-21G の細胞周期とアポトーシスを評価した。 *CCNE1* を干渉すると、48 時間後および 72 時間後に、コントロール群と比較して sub-G1 期が増加する傾向が見られた (9.5 ± 4.6 vs. 8.5 ± 5.4 , $p = 0.819$; 19.2 ± 11.5 vs. 8.4 ± 2.5 , $p = 0.186$)。S 期では減少した (22.1 ± 2.6 vs. 25.8 ± 4.4 , $p = 0.283$; 18.8 ± 3.3 vs. 24.0 ± 1.4 , $p = 0.066$) (図3)。

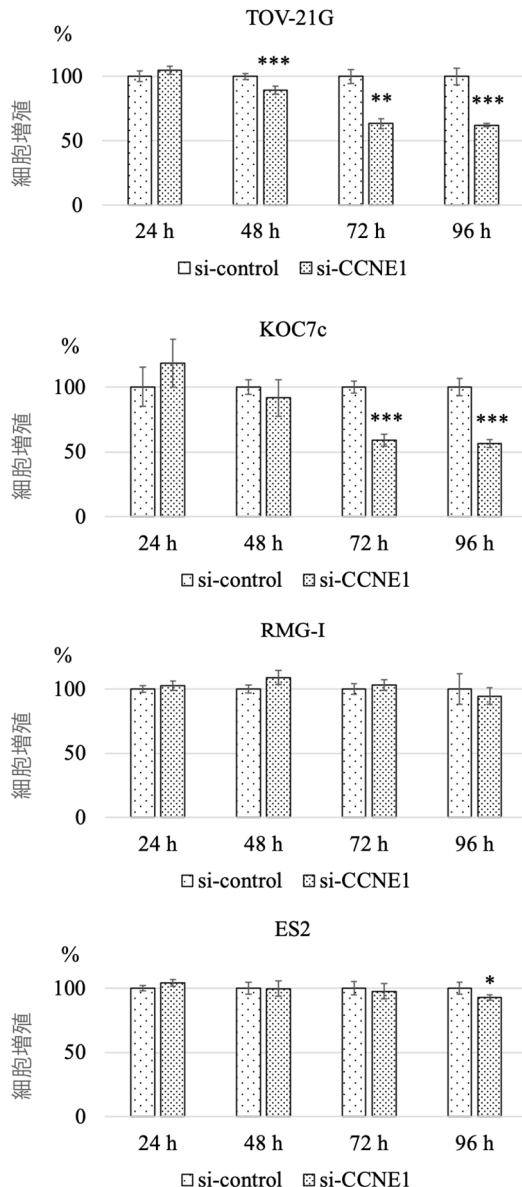


図2. *ARID1A* 遺伝子変異株特異的な *CCNE1* 干渉の細胞増殖抑制効果

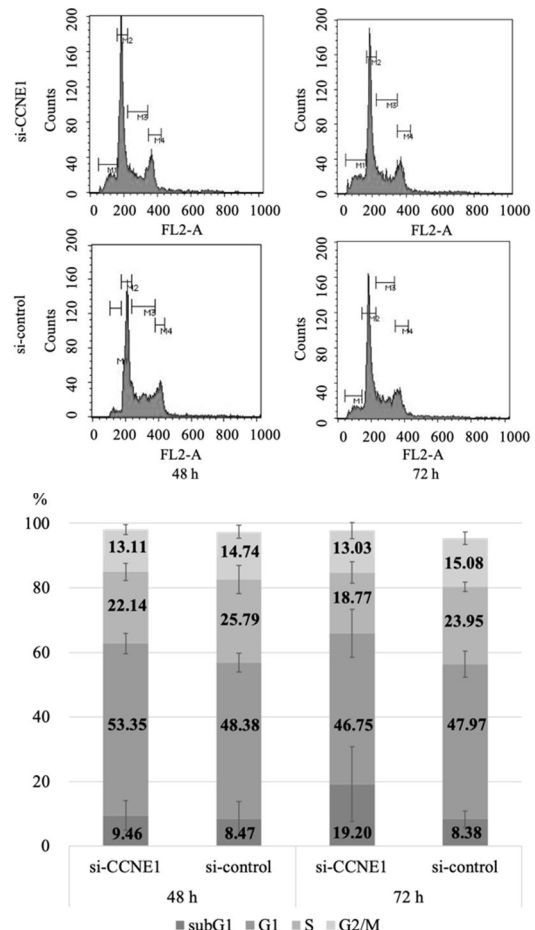


図3. *ARID1A* 遺伝子変異株である TOV-21G に対する *CCNE1* 干渉時の細胞周期

さらに、トランスフェクションから 48 時間後のアポトーシスアッセイでは、初期と後期アポトーシス細胞の割合が、対照群と比較して *CCNE1* 干渉群で有意に増加した (28.2 ± 3.7 vs. 34.6 ± 1.1 , $p = 0.045$) (図 4)。

ARID1A 一過性変異株に対する *CCNE1* 干渉の細胞増殖抑制試験

