

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09308

研究課題名(和文) リキッドバイオプシーを用いた卵巣癌の術前組織診断法と卵巣癌予測診断法の開発

研究課題名(英文) Development of histological diagnosis method and predictive diagnosis method for ovarian cancer using liquid biopsy before the surgery

研究代表者

山口 建 (Yamaguchi, Ken)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20378772

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)：卵巣癌組織を用いた網羅的DNAメチル化解析から、明細胞癌において機能的に重要と思われるDNAメチル化により制御されている活性化遺伝子は22遺伝子、抑制遺伝子は276遺伝子あった。卵巣明細胞癌を用いたエクソームシーケンス解析から、明細胞癌では、KRAS-PI3Kシグナル、MYC-RBシグナル、SWI/SNF複合体に関わる遺伝子に、SNVsやコピー数異常が多いことがわかった。卵巣癌、子宮内膜症の患者、健常人の血液からcell free DNAの濃度を測定すると、進行期卵巣癌、早期卵巣癌、子宮内膜症、健常人の順に濃度が高くなることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞癌に特徴的なDNAメチル化やコピー数異常、SNVを明らかにした。これはリキッドバイオプシーの検査対象になり得ると考える。健常人、子宮内膜症、卵巣癌患者のcell-free DNAの濃度を測定し、実現性を検証した。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive DNA methylation analysis using ovarian cancer tissues revealed that 22 genes were activated and 276 genes were suppressed that were considered to be functionally important in clear cell cancer and were regulated by DNA methylation. Exome sequence analysis using clear cell ovarian cancer revealed that there are many SNVs and copy count abnormalities in the genes involved in KRAS-PI3K signal, MYC-RB signal, and SWI / SNF complex in ovarian clear cell carcinoma. The concentration of cell-free DNA was measured from the blood of patients with ovarian cancer, endometriosis, and healthy counterparts, The concentrations of cell-free DNA increased was highest in advanced ovarian cancer, and lowest in healthy counterparts.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：婦人科がん リキッドバイオプシー DNAメチル化 SNV

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科悪性疾患の中で最も予後不良の疾患である。卵巣癌のスクリーニング法は確立されていないため、4割以上が 1 期以上で診断されることが予後不良の大きな原因となっている。卵巣癌の中でも明細胞癌は日本人に多く、抗がん剤耐性を示す予後不良の疾患である。卵巣明細胞癌は子宮内膜症から発生することから 30-40 歳代の生殖年齢や 50 歳女性に多く、不妊治療など子宮内膜症を経過観察中に卵巣明細胞癌が発生することがあるため、取扱いに難渋する。このように卵巣明細胞癌は早期診断が重要である一方で、子宮内膜症の患者の中で卵巣癌に移行しやすい症例を選別することが子宮内膜症患者の治療を選択する上でも重要である。しかしながら子宮内膜症から卵巣癌を発症しやすい高危険患者を予測する方法は存在しない。

我々は子宮内膜症から発生する卵巣明細胞癌の研究を行ってきた。卵巣明細胞癌の発癌において、子宮内膜症の自由鉄から発生する酸化ストレスが発癌に関わることを明らかにした。また網羅的遺伝子解析より、明細胞癌の性質を反映した HNF1B を含む遺伝子群 (OCCC signature) は発癌環境により誘導されることを示した。網羅的 DNA メチル化解析では、HNF1 転写経路は全体的にメチル化で制御されることを明らかにした。OCCC signature には糖代謝に関わる遺伝子が多く含まれ、明細胞癌では好氣的環境においても嫌氣的解糖系が亢進すること (ワールブルグ効果) で、酸化ストレス耐性・抗がん剤耐性を獲得することを明らかにした。

