

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18219

研究課題名（和文）ARID1A変異型卵巣明細胞癌を標的としたATRかつBRD4阻害療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a novel combination therapy of ATR inhibitor and BRD4 inhibitor targeting ARID1A mutated clear cell ovarian cancer

研究代表者

木瀬 康人（Kinose, Yasuto）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90778531

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣明細胞癌（CCOC）は抗がん剤抵抗性症例が多く難治性であるが、その約半数が持つARID1A変異という遺伝子異常を標的とした新規治療法の可能性を探索した。先行研究でCCOC細胞にはATR阻害剤とBRD4阻害剤がそれぞれ単独で強い効果を示したことをふまえ、本研究ではARID1A変異CCOCに対するATR阻害剤かつBRD4阻害併用療法の確立を目指した。研究結果は、ATR阻害剤かつBRD4阻害併用療法は細胞株でも患者由来腫瘍卵巣同所移植マウスモデルにおいても、ARID1A変異癌に強い抗がん効果を認め、CCOCに対する新規の分子標的治療となる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞癌（CCOC）は、現在臨床において使用している抗がん剤に対する抵抗性症例が多く治療に難渋しており、新規治療法の開発が喫緊の課題である。本研究ではCCOCの約50%が持つARID1A変異という特徴に着目し、新規治療の開発を目指した。本研究結果にて、ATR阻害剤かつBRD4阻害併用療法は、ARID1A変異を持つCCOCに対して強い相乗的な抗腫瘍効果が示され、この併用療法がARID1A変異を持つCCOCへの新規治療法となる可能性が見出された。本研究結果を早期に臨床応用するべく、今後も研究ならびに臨床試験の準備を進めてゆく。

研究成果の概要（英文）：Clear cell ovarian cancer (CCOC) is often resistant to standard chemotherapy agents and has limited treatment options. ARID1A is the most prevalent genomic mutation with approximately 50% of all CCOC harboring this mutation. As we reported that ATR inhibitor (ATRi) alone and BRD4 inhibitor (BRD4i) alone demonstrated significant anti-tumor effect in CCOC experimental models from our previous study, we hypothesize that a combination of ATRi+ BRD4i will especially target ARID1A-mutated CCOC. We tested the combination of ATRi+ BRD4i in CCOC cell lines and patient-derived xenograft mouse models and observed significant synergy tumor regression. We found that ATRi+ BRD4i would be a novel molecular-targeted therapy in CCOC in the future.

研究分野：婦人科癌、卵巣癌、分子標的治療、ゲノム医療、個別化医療

キーワード：卵巣癌 明細胞癌 ゲノム医療 個別化医療 ARID1A PDX ATR BRD4

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは婦人科悪性腫瘍において最も予後不良な疾患であり、従来より組織学的診断によって分類される多様な疾患である。日本において最も多い組織型は高悪性度漿液性癌 (High-grade serous ovarian cancer; HGSOC) あるいは明細胞癌 (Clear cell ovarian cancer; CCOC) である。CCOC は初回治療、再発治療において抗がん剤抵抗性症例が HGSOC に比して非常に多く、進行・再発 CCOC には現行の標準治療の奏効例はわずかしかなく、新規治療法の確立が喫緊の課題となっている。また、日本は世界で最も全卵巣がんにおける CCOC の割合が高い国の一つであるが (25-30%)、欧米諸国では約 5%と低いため CCOC は稀な腫瘍として扱われており、その研究・治療開発は世界的に遅れている。

近年次世代シーケンサーの普及に伴って、各がんにおける Genomics (遺伝子変異、コピー数異常、DNA メチル化異常など) が容易に同定出来るようになってきた。これらの技術の進歩とともに、個々のがんにおける遺伝子異常を治療 Biomarker として利用する個別化医療 (Precision medicine) ががん治療の新たな戦略として注目されている。例えば遺伝性乳がん卵巣がん症候群の原因遺伝子として知られる *BRCA1*、*BRCA2* の遺伝子変異は、この遺伝子産物が深く関与する DNA damage 修復機構の脆弱性を引き起こし、ポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP) が関与する DNA damage 修復への依存性を高めることになる。このメカニズムを治療に応用した *BRCA1/2* 遺伝子異常を持つがんへの PARP 阻害剤治療はがん治療の大きな Breakthrough となり、その臨床応用は卵巣がんのみならず乳がん、前立腺がん、膵がん等と広がってきている。このように遺伝子異常を標的にした個別化医療は、がん種の枠を超え、新たながん治療を切り拓いていっている。

