

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09282

研究課題名（和文）卵巣明細胞癌のテロメラゼ逆転写酵素プロモーター変異とビタミンA受容体の関連

研究課題名（英文）Association between TERT promoter mutation and vitamin A receptor in ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

錦見 恭子（Nishikimi, Kyoko）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00536302

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣癌細胞株に、RXR agonistであるベキサロテンを10 $\mu$ M、20 $\mu$ Mの濃度で48時間添加したところ、細胞数は有意に減少し、hTERTのmRNAレベルがそれぞれ、37%、6.4%有意に低下した。また、Luciferase assayでも、ベキサロテンの添加によって有意にpromoter活性の低下を認めた。培養上清中のLDH活性は、10 $\mu$ M以上の濃度で有意に増加することが明らかとなり、ベキサロテンが細胞死を誘導していることが明らかとなった。ベキサロテン刺激4時間後より、パイロトーシスマーカーであるカスパーゼ4およびガスダーミンEが活性化を誘導することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞癌は漿液性癌よりも抗がん薬の奏効率が低く、治療に難渋するため、既存薬よりも有効な薬の開発が望まれている。ベキサロテンによる卵巣癌の細胞死誘導はこれまでに報告がなく、卵巣癌に対する新規治療薬としての応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：When bexarotene, an RXR agonist, was added to an ovarian cancer cell line at concentrations of 10 $\mu$ M and 20 $\mu$ M for 48 hours, the number of cells decreased significantly and the mRNA level of hTERT decreased significantly by 37% and 6.4%, respectively. In addition, the Luciferase assay also showed a significant decrease in promoter activity due to the addition of bexarotene. It was revealed that the LDH activity in the culture supernatant was significantly increased at a concentration of 10 $\mu$ M or higher, and that bexarotene induced cell death. From 4 hours after bexarotene stimulation, it was revealed that the pyrotoxis markers caspase 4 and gasdermin E induce activation.

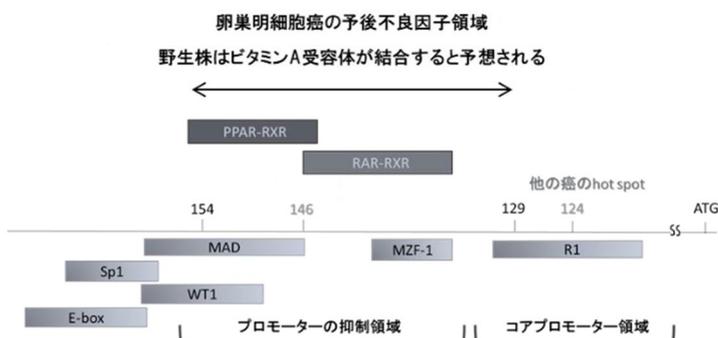
研究分野：卵巣癌

キーワード：卵巣癌 TERTプロモーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣明細胞癌は、進行した症例では他の卵巣癌の組織型よりも予後が悪く、早期症例であっても初回治療後早期に再発し、病勢をコントロールできないまま亡くなる症例もある。卵巣明細胞癌の発生機序は内膜症由来が多いと考えられ、多数の研究がなされてきたが、分子生物学的予後因子は未だにわかっていない。2010年に Adenine-thymine-rich interactive domain 1A (ARID1A) の変異が卵巣明細胞癌の約半数にみられると報告されたが、予後因子にはならず、治療にも結びついていない。また、2014年には、卵巣明細胞癌の一部に、テロメラーゼ逆転写酵素 (telomerase reverse transcriptase: TERT) のプロモーター変異がみられることが報告された (Wu et al. J Pathol 2014) が、発見された変異 (転写開始部位から -124bp, -146bp) と予後には関連が認められていない。われわれは、千葉大学およびその関連施設の卵巣明細胞癌 93 例を集め、TERT プロモーターの変異を検索したところ、既存の報告された変異部位 (転写開始部位から -124bp と -146bp) の他に、転写開始部位から -129~-154bp の領域に変異があることを発見した (下図)。



そして、この領域の変異がある症例は、既存の報告された変異のある症例よりも予後不良であることを発見した (投稿中)。この領域は、ビタミン A 受容体の結合配列 (RAR/RXR) がタンデムに繋がった配列があるので、正常アレルではビタミン A 受容体が結合してテロメラーゼの転写が抑制され、変異アレルではビタミン A の抑制作用が解除されて、テロメラーゼの転写が亢進すると予想された。

## 2. 研究の目的

悪性腫瘍における TERT プロモーター変異は、2011 年に、悪性黒色腫で報告され、その後、膀胱癌、肝癌、肺癌、副腎癌、乳癌、神経膠芽腫等においても変異があることが報告された。2014 年に、卵巣癌における TERT プロモーター変異は、明細胞癌にはあるが、漿液癌にはないと報告された。TERT プロモーター変異は転写開始部位から -124bp と -146bp に hot spot があると報告されており、それ以外の部位の変異は、悪性黒色腫と膀胱癌のみに報告がみられる。卵巣明細胞癌において、-129~-154bp 領域に変異があるという報告は、われわれ以外にはない。本研究では TERT プロモーターの -129~-154bp 領域は、ビタミン A 受容体を介して、テロメラーゼの転写を抑制し、細胞増殖を制御しているかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 卵巣癌細胞株へのビタミン A の影響

