

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15706

研究課題名(和文) In vivo機能ゲノミクススクリーニングによる卵巣がん腹膜播種メカニズムの解明

研究課題名(英文) In vivo functional genomics screen reveals mechanism of peritoneal dissemination in ovarian cancer

研究代表者

小西 郁生 (Konishi, Ikuo)

京都大学・医学研究科・名誉教授

研究者番号：90192062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト遺伝子を標的としたshRNAライブラリーを安定発現するヒト卵巣癌細胞株を作成した。この細胞株を用いて、発現抑制によりanoikis耐性に関与する遺伝子の同定に成功し、そのひとつ、ABHD2について、機能実験を行い、シスプラチン耐性との関連を見出した。また、発現抑制によりHoechst 33342の高い排出能をもつSide Population細胞が増加する遺伝子を同定した。この遺伝子について、発現抑制株はスフィア形成能などの幹細胞形質を獲得していることを機能実験で示した。

研究成果の概要(英文)：A library of 81 000 shRNAs targeting 15 000 human genes was stably transfected to ovarian cancer cell lines. By functional screening of these cancer cells, we screened genes that are responsible for anoikis resistance when down-regulated. One of the screened genes was ABHD2, which was functionally related to cisplatin resistance. Furthermore, we identified genes that increase Side Population cells when down-regulated. Side Population cells are defined as cells which have ability to efflux Hoechst 33342. Down-regulation of these genes were related to cancer stemness phenotype.

研究分野：産婦人科

キーワード：卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

卵巣がん患者は本邦で年々増加している。卵巣がんはその解剖学的特徴から、腹膜播種により卵巣外へ進展することが多く、診断時にはすでに広範囲の腹膜播種を有している症例が多い。抗癌剤と手術を組み合わせた初回治療で寛解した後、再発するときにも、腹膜播種として再発することが多い。しかしながら、卵巣がんの腹膜播種の分子生物学的メカニズムについてはほとんどわかっておらず、腹膜播種の責任分子を標的とした治療法も存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、包括的な *in vivo* 機能ゲノムスクリーニングにより、卵巣がん腹膜播種の責任分子の探索と評価を行うことを目的とする。卵巣がん腹膜播種のメカニズムを解明し、新規分子標的療法の開発や、予後予測マーカー、治療反応予測マーカーなどの同定につなげる。最終的には、予後不良の卵巣がんの新規治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

In vivo での shRNA ライブラリーを用いた包括的遺伝子機能スクリーニング：shRNA ライブラリーを 293FT 細胞に transfection させて産生されたレンチウイルスをマウス卵巣がん細胞株である HM-1 や ID8 に添加して、shRNA ライブラリーを stable transfection する。その HM-1 や ID8 を免疫正常の野生型マウスに腹腔内投与し、生じた腹膜播種腫瘍を回収し、腫瘍細胞をソーティングして 96 穴培地に蒔いてコロニー分離し、DNA を抽出して、shRNA/bar-code 配列を PCR で増幅し、シーケンシングを行い、shRNA を同定する。この方法により、遺伝子発現抑制をすることにより腹膜播種性転移をおこしやすくなる機能遺伝子をスクリーニングする。

ヒト遺伝子をターゲットとした shRNA ライブラリーを安定発現するヒト卵巣がん細胞株の作成：shRNA ライブラリーを 293FT 細胞に transfection させて産生されたレンチウイルスをヒト卵巣がん細胞株 OVCA420 や CH1、SKOV3 に stable transfection する。

発現抑制により anoikis 耐性に関与する遺伝子の同定：上記で得られた OVCA420 を soft agar 培地で培養しコロニー分離し、DNA を抽出して、shRNA/bar-code 配列を PCR で増幅し、シーケンシングを行い、shRNA を同定することで、遺伝子発現抑制をすることにより anoikis 耐性を獲得する機能遺伝子をスクリーニングする。

発現抑制により Hoechst 33342 の高い排出能をもつ Side Population 細胞が増加する遺伝子の同定：上記で得られたヒト卵巣がん細胞株 CH1 と SKOV3 のフローサイトメトリーによる side population 解析を行って、side population 細胞をソーティングすることを繰り返す。この side population 細胞から DNA を抽出して、shRNA/bar-code 配列を PCR で増幅し、シーケンシングを行い、shRNA を同定することで、遺伝子発現抑制をすることにより Side Population 細胞を増加させる遺伝子をスクリーニングする。

スクリーニングで得られた遺伝子の発現抑制による再現性の確認：スクリーニングで得られた遺伝子を標的とした shRNA を作成し、これをもとの細胞株 OVCA420、CH1、SKOV3 に transfection することにより作成した遺伝子発現抑制細胞株を用いて、anoikis 耐性や Side Population 増加が再現されるかどうかを確認する。

スクリーニングで得られた遺伝子の発現抑制卵巣がん細胞株の機能実験：上記遺伝子の発現抑制卵巣がん細胞株を用いて、抗がん剤に対する感受性や、スフィア形成能、*in vivo* tumorigenicity といった悪性形質の有無を調べる。具体的には、シスプラチン感受性を WST アッセイで測定し、IC50 値を測定する。また、3 次元培養により、スフィア形成能があるかどうかを調べる。また、少数の細胞を免疫抑制マウスの皮下に接種し、腫瘍形成能が変化していることを確認する。

スクリーニングで得られた遺伝子の卵巣がん臨床検体における発現の解析：スクリーニングで得られた遺伝子が実際の卵巣がん臨床検体において発現しているかどうか、また、発現と臨床情報の間に関連があるかどうかを調べる。具体的には、卵巣がん遺伝子発現データセットを *in silico* で解析して、全生存期間や無増悪生存期間などの臨床情報との関連があるかどうかを調べる。また、スクリーニングで得られた遺伝子の code しているタンパクの抗体が入手可能である場合には、臨床検体のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて、免疫染色を行い、臨床情報との関連を調べる。