難治性がんの一つである CCOC の Genomics について、これまでの研究にて HGSOC と大きく異なるということが報告されている。HGSOC はほぼ全例に *TP53* 変異が見られるが、その他のがん関連遺伝子異常については非常に多様であり、一方で顕著なコピー数異常の存在が際立っている。CCOC は約 50% に *ARID1A* 変異、約 40% に *PI3KCA* 変異が見られ、目立ったコピー数異常は認められない。Genomics だけでもこれほど違う HGSOC と CCOC を「卵巣がん」として一括し同じ治療を実施してきたのだが、HGSOC に対して奏効率の高い標準化学療法が CCOC に効きづらいのも納得できる。今回の我々は、CCOC に対する新規治療を開発することを目指して *ARID1A* 変異を標的とした新戦略を研究する。

ARID1A 変異は全ゲノムアトラス (TCGA) によると全がんの約 8%に存在する。最も高頻度に認められるがんは CCOC (約 50%)、次いで子宮内膜癌 (約 30%)であり、婦人科悪性腫瘍と非常に関連が強い。*ARID1A* タンパクは SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の構成分子の一つであり、ほとんどの *ARID1A* 変異は *ARID1A* タンパクの低発現・機能異常を引き起こす。SWI/SNF 複合体はクロマチンの立体構造を制御することによって、各種の遺伝子発現、特にがんと深く関わる遺伝子群 (DNA damage 修復、PI3K/AKT 経路、アポトーシス制御、ROS 産生など) を制御している (Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2018;1870:176-184.)。これまでの報告では *ARID1A* 変異をもつがんは DNA damage 修復機構への依存性を高めており、これを標的とした研究が報告されている (Cancer Discov. 2015;5:752-67.、Nat Commun. 2016;7:13837.)。これを踏まえて、我々は *ARID1A* 変異 CCOC に対する DNA damage 修復機構を標的とした新規治療開発を目指す。

これまで我々は予備実験として、6 種類の CCOC 細胞株 (ES-2、TOV21G、OVTOKO、

OVMANA、JHOC-9、OVISE) を用いたドラッグスクリーニングを行った。なお、我々の全ゲノムシーケンスを用いた先行研究により、ES-2 は *ARID1A* 野生型、残りの 5 細胞株は *ARID1A* 変異型と確認されている (Cell Rep. 2018;25:2617-2633.)。今回スクリーニングに用いた薬は、現行の標準治療である Carboplatin と Paclitaxel、DNA damage 修復機構関連薬 (PARP 阻害剤、ATR 阻害剤)、ならびに近年がん治療への新たな戦略として有望と注目されているエピジェネティクス制御関連薬 (BRD4 阻害薬、EZH2 阻害薬、DNMT 阻害薬) である。これらのうち単剤で最も効果を示したのは ATR 阻害剤 (ATRi) と BRD4 阻害薬 (BRD4i) であった。がん治療では単剤の分子標的治療では早期にその耐性が生じることが多いが、我々の行った予備動物実験データにおいても ATRi と BRD4i のそれぞれ単剤群ではコントロール群と比較して大きく予後を改善することはなかった。次に我々は機序の異なるこの 2 剤の併用療法を *in vitro* にて試みたところ、*ARID1A* 野生型に比べて *ARID1A* 変異をもつがんに対して強い相乗的な抗腫瘍効果を認めることを発見した。よって本研究では *ARID1A* 変異 CCOC に対する ATRi + BRD4i 併用療法の有用性を証明するために、*in vitro* 実験ならびに患者由来腫瘍異種移植 (Patient-derived xenograft、PDX) マウスモデルを用いた検証を行い、将来的に新たな治療法の確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、予後不良である CCOC の予後を改善させるべく、*ARID1A* 変異 CCOC に対する ATRi と BRD4i を用いた併用療法の有用性を検証することである。*ARID1A* 変異を標的とした CCOC の個別化医療は世界中で未だに臨床応用されていない。ATRi と BRD4i は現在数剤が各がんの Phase I/II 臨床試験が行われており、そのヒトへの最大耐量・安全性が確認されている。本研究にて有効性が確認されれば、早期に臨床試験・臨床応用への可能性が高い。また *ARID1A* 変異は婦人科がんのみならずほとんどのがん種で見られるため、本研究の成果によっては多くのがん治療への応用できる革新的な成果となる可能性を有している。

