

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09531

研究課題名（和文）予後不良卵巣癌における薬剤製剤抵抗性の機序解明と新規治療標的の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of drug resistance in ovarian cancer with poor prognosis and development of new therapeutic targets

研究代表者

徳永 英樹（TOKUNAGA, Hideki）

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30595559

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）：化学療法抵抗性の難治卵巣がんである明細胞癌において2次元培養細胞株を用いた実験結果より、クロマチンリモデリング因子であるCHD4が白金製剤感受性を制御することを見出した。また明細胞癌における発癌機構に深く関与するARID1Aの変異の有無によってスフィンゴ脂質の代謝に変動があることをバイオバンクデータおよびヒト臨床検体、培養細胞下部の基礎実験データから明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌細胞株を用いてZFHX4とCHD4のノックダウン実験によってシスプラチン感受性が亢進する現象を認めた。現時点でクロマチンリモデリング機構の異常を標的とした治療薬は卵巣がんにおいて未開発であるが、転移能やシスプラチン感受性を調節することを明らかにすることで、これまで治療抵抗性であった腫瘍の予後改善に寄与すると考えられる。癌患者と健常者又、遺伝子型に応じてメタボロームプロファイルが異なることを見出したことから、遺伝子型に応じた個別化治療につながると思われる。

研究成果の概要（英文）：Based on the results of experiments using two-dimensional cultured cell lines in clear cell carcinoma, a poor prognostic histological type of ovarian cancer that is resistant to chemotherapy, we found that CHD4, a chromatin remodeling factor, controls sensitivity to platinum drugs. Furthermore, we found that sphingolipid metabolism varies depending on the presence or absence of mutations in ARID1A, which is deeply involved in the carcinogenic mechanism of clear cell carcinoma, based on biobank data, human clinical specimens, and basic experimental data on cultured cell samples.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 薬剤耐性 白金製剤 クロマチンリモデリング メタボローム セラミド

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは婦人科悪性腫瘍の中でも最も予後が悪く、本邦のがん登録では4840人が卵巣がんで死亡しており、米国では年間15500人が卵巣がんで死亡している(Siegel R, A cancer journal for clinicians, 2012)。卵巣がんで最も頻度が高い組織型は漿液性癌(serous carcinoma: SC)であり、明細胞癌(clear cell carcinoma: CCC)は希少な組織型と考えられてきたが、人種ごとに卵巣癌におけるCCCの頻度をみたとところアジア人で11.1%、白色人種で4.8%、黒色人種で3.1%(Chan JK, Gynecol Oncol, 2008)であり、日本人では卵巣がんの25%がCCCである(Okamoto A, IGCS, 2014)。日本人においてCCCは比較的多い組織型であり、薬物治療に抵抗性があることが本邦から報告されている(Sugiyama T, Cancer, 2000)。CCCはSCと比較し、卵巣癌の標準治療であるプラチナ・タキサン療法に対する感受性が低く、III/IV期のCCCの生存期間の中央値はSCと比較し有意に低い(del Carmen MG, Gynecol Oncol, 2012)。そこで、CCCの治療を改善する取り組みがなされてきたが、殺細胞性薬剤のみによる治療成績の改善は限界に達しており、CCCに対する有効な標的分子を発見することが、CCCの治療成績を改善する上で重要と考えられる。

我々は先行研究でCCCの臨床検体に全エクソーム解析を行い、進行度と転写因子ZFHX4の体細胞変異との間に相関を認めた(Shibuya Y and Tokunaga H, et al, Genes Chromosomes Cancer, 2018)。ZFHX4の機能については不明な点が多いが、神経膠芽腫においてクロマチンリモデリングに関わるCHD4遺伝子の役割を制御して腫瘍細胞の分化に影響を与えることが報告されている(Chundnovsky Y, Cell reports, 2014)。QingらはZFHX4の変異は中国人の食道がん患者の予後不良群と相関があることを報告している(Qing T, Scientific reports, 2017)。CCCの発症には癌抑制遺伝子ARID1Aの変異が深く寄与している。ARID1Aの機能低下によりPI3K/mTOR経路のシグナル亢進することで腫瘍の増殖に寄与していると考えられ、mTOR inhibitorがキードラッグになりうる可能性があった。ところが、mTOR inhibitorを用いた第III相臨床試験により、卵巣CCCに対する有効性は否定されたており、新たな治療標的因子の探索が依然求められている(Kwan et al. AACR 2015)。