4. 研究成果

レンチウイルスベクターに組み込まれた、マウス遺伝子をターゲットとした shRNA ライブラリーを 293FT 細胞に感染させることで、レンチウイルスを産生させた。このレンチウイルスを MOI 1 程度の濃度でマウス卵巣がん細胞株へ感染させることにより、安定した遺伝子導入を行った。この細胞株を同系マウスの腹腔内に接種してできた腹膜播種腫瘍を回

収したが、腹膜播種組織内の腫瘍細胞をソーティングしてクローニングしたところ、shRNA 配列が含まれていなかった。レンチウイルスの MOI を上げると一つの細胞に複数の shRNA が導入されるため、低い MOI を保つことが必要である一方、MOI を低く保つとどうしても shRNA ライブラリーを含まない(レンチウイルスが感染していない)細胞が多くなる。本結果により、免疫正常マウスの in vivo ではレンチウイルスが感染していない細胞が生存に有利であることが示唆された。反復しても同じ結果であったため、マウスの in vivo でのゲノミクススクリーニングは断念した。一方で、ヒト遺伝子をターゲットとした shRNA ライブラリーを 293FT 細胞に感染させ、産生させたレンチウイルスを用いて、複数のヒト卵巣がん細胞株に遺伝子導入を行うことができた。この結果、shRNA ライブラリーを安定発現するヒト卵巣がん細胞株を複数作成することができた。そこで、この shRNA を遺伝子導入したヒト卵巣がん細胞株を soft agar 培地で培養しコロニー分離することで、発現抑制により anoikis 耐性に関する遺伝子を同定することに成功した。その anoikis 耐性遺伝子のひとつ、ABHD2 について、機能実験を行い、シスプラチン耐性との関連を見出した。免疫染色およびマイクロアレイデータセットの解析によると、卵巣がん臨床検体における ABHD2 の発現低下は、プラチナ製剤耐性と予後不良に関連していた。以上の成果は論文として報告した。また、同様の手法でヒト卵巣がん細胞株を用いて、発現抑制により Hoechst 33342 の高い排出能をもつ Side Population 細胞が増加する 6 つの遺伝子を同定した。Side Population 細胞は癌幹細胞の形質の一つと考えられている。これらの 6 つの遺伝子について、それぞれ shRNA により発現抑制株を作成し、コントロール株と比較して、抗がん剤抵抗性やスフィア形成能や in vivo tumorigenicity といった幹細胞形質を獲得していることを複数の機能実験で示した。この成果については現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Koji Yamanoi, Noriomi Matsumura, Susan K Murphy, Tsukasa Baba, Kaoru Abiko, Junzo Hamanishi, Ken Yamaguchi, Masafumi Koshiyama, Ikuo Konishi, Masaki Mandai. Suppression of ABHD2, identified through a functional genomics screen, causes anoikis resistance, chemoresistance and poor prognosis in ovarian cancer、Oncotarget、査読有、26; 7(30):

47620-47636、2016

DOI: 10.18632/oncotarget.9951

松村謙臣、小西郁生、「卵巣高異型度漿液性腺癌のゲノム研究」、産婦人科の進歩、査読なし、68 巻 1 号 2016 p.48-50

松村謙臣、「卵巣腫瘍・類腫瘍」、SRL 宝函、査読なし、37 巻 4 号 2017 p.18-26

松村謙臣、「卵巣癌のゲノム解析に基づく個別化治療の展望」、産婦人科の実際、査読なし、65 巻 12 号 2016 p.1625-1631

松村謙臣、山口建、村上隆介、万代昌紀、小西郁生、「卵巣癌のゲノム解析と個別化治療の展望」、癌と化学療法、査読なし、43 巻 1 号 2016 p. 1316-1320

[学会発表](計 4 件)

山ノ井康二、「機能的ゲノミクススクリーニングによる、卵巣癌の side population 分画を制御する因子の探索」、第 22 回生殖医学フォーラム 平成 29 年 6 月 9 日-10 日 石川県加賀市山代温泉

松村 謙臣、特別講演「卵巣癌のゲノム解析」、第 3 回新潟産婦人科シンポジウム、平成 28 年 10 月 9 日、有壬記念館、新潟市

山ノ井康二、松村謙臣、安彦郁、山口建、濱西潤三、馬場長、越山雅文、小西郁生、英語口演「機能的ゲノミクススクリーニングによる、卵巣癌の side population(SP) 分画を制御する 6 遺伝子の同定」、第 75 回日本癌学会学術総会、平成 28 年 10 月 6 日~8 日、パシフィコ横浜、横浜市

Koji Yamanoi, Noriomi Matsumura, Kaoru Abiko, Ken Yamaguchi, Junzo Hamanishi, Tsukasa Baba, Masafumi Koshiyama, Ikuo Konishi, "Identification through a functional genomics screen of

factors whose down-regulation enhances the cancer stem cell population in ovarian cancer"、第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 28 年 4 月 21 日～24 日、東京国際フォーラム、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 郁生 (KONISHI, Ikuo)
京都大学・大学院医学研究科・名誉教授
研究者番号： 90192062

(2) 研究分担者

松村 謙臣 (MATSUMURA, Noriomi)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号： 20452336

安彦 郁 (ABIKO, Kaoru)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号： 20508246

濱西 潤三 (HAMANISHI, Junzo)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号： 80378736

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者
なし