3. 研究の方法

以下の 4. 研究成果に記載した通りに下記の研究を行った。

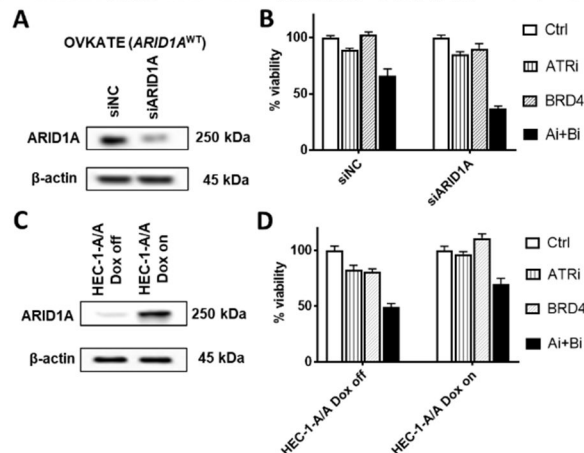
- (1) *ARID1A* 発現が ATRi + BRD4i 併用療法に与える影響に関する *in vitro* での検討
- (2) *ARID1A* 野生型と変異型細胞における ATRi + BRD4i 併用療法が DNA damage、アポトーシスへ与える影響の差異の検討
- (3) *ARID1A* 野生型と変異型 PDX マウスモデルにおける検討

4. 研究成果

(1) *ARID1A* 発現が ATRi + BRD4i 併用療法に与える影響に関する *in vitro* での検討

ARID1A 野生型卵巣がん細胞 OVKATE に siRNA を用いて *ARID1A* をノックダウンし (図 1A)、ATRi + BRD4i 併用療法への感受性の変化を MTT assay にて評価した (各投薬を 5 日間実施、Ctrl コントロール、ATRi AZD6738 0.5 μ M、BRD4i AZD5153 0.5 μ M、Ai + Bi AZD6738 0.5 μ M + BRD4i AZD5153 0.5 μ M)。*ARID1A* をノ

図 1 *ARID1A* 発現が ATRi + BRD4i 併用療法に与える影響についての *in vitro* の検討



ックダウンすることで ATRi + BRD4i 併用療法の感受性は増加した (図 1B)。一方、ドキシサイ

クリン応答性 *ARID1A* 誘導性子宮内膜がん細胞 HEC-1-A を用いて、*ARID1A* 変異型細胞に *ARID1A* を強制発現させた場合 (図 1C、1 µg/ml Doxycyclin を 2 日間投与) の ATRi + BRD4i 併用療法への感受性へ与える変化を MTT assay (各投薬を 5 日間実施、Ctrl コントロール、ATRi AZD6738 0.1 µM、BRD4i AZD5153 0.1 µM、Ai + Bi AZD6738 0.1 µM + BRD4i AZD5153 0.1 µM) にて検討した。*ARID1A* を強制発現させると、ATRi + BRD4i 併用療法への感受性は低下した (図 1D)。以上より *ARID1A* タンパクの発現は ATRi + BRD4i 併用療法への感受性のバイオ マーカーとなることが示唆される。

(2) *ARID1A* 野生型と変異型細胞における ATRi + BRD4i 併用療法が DNA damage、アポトーシスへ与える影響の差異の検討

ARID1A 野生型 (OVTAKE、ES-2) と *ARID1A* 変異型 (TOV21G、OVMANA) 卵巣癌細胞株を用いて、ATRi + BRD4i 併用療法が DNA damage に与える影響を抗 γ H2AX 抗体を使用したフローサイトメトリーで (各投薬を 24 時間実施、Ctrl コントロール、ATRi AZD6738 0.25 µM、BRD4i AZD5153 0.25 µM、Ai + Bi AZD6738 0.25 µM + BRD4i AZD5153 0.25 µM)、アポトーシスに