リキッドバイオプシーは腫瘍組織を採取しなくとも血液から腫瘍細胞や腫瘍 DNA (cell free DNA: cfDNA) を同定する画期的な技術である。腫瘍組織を採取せずとも、リキッドバイオプシーにより同定された遺伝子異常に沿って適切な分子標的薬の選別が可能となる。リキッドバイオプシーにより抽出された cfDNA は断片化されていることから、腫瘍組織との相同性が問題となる。ゆえに解析領域が限られている Hot spots がわかっている遺伝子変異や特異的な CpG 領域を解析する DNA メチル化が適した解析対象となり得る。卵巣癌は生検が困難であることからリキッドバイオプシーの良い対象となるが、卵巣癌におけるリキッドバイオプシーは十分に検討されていない。

2. 研究の目的

卵巣明細胞癌を含む卵巣癌、子宮内膜症の患者組織を用いてリキッドバイオプシーに用いることができる遺伝子の探索とその遺伝子の機能を明らかにすることを目的とする。また、患者血液から cfDNA を同定し、リキッドバイオプシーの実現性を検証する。

3. 研究の方法

倫理委員会承認、患者同意の下、卵巣明細胞癌に特異的な DNA メチル化領域を同定するために、卵巣癌組織 85 検体、正常卵管・卵巣表層上皮細胞 8 検体、卵巣癌細胞株 46 株、正常卵管・卵巣表層上皮細胞株 4 株を用いて網羅的 DNA メチル化解析、網羅的 mRNA 発現解析、エクソームシーケンシング解析を行った。卵巣癌患者、子宮内膜症患者の血液から cfDNA を検出した。

4. 研究成果

コンセンサスクラスタリング解析では卵巣癌の組織型により DNA メチル化プロファイルが異なることが分かった。卵巣癌組織、卵巣癌細胞株に共通して明細胞癌が非明細胞癌より DNA メチル化が 20% 以上 (β 値が 0.2 以上) 高く、 p 値が 0.01 以下の遺伝子は 25 個あった。逆に明細胞癌が非明細胞癌よりも β 値が 0.2 以上低く、 p 値が 0.01 以下の遺伝子は 6 個あった。また、機能的に重要と思われる、DNA メチル化によって制御されている遺伝子を卵巣癌細胞株を用いて、以下の基準によって抽出した。1) t 検定で p 値が 0.01 未満、2) 明細胞癌と非明細胞癌との間で β 値が 0.2 以上 (DNA メチル化が 20% 以上) 異なる、3) 発現マイクロアレイと網羅的 DNA メチル化のデータから発現と β 値が有意に逆相関を示す ($p < 0.05$)。この解析により、非明細胞癌と比較して明細胞癌において低 DNA メチル化により活性化している遺伝子は 22 遺伝子、逆に高 DNA メチル化により抑制されている遺伝子が 276 遺伝子あった。明細胞癌において低 DNA メチル化により活性化している遺伝子は 22 遺伝子は HNF1B 転写に関わる遺伝子が含まれ、高 DNA メチル化により抑制されている遺伝子が 276 遺伝子は ER ネットワークに含まれる遺伝子が含まれていた。これらの HNF1B 転写ネットワークや ER ネットワークの遺伝子は、それぞれ協調して DNA の低メチル化、高メチル化が起きていることが分かった。

続いて組織型に関わらず卵巣癌において DNA メチル化によって制御される重要な候補遺伝子を以下の 3 つのデータ解析から同定した。卵巣癌細胞株 30 株を用いて脱メチル化剤であるデシタピン投与による網羅的発現解析と網羅的 DNA メチル化解析を用いたデータ、卵巣癌細胞株 32 株を用いて網羅的発現解析と網羅的 DNA メチル化解析のデータ、卵巣癌検体 508 組織を用いた TCGA の網羅的発現解析と網羅的 DNA メチル化解析のデータ。この解析では、脱メチル化により遺伝子発現が変化する値と β 値とが有意に正の相関をする遺伝子は解析した 8110 遺伝子中 907 遺伝子 (11.2%) があった。その中で β 値の差が 0.5 以上あり、かつ Fold Change が 2.9 以上あるものは

