

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11268

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌におけるChIPシーケンスを用いた網羅的解析と新規エピゲノム創薬

研究課題名(英文) Comprehensive analysis and novel epigenomic drug discovery using ChIP sequence in ovarian clear cell adenocarcinoma.

研究代表者

曾根 献文 (SONE, KENBUN)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90598872

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)：卵巣癌の中で本邦に多く、薬剤耐性である卵巣明細胞癌(Ovarian Clear Cell carcinoma：OCCC)においてヒストンメチル化酵素が治療標的となりうるかを検討した。卵巣明細胞癌組織において2種類のヒストンメチル化酵素(WHSC1, SMYD2)の発現亢進が認められた。WHSC1とSMYD2をノックダウンすると細胞増殖抑制が認められた。この事からWHSC1、SMYD2は卵巣明細胞癌の治療標的となりうることを示された。次に臨床検体に対応したロボティクス技術を利用した次世代型ChIP-seq法のプロトコール開発を行った。今後OCCC臨床検体を用いた大規模研究を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒストンメチル化は癌治療のトピックにも関わらず、婦人科癌においては研究が進んでいない状況である。よってOCCCに対するヒストンメチル化酵素を標的とした新規エピゲノム創薬につなげる研究を行う事が目的であり、本研究において上記が達成されたと考える。また今までChIP-seq法は細胞株における解析が主な適応であったが、本研究で臨床検体を使用した次世代型ChIP-seq法を開発した。この解析法は本研究独自のものであり、今後この分野でリードできると考える。

研究成果の概要(英文)：Among ovarian cancers, ovarian clear cell carcinoma (OCCC) is prevalent in Japan, and is chemo-resistant. In this study, we investigated whether histone methyltransferases could be a therapeutic target for OCCC. Overexpression of two histone methyltransferases (WHSC1, SMYD2) was observed in OCCC tissues compared with normal ovarian tissues. Knockdown of WHSC1 and SMYD2 suppressed cell proliferation. A histone methyltransferase EZH2 was also found to regulate WHSC1, and knockdown of SMYD2 induced apoptosis in OCCC cell lines. This suggests that WHSC1 and SMYD2 could be therapeutic targets for ovarian clear cell carcinoma. Next, the protocol development of the next generation ChIP-seq method using the robotics technology for the clinical specimen was carried out. The large-scale research using OCCC clinical sample will be carried out in future.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：ヒストンメチル化酵素 卵巣癌 ChIP-seq 実験ロボット

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科癌の中で最も予後不良である。卵巣癌の中では漿液性腺癌が最多（全体の約 50%）であり、多くの臨床試験が行われているが非漿液性腺癌に有効な分子標的薬は未だ確立されていない。特に明細胞癌（Ovarian Clear Cell carcinoma：OCCC）は欧米で 5%と低頻度であるのに対し、日本では卵巣癌の約 24%を占め、抗癌剤耐性であり予後不良である。OCCC は卵巣内膜症性嚢胞を発生母地として多段階的に発癌することより、出産年齢の高齢化・子宮内膜症の増加に伴い、本邦では今後さらに OCCC の罹患率・死亡者数が増加していくと懸念される。

ヒストンメチル化はエピジェネティックスの主要因子であり、ヒストンメチル化酵素/脱メチル化酵素がそれを司り、遺伝子発現を調節している。様々な癌腫でヒストンメチル化酵素/脱メチル化酵素の発現の亢進が報告され、ヒストンメチル化酵素と脱メチル化酵素の均衡の破壊が癌の進展と密接に関わっていることが明らかとなった。またヒストンメチル化酵素、脱メチル化酵素の特異的阻害剤が開発され、複数の癌腫で臨床試験が進行中であるが、卵巣癌をはじめとする婦人科癌においては行われていない。

2. 研究の目的

ヒストンメチル化は卵巣癌においても注目されつつあり、クロマチンリモデリング因子である ARID1A 変異の OCCC 細胞株ではヒストンメチル化酵素 EZH2 の阻害が合成致死的に働く事が報告されている (Bitler BG et al, Nature Medicine 2015)。上記よりヒストンメチル化酵素、脱メチル化酵素が OCCC を対象とした新規治療法となり得ると考えた。