10nM での *ARID1A* の干渉は、48 時間および 96 時間の両方で、5nM よりも効果的なタンパク量減少を示した。*CCNE1* の干渉が *ARID1A* 欠損状態に対して選択的効果を示すことを確認するために、si-*ARID1A* (5nM または 10nM) および si-control を用いて ES2 および RMG-1 (*ARID1A* 野生型) に干渉し、最初のノックダウンから 48 時間後に、これらの細胞に 5nM または 10nM の si-*CCNE1* をトランスフェクションした。この二次トランスフェクション時間を 0h とし、IncuCyte ZOOM™ で細胞増殖を時系列的に長時間測定した。観察継続時間は ES2 は 72 時間、RMG-1 は 108 時間であった。これらのアッセイの終点において、*CCNE1* を干渉 (5nM) した、ES2 (*ARID1A* 干渉 [5nM]) および RMG-1 (*ARID1A* 干渉 [10nM]) は、コントロール群と比較して有意な細胞増殖抑制を示した (98.3 ± 1.3 vs. 83.8 ± 8.1 , $p = 0.034$; 96.1 ± 3.9 vs. 57.9 ± 5.1 , $p < 0.001$)。さらに、*CCNE1* を干渉 (10nM) した、ES2 および RMG-1 は、5 nM または 10 nM での *ARID1A* 干渉において、対照群と比較して有意な細胞増殖抑制を示した (75.0 ± 7.6 および 76.6 ± 2.4 対 98.4 ± 1.6 , $p = 0.004$ および $p < 0.001$; 53.1 ± 12.2 および 55.7 ± 5.1 対 97.3 ± 3.6 , $p = 0.002$ および $p < 0.001$) (図 5)。