RAR/RXR agonist として all trans retinoic acid(ATRA), RXR homodimer の agonist としてベキサロテンを用い、卵巣明細胞癌株 TOV21G を用いて、ビタミン A が hTERT の発現を低下させるかを real time PCR を用いて mRNA レベルで検討した。次に hTERT promoter 領域を結合した Luciferase vector を用いて、ATRA およびベキサロテンが hTERT wild promoter の活性に影響を与えるかを検討した。また、推定のビタミン A 結合領域に変異を導入した plasmid による検討も行なった。

#### (2) RXR agonist (ベキサロテン) の細胞死誘導作用の解析

ES2、OVACAR3 に BEX を 0, 0.1, 1, 10 $\mu$ M の濃度で添加し、細胞増殖抑制効果を細胞数測定および培養上清中の LDH 測定により検討した。また細胞シグナル解析はウエスタンブロット (WB) にて行なった。

#### (3) TERT uncommon mutation の promoter 活性への影響

卵巣癌明細胞腺がんの臨床サンプルより同定した TERT core promoter 変異(既知のものを含む 13 種類)がプロモーター活性に影響するかを Luciferase assay にて評価した。TERT プロモーター領域 (-259bp) を Luciferase vector に接続し、promoter の変異株を作成した。作成した vector を卵巣癌細胞 TOV21 細胞に導入し、Dual Luciferase assay により野生型と変異型の promoter 活性を比較した。

#### (4) hTERT promoter のゲノム編集

CRISPR/Cas9 法により、卵巣明細胞腺癌由来細胞株である TOV21G の TERT core promoter 領域のゲノム編集を行なった。推定の RXR/RAR 結合領域を target とした 3 種類のガイド RNA (右図) 発現ベクターをそれぞれ TOV21G にエレクトロポレーション法により導入し、ゲノム編集株の樹立を試みた。

Putative RARb:RXRa binding region: TCCCGGTCCC



図. 推定のレチノイン酸結合配列と標的塩基配列

### 4. 研究成果

#### (1) 卵巣癌細胞株へのビタミン A の影響

Real time PCR の結果、実験当初の予想に反し、ATRA による hTERT の発現低下は認められなかった。一方、RXR agonist であるベキサロテンを 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M の濃度で 48 時間添加することで、hTERT の mRNA レベルがそれぞれ、37%, 6.4% 有意に低下することが明らかとなった。また、Luciferase assay の結果でも、mRNA と同様にベキサロテンの添加によって有

意な promoter 活性の低下を認めた。しかしながら、この活性低下は推定のレチノイン酸結合領域の変異の有無には影響されなかった。また、RXR agonist 濃度依的に細胞数の減少を誘導したため、hTERT mRNA および promoter 活性の低下は、ベキサロテンによる細胞増殖抑制に起因したものと推定された。

## (2)ベキサロテンの細胞死誘導作用の解析

ベキサロテンは 5 $\mu$ M、10 $\mu$ M、20 $\mu$ M の濃度で ES2 の細胞数を有意に減少させた(P<0.05、図 A)。一方、培養上清中の LDH 活性は 10 $\mu$ M 濃度以上の濃度で有意に増加することが明

らかとなり、ベキサロテンが ES2 の細胞死を誘導していることが明らかとなった(右図 A,B)。また、ベキサロテンによる細胞死は漿液性腺がん由来細胞株である OVCAR3 でも同様に観察された(右図

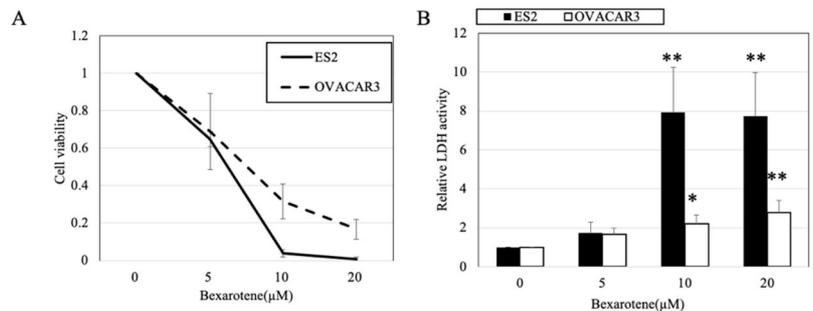


図. ベキサロテンは卵巣癌細胞の細胞死を誘導する

A,B)。形態学的観察では、ベキサロテンによって刺激した細胞では細胞膨潤、細胞膜の破裂を伴う特徴的な細胞死像が得られた(図)。そこで、顕著な細胞破裂を特徴プログラム細胞死であるパイロトーシスに着目し、ベキサロテンにパイロトーシス誘導作用があるかを検討した。ベキサロテン刺激4時間後より、パイロトーシスマーカーであるカスパーゼ4およびガスダーミンEが活性化を誘導することが明らかとなった。また、Caspase1,4 阻害剤の併用によりベキサロテンによる LDH 活性の上昇を減弱できることが明らかとなった。以上の結果より、ベキサロテンは卵巣癌細胞株において Caspase4-GSDME を介したパイロトーシスにより細胞死を誘導することが初めて明らかとなった(論文投稿準備中)。これまで、ベキサロテンによる卵巣癌の細胞死誘導は報告がなく、卵巣癌に対する新規治療薬としての応用が期待される。

