

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23904

研究課題名（和文）プロモドメインを標的とした卵巣明細胞癌個別化医療の確立

研究課題名（英文）Targeting bromodomains as a novel therapeutic strategy for clear cell carcinoma of the ovary.

研究代表者

重田 昌吾 (Shigeta, Shogo)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90842633

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：治療抵抗性卵巣癌である卵巣明細胞癌についてエピゲノム領域を中心に治療標的候補分子を探索した。その結果、BETタンパク質BRD2/BRD3の機能抑制が著明に癌の増殖を抑制することを見出した。また、BET阻害剤と併用で相乗的な治療効果が期待できる薬剤の組み合わせを同定した。さらに、CHD4の機能を抑制すると卵巣癌治療の中心であるプラチナ製剤への感受性が高まることを発見した。

本研究では癌本来の特徴をより忠実に再現可能な実験モデルである卵巣癌オルガノイドモデルの作成も試み、短期的な卵巣癌オルガノイド培養に成功した。安定維持可能となったのち、将来的にオルガノイドでも治療効果を検証する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞癌は本邦で発症頻度が高い疾患であるが、卵巣癌で最も高頻度に見られる高異型度漿液性癌と比較して卵巣癌治療の第一選択薬であるプラチナ製剤に抵抗性を示すことが多い。卵巣癌で使用可能となったPARP阻害剤による治療効果も限定的である可能性が示唆されている。

本研究では卵巣明細胞癌で特に有効と考えられる新規治療標的タンパク質の同定に成功し、有効な薬剤の組み合わせについても検証を行った。同定したタンパク質の一部については阻害剤が開発され、ヒトでの臨床試験が進行中のものも含まれている。本研究結果は組織型に応じた治療戦略が確立されていない卵巣癌において新たな個別化医療の可能性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：Focusing on epigenomic regulators, we investigate therapeutic target candidates for clear cell carcinoma of the ovary (OCCC), one of the chemo-resistant subtypes in ovarian cancer. It was elucidated that functional interference of BET proteins BRD2/BRD3 strongly suppresses OCCC cell proliferation. We also identified several inhibitors which synergistically suppress OCCC cell growth in combination with BET inhibitors.

It was also revealed that the suppression of the function of CHD4 sensitizes OCCC cells to platinum agents, a key anti-cancer drug in the treatment of ovarian cancer.

In this study, we also attempted to develop OCCC organoids that recapitulate drug sensitivity of their original tumor. We were successful in short-term OCCC organoid maintenance. The synergistic drug interactions detected in this study is to be examined in organoid model after the optimization of the culture protocol for long-term stable maintenance.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：卵巣癌 明細胞癌 個別化医療 エピゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の中で予後不良な疾患であり、それぞれ特有の分子生物学的特徴を有する多様な組織型に細分類される。その中で卵巣明細胞癌は本邦女性で発症頻度が高い治療抵抗性サブグループである。オラパリブ、ニラパリブに代表される PARP 阻害剤の登場で卵巣癌治療は大きな転換期を迎えているが、その恩恵を最大限享受しうるのは DNA 二重鎖切断に対する相同組み換え修復機構に異常を有するタイプであり、大部分が高異型度漿液性癌や高異型度類内膜癌といった組織型である。明細胞癌では相同組み換え異常の頻度は低く、PARP 阻害剤以外に新たな個別化医療の確立が求められている。

一方、これまで卵巣癌治療の研究で用いられてきた既存の細胞モデルは卵巣癌本来の性質を正確に再現しているとは言えず、個別化医療確立へ向けた基礎と臨床の橋渡しにおいて少なからず障害となっている。

オルガノイドは由来臓器の構造、性質を細胞培養環境で忠実に再現可能なミニチュアモデルといえる。癌研究の分野でも応用が進んでおり、癌オルガノイドは従来の実験細胞と比較してより正確に腫瘍本来の薬剤感受性を評価可能なモデルとして注目されている。⁽¹⁾ 卵巣癌オルガノイドについての知見はまだ十分とは言えないが、今後オルガノイド技術の応用によって卵巣癌の領域でも個別化医療研究の発展が期待されている。

2. 研究の目的

十分な個別化医療が展開できていない卵巣明細胞癌に焦点をあて、本研究では卵巣明細胞癌の新規治療標的分子の探索を目的とした。予備的検討からプロモドメインタンパク質を中心とするエピゲノム制御分子が明細胞癌で有望な治療標的であると予想されたため、エピゲノム関連の分子を主な治療標的候補として検討を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 卵巣明細胞癌オルガノイドの樹立

書面による説明と同意を得た後に、自施設において手術で摘出された卵巣癌組織から卵巣明細胞癌オルガノイドを樹立する。既報の文献を参考に予備的な培養条件の検討を行った後、最大 5 例の卵巣明細胞癌オルガノイド樹立を目指す。

