

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月27日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06907

研究課題名(和文) 難治性卵巣明細胞癌のTOP2A遺伝子増幅例に対する新規治療薬の探索

研究課題名(英文) The investigation of new treatment for ovarian clear cell carcinoma with TOP2A amplification

研究代表者

村上 隆介 (Murakami, Ryusuke)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：40782363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞癌のゲノム解析により再発に寄与する遺伝子増幅領域(chr17q21-24)を同定し、この領域のTOP2A着目したが、卵巣癌治療薬のキードラッグであるシスプラチンに対してTOP2Aを阻害してもさらに耐性になるという想定と逆の結果となった。そこでピルビン酸脱水素酵素のPDK2に着目し、PDK2の活性化が活性酸素種ROSを抑え、明細胞癌のアポトーシス機能を抑制し、シスプラチン耐性に寄与することを確認した。さらにPDK2を抑制する薬剤DCAがシスプラチンとの併用で、ROS産生を高め、ミトコンドリア膜電位を抑制し、細胞死を誘導することでシスプラチンの感受性が改善されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Ovarian clear cell carcinoma (CCC) has poor prognosis owing to its chemoresistance. Here we aimed to identify a biomarker of this drug resistance and the therapeutic target of CCC. Whole exome sequencing and expression microarray were conducted using 39 CCC clinical samples and 13 CCC cell lines. IC50 values and apoptosis of 13 CCC cell lines against cisplatin were measured by cleaved caspase-3. Chr17q21-24 amplification correlated positively with IC50 values for cisplatin in 13 CCC cell lines ($r>0.4$). The expression levels of 59 genes located on chr17q21-24 are positively correlated with Chr17q21-24 amplification in 13 CCC cell lines and 18 CCC patients ($r>0.4$). Of these 59 genes, we focused on pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2 (PDK2). A PDK inhibitor and suppression of PDK2 decreased the IC50 values for cisplatin by increasing cleaved caspase-3 expression. PDK2 inhibition is a promising therapeutic strategy against CCC.

研究分野：卵巣癌

キーワード：卵巣明細胞癌 染色体17番長腕増幅 シスプラチン耐性 PDK2

1. 研究開始当初の背景

卵巣明細胞癌 (OCCC) は多くは初期で発見されるが、いったん再発すると難治性の疾患である。当科の39症例のOCCCの腫瘍組織を用いた全エクソームシーケンス解析で再発に関連するコピー数解析で染色体17番長腕21-24領域の増幅が再発に寄与していることがわかった。この領域で統計的にTOP2A増幅が特にOCCCの再発に寄与する可能性が示唆されており、卵巣癌細胞株を用いたTOP2A増幅と薬剤感受性試験の解析の結果からプラチナ抵抗性に関連している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

卵巣明細胞癌のゲノム解析により再発に寄与する遺伝子増幅領域 (chr17q21 - 24) を同定し、この領域のTOP2A着目し、卵巣癌治療薬のキードラッグであるシスプラチンに対してTOP2Aの増幅が抵抗性に寄与するか検証することを目的とした。TOP2Aでうまくいかない場合、そのほかの領域のchr17q21 - 24の中で増幅する遺伝子に着目して、シスプラチン抵抗性との関連とその生物学的意義を明らかにすることを研究目的とした。

3. 研究の方法

TOP2A増幅細胞株でTOP2Aを抑制するとプラチナ感受性に形質が変わるかを検証した。TOP2A増幅OCCC細胞株にshRNAによりTOP2Aを抑制した細胞株の実験系を用いて、シスプラチンを添加した薬剤感受性試験 (IC50) を行ったが、TOP2Aを抑制するとプラチナ抵抗性が増すという仮説と逆の結果となった。したがって当初の計画を変更し、TOP2A以外の標的分子を探索した。17q21-24に存在する複数の遺伝子のうち、臨床サンプルと細胞株において増幅と発現が正の相関にある59遺伝子に絞り、これまでに我々は卵巣明細胞癌の特徴として嫌気性代謝が亢進していることを見出している背景から嫌気性代

謝に関与するPDK2遺伝子に注目した。

4. 研究成果

最も遺伝子増幅を認める卵巣明細胞癌細胞株においてPDK2遺伝子の発現を抑制するとCDDPの感受性が亢進し、またPDK阻害剤として知られているDichloroacetate(DCA)を併用することでCDDPの感受性を改善することを明らかにした。さらにPDK2を抑制することでstemness markerやsphere formationが変化する結果を予備実験で得ており癌幹細胞性と代謝の側面からPDK2を標的とした実験を計画した。さらにPDK2を抑制する薬剤DCAがシスプラチンとの併用で、ROS産生を高め、ミトコンドリア膜電位を抑制し、細胞死を誘導することでシスプラチンの感受性が改善されることを確認した。

卵巣明細胞癌のExome sequencing解析により、あきらかになった、遺伝子変異とコピー数変異の解析の結果、がんの特徴的な遺伝子として、複数の患者さんの腫瘍で検出された426の遺伝子変異を特定した。これらを用いて、相互に影響する遺伝子の働きから、タンパク質同士の相互作用データをもとにネットワークを構築すると、PIK3CA、KRAS、PTEN、PPP2R1Aなど細胞増殖にかかわるシグナル経路や ARID1A、ARID1B、SMARCA4などクロマチン修飾に関連する経路の他に、細胞周期のチェックポイントや細胞骨格に関連する4つのネットワークを同定した。今回の研究では個々の遺伝子の異常だけではなく、細胞分裂の際にコピーされる遺伝子の量の異常も検証し、MYC、RB経路の細胞周期に関わる遺伝子変異がコピー数で増減していることがわかった。全体的にがんを抑制する遺伝子が少なくなりがんを進行させる遺伝子は多くなるなど、エクソーム解析で判明した原因遺伝子はその量にも異常が起きていることが分かった。

