

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15304

研究課題名（和文）卵巣漿液性癌におけるDNA修復遺伝子に関わる治療標的経路の探索

研究課題名（英文）Exploration of Therapeutic Target Pathways Involving DNA Repair Genes in High Grade Serous Ovarian Carcinoma

研究代表者

浅田 佳代（Asada, Kayo）

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：50805843

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では卵巣高異型度漿液性癌を対象とし、これまでに施行した78症例における全エクソンシーケンス、RNAシーケンス、メチル化アレイの解析結果をもとに DNA傷害修復に関わる遺伝子の変異、発現異常を明らかにすること、BRCA1/2以外にPARP阻害剤の治療標的となる因子を明らかにすること、DNA修復機構に着目したPARP阻害剤以外の分子標的治療法を開発することを研究目的とした。結果、SMYD2選択的阻害剤や、免疫チェックポイント阻害剤が卵巣がん治療の代替手段となる可能性を示すことが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では次世代シーケンサーを用いた解析結果より、卵巣高異型度漿液性癌におけるDNA傷害修復に関わる遺伝子の変異・発現異常を明らかにした。次に、卵巣がん治療に用いられるPARP阻害剤の治療標的として、BRCA1/2以外にヒストンメチルトランスフェラーゼであるSMYD2や、腫瘍免疫に着目した。結果、SMYD2選択的阻害剤や、免疫チェックポイント阻害剤が卵巣がん治療の代替手段となる可能性を示すことが出来た。加えて、外来子宮鏡の有効性についての検討を進めており、子宮体がんの早期発見にdeep-learningを用いた外来子宮鏡でのAI診断が有用である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aim to identify mutations and aberrant expression of genes involved in DNA damage repair based on the results of whole exon sequencing, RNA sequencing, and methylation array analysis in 78 cases of high grade serous ovarian carcinoma. The objectives of the research were to identify target factors, and to develop molecularly targeted therapies other than PARP inhibitors that focus on DNA repair mechanisms. As a result, we were able to show that SMYD2 selective inhibitors and immune checkpoint inhibitors may be alternative approaches to ovarian cancer treatment.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：統合的ゲノム解析 卵巣高異型度漿液性癌 相同組換修復関連遺伝子変異 PARP阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

発癌の原因は一昔前、喫煙や食生活など、抽象的な環境因子を中心に語られてきた。しかし遺伝子解析が進み、ヒト遺伝子の網羅的な解析が急速に発展するにつれて、さまざまな遺伝子の発現異常が蓄積していくことで浸潤、転移などの悪性形質を獲得していくことが明らかとなってきている。

卵巣癌は発症率に比して致死率が高く、婦人科癌において最も死亡率の高い悪性腫瘍である。同じ卵巣上皮由来でありながら、多数の組織型が存在し、分子生物学的にも多様であるため、その発癌過程の相違には未知の部分も多い(表)。

	頻度(日本)	特徴	遺伝子発現異常
漿液性癌	39%	進行癌が多い。	TP53, BRCA1/2, RB1
明細胞癌	24%	日本人に多い。	PIK3CA
		化学療法に低感受性。	ARID1A
類内膜癌	18%	子宮内膜症合併例が多い。	CTNNB1, PTEN, KRAS
粘液性癌	13%	化学療法に低感受性。	RAS, RAF

卵巣漿液性癌においては、The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA)が316例に対し全エクソン解析を行っているが、本邦での報告はみられていない。TCGAの報告では、96%の症例でTP53変異(体細胞変異)が同定されている。BRCA1, BRCA2の生殖細胞変異は、遺伝性乳癌卵巣癌(HBOC: Hereditary Breast and Ovarian Cancer)の原因遺伝子として広く知られており、卵巣癌の中でも漿液性癌との関連性が強いことが明らかとなっている。BRCA1, BRCA2は相同組換え修復(HR: Homologous Recombination)に必須の遺伝子であり、変異などにより相同組換え修復異常(HRD: Homologous Recombination Deficiency)が生じると、2本鎖DNA切断を修復することができなくなるため、遺伝子変異が蓄積しやすい。