ヒストンメチル化/脱メチル化酵素は癌治療のトピックにも関わらず、婦人科癌においては研究が進んでいない状況である。よって OCCC に対するヒストンメチル化酵素/脱メチル化酵素を標的とした新規エピゲノム創薬につなげる研究を行う事が目的である。また OCCC においてヒストンメチル化酵素、脱メチル化酵素の発現の亢進が下流遺伝子に対してどのように作用しているか解明されていない。本研究の独創的な点は ChIP シークエンス法を用いて OCCC におけるエピジェネティックスから見た癌化メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

I. OCCC における治療標的遺伝子(ヒストンメチル化酵素)の絞り込み

ヒストンメチル化酵素の中で様々な癌腫において、発現の亢進が報告されている計 10 種類の遺伝子を候補遺伝子とし以下の研究を行う。

(1) OCCC 細胞株、臨床組織検体におけるヒストンメチル化酵素/脱メチル化酵素の発現解析
OCCA 細胞株 10 種類、OCCA 手術検体 40 検体において上記の遺伝子に関する発現解析を行う。解析方法はリアルタイム PCR、免疫組織染色を施行し、正常卵巣不死化細胞株、正常卵巣検体との比較を行う。また最も多い組織型である卵巣漿液性腺癌にも適応を拡大する。

(2) ノックダウン法を用いた OCCA 細胞株における細胞増殖試験

OCCA 細胞株種類に(1)で同定した候補遺伝子を siRNA 法によりノックダウンする。ノックダウン後に MTT アッセイ法により増殖試験を行い、その活性を抑える事により増殖が抑制される遺伝子を同定する。

II:実験ロボット”まほろ”を用いた、臨床検体に対応した次世代型 ChIP-seq 法の開発について
現状の ChIP-seq 法は細胞株における解析が主な適応であるのに対して、臨床検体を用いた ChIP-seq 法には以下のような問題点がある。問題点 1:臨床検体(FFPE 検体、新鮮凍結検体)に対応したプロトコールが確立されていない。問題点 2:ChIP-seq 法は実験手順が煩雑であるため、実験手技の個人差が出やすいことが挙げられる。以上のことから現時点での ChIP-seq 法では臨床検体を用いた大規模研究には対応できない。そこで我々は臨床検体に対応する次世代 ChIP-seq 法の開発を目指した。

4. 研究成果

まず卵巣明細胞癌について検討を行った。卵巣明細胞癌組織において正常卵巣組織と比較して、2 種類のヒストンメチル化酵素(WHSC1,SMYD2)の発現亢進が認められた。その WHSC1 と SMYD2 をノックダウンすると細胞増殖抑制が認められた。また EZH2 をノックダウンすると WHSC1 の減少が認められたことから、EZH2 が WHSC1 を調節している事がわかった。また SMYD2 をノックダウンするとアポトーシスの誘導が認められた。このことから WHSC1、SMYD2 は卵巣明細胞癌の治療標的となりうる事が示された。上記の結果より卵巣明細胞癌においてヒストンメチル化酵素が治療標的になりうる事が示された。次に卵巣高異型度漿液性癌について検討を行った。正常卵巣組織と比較して、9 種類のヒストンメチル化酵素の発現亢進が認められた。その中でヒストンメチル化酵素 SMYD2 は PRAP をメチル化し、その活性を上昇させることが報告されている。そのメカニズムを利用して、SMYD2 阻害剤と PARP 阻害剤オラパリブの併用効果を検討したところ、有意差をもって SMYD2 阻害剤の上乗せ効果が認められた。このことから SMYD2 阻害剤は卵巣高異型度漿液性癌の治療標的になりうる事が示された。