2. 研究の目的

研究代表者らはOCCCにおけるZFHX4の体細胞変異が癌の播種・転移を促進する可能性を示しており、海外の報告では膠芽腫や食道癌においてZFHX4の体細胞変異や活性化を認める症例は生命予後が悪いことが報告されている。(Chundnovsky Y, Cell reports, 2014, Qing T, Scientific reports, 2017)。ZFHX4の機能に関しては解明されていない点が多いが、CHD4の発現を促進する転写因子であり(Chundnovsky Y, Cell reports, 2014)、CHD4と直接結合し転写を共調節することがわかっている。CHD4の阻害により急性骨髄性白血病の治療効果が改善したという報告(Sperlazza J, Blood, 2015)があり、CHD4が新規の治療標的として注目されつつある。

卵巣癌細胞株を用いてZFHX4とCHD4のノックダウン実験によってシスプラチン感受性が亢進する現象を認めた。現時点でクロマチンリモデリング機構の異常を標的とした治療薬は卵巣がんにおいて未開発であるが、転移能やシスプラチン感受性を調節することを明らかにすることで、これまで治療抵抗性であった腫瘍の予後改善に寄与すると考えられる。

3. 研究の方法

ZFHX4, CHD4によるがん幹細胞化の維持、プラチン感受性制御機構の解明

先行実験において、CHD4のプラチン感受性の制御は、細胞膜上のATP依存性トランスポーター(MDR1)の発現を介していることを示唆する知見を得た。本研究では、MDR1の発現調節の具体的機序を明らかにする。

(1) オルガノイドモデルを用いたZFHX4, CHD4の抑制実験

細胞の足場となるマトリゲルを用い、卵巣癌細胞株によるオルガノイドを作成する。3次元培養であるオルガノイドはがん幹細胞の性質を保持しているため、生体に近い薬剤反応性を示す。オルガノイドモデルに対し、siRNAを用いてZFHX4, CHD4を抑制し、オルガノイド形成能およびシスプラチン感受性、MDR1タンパクの発現の変化を観察する。

(2) ChIP-seqを用いたZFHX4/CHD4の標的遺伝子発現制御機構の解明

ZFHX4はCHD4と結合することで、転写因子複合体として共通の遺伝子発現制御に関わる可能性が示唆される。本研究ではZFHX4およびCHD4抗体によるChIP-Seqを行い、ZFHX4とCHD4が協調して発現調節している遺伝子領域を抽出する。ZFHX4にアミノ酸変異を伴う変異を持つ卵巣癌細胞株であるA2780とその他の卵巣癌細胞株をオルガノイド培養したうえで比較し、ZFHX4の遺伝子変異による、SOX2やOCT4といったがん幹細胞関連遺伝子へZFHX4とCHD4の転写活性を比較する。また、MDR1の発現調節を直接制御しているか、何らかの分子を介して間接的に制御しているかを明らかにし、ZFHX4/CHD4を直接阻害するよりも効果的なプラチン感受性制御因子の

同定あるいは、同時に阻害することで効果を増強する因子を探索する。

(3) オルガノイドモデルに対する CHD4 阻害剤の作用

現時点で ZFH4 阻害剤は未だ開発されていないが、世界初の CHD4 阻害剤である ED2-AD101 を卵巣癌細胞株および患者由来オルガノイドモデルに使用し、シスプラチン感受性の変化、およびオルガノイド形成能の変化を観察する。