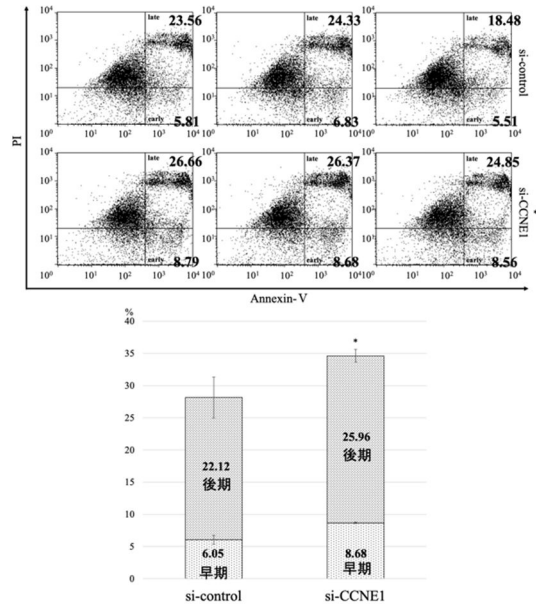


図4. *ARID1A* 遺伝子変異株である TOV-21G に対する *CCNE1* 干渉時のアポトーシスアッセイ

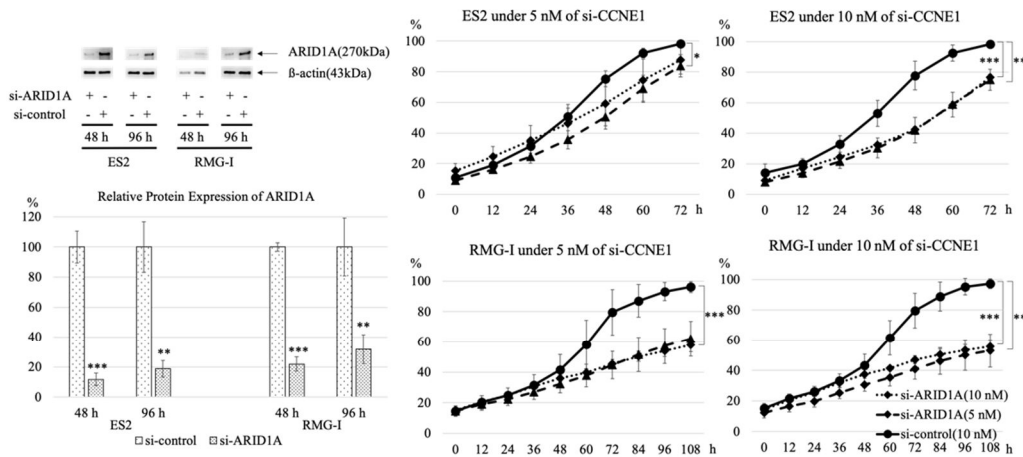


図5. *ARID1A* 遺伝子一過性変異株に対する *CCNE1* 干渉による細胞増殖抑制試験

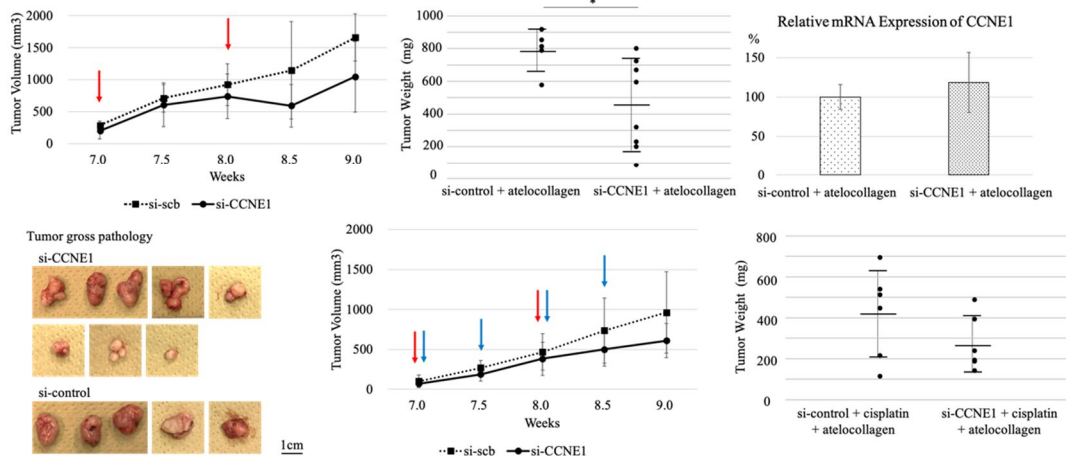


図6. *ARID1A* 遺伝子変異株移植モデルに対する in vivo *CCNE1* 干渉の有効性試験

ARID1A 遺伝子変異株移植モデルにおける生体内 *CCNE1* 干渉の

CCNE1 の干渉が腫瘍増殖抑制効果を示すかどうかを調べるため、異種移植マウスモデルを用いて実験を行った。まず 4.5×10^6 (個/200 μ L の PBS 中) の TOV-21G を、5~6 週齢の胸腺欠損ヌードマウスの背側正中線の頸部に皮下注射した(コントロールとして 5 匹、ターゲット群として 8 匹)。腫瘍触知可能時点から、アテロコラーゲンを含む si-*CCNE1* とアテロコラーゲンを含む si-control を 1 週間に 1 回、2 回に分けて皮下投与した。犠牲死させた後に腫瘍重量を測定したところ、si-*CCNE1* 群はコントロール群よりも有意に腫瘍増殖が減少したことが示された (452.8 ± 274.6 vs. 789.9 ± 129.0 , $p = 0.013$)。 *CCNE1* の効果的な in-vivo 干渉を確認するために、mRNA を腫瘍から抽出し、RT-PCR で評価した。コントロール群と *CCNE1* 干渉群との間に差はなかった (100.0 ± 15.7 対 118.5 ± 38.2 , $p = 0.28$)。さらに、*CCNE1* 干渉がシスプラチン (60 μ g/kg) などの抗がん剤と相乗効果を示すかどうかを評価するため、in vivo の併用アッセイを行った。*CCNE1* 群にシスプラチン (60 μ g/kg) 投与した群は、コントロールにシスプラチン (60 μ g/kg) を投与した群と比較して腫瘍重量が減少する傾向を示したが有意差はなかった (274.3 ± 136.4 対 420.6 ± 216.4 , $p = 0.191$) (図 6)。