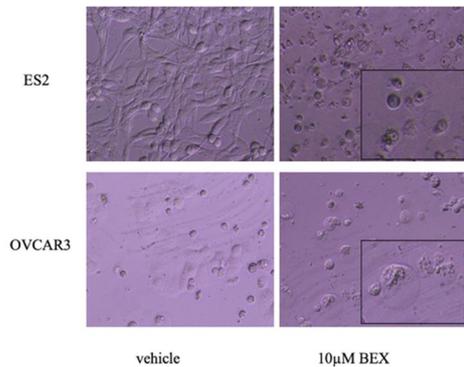
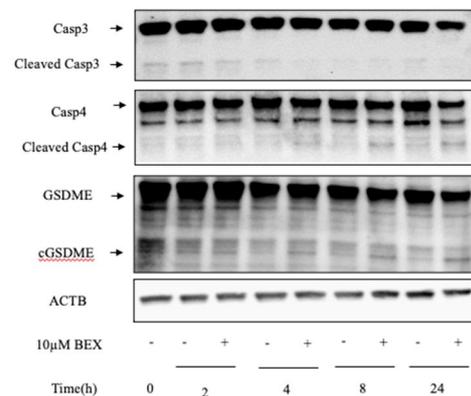


図. ベキサロテンによる卵巣癌細胞の形態変化



### (3) TERT uncommon mutation の promoter 活性への影響

われわれが同定した、新規 TERT promoter 領域変異を Luciferase assay にて解析した結果、活性上昇型が 5 種類、活性変化なしが 2 種類、活性低下型が 6 種類存在することが明らかとなった。活性の変化と再発率との関係を調べると、変化がないタイプでは再発率が 20.3%(74 症例中 15 症例)であったのに対し、活性上昇型では 7.7%(13 症例中 1 症例)に低下した。一方、活性低下型変異をもつ症例での再発率は 62.5%(8 症例中 5 症例)と再発率が約 3 倍上昇することが明らかとなった (OR:6.6,  $p=0.0186$ )。この時の生存時間分析を右図に示す。

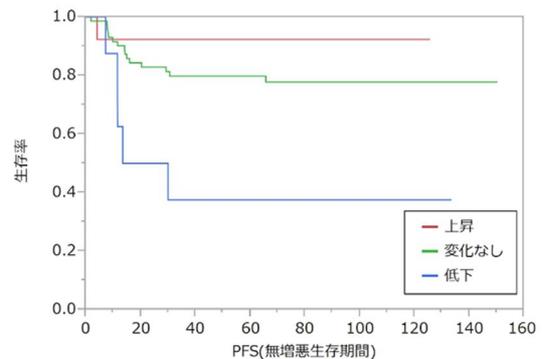


図. hTERT promoter活性別の生存時間解析

今回得られた「hTERT の活性が下がる変異を持つ

がんが再発をする可能性がある」という知見は、これまでのテロメラーゼ研究とは相反するものである(論文投稿準備中)。今後検討を重ね、テロメラーゼ活性の低下とがんの再発がどのように関連するかを検証していく予定である。

### (4) TERT uncommon mutation の promoter 活性への影響

卵巣癌細胞株 TOV21G を用いて CRISPR Cas9 による promoter 領域のゲノム編集を行なったところ、点変異の導入直後は、変異が導入されていると思われる細胞が DNA ミスマッチ切断法にて確認できたが、単一コロニーに分離することができなかった。これは core promoter 活性の低下による細胞増殖抑制が関連すると推定された。

本研究では、当初予定していた卵巣癌に対するビタミン A 療法の有用性を確認することはできなかった。しかしながら、既存薬であるベキサロテンが新規卵巣癌の治療薬候補になる可能性がある hTERT の promoter 活性低下型変異が卵巣明細胞腺癌の再発と関連する可能性があるという 2 つの興味深い知見が得られた。今後この 2 つの知見に焦点を当て、研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nishikimi K, Nakagawa K, Tate S, Matsuoka A, Iwamoto M, Kiyokawa T, Shozu M.	4. 巻 149(4)
2. 論文標題 Uncommon Human Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Mutations Are Associated With Poor Survival in Ovarian Clear Cell Carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 352-361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ajcp/aqx166	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林達也、三橋暁、バクコウエイ、塩谷仁之、石井久美子、錦見恭子、アレハンドラカナシロ、高山直也、八尋錦之助、生水真紀夫
2. 発表標題 ベキサロテンはRXR非依存的に卵巣癌細胞株の増殖を抑制する
3. 学会等名 第37回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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