(4) 卵巣がん患者の治療前後の血漿を用いたメタボローム解析

630 種の代謝産物の同時絶対定量が可能な MxP Quant 500 Kit を用い、東北メディカル・メガバンク機構 (ToMMo) にて液体クロマトグラフ-質量分析装置で測定する。得られた各代謝物濃度を変数とした多変量解析を行い、代謝変化の背後に関わる分子の探索を行い、濃度が有意に変動している代謝物を抽出する。メタボローム解析によって、糖、アミノ酸、脂質、代謝産物などが含まれている生体内の代謝プロファイリングを構築し、治療標的及びバイオマーカーの探索を行う。同時に ToMMo に集積されている数万人規模の住民コホートから得られたメタボローム解析データより、卵巣がん患者と年齢、身長、体重などの背景をマッチさせた健常者集団のデータを抽出し、それら 2 群間でのデータ比較解析を行う。

4. 研究成果

初年度は、研究の基盤の系となるオルガノイドモデルの樹立に注力した。2 次元培養系のデータを論文として公開した。CGA で公開されているデータを参照すると、ZFH4 および CHD4 の遺伝子発現量は予後と相関することが判明した。(図 1 Oyama Y and Tokunaga H, et al, PLoS One, 2021)。卵巣癌細胞株において CHD4 阻害剤が細胞膜上の ATP 依存性トランスポーター (MDR1) を介してシスプラチン感受性を亢進することを明らかとした (図 2 Oyama Y and Tokunaga H, et al, PLoS One, 2021)。また、CHD4 をノックダウンすることにより、白金感受性が亢進し、CHD4 阻害剤により、同様の効果が発現することを明らかとした (図 3 Oyama Y and Tokunaga H, et al, PLoS One, 2021)。

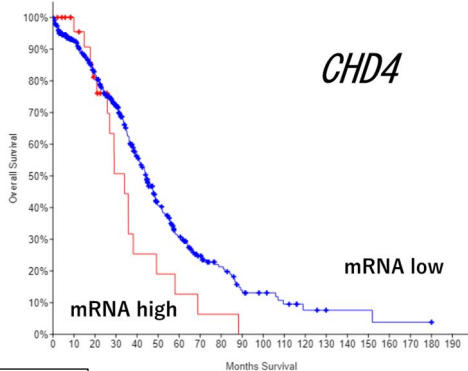


図 1

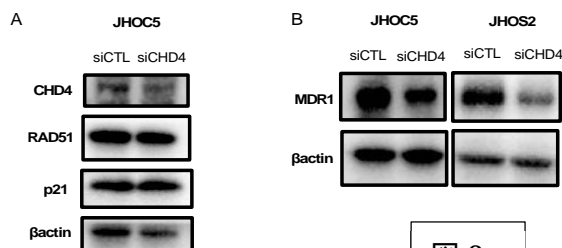


図 2

R3-4 年度は卵巣がん細胞株および患者由来の腫瘍摘出検体由来のオルガノイド作成を計画していた。比較検討のため細胞培養条件を可能な限り同条件とする実験系の樹立を試みたが、臨床検体オルガノイドの樹立ができなかった。

R5 年度は臨床検体および 2 次元培養細胞株を用いて網羅的メタボローム解析を行った。卵巣がん患者から摘出した腫瘍組織、治療前後の採血検体を用いてメタボローム解析を行った。東北メディカルメガバンク (ToMMo) に保管されている一般住民コホート検体から得られたメタボローム解析結果と比較し、卵巣がん患者と健常人とでは発現する代謝物プロファイルが異なることを見出した。さらにキヌレニン・トリプトファン比が化学療法抵抗性および予後を予測するマーカーとなりうることを見出した。また細胞株を用いた検証