与える影響を PI 染色かつ抗 AnnexinV 抗体を使用したフローサイトメトリー (各投薬を 5 日間実施、Ctrl コントロール、ATRi AZD6738 0.1 µM、BRD4i AZD5153 0.1 µM、Ai + Bi AZD6738 0.1 µM + BRD4i AZD5153 0.1 µM) にて検討した。

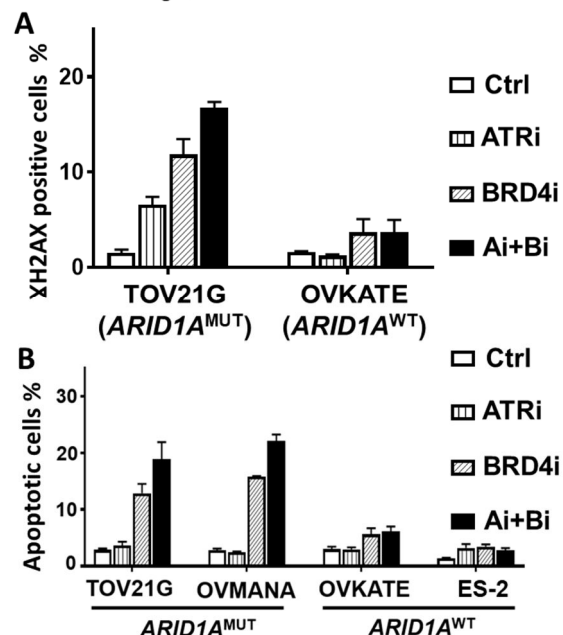
ARID1A 変異型 TOV21G では、ATRi 単剤または BRD4i 単剤と比べて ATRi + BRD4i 併用療法が DNA damage を上昇させたが、*ARID1A* 野生型 OVTAKE ではその変化は認めなかった (図 2A)。また、*ARID1A* 変異型 (TOV21G、OVMANA) では ATRi + BRD4i 併用療法によって著しくアポトーシスの増加を認めた

が、*ARID1A* 野生型 (OVTAKE、ES-2) では ATRi + BRD4i 併用療法による有意なアポトーシスの増加は認めなかった (図 2B)。以上より、ATRi + BRD4i 併用療法は *ARID1A* 変異型 (TOV21G、OVMANA) 卵巣癌細胞株に有意に DNA damage 上昇、アポトーシス増加をきたすことを同定した。

(3) *ARID1A* 野生型と変異型 PDX マウスモデルにおける検討

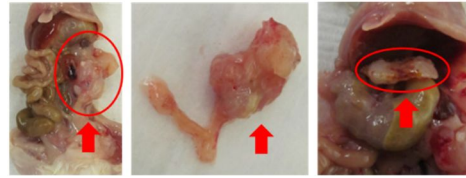
University of Pennsylvania にて確立した *ARID1A* 野生型 (WO-30) と変異型 (WO-38、WO-24) の CCOC PDX 卵巣同所移植マウスモデル (図 3) を用いて、ATRi + BRD4i 併用療法の効果を比較検討した。具体的には、麻酔下に免疫不全マウスに開腹手術を実施し、1 mm³ 大の PDX 腫瘍 3 個をマウス卵巣に縫合し PDX マウスモデルを作成した。数週間後に増大してくる PDX 腫瘍を触診と経腹超音波にて経時的に観察し、腫瘍が 60-100 mm³ に達した時点で 4 群 (コントロール、ATRi 単剤、BRD4i 単剤、ATRi + BRD4i 併用) にランダム化し投薬を開始した。腫瘍サ