293遺伝子あった。 の解析では、発現と β 値が有意に逆の相関を示したのが8110遺伝子中1976遺伝子(24.4%)あった。その中で β 値の差が0.5以上あり、かつ発現のRMA値が3以上のものが1044遺伝子あった。 の解析では、発現と β 値が有意に逆の相関を示したのが8716遺伝子中4547遺伝子(52.2%)あった。その中で β 値の差が0.5以上あり、かつ発現のRMA値が3以上のものが2174遺伝子あった。 、 、 の解析から脱メチル化剤であるデシタピン投与により発現が上昇し、かつ卵巣癌組織もしくは卵巣癌細胞株においてmRNA発現と β 値が逆相関している遺伝子は237遺伝子あり、有意に共通している遺伝子が含まれていた($p<0.0001$)。これを卵巣癌において機能的にDNAメチル化により制御されている重要な遺伝子と考えた。これらをカテゴリー解析すると、形態形成、増殖、代謝、細胞死に関わる遺伝子が多く含まれていることが分かった。237遺伝子を用いてクラスタリングで2群に分けると、この2群の間で細胞増殖の倍加時間が有意に差があった($p<0.0001$)。

卵巣明細胞癌組織を用いたエクソームシーケンス解析を行った。卵巣明細胞癌では、KRAS-PI3Kシグナル、MYC-RBシグナル、SWI/SNF複合体に関わる遺伝子に、SNVsやコピー数異常が多いことがわかった。具体的には、51%にPIK3CA遺伝子のSNVsが、26%にPIK3CA遺伝子の増幅が、10%にKRAS遺伝子変異が、18%にKRAS遺伝子増幅を認め、シグナル全体としては82%の明細胞癌にKRAS-PI3Kシグナルに関わる遺伝子にゲノム異常を認めた。MYC-RBシグナルでは、64%の症例にMYC遺伝子増幅、31%にRB遺伝子欠失を認め、全体として79%の症例にMYC-RBシグナルに属する遺伝子にコピー数異常を認めた。SWI/SNF複合体は、62%の症例にARID1A遺伝子変異を認め、21%の症例にARID1A遺伝子の欠失、ARID1B遺伝子欠失、SMARCA2遺伝子欠失を認めた。SMARCA4遺伝子欠失は41%に認めた。SWI/SNF複合体に属する遺伝子は全体として85%にゲノム異常を認めた。これらの結果は、明細胞癌の診断においてDNAゲノムメチル化のみならずゲノム異常の同定も有用であることが示唆された。

また、現在卵巣癌の患者の手術前の血液検体、手術組織を回収保存中である。一部血液検体を用いてcfDNA抽出を試みた。卵巣癌IV期の患者血漿1mlから22.43ng/ μ l、卵巣癌 期の患者血漿500 μ lから23.75ng/ μ l、子宮内膜症患者の血漿1ml から7.75ng/ μ l、健常人の血漿800 μ lから1.03ng/ μ lのDNAを抽出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mulati Kumuluzi, Hamanishi Junzo, Matsumura Noriomi, Chamoto Kenji, Mise Nathan, Abiko Kaoru, Baba Tsukasa, Yamaguchi Ken, Horikawa Naoki, Murakami Ryusuke, Taki Mana, Budiman Kharma, Zeng Xiang, Hosoe Yuko, Azuma Miyuki, Konishi Ikuo, Mandai Masaki	4. 巻 120
2. 論文標題 VISTA expressed in tumour cells regulates T cell function	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 115 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-018-0313-5	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 該当する
1. 著者名 Inayama Yoshihide, Hamanishi Junzo, Matsumura Noriomi, Murakami Ryusuke, Abiko Kaoru, Yamaguchi Ken, Baba Tsukasa, Horie Katsuyuki, Konishi Ikuo, Mandai Masaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Antitumor Effect of Nivolumab on Subsequent Chemotherapy for Platinum Resistant Ovarian Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Oncologist	6. 最初と最後の頁 1382 ~ 1384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1634/theoncologist.2018-0167	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 該当する
1. 著者名 Nakamura Ayano, Yamaguchi Ken, Minamiguchi Sachiko, Murakami Ryusuke, Abiko Kaoru, Hamanishi Junzo, Kondoh Eiji, Baba Tsukasa, Mandai Masaki, Matsumura Noriomi	4. 巻 52
2. 論文標題 Mucinous adenocarcinoma, gastric type of the uterine cervix: clinical features and HER2 amplification	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 52 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-018-0202-2	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 該当する
1. 著者名 Taha Ahmed A.A., Koshiyama Masafumi, Matsumura Noriomi, Abiko Kaoru, Yamaguchi Ken, Hamanishi Jyunzo, Baba Tsukasa, Kharma Budiman, Mohamed Ibrahim Hassanin, Ameen Magdy Mohamed, Ismail Salah Ali, Konishi Ikuo, Mandai Masaki	4. 巻 9
2. 論文標題 The effect of the type of dietary protein on the development of ovarian cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 23987 ~ 23999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25253	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 該当する