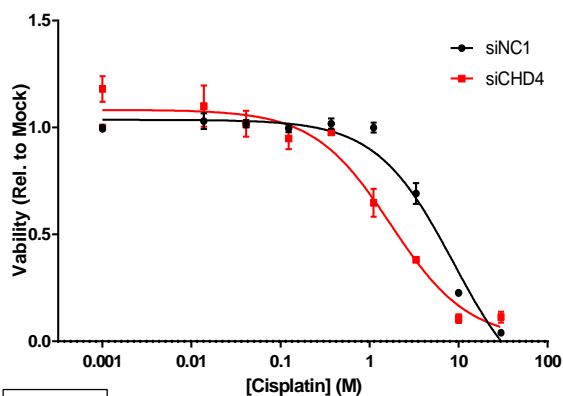


図 3

実験におけるメタボローム解析より、ARID1A 変異の有無によりスフィンゴ脂質代謝が変動することがわかり、セラミド代謝酵素の発現に影響することがわかった。これによりセラミド脂質代謝経路が ARID1A 変異卵巣がん選択的な治療標的となる可能性が示唆された。バイオバンクで収集したヒト臨床検体を用いた研究と、培養細胞株実験の 2 方向からのアプローチにより、卵巣がんセラミドという新たな治療標的につながる知見を獲得するに至った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Takatori E, Nagasawa T, Kagabu M, Baba T, Shigeto T, Matsumura Y, Shimizu D, Terada Y, Seino M, Ohta T, Nagase S, Shigeta S, Tokunaga H, Shimada M, Kaiho-Sakuma M, Furukawa S, Soeda S, Watanabe T, Takahashi F, Yokoyama Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Comparison of treatment outcomes between first-line chemotherapy with or without bevacizumab for advanced ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer (Tohoku gynecologic cancer unit: TGPU-RS001 study)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1874 ~ 1880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-022-02246-1	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 Endo Shun, Shigeta Shogo, Tokunaga Hideki, Shimizu Takanori, Hasegawa-Minato Junko, Hashimoto Chiaki, Ishibashi Masumi, Nagai Tomoyuki, Shiga Naomi, Shimada Muneaki, Yaegashi Nobuo	4. 巻 258
2. 論文標題 A Retrospective Analysis of Clinical Biomarkers for Olaparib Maintenance Therapy in Patients with Recurrent Ovarian Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.2022.J050	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 Y. Oyama, S. Shigeta, H. Tokunaga, K. Tsuji, M. Ishibashi, Y. Shibuya, et al.	4. 巻 16(6)
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	6. 最初と最後の頁 e0251079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0251079	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 E. Hishinuma, M. Shimada, N. Matsukawa, D. Saigusa, B. Li, K. Kudo, et al.	4. 巻 13(7)
2. 論文標題 Wide-Targeted Metabolome Analysis Identifies Potential Biomarkers for Prognosis Prediction of Epithelial Ovarian Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxins (Basel)	6. 最初と最後の頁 461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins13070461	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 Hishinuma Eiji, Shimada Muneaki, Matsukawa Naomi, Li Bin, Motoike Ikuko N., Hagihara Tatsuya, Shigeta Shogo, Tokunaga Hideki, Saigusa Daisuke, Kinoshita Kengo, Koshiba Seizo, Yaegashi Nobuo	4. 巻 49
2. 論文標題 Identification of predictive biomarkers for diagnosis and radiation sensitivity of uterine cervical cancer using wide targeted metabolomics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 2109 ~ 2117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.15709	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 Hishinuma Eiji, Shimada Muneaki, Matsukawa Naomi, Shima Yoshiko, Li Bin, Motoike Ikuko N., Shibuya Yusuke, Hagihara Tatsuya, Shigeta Shogo, Tokunaga Hideki, Saigusa Daisuke, Kinoshita Kengo, Koshiba Seizo, Yaegashi Nobuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of predictive biomarkers for endometrial cancer diagnosis and treatment response monitoring using plasma metabolome profiling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Metab.	