

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09809

研究課題名(和文)PIK3CA遺伝子変異に対する合成致死候補の検索

研究課題名(英文)Search for synthetic lethal candidates for PIK3CA mutations

研究代表者

長安 実加(Mika, Nagayasu)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80623496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ARID1A変異の合成致死候補としてCyclin-E1(CCNE1)が同定された。CCNE1の干渉は、ARID1A遺伝子変異株の増殖を抑制し、ARID1A野生株への影響は認めなかった。細胞周期解析によりG1-S移行の阻害とアポトーシス誘導が示唆され、アポトーシスアッセイでもこれを確認した。さらに、異種移植モデルマウスにおいて、CCNE1の干渉は腫瘍細胞の増殖を効果的に抑制した。本研究により、CCNE1がARID1A変異を有する卵巣明細胞癌株に対する合成致死標的遺伝子であることが初めて示された。この遺伝子を標的とすることは、卵巣明細胞癌治療における新規の抗がん戦略として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、CCNE1がARID1A変異を有する卵巣明細胞癌株に対する合成致死標的遺伝子であることが初めて示された。この遺伝子を標的とすることは、卵巣明細胞癌治療における新規の抗がん戦略として期待される。

研究成果の概要(英文)：Cyclin-E1 (CCNE1) was identified as a candidate for synthetic lethality of the ARID1A mutation; interference with CCNE1 inhibited growth of the ARID1A mutant strain and had no effect on the ARID1A wild strain. Cell cycle analysis suggested inhibition of G1-S transition and induction of apoptosis, which was confirmed by apoptosis assays. Furthermore, in a xenograft mouse model, interference with CCNE1 effectively inhibited tumor cell growth. This study demonstrates for the first time that CCNE1 is a synthetic lethal target gene for ovarian clear cell carcinoma lines with ARID1A mutations. Targeting this gene is expected to be a novel anticancer strategy in the treatment of ovarian clear cell carcinoma.

研究分野：癌分子生物学

キーワード：卵巣明細胞癌 合成致死 ARID1A遺伝子変異 Cyclin-E1 CCNE1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣明細胞癌は白金製剤を主体とする化学療法に対して抵抗性が高いため、極めて予後不良な疾患である。欧米では上皮性卵巣癌に占める明細胞癌の割合は6-8%と低いものの、本邦では25%以上を占めている。このため、とりわけ本邦においては治療成績を向上させる新たな治療戦略の構築が求められている。従来の殺細胞性の抗癌剤と異なり癌細胞の特定分子に結合して効果を発揮する分子標的薬が次々と開発されており大変注目されているが、残念ながら卵巣明細胞癌において劇的に奏効する分子標的薬は未だないのが現状である。

本研究の位置づけとしては、PIK3CA 遺伝子変異に対する合成致死候補に対する阻害薬使用を卵巣明細胞癌における新規治療法として確立するための前臨床試験である。今回は細胞周期に関わる遺伝子群から候補となる遺伝子を検索する。更にこれらの候補について PIK3CA 野生株および変異株を用いて変異株のみ効果を示す最終候補遺伝子を見つけ出す。また PIK3CA 遺伝子とこの最終候補遺伝子との関わりを解明する。この遺伝子が発現しているときにだけ特異的に作用する「合成致死」候補遺伝子を細胞周期に関わる遺伝子を中心に探索する。これによって新規治療法を確立し、安全性・有効性を確認するための前臨床試験を行う予定であった。しかし、PIK3CA 遺伝子変異に対する合成致死候補のスクリーニングの段階で有意な候補遺伝子が見つかることが出来なかった。ここで同様に卵巣明細胞癌の約半数が発現していると報告されている ARID1A 遺伝子変異に着目し、これに対して合成致死効果のある遺伝子の対象を細胞周期、脱ユビキチン化、および DNA 損傷応答に関わる遺伝子約 500 種類の中から候補遺伝子を探し出し、合成致死メカニズムを解明する。