PARP (poly ADP ribose polymerase) 阻害剤は一本鎖DNA損傷の修復を阻害し、二本鎖DNA切断を蓄積させる薬剤である。HRDを有するがんでは二本鎖DNA切断を修復できないため、PARP阻害剤により細胞死が生じうる(合成致死として知られる)。実際に欧米では、PARP阻害剤がBRCA1, BRCA2変異陽性の再発卵巣癌で保険適用になっており、日本でも保険収載が期待されている。TCGAでは51%の症例においてHRDを来たしうる遺伝子発現異常があったと報告している。しかしながら、HRD関連遺伝子の異常とPARP阻害剤の感受性には不明な点が多い。

申請者は、すでに高異型度漿液性癌78症例について、全エクソンシーケンス、RNAシーケンス、メチル化アレイを施行しており、臨床データとの意義づけを行ってきたため、そのゲノムの全体像を通して、サブグループの生物学的特徴や予後を予測するバイオマーカーを明らかとし、新たな治療戦略について検討を行うこととする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、卵巣高異型度漿液性癌において、ゲノムワイドな統合解析結果をもとに、DNA傷害に着目した新規の分子標的治療法を確立することである。具体的には、

- (1) 卵巣高異型度漿液性癌における統合的ゲノム解析におけるDNA修復経路の異常の同定
- (2) PARP阻害剤の治療標的となるDNA修復関連因子の解明
- (3) PARP阻害剤以外の分子標的薬による抗腫瘍効果の検討

の3つである。最終目標は、卵巣高異型度漿液性癌において、相同組換え修復を含めたDNA修復異常関連因子を明らかとし、DNA傷害修復経路を標的とした新規治療法の個別化を提唱することである。

## 3. 研究の方法

本研究は卵巣癌臨床検体と細胞株を用いて、卵巣高異型度漿液性癌に焦点をあてて、以下の2点を中心に解析を行う。

- (1) 遺伝子プロファイルの同定と、遺伝学的な亜分類法の確立
- (2) 卵巣高異型度漿液性癌におけるPARP阻害剤の抗腫瘍効果の検討と機序の解明

具体的には、高異型度漿液性癌の癌臨床検体を用いて、網羅的な遺伝子解析(全エクソンシーケンス、RNAシーケンス、メチル化アレイ)を行った結果を用い、統合解析を行う。次に、PARP阻害剤使用の適応となるBRCA変異やHRDやその候補遺伝子群に着目し、免疫組織染色や細胞株にて機能解析を行う。さらに、PARP阻害薬を各細胞株に添加・投与し、抗腫瘍効果を*in vitro*, *in vivo*で検証する。

#### 4 . 研究成果

(1) 全エクソンシーケンスの結果、TP53 は 95%の変異率を示した。BRCA1/2 の体細胞変異・生殖細胞変異、BRCA1 プロモーター領域の高メチル化など、42.3%の症例で HRD を認めた。次に、変異シグネチャーの解析では「BRCA シグネチャー」と「Age シグネチャー」が同定された。メチル化解析において「Age/BRCA シグネチャー優位群」の 2 群間で差のある遺伝子を抽出したところ、特徴的なメチル化遺伝子を同定できた。また、RNA シーケンス解析では、4 つのクラスター（上皮間葉転換関連遺伝子、細胞増殖・細胞分化関連遺伝子、サイトカインや炎症に関連した遺伝子、細胞分化に関連した遺伝子群）に分類された。これらは HRD 因子、変異シグネチャーと密接に関連しており、卵巣漿液性癌の生物学的特徴を反映していることが示唆された。

(2) ヒストンメチルトランスフェラーゼである SMYD2 の機能分析を施行したところ、卵巣高異型度漿液性癌細胞において SMYD2 は有意に過剰発現していた。次に、SMYD2 siRNA または SMYD2 選択的阻害剤で処理をした卵巣高異型度漿液性癌細胞では、アポトーシス細胞の割合を増加させることにより細胞増殖が抑制されることがわかった。さらに SMYD2 選択的阻害剤はコロニー形成アッセイでオラパリブと相加効果を示した。これにより、SMYD2 選択的阻害剤は単独で、または PARP 阻害剤と組み合わせることにより、卵巣高異型度漿液性癌患者の治療に使用できる可能性が示された。