5. 結論と考察

今回の研究では、*CCNE1* の干渉は、*ARID1A* 変異細胞株に対してだけでなく発現を低下させた *ARID1A* 野生型細胞株でも細胞増殖抑制効果を示した。また、*CCNE1* の生体内干渉は、*ARID1A* 変異型である TOV-21G 異種移植マウスモデルに対して腫瘍増殖抑制効果を示した。これらの結果は、*CCNE1* の干渉が、*ARID1A* のダウンレギュレーションまたは変異した腫瘍細胞に対して選択的な効果を持つ可能性を示唆している。異種移植マウスモデルから得られた腫瘍の *CCNE1* 干渉が確認できなかった理由は、自然免疫系に関連する T 細胞や NK 細胞を介して、生体内環境に影響される可能性があり、生体内干渉された細胞がすぐに貪食されてしまった可能性が考えられる。本研究により、*CCNE1* が *ARID1A* 変異 OCCC の合成致死標的遺伝子であることが初めて示された。この遺伝子を標的とすることは、OCCC における新規の抗がん戦略になりうると考えられる。

当研究は International Journal of Molecular Sciences に投稿した内容である。

参照 : Kawahara N, Yamada Y, Kobayashi H. *CCNE1* Is a Putative Therapeutic Target for *ARID1A*-Mutated Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2021 May 30;22(11):5869. doi: 10.3390/ijms22115869. PMID: 34070839; PMCID: PMC8198755.

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 6件）

1. 著者名 Kawahara N, Kawaguchi R, Maehana T, Yamanaka S, Yamada Y, Kobayashi H, Kimura F.	4. 巻 10(11)
2. 論文標題 The Endometriotic Neoplasm Algorithm for Risk Assessment (e-NARA) Index Sheds Light on the Discrimination of Endometriosis-Associated Ovarian Cancer from Ovarian Endometrioma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines.	6. 最初と最後の頁 2683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10112683.	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 Kawahara N, Kawaguchi R, Waki K, Maehana T, Yamanaka S, Yamada Y, Kimura F.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 The prognosis predictive score around primary debulking surgery (PPSP) improves diagnostic efficacy in predicting the prognosis of ovarian cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 22636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-27333-1.	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 Kawahara Naoki, Yamada Yuki, Kobayashi Hiroshi	4. 巻 22
2. 論文標題 CCNE1 Is a Putative Therapeutic Target for ARID1A-Mutated Ovarian Clear Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5869 ~ 5869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115869	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 Yamanaka Shoichiro, Kawahara Naoki, Kawaguchi Ryuji, Waki Keita, Maehana Tomoka, Fukui Yosuke, Miyake Ryuta, Yamada Yuki, Kobayashi Hiroshi, Kimura Fuminori	4. 巻 12
2. 論文標題 The Comparison of Three Predictive Indexes to Discriminate Malignant Ovarian Tumors from Benign Ovarian Endometrioma: The Characteristics and Efficacy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1212 ~ 1212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics12051212	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 Kawahara Naoki, Miyake Ryuta, Yamanaka Shoichiro, Kobayashi Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 A Novel Predictive Tool for Discriminating Endometriosis Associated Ovarian Cancer from Ovarian Endometrioma: The R2 Predictive Index	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3829 ~ 3829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13153829	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 Ogawa Kenji, Liu Tingting, Kawahara Naoki, Kobayashi Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Macrophages Protect Endometriotic Cells Against Oxidative Damage Through a Cross-Talk Mechanism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43032-022-00890-6	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大須賀穰、甲賀かをり	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 304
3. 書名 子宮内膜症・子宮腺筋症—診断アトラス&新たな治療戦略	

〔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
---------	---------