2. 研究の目的

卵巣明細胞癌の半数以上に遺伝子変異を伴うとされる ARID1A 遺伝子変異に対する合成致死候補の検索と、そのメカニズムを解明する。

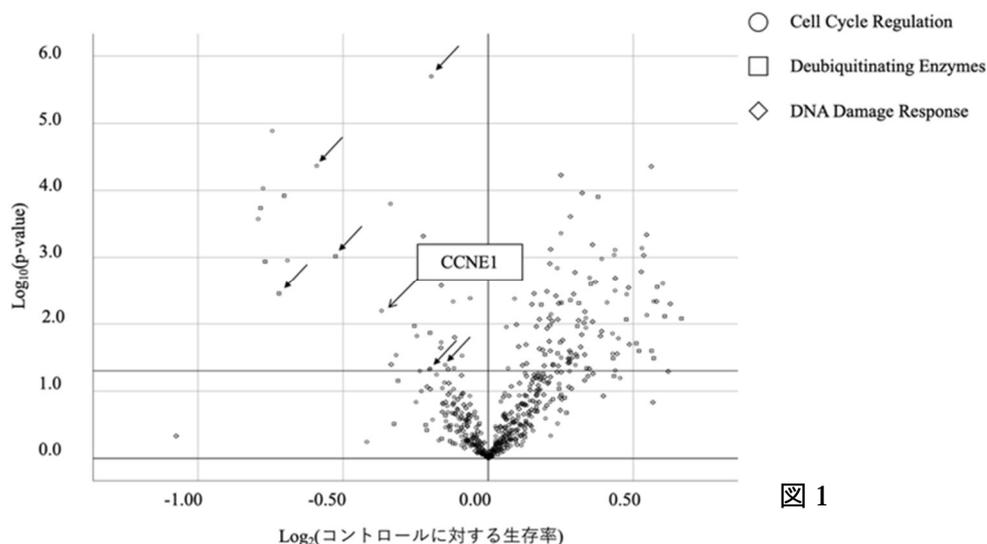
3. 研究の方法

ARID1A 野生型卵巣明細胞癌株(RMG-1)において ARID1A(5nM)で干渉する。この細胞の干渉群とコントロール群に対して siRNA ライブラリー(5nM)を用いて更に干渉を行うことでスクリーニングを行う。ARID1A 干渉群で有意に生存率が低下している候補遺伝子を抽出する。

更に ARID1A 野生型卵巣明細胞癌(RMG-1 と ES2)と ARID1A 変異型株(TOV-21G と KOC7c)に対して、上記候補遺伝子のノックダウンを行い、生存率や細胞増殖アッセイ、コロニー形成アッセイを行った。さらに細胞周期解析およびアポトーシスアッセイを行うことで腫瘍増殖抑制効果の作用機序を明らかにしていく。

4. 研究成果

ARID1A 遺伝子変異に対して合成致死効果のある遺伝子の対象を細胞周期、脱ユビキチン化、および DNA 損傷応答に関わる遺伝子約 500 種類に渡ってスクリーニングを行った結果、7 種類の候補遺伝子を同定した(図 1、矢印)。



この中で Cyclin-E1(以下 CCNE1)について細胞増殖抑制効果、アポトーシスの誘導、およびヌードマウスを用いた腫瘍増大抑制効果を確認した。TOV-21G(ARID1A 変異型)では、CCNE1 干渉により 48 時間、72 時間、96 時間において、対照群と比較して有意に増殖が抑制された。KOC7c(ARID1A 変異型)でも、CCNE1 干渉群はコントロール群と比較して、72 時間および 96 時間において時間依

存的に増殖の低下が認められた(図2上)。一方、RMG-I(ARID1A 野生型)では、CCNE1 干渉群はコントロール群と比較して有意な細胞増殖の低下を示さなかった。ES2(ARID1A 野生型)では、96時間目にも、CCNE1 干渉は細胞増殖の抑制を示した(図2下)。