図 2 *ARID1A* 野生型と変異型細胞における ATRi + BRD4i 併用療法が DNA damage、アポトーシスへ与える影響の検討



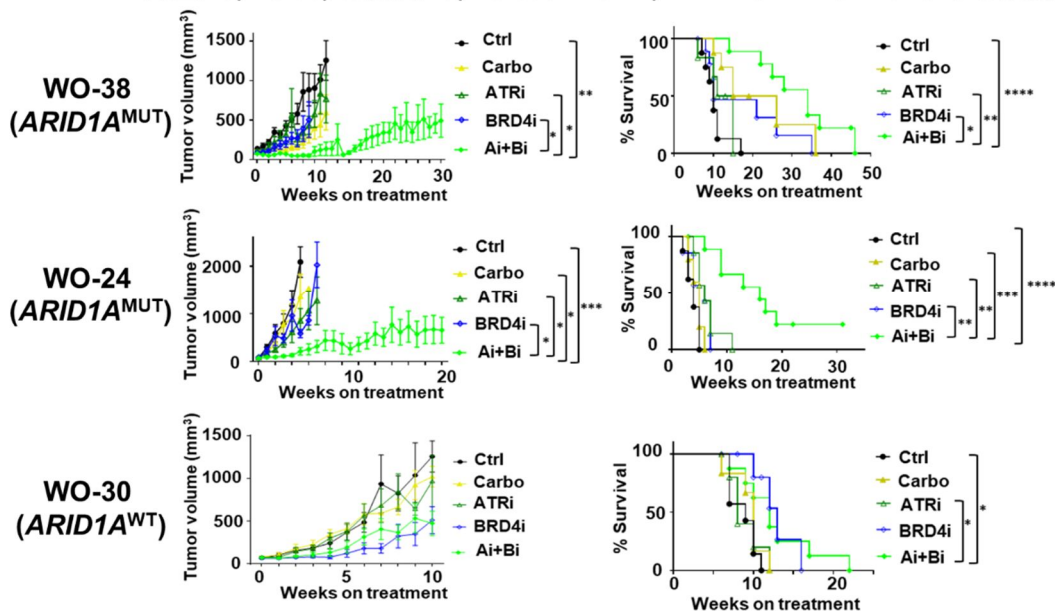
サイズは毎週超音波にて計測し、1200 mm³ に達した時点でマウスを安楽死させ、腫瘍組織を採取しエンドポイントとした。薬の副作用に関しては毎週体重の評価ならびにコンディションスコアを記録しモニタリングした。

図3 卵巢明細胞癌卵巢同所移植 PDX モデルにおける左卵巢腫瘍(左、中央)と肝下面への転移巣(右)



ARID1A 変異型 PDX である WO-38 と WO-24 では ATRi+BRD4i 併用療法はそれぞれの単剤療法やカルボプラチン単剤に比して有意な抗腫瘍効果とマウス生存率改善を認めた(図4)。一方で、*ARID1A* 野生型 PDX の WO-30 では ATRi+BRD4i はそれぞれの単剤療法と抗腫瘍効果は有意差を認めなかった(図4)。以上より卵巢癌同所移植 PDX マウスモデルを用いた検討においても、ATRi+BRD4i 併用療法は *ARID1A* 野生型と比べて *ARID1A* 変異型腫瘍に特異的に抗腫瘍効果を示すことがわかった。

図4 *ARID1A* 野生型(WO-30)と変異型(WO-38、WO-24) PDX マウスモデルにおける検討



以上の成果より、ATRi+BRD4i 療法が *ARID1A* 変異型 CCOC に対して DNA damage 上昇、アポトーシス増加をきたすことで *In vitro*、*In vivo* PDX マウスモデルで抗腫瘍効果をもたらすことを証明した。本研究成果が *ARID1A* 変異型 CCOC に対する新規の分子標的治療となりうるものが高く評価され、現在臨床応用に向けて米国臨床研究グループ NRG Oncology とともに臨床試験を計画・準備している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Yasuto Kinose, Kenjiro Sawada, Tadashi Kimura, Ronny Drapkin, Fiona Simpkins |
| 2. 発表標題 Dual blockade of BRD4 and ATR/Wee1 pathway exploits ARID1A mutations in clear cell ovarian cancer orthotopic PDX models |
| 3. 学会等名 第62回日本婦人科腫瘍学会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|-------|--|----------------------------------|----|
| 研究協力者 | 粕谷 香南子 (Kasuya Kanako) | 大阪大学・医学系研究科・大学院生 (14401) | |
| 研究協力者 | 王 妍 (Wang Yan) | 大阪大学・医学系研究科・大学院生 (14401) | |
| 研究協力者 | 岡村 綾子 (Okamura Ayako) (40910253) | 大阪大学・医学系研究科・技術補佐員 (14401) | |

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 |
|---------|---------|