(3) がん細胞独自の遺伝子変異に伴って新たに生まれた変異抗原(neoantigen, neoAg)の数と HLA-class I の発現に着目したところ、HR-proficient 群の方が HRdeficient 群よりも有意に neoAg が少なく、予後不良であった。HR-proficient 群の中でも、neoAg の数が多く、HLA-class I の発現量が多い群では予後が良好であった。予後良好な患者では Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) にて免疫関連遺伝子が濃縮されていることが示され、腫瘍微小環境への免疫細胞の浸潤と活性化を示している T-cell-inflamed 型を持っていることが判明した。これにより、現在 PARP 阻害の恩恵を受けていない HR-proficient 群において、免疫チェックポイント阻害剤が治療の代替手段となる可能性が示された。

(4) 加えて、昨年度から外来子宮鏡の有効性についての検討を進めており、子宮体がんの早期発見に deep-learning を用いた外来子宮鏡での AI 診断が有用である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsushita Hirokazu, Hasegawa Kosei, Oda Katsutoshi, Yamamoto Shogo, Asada Kayo, Karasaki Takahiro, Yabuno Akira, Nishijima Akira, Nejo Takahide, Kobayashi Yukari, Sato Sho, Ikeda Yuji, Miyai Manami, Takahashi Yusuke, Yamaguchi Rui, Fujiwara Keiichi, Aburatani Hiroyuki, Kakimi Kazuhiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Neoantigen load and HLA-class I expression identify a subgroup of tumors with a T-cell-inflamed phenotype and favorable prognosis in homologous recombination-proficient high-grade serous ovarian carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e000375 ~ e000375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2019-000375	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 Sone Kenbun, Eguchi Satoko, Asada Kayo, Inoue Futaba, Miyamoto Yuichiro, Tanikawa Michihiro, Tsuruga Tetsushi, Mori-Uchino Mayuyo, Matsumoto Yoko, Hiraike-Wada Osamu, Oda Katsutoshi, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Usefulness of biopsy by office hysteroscopy for endometrial cancer: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 141 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2020.2053	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 -
1. 著者名 Kukita Asako, Sone Kenbun, Oda Katsutoshi, Hamamoto Ryuji, Kaneko Syuzo, Komatsu Masaaki, Wada Miku, Honjoh Harunori, Kawata Yoshiko, Kojima Machiko, Oki Shinya, Sato Masakazu, Asada Kayo, Taguchi Ayumi, Miyasaka Aki, Tanikawa Michihiro, Nagasaka Kazunori, Matsumoto Yoko, Wada-Hiraike Osamu, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 513
2. 論文標題 Histone methyltransferase SMYD2 selective inhibitor LLY-507 in combination with poly ADP ribose polymerase inhibitor has therapeutic potential against high-grade serous ovarian carcinomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 340 ~ 346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.03.155	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 Kojima Machiko, Sone Kenbun, Oda Katsutoshi, Hamamoto Ryuji, Kaneko Syuzo, Oki Shinya, Kukita Asako, Machino Hidenori, Honjoh Harunori, Kawata Yoshiko, Kashiya Tomoko, Asada Kayo, Tanikawa Michihiro, Mori-Uchino Mayuyo, Tsuruga Tetsushi, Nagasaka Kazunori, Matsumoto Yoko, Wada-Hiraike Osamu, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 19
2. 論文標題 The histone methyltransferase WHSC1 is regulated by EZH2 and is important for ovarian clear cell carcinoma cell proliferation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-019-5638-9	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kayo Asada
2. 発表標題 Genomic characterization of high grade serous ovarian carcinoma
3. 学会等名 International Gynecologic Cancer Society (招待講演) (国際学会)
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

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