(2) 治療標的候補分子及び同分子の阻害剤による検証実験

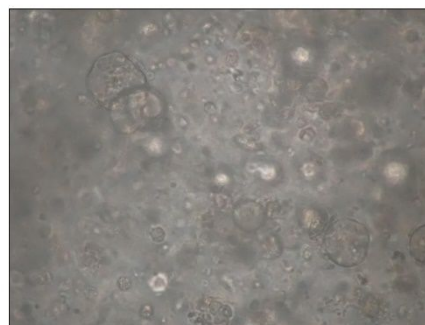
樹立したオルガノイド、或いは進捗状況によってはその代替となる研究モデルを用いて治療標的候補遺伝子のノックアウト/ノックダウンの導入や阻害剤投与を行い、卵巣明細胞癌に最適な治療標的分子の同定を試みる。また、その抗腫瘍メカニズムについても探索を行う。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌オルガノイドモデル作成に向けた試み

同意が得られた患者から術中に卵巣腫瘍組織を採取し、卵巣癌オルガノイドの樹立を試みた。数例の予備的検討で培養条件を設定の上、10 症例の卵巣癌組織でオルガノイド培養を開始した。卵巣明細胞癌を含め半数以上の症例でがん組織の三次元構造を維持した癌オルガノイドの発育を確認することができた。代表的なオルガノイドを図 1 に示す。しかしながら、いずれのオルガノイドも数週間以内の培養期間中に細胞死に至った。本研究期間中に安定して実験に用いることができるオルガノイドモデル樹立には至らず、引き続き培地中の増殖因子の種類や濃度、継代方法などの最適化を現在行っている。

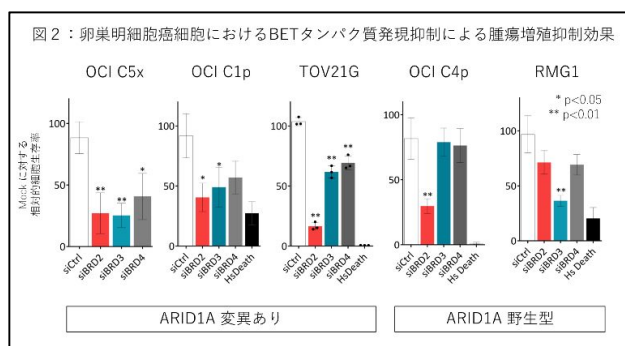
図 1 培養開始初期の卵巣明細胞癌オルガノイド



(2) 患者由来卵巣癌細胞を用いた治療標的候補プロモドメインタンパク質の絞り込み

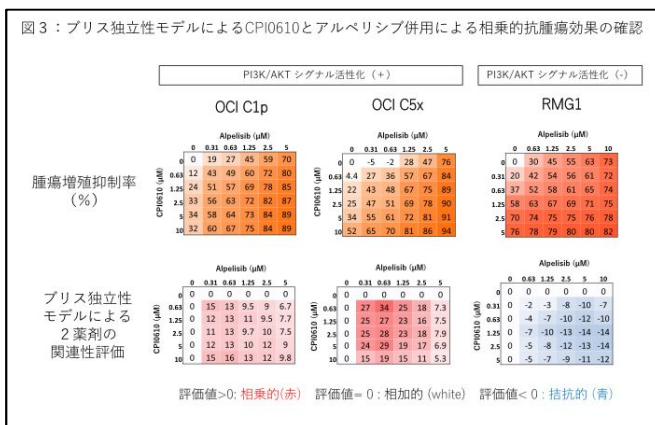
予備実験で抽出したプロモドメインタンパク質を対象として、RNA 干渉法を用いてその有効性を検証した。当初の研究計画では卵巣癌オルガノイドに遺伝子ノックアウトを導入して検討する予定であったが、研究期間内にオルガノイドを用いた実験系の確立は困難であったため患者由来卵巣癌細胞を代替として使い、siRNA トランスフェクションによる発現抑制を行った。その結果、

bromodomain and extra-terminal domain (BET) タンパク質の一群である BRD2/BRD3 の発現抑制が特に強く卵巣明細胞癌の腫瘍増殖能を抑制することを見出した。悪性腫瘍の分子標的治療において、BET タンパク質の中では特に BRD4 がこれまで着目されてきたため BRD4 発現抑制との比較検討も行ったが、BRD2/BRD3 ノックダウンにおいてより顕著な細胞増殖が抑制される傾向を得た。また、BRD2 は ARID1A 変異を有する卵巣癌で有望な治療標的分子であることが報告されているが⁽²⁾、本研究結果からは BRD2, BRD3 共に ARID1A 変異の有無にかかわらず卵巣明細胞癌の腫瘍増殖を抑制する可能性が示唆された (図 2)。