CCNE1 の干渉効果を確認するために、RT-PCR 法およびウエスタンブロット法によりメッセンジャーRNA とタンパク質の発現量の減少を確認した。

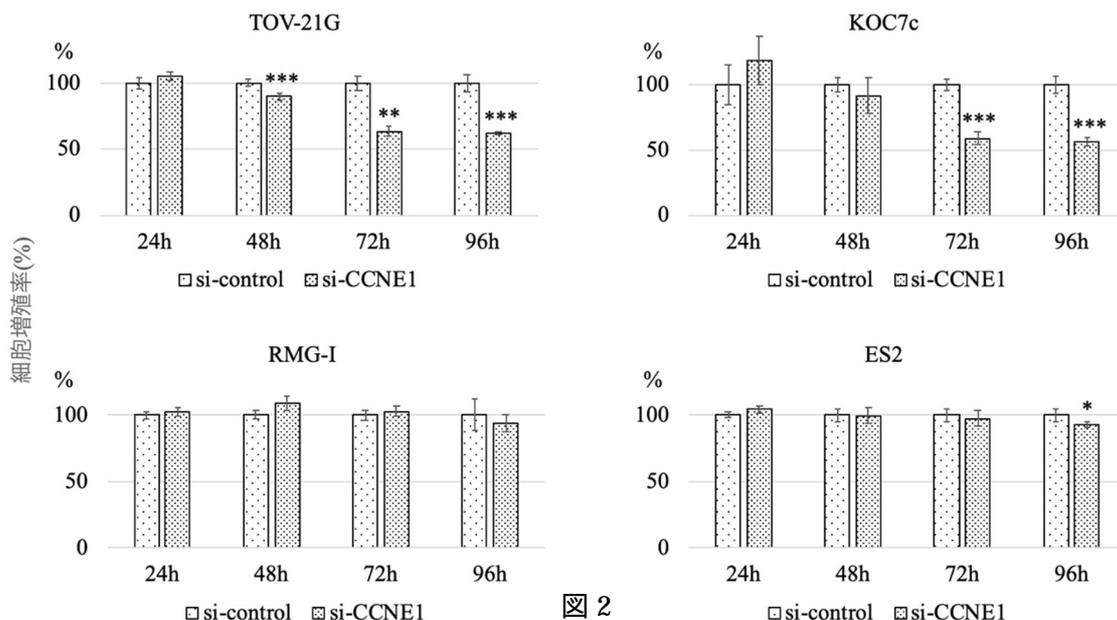
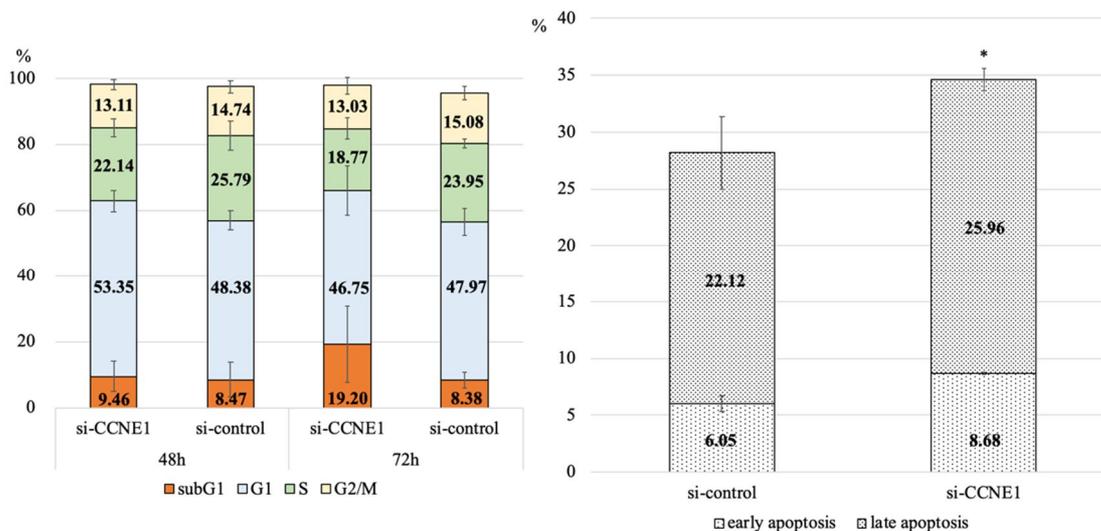


図 2

TOV-21G(ARID1A 変異型)において、CCNE1 干渉による細胞周期およびアポトーシスに及ぼす影響を評価した。CCNE1 を干渉すると、48 時間および 72 時間において、対照群に比べ sub-G1 期の割合が増加し、S 期の減少傾向が確認された(図3左)。さらに、トランスフェクション後 48 時間のアポトーシスアッセイでは、初期および後期のアポトーシス細胞の割合が、対照群に比べて CCNE1 干渉群で有意に増加した(図3右)。

TOV-21G(ARID1A 変異型)細胞をヌードマウス皮下に移植し、アテロコラーゲンに溶解した in



vivo si-RNA(CCNE1 とコントロール各 5 μ M) 200 μ l を腫瘍周辺に週 1 回、計 2 回投与した。第 3 週目に犠牲死させ腫瘍を摘出し、腫瘍重量測定を行った結果、CCNE1 干渉群はコントロール群よりも有意に腫瘍の成長が抑制されていた(452.8 \pm 274.6 vs. 789.9 \pm 129.0, p=0.013)。

本研究により、CCNE1 が ARID1A 変異型卵巣明細胞癌の合成致死標的遺伝子であることが初めて示された。この遺伝子を標的とすることは、卵巣明細胞癌における新規の抗がん戦略として期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Kawahara Naoki, Yamada Yuki, Kobayashi Hiroshi	4. 巻 22
2. 論文標題 CCNE1 Is a Putative Therapeutic Target for ARID1A-Mutated Ovarian Clear Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5869 ~ 5869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22115869	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河原直紀, 竹田善紀, 松原 翔, 山田有紀, 小林 浩
2. 発表標題 HNF-1beta 強発現を呈する卵巣明細胞癌に対する合成致死候補の検索
3. 学会等名 第24回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
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
研究分担者	松原 翔 (Sho Matsubara) (20825236)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	
研究分担者	小林 浩 (Hiroshi Kobayashi) (40178330)	奈良県立医科大学・医学部・研究員 (24601)	
研究分担者	小川 憲二 (Kenji Ogawa) (60623494)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	河原 直紀 (Naoki Kawahara) (70623495)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	
研究分担者	山中 彰一郎 (Shoichiro Yamanaka) (30866009)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	

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