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/s40170-023-00317-z	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 Yoshihara Kosuke, Baba Tsukasa, Tokunaga Hideki, Nishino Koji, Sekine Masayuki, Takamatsu Shiro, Matsumura Noriomi, Yoshida Hiroshi, Kajiyama Hiroaki, Shimada Muneaki, Kagimura Tatsuo, Oda Katsutoshi, Sasajima Yuko, Yaegashi Nobuo, Okamoto Aikou, Sugiyama Toru, Enomoto Takayuki	4. 巻 114
2. 論文標題 Homologous recombination inquiry through ovarian malignancy investigations: <scp>JGOG3025</scp> Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2515 ~ 2523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15747	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8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 徳永英樹
2. 発表標題 Exploration of BRCA1/2 gene variants in a general population cohort and return of genomic results to the participants—般住民コホートにおけるBRCA遺伝子バリエーションの探索及び結果の回付事業について
3. 学会等名 第81回日本癌学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本栄文, 萩原 達也, 遠藤 俊, 清水 孝規, 湊 敬道, 湊 純子, 橋本 千明, 石橋 ますみ, 重田 昌吾, 徳永 英樹, 島田 宗昭, 八重樫 伸生
2. 発表標題 進行卵巢癌における初回化学療法後の維持療法選択に関する後方視的検討
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湊 純子, 島田 宗昭, 萩原 達也, 橋本 栄文, 湊 敬道, 橋本 千明, 石橋 ますみ, 重田 昌吾, 永井 智之, 徳永 英樹, 八重樫 伸生
2. 発表標題 当院における遺伝性乳癌卵巢癌症候群に対するリスク低減卵管卵巢摘出術の経験
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湊 純子, 島田 宗昭, 橋本 栄文, 萩原 達也, 湊 敬道, 橋本 千明, 石橋 ますみ, 重田 昌吾, 永井 智之, 徳永 英樹, 八重樫 伸生
2. 発表標題 卵巢癌既発症のBRCA病的バリエント保持者に対する乳房サーベイランスの現状
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石橋 ますみ, 徳永 英樹, 重田 昌吾, 永井 智之, 島田 宗昭, 八重樫 伸生
2. 発表標題 チロシンキナーゼ受容体型蛋白TIE-1の卵巢癌に対する抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹島 信宏, 安岡 稔晃, 濱西 潤三, 長谷川 幸清, 松浦 基樹, 三浦 清徳, 長尾 昌二, 中井 英勝, 田中 尚武, 徳永 英樹, 牛嶋 公生, 渡利 英道, 横山 良仁, 加瀬 陽一, 角野 修司, Suri Ajit, 板持 広明, 竹原 和宏
2. 発表標題 プラチナ製剤感受性の日本人再発卵巣癌患者を対象としたニラバリブの第II相臨床試験の最終結果
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村川 真理弥, 湊 純子, 熊谷 奈津美, 萩原 達也, 橋本 栄文, 高橋 友梨, 栃木 実佳子, 橋本 千明, 石橋 ますみ, 重田 昌吾, 永井 智之, 徳永 英樹, 島田 宗昭, 八重樫 伸生
2. 発表標題 リスク低減卵管卵巣摘出術待機中にIIIA1(ii)期の卵管癌を発症した遺伝性乳癌卵巣癌症候群の一例
3. 学会等名 第151回東北連合産科婦人科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳永英樹
2. 発表標題 複合バイオバンクを活用した多層のオミックス解析に基づく、データ駆動型卵巣がん個別化医療の展望
3. 学会等名 第75回日本産科婦人科学会学術講演会（シンポジウム）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 執筆者：橋本真一、岩淵禎弘、岩田岳、美辺詩織、小巻翔平、清水厚志、藤田直也、中井謙太、伊藤眞里、笹栗弘貴、船山学、松村剛、成瀬紘也、辻省次、田中章景、土井宏、佐々木征行、松林泰毅、三條伸夫、徳永英樹、他	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 530
3. 書名 疾患原因遺伝子・タンパク質の解析技術と創薬/診断技術への応用	

1. 著者名 日本産科婦人科学会、日本病理学会（編集幹事徳永英樹）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 136
3. 書名 卵巣腫瘍・卵管癌・腹膜癌取扱い規約 病理編 第2版	

〔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	島田 宗昭 (SHIMADA Muneaki) (40362892)	東北大学・未来型医療創成センター・教授 (11301)	
研究 分担者	重田 昌吾 (SHIGETA Shogo) (90842633)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

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