(3) BET 阻害剤による抗腫瘍効果の検証

複数の BET 阻害剤に対する卵巣明細胞癌の感受性を確認し、臨床応用を検討する阻害剤としての妥当性を確認した。一方、既報臨床試験では固形癌において BET 阻害剤単剤投与での奏効率は低いため、BET 阻害剤と併用することで相乗的抗腫瘍効果が得られる阻害剤についてのスクリーニングを行い検証した。その結果、PI3K/AKT 阻害剤との併用が有望である可能性が示唆された。現在ヒトでの臨床試験が進行中である BET 阻害剤 CPI0610、および国外で乳癌患者への投与が認可されている PI3K 阻害剤アルペリシブを用いて



ブリス独立性モデル⁽³⁾により詳細な検討を行ったところ、PI3K/AKT シグナル活性が亢進している卵巣明細胞癌細胞を中心に同薬剤の併用によって相乗的な抗腫瘍効果が得られることが確認された (図 3)。また、BET 阻害剤存在下ではより低濃度の PI3K/AKT 阻害剤で AKT リン酸化が抑制されること、その結果 p53 非依存性アポトーシスが誘導され細胞死に至ることが併用療法による作用機序の一つであることを解明した。

(4) 新規治療標的分子 chromodomain helicase DNA-binding protein 4 (CHD4) の同定

プロモドメインタンパク以外のエピゲノム制御分子についても治療標的となる可能性の探索を行った。過去の研究結果から卵巣明細胞癌の進行に転写調節因子 zing finger homeobox 4 (ZFHX4) がかわる可能性が示唆されていたが、ZFHX4 はクロマチンリモデリング因子である NuRD 複合体を構成する CHD4 と直接結合し相互作用することがわかっており、CHD4 が卵巣明細胞癌において治療標的となり得るかについて細胞株を用いた *in vitro* の実験系で検証した。卵巣明細胞癌において CHD4 の発現を抑制したところ、CHD4 のノックダウンそのもので著明な腫瘍増殖抑制効果は認められなかったが、卵巣癌治療の中心的薬剤であるプラチナ製剤への感受性が有意に増強することが確認された。加えて、CHD4 が多剤薬剤耐性に関与する P 糖タンパク質の発現を制御することが作用機序の一部であることを解明した。ヒトへの投与が検討されている CHD4 阻害剤は現在ないが、Cleveland Clinic の研究チームが CHD4/SMARC5A 阻害剤を同定し血液悪性腫瘍細胞を用いてその抗腫瘍効果を示している⁽⁴⁾。同研究グループから阻害薬の譲渡を得、プラチナ製剤であるシスプラチンとの併用実験を行い相乗的な抗腫瘍効果を確認すること

に成功した。卵巣明細胞癌は卵巣癌の代表的組織型である高異型度漿液性癌と比較して一般にプラチナ抵抗性症例が多く、CHD4 とプラチナ製剤の併用療法によるプラチナ抵抗性の克服が期待できる結果であった。

参考文献

1. Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, Shaw R, Fedrizzi T, Sboner A, et al. Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer discovery*. 2017;7(5):462-77.
2. Berns K, Caumanns JJ, Hijmans EM, Gennissen AMC, Severson TM, Evers B, et al. ARID1A mutation sensitizes most ovarian clear cell carcinomas to BET inhibitors. *Oncogene*. 2018;37(33):4611-25.
3. Bliss CI. The calculation of microbial assays. *Bacteriological reviews*. 1956;20(4):243-58.
4. Kishtagari A, Ng KP, Jarman C, Tiwari AD, Phillips JG, Schuerger C, et al. A First-in-Class Inhibitor of ISWI-Mediated (ATP-Dependent) Transcription Repression Releases Terminal-Differentiation in AML Cells While Sparing Normal Hematopoiesis. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):216-.

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 1件）

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 Yoshiko Oyama, Shogo Shigeta, Hideki Tokunaga, Keita Tsuji, Masumi Ishibashi, Yusuke Shibuya, Muneaki Shimada, Jun Yasuda, Nobuo Yaegashi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 CHD4 regulates platinum sensitivity through MDR1 expression in ovarian cancer: A potential role of CHD4 inhibition as a combination therapy with platinum agents | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 PLOS ONE (in press) | 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） なし | 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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|-----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 重田 昌吾, Christopher Kemp, 八重樫 伸生 |
| 2. 発表標題 RNAi及び薬剤スクリーニングを用いた卵巣明細胞癌に対する新規治療標的分子の同定 |
| 3. 学会等名 第8回 婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Yoshiko Oyama, Shogo Shigeta, Keita Tsuji, Hideki Tokunaga, Muneaki Shimada, Nobuo Yaegashi |
| 2. 発表標題 Functional analysis of ZFH4 as a novel therapeutic target in ovarian cancer |
| 3. 学会等名 AACR Virtual Annual Meeting 2020 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
|---------|---------|