1. 著者名 Taki Mana, Abiko Kaoru, Baba Tsukasa, Hamanishi Junzo, Yamaguchi Ken, Murakami Ryusuke, Yamanoi Koji, Horikawa Naoki, Hosoe Yuko, Nakamura Eijiro, Sugiyama Aiko, Mandai Masaki, Konishi Ikuo, Matsumura Noriomi	4. 巻 9
2. 論文標題 Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-03966-7	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 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Shiro Takamatsu, Noriomi Matsumura*, Ryusuke Murakami, Ken Yamaguchi, Junzo Hamanishi, J.B.Brown**, Masaki Mandai
2. 発表標題 Comprehensive RNA-seq Analysis Identifies the Progression Signature in Ovarian Clear Cell Carcinoma
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sachiko Kitamura, Ken Yamaguchi, Ryusuke Murakami, Kaoru Abiko, Junzo Hamanishi, Tsukasa Baba, Noriomi Matsumura, Masaki Mandai
2. 発表標題 Genomic alterations induces metabolic change through the activation of PDK2 in ovarian clear cell carcinoma.
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sachiko Kitamura, Ken Yamaguchi, Ryusuke Murakami, Kaoru Abiko, Junzo Hamanishi, Tsukasa Baba, Masaki Mandai
2. 発表標題 PDK2 inhibition has synergic effect with cisplatin targeting mitochondrial metabolism in ovarian clear cell carcinoma.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sachiko Kitamura, Ken Yamaguchi, Ryusuke Murakami, Kaoru Abiko, Junzo Hamanishi, Tsukasa Baba, Noriomi Matsumura, Masaki Mandai
2. 発表標題 PDK inhibition has synergic effect with cisplatin targeting mitochondrial metabolism in ovarian clear cell carcinoma.
3. 学会等名 The 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayano Nakamura, Ken Yamaguchi, Tsukasa Baba, Noriomi Matsumura, and Masaki Mandai
2. 発表標題 Clinicopathological Feature and HER-2 Amplification in Gastric Type Adenocarcinoma of the Uterine Cervix.
3. 学会等名 American College of Obstetricians and Gynecologists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Murat Kumuruz, 濱西 潤三, 松村 謙臣, 茶本 健司, 三瀬 名丹, 安彦 郁, 馬場 長, 山口 建, 村上 隆介, 細江 裕子, 東 みゆき, 小西 郁夫, 万代 昌紀
2. 発表標題 VISTA expressed in tumor cells regulates T cell function VISTA expressed in tumor cells regulates T cell function
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北村幸子、山口 建、村上隆介、安彦 郁、濱西潤三、馬場 長、万代昌紀
2. 発表標題 卵巢明細胞癌においてミトコンドリア代謝を標的とするPDK2阻害はシスプラチンと合成致死性を示す
3. 学会等名 第6回婦人科がんバイオマーカー研究会
4. 発表年 2018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
研究 分担者	馬場 長 (Baba Tsukasa) (60508240)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	
研究 分担者	万代 昌紀 (Mandai Masaki) (80283597)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	

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