これらのPIK3CA、KRAS、PTEN経路やMYC、RB経路を阻害薬実験で抑制すると、PDK2の発現が抑制されることが明らかとなり、このことはOCCCが増殖に依存している2つの経路が亢進していることで、PDK2の発現が亢進している可能性が示唆された。つまりOCCCにおいてPDK2はgenomicにもepigenomicにも高発現していることが明らかになり、PDK2がOCCCのシスプラチン耐性に関与し、これを抑制することが、治療抵抗性を改善することが示唆された。

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)

1. Comprehensive assessment of the expression of the SWI/SNF complex defines two distinct prognostic subtypes of ovarian clear cell carcinoma.
Abou-Taleb H, Yamaguchi K, Matsumura N, Murakami R, Nakai H, Higasa K, Amano Y, Abiko K, Yoshioka Y, Hamanishi J, Koshiyama M, Baba T, Yamada R, Matsuda F, Konishi I, Mandai M. *Oncotarget*. 2016 Aug 23;7(34):54758-54770.
2. Perspectives of Individualized Treatment by Genome-Wide Analyses in Ovarian Cancer.
Matsumura N, Yamaguchi K, Murakami R, Mandai M, Konishi I. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2016 Nov;43(11):1316-1320
3. Exome Sequencing Landscape Analysis in Ovarian Clear Cell Carcinoma Shed Light on Key Chromosomal Regions and Mutation Gene Networks.
Murakami R, Matsumura N, Brown JB, Higasa K, Tsutsumi T, Kamada M, Abou-Taleb H, Hosoe Y, Kitamura S, Yamaguchi K, Abiko K, Hamanishi J, Baba T, Koshiyama M, Okuno Y, Yamada R, Matsuda F, Konishi I, Mandai M. *Am J Pathol*. 2017 Oct;187(10):2246-2258
4. Distinct preoperative clinical features predict four histopathological subtypes of high-grade serous carcinoma of the ovary, fallopian tube, and peritoneum.
Ohsuga T, Yamaguchi K, Kido A, Murakami R, Abiko K, Hamanishi J, Kondoh E, Baba T, Konishi I, Matsumura N. *BMC Cancer*. 2017 Aug 29;17(1):580.

5. Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation.
Taki M, Abiko K, Baba T, Hamanishi J, Yamaguchi K, Murakami R, Yamanoi K, Horikawa N, Hosoe Y, Nakamura E, Sugiyama A, Mandai M, Konishi I, Matsumura N. *Nat Commun*. 2018 Apr 27;9(1):1685.

[学会発表](計7件)

1. Is the Mesenchymal Transition subtype more responsive to dose dense taxane chemotherapy combined with carboplatin (ddTC) than to conventional taxane and carboplatin chemotherapy (TC) in high grade serous ovarian carcinoma? : A survey of Japanese Gynecologic Oncology Group study (JGOG3016A1) ASCO 2017 Clinical science symposium # 5510 筆頭演者
2. Specific gene signatures and oligoclonal expansion of B cell repertoire with the responders of anti-PD-1 antibody (Nivolumab) for ovarian cancer; Novel predictive biomarkers.
Hamanishi J, Murakami R, Mandai M, Matsumura M, Abiko K, Baba T, Hosoe Y, Yamaguchi K, Konishi I. *International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017*. Hyogo, Japan.
3. 「進行卵巣癌 3C 期 4 期に対する、術前化学療法 dose dense TC 療法を用いた手術完遂率向上への取り組み」
佐藤華子、村上隆介、中村充宏、馬場長、宮本泰斗、安彦郁、山口建、濱西潤三、松村謙臣、万代昌紀 第 59 回 日本婦人科腫瘍学会学術集会 平成 29 年 7 月 27 日 日航ホテル熊本 熊本県
4. 卵巣癌の分子プロファイルに基づく個別化治療の実践にむけて～腫瘍微小環境に基づく新しい病理組織分類 村上隆介 平成 30 年京都臨床細胞学会総会ならびに第 31 回生活習慣病予防健診細胞診従事者研修会 平成 30 年 1 月 21 日(日) 講演

研究者番号

(4)研究協力者

なし()

5. PDK2 contributes to the platinum resistance of ovarian clear cell carcinoma accompanied by chromosome 17q amplification Sachiko Kitamura, Ken Yamaguchi, Ryusuke Murakami, Kaoru Abiko Junzo Hamanishi, Tsukasa Baba, Noriomi Matsumura, Masaki Mandai, Department of Gynecology & Obstetrics, Kyoto University Graduate School of Medicine 平成 29 年 9 月 29 日 日本癌学会 ポスター発表

6. Suppression of Warburg effect enhances cisplatin sensitivity in ovarian clear cell carcinoma 北村幸子、村上隆介 他 2017/4/16 第 69 回日本産科婦人科学会 学術講演会 口演

7. Suppression of Warburg effect influences chemosensitivity in ovarian clear cell carcinoma 北村幸子、村上隆介 他 2017/7/29 第 59 回日本婦人科腫瘍学会 学術講演会 口演

〔図書〕(計 2 件)

「臨床腫瘍学第 6 版 トランスクリプトーム解析」執筆

「オペナージング臨時増刊 婦人科の手術看護パーフェクトマニュアル 1 章ー3 よく使用する器具・器械について」執筆

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 隆介(MURAKAMI RYUSUKE)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号： 40782363

(2)研究分担者

()

なし

研究者番号：

(3)連携研究者

なし()