次に臨床検体を用いた次世代型 ChIP-seq 法の開発を目指した。臨床検体の中で FFPE 検体の ChIP-seq は一番困難だと考えられているが、2016 年 Nature Medicine 誌で Cejas らが FFPE からの ChIP-seq 法に成功した事を報告した。ただこの ChIP-seq 法はいくつか問題点があり、改良の余地があると考えた。そこで我々は国立がんセンター(浜本隆二分野長:研究室)と共同研究により臨床検体に対応した ChIP-seq 法の標準化へ向けて新しいプロトコールを開発した。このプロトコールは、既報のプロトコールよりも 10 分の 1 程度のサンプル量での ChIP-seq 法を可能にした。またヒストン修飾だけでなく転写因子の ChIP-seq 法に対応できるようになった点も特徴の 1 つである。このプロトコールを用いて卵巣明細胞癌・FFPE 検体を用いて ChIP-seq 法を行った。転写活性マーカーである H3 リジン 4 番目のメチル化の CHIP-seq 法を行ったところ、濃縮された遺伝子シグナルが認められ、転写開始点付近にピークが認められた。この結果により卵巣明細胞癌 FFPE 検体による ChP-seq 法に成功したといえる。しかし ChIP-seq 法のもう 1 つの問題点として、検体数が増えると、実験手順が煩雑であるため、実験手技の個人差が出やすいということが挙げられる。我々は、その問題点の解決のため、東京医科歯科大学(浅原 弘嗣教授:研究室)との共同研究汎用ヒト型ロボットまほろを使用した ChIP-seq 法を行った。まほろは人間を模倣した実験手技が可能で、高い再現性・正確性を有す。このまほろを使った臨床検体の ChIP-seq 法。これは全癌腫を通じて世界初の解析法であり、この解析法を我々は次世代型 ChIP-seq 法と名付けた。この次世代 ChIP-seq 法を使い、癌におけるヒストン修飾の全体像を解明することは、エピゲノム研究のブレイクスルーにつながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 0件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Akino Nana, Wada-Hiraike Osamu, Isono Wataru, Terao Hiromi, Honjo Harunori, Miyamoto Yuichiro, Tanikawa Michihiro, Sone Kenbun, Hirano Mana, Harada Miyuki, Hirata Tetsuya, Hirota Yasushi, Koga Kaori, Oda Katsutoshi, Fujii Tomoyuki, Osuga Yutaka | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Activation of Nrf2/Keap1 pathway by oral Dimethylfumarate administration alleviates oxidative stress and age-associated infertility might be delayed in the mouse ovary | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Reproductive Biology and Endocrinology | 6. 最初と最後の頁 23 23 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12958-019-0466-y | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Kawata Yoshiko, Nagasaka Kazunori, Matsumoto Yoko, Oda Katsutoshi, Tanikawa Michihiro, Sone Kenbun, Mori-Uchino Mayuyo, Tsuruga Tetsushi, Arimoto Takahide, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Usefulness of cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy in the therapeutic management of advanced ovarian cancer patients with massive ascites | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology | 6. 最初と最後の頁 420 ~ 427 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-018-1371-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Chuwa Agapiti, Sone Kenbun, Oda Katsutoshi, Tanikawa Michihiro, Kukita Asako, Kojima Machiko, Oki Shinya, Fukuda Tomohiko, Takeuchi Makoto, Miyasaka Aki, Kashiyama Tomoko, Ikeda Yuji, Nagasaka Kazunori, Mori-Uchino Mayuyo, Matsumoto Yoko, Wada-Hiraike Osamu, Kuramoto Hiroyuki, Kawana Kei, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Kaempferol, a natural dietary flavonoid, suppresses 17 β -estradiol induced survivin expression and causes apoptotic cell death in endometrial cancer | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Letters | 6. 最初と最後の頁 6195-6201 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.9340 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Oda Katsutoshi, Tanikawa Michihiro, Sone Kenbun, Mori-Uchino Mayuyo, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Recent advances in targeting DNA repair pathways for the treatment of ovarian cancer and their clinical relevance | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology | 6. 最初と最後の頁 611 ~ 618 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-017-1137-7 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 曾根 献文 |
| 2. 発表標題 ChIP-シーケンス (ChIP-seq) 法を用いた婦人科がんにおけるヒストン修飾が及ぼす癌化メカニズムの解明とエピゲノム標的治療薬の探索について |
| 3. 学会等名 第71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 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Okii Shinya, Sone Kenbun, Oda Katsutoshi, Tanikawa Michihiro, Nagasaka Kazunori, Ikeda Yuji, Arimoto Takahide, Kuramoto Hiroyuki, Hiraike Osamu, Kawana Kei, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuk |
| 2. 発表標題 Oncogenic histone methyltransferase EZH2: A novel prognostic marker and therapeutic target in endometrial cancer |
| 3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大木慎也 曾根献文 織田克利 町野英徳 児嶋真千子 川田淑子 Chuwa Agapiti 福田友彦 宮坂亞希 谷川道洋 長阪一憲 松本陽子 平池修 大須賀穰 藤井知行 |
| 2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素SETD8を標的とした子宮体癌における新規エピゲノム創薬 の検討 |
| 3. 学会等名 第 59 回 日本婦人科腫瘍学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2017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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |