

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15519

研究課題名（和文）段階的発がんモデルを用いた卵巣がんのマルチオミックス解析

研究課題名（英文）Multi-omics analysis of ovarian cancer using a stepwise tumorigenesis model

研究代表者

町野 英徳 (Machino, Hidenori)

国立研究開発法人理化学研究所・革新知能統合研究センター・研究員

研究者番号：60833762

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：高異型度卵巣漿液性がんの段階的発がんモデル細胞を樹立し、RNA-seq、ATAC-seq、ChIP-seqを活用した統合的エピゲノム解析を実施した。この結果、卵巣がんの正常由来細胞からがん細胞へと変化する過程において、AP-1 familyの転写因子が活性化し、GATA familyの転写因子が不活性化することが明らかになった。これらの転写因子の機能異常は発がん初期に上皮間葉転換を介して卵巣がんの浸潤・播種を促進していると考えられた。MEK阻害剤による治療は上記のエピゲノム異常を修復する効果をもつことが明らかになった。この知見は高異型度卵巣漿液性がんの早期発見・早期治療に寄与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高異型度漿液性卵巣がんは最も頻度が高く死亡者数が多い婦人科系悪性腫瘍である。網羅的ゲノム解析が世界規模で完了した現在においても、相同組換え修復経路に異常が認められないサブタイプには有効な治療法が確立しておらず予後不良である。そこで本研究では、高異型度漿液性卵巣がんの正常由来細胞から予後不良なサブタイプの段階的発がんモデル細胞を樹立し、網羅的エピゲノム解析を実施した。この結果、発がん初期にエピゲノム異常を介して転写因子の結合異常が生じ、卵巣がん細胞の浸潤・播種が促進されることが明らかになった。この成果は、高異型度漿液性卵巣がんの新規バイオマーカー・新規治療法の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We established a stepwise tumorigenesis model of high-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC) and conducted integrated epigenetic analysis using RNA-seq, ATAC-seq, and ChIP-seq. Our analysis revealed activation of AP-1 family transcription factors (TFs) and inactivation of GATA family TFs during the transition from cell-of-origin to cancerous cells in the process of ovarian cancer development. Dysfunction of these TFs was implicated in promoting invasion and metastasis of ovarian cancer through epithelial-mesenchymal transition in the early stages of tumorigenesis. Treatment with a MEK inhibitor was found to partially reverse these epigenetic abnormalities. These findings hold promise for contributing to the early detection and treatment of HGSOCs.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：高異型度卵巣漿液性がん マルチオミックス解析 上皮間葉転換 転写因子 AP-1 family GATA family

1. 研究開始当初の背景

高異型度漿液性卵巣がんは世界的に最も頻度の高い婦人科系悪性腫瘍であり、卵巣がんによる死亡者数の70~80%を占めている。高異型度漿液性卵巣がんのゲノム異常はこれまで頻繁に研究されてきており、相同組換え修復経路の分子に機能異常が認められるサブタイプには新しい分子標的治療薬である PARP 阻害剤が有効であることが示され、既に臨床応用が始まっている。一方で、相同組換え修復経路に異常が認められないサブタイプには有効な分子標的治療薬が開発されておらず、未だに予後不良であることから、個別化医療を推進する上で課題となっている。

2. 研究の目的

相同組換え修復経路に異常が認められない予後不良なサブタイプの高異型度漿液性卵巣がんでは、網羅的ゲノム解析によっても有望な治療標的が発見されるに至っていない。そこで本研究では、DNA やヒストンの化学修飾によってゲノムの三次元構造を制御するエピゲノムに注目し、予後不良な高異型度漿液性卵巣がん特有のエピゲノム異常を解明し、がんエピゲノムを治療標的とした新規治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

高異型度漿液性卵巣がんの多くは、卵管采に存在する卵管分泌上皮細胞 (HTFSEC) を由来として前がん病変 (卵管上皮内がん) が発生し、その後に卵巣表面に播種することで卵巣がんに進展すると考えられている。本研究では、卵管分泌上皮細胞を単離培養して段階的にがん遺伝子を導入することにより、相同組換え修復経路の分子に異常を認めない予後不良なサブタイプの高異型度漿液性卵巣がんの段階的な発がんモデル細胞 (H、HT、HTK、HTKA、HTKM) を樹立した。このサンプルに対して RNA-seq、ATAC-seq、ChIP-seq を含む網羅的エピゲノム解析手法を用いたマルチオミックス解析を実施して、高異型度漿液性卵巣がんの発がん初期に生じるエピゲノム異常を探索した (図 1a)。

4. 研究成果

RNA-seq 解析の結果、がん遺伝子の導入過程に沿って段階的に発がんモデル細胞のトランスクリプトームが変化していることが確認された (図 1b 左)。ゲノムのオープンクロマチン領域を評価する ATAC-seq 解析では、腫瘍形成能を獲得した細胞 (HTKA、HTKM) の特徴を RNA-seq よりさらに明瞭に抽出できた (図 1b 右)。これはエピゲノム解析が、トランスクリプトーム解析と比較してより詳細な細胞情報を取得できたことを示唆している。

次に、ATAC-seq データを用いて転写因子モチーフ解析を実施したところ、腫瘍形成能を獲得する過程で AP-1 family の転写因子が活性化する一方、GATA family の転写因子が不活性化することが明らかになった (図 1c、d)。

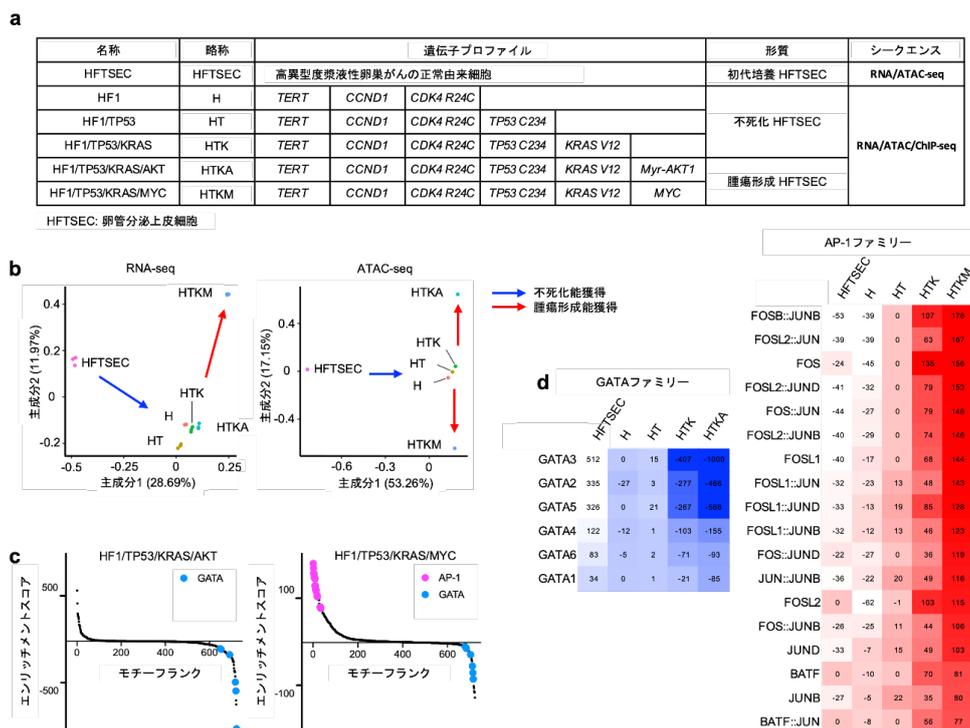


図 1 高異型度漿液性卵巣がんの発がんモデル細胞のマルチオミックス解析

この解析結果を検証するために、卵巣がん患者の臨床検体を活用し、卵管組織(正常由来組織)と前がん病変(卵管上皮内がん)組織、浸潤がん(高異型度漿液性卵巣がん)組織に免疫組織化学染色を実施し、タンパク質発現量を比較した。この結果、AP-1 familyの転写因子である JUN の発現量が卵管上皮細胞(黒矢頭)と比較して前がん病変(赤矢頭)と浸潤がんで上昇し、特に前がん病変では、活性化型のリン酸化 JUN (p-JUN) の発現量が上昇することが明らかになった(図 2a)。これは、高異型度漿液性卵巣がんの発がん初期に JUN の発現上昇と活性化が重要な意義を持つことを示唆している。また、遺伝子の転写を促進するエンハンサーの指標であるヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) のアセチル化 (H3K27ac) 修飾を ChIP-seq 解析で評価したところ、卵巣がん細胞株において確かに JUN の転写が活性化されていることが明らかになった(図 2b)。

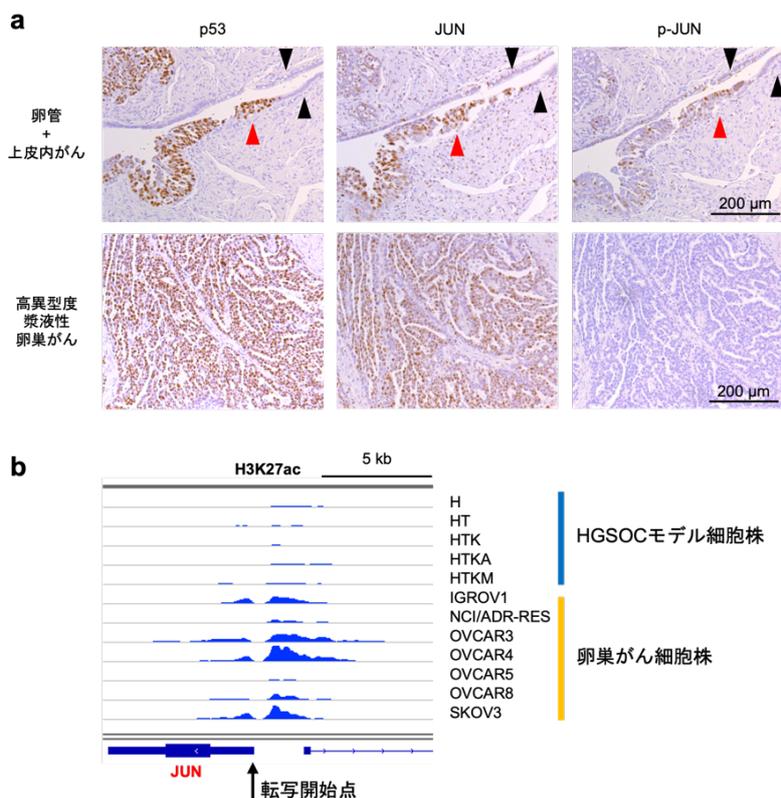


図 2 AP-1 family の転写因子 JUN の発現解析

一方で、GATA family の転写因子である GATA6 のタンパク質発現量は、卵管上皮細胞(黒矢頭)と比較して前がん病変(赤矢頭)と浸潤がん低低下しており、GATA6 によって転写されることが知られている DAB2 も同様に発現量が低下していた(図 3a)。また、GATA6 遺伝子と DAB2 遺伝子は、いずれも H3K27ac のヒストン修飾の不活性化によって転写が抑制されていることが ChIP-seq 解析から明らかになった(図 3b)。DAB2 遺伝子は、がんの増殖を促進させる RAS シグナルの抑制因子として機能し、卵巣がんにおいては発現抑制されているため、がん抑制遺伝子だと考えられている。以上の検討から、GATA6-DAB2 経路の不活性化を介して RAS シグナルが活性化することが、高異型度漿液性卵巣がんの発がん初期段階で重要な役割を果たしていると考えられた。

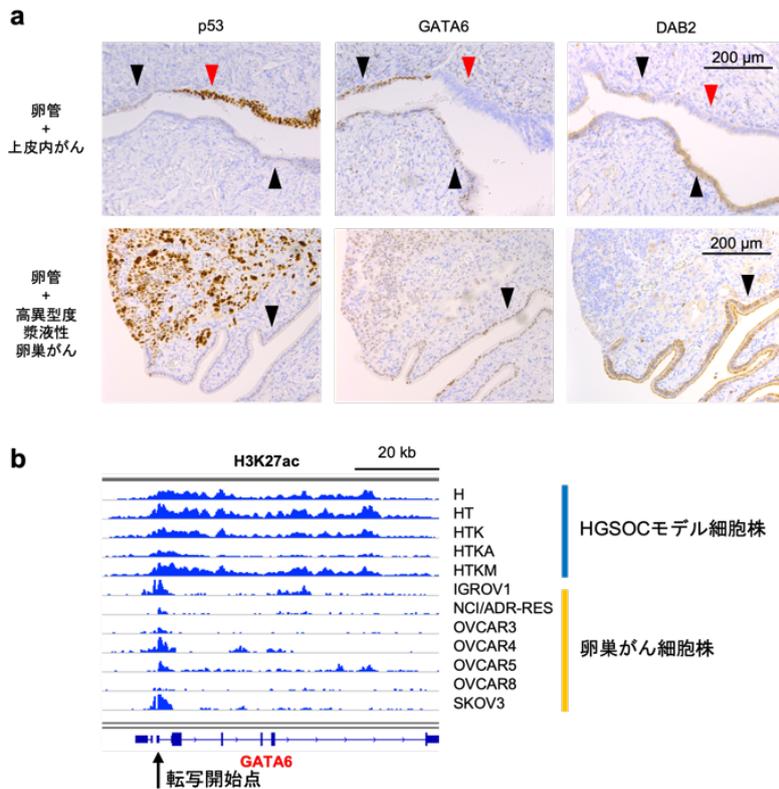


図3 GATA family の GATA6 とその転写産物 DAB2 の発現解析

RAS シグナルの活性化は、正常な上皮細胞が浸潤能・転移能を獲得する際の変化である上皮間葉転換を促進させることが知られている。本研究で得られたマルチオミクス解析の結果も、高異型度漿液性卵巣がんの発がん初期段階で上皮間葉転換が生じていることが示唆されていた。そこで、上皮間葉転換において中心的な役割を持つカドヘリン遺伝子が集積する 16 番染色体カドヘリンクラスター領域に注目したところ、卵巣がん細胞では同領域のコピー数減少に加えて、H3K27ac で評価されるエンハンサー活性が広範囲に不活性化していることが明らかになった (図 4a,b)。

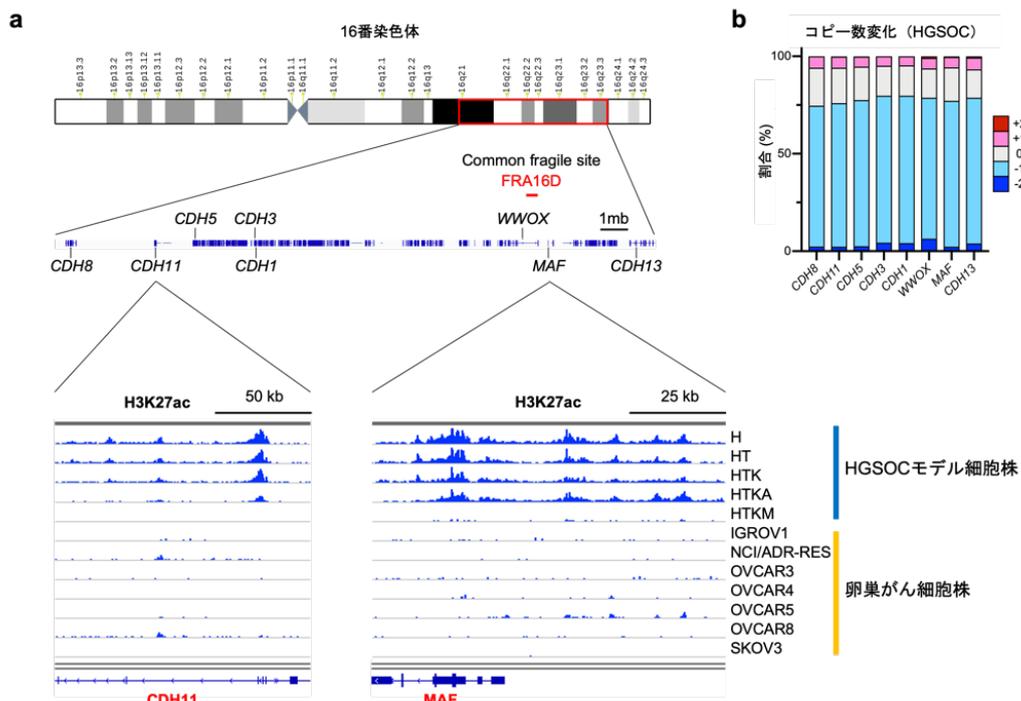


図4 16 番染色体カドヘリンクラスター近傍のゲノム・エピゲノム解析

最後に、このエピゲノム異常を修復する治療法を探索するために、RAS シグナルの阻害剤である MEK 阻害剤（トラメチニブ、Trametinib）で治療した発がんモデル細胞を解析した。この結果、腫瘍形成能を持つ発がんモデル細胞（HF1/TP53/KRAS/MYC）において、MEK 阻害剤による治療に反応して上皮間葉転換に関わる *CDH1* 遺伝子の発現量が回復し、*JUN* 遺伝子に拮抗的に作用する *MAF* 遺伝子に加え、*GATA6* 遺伝子と *DAB2* 遺伝子の発現量も回復した（図 5）。

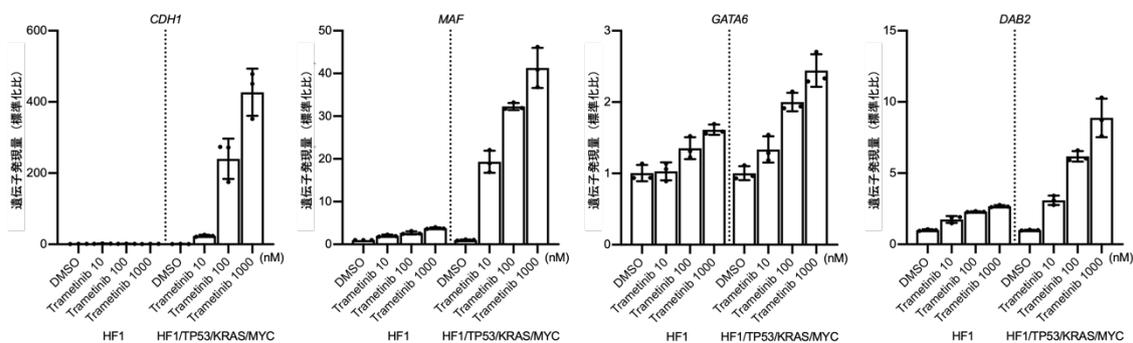


図 5 MEK 阻害剤を投与した発がんモデル細胞の遺伝子発現量解析

以上を要約すると、高異型度漿液性卵巣がんの発がん初期段階に、エピゲノム異常によって AP-1 family と GATA family の転写因子の機能異常が起きることで、RAS シグナルの活性化を介したカドヘリンクラスター領域の不活性化が生じて上皮間葉転換が誘導されると考えられた。また、MEK 阻害剤による治療で RAS シグナルを抑制することにより、高異型度漿液性卵巣がんのエピゲノム異常を修復できることが明らかになった。本研究成果は、がんエピゲノムを標的とした新規治療法の開発に寄与する可能性がある。

本研究では、理化学研究所・革新知能統合研究センター、国立がん研究センター、島根大学医学部産科婦人科、National Cancer Institute（米国）が国際共同研究を行い、高異型度漿液性卵巣がんの発がんモデル細胞を樹立し、がんエピゲノムを対象としたマルチオミクス解析を実施した。この結果、従来のゲノム解析では同定できなかった卵巣がん発がん初期段階のエピゲノム異常とこれに起因する転写因子の DNA 結合異常を発見することができた。本研究で示されたエピゲノム異常を標的とする新規治療法を確立することにより高異型度漿液性卵巣がんの予後改善に貢献できる可能性がある。

本研究成果は、科学雑誌『*Experimental & Molecular Medicine*』に掲載された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Sakai Akira, Komatsu Masaaki, Komatsu Reina, Matsuoka Ryu, Yasutomi Suguru, Dozen Ai, Shozu Kanto, Arakaki Tatsuya, Machino Hidenori, Asada Ken, Kaneko Syuzo, Sekizawa Akihiko, Hamamoto Ryuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Medical Professional Enhancement Using Explainable Artificial Intelligence in Fetal Cardiac Ultrasound Screening	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 551 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10030551	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 Hamamoto Ryuji, Takasawa Ken, Machino Hidenori, Kobayashi Kazuma, Takahashi Satoshi, Bolatkan Amina, Shinkai Norio, Sakai Akira, Aoyama Rina, Yamada Masayoshi, Asada Ken, Komatsu Masaaki, Okamoto Koji, Kameoka Hirokazu, Kaneko Syuzo	4. 巻 23
2. 論文標題 Application of non-negative matrix factorization in oncology: one approach for establishing precision medicine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Briefings in Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 bbac246 ~ bbac246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bib/bbac246	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 Hamamoto Ryuji, Koyama Takafumi, Kouno Nobuji, Yasuda Tomohiro, Yui Shuntaro, Sudo Kazuki, Hirata Makoto, Sunami Kuniko, Kubo Takashi, Takasawa Ken, Takahashi Satoshi, Machino Hidenori, Kobayashi Kazuma, Asada Ken, Komatsu Masaaki, Kaneko Syuzo, Yatabe Yasushi, Yamamoto Noboru	4. 巻 11
2. 論文標題 Introducing AI to the molecular tumor board: one direction toward the establishment of precision medicine using large-scale cancer clinical and biological information	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Hematology & Oncology	6. 最初と最後の頁 82 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40164-022-00333-7	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 Shozu Kanto, Kaneko Syuzo, Shinkai Norio, Dozen Ai, Kosuge Hirofumi, Nakakido Makoto, Machino Hidenori, Takasawa Ken, Asada Ken, Komatsu Masaaki, Tsumoto Kouhei, Ohnuma Shin-Ichi, Hamamoto Ryuji	4. 巻 14
2. 論文標題 Repression of the PRELP gene is relieved by histone deacetylase inhibitors through acetylation of histone H2B lysine 5 in bladder cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13148-022-01370-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 Dozen Ai, Shozu Kanto, Shinkai Norio, Ikawa Noriko, Aoyama Rina, Machino Hidenori, Asada Ken, Yoshida Hiroshi, Kato Tomoyasu, Hamamoto Ryuji, Kaneko Syuzo, Komatsu Masaaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Tumor Suppressive Role of the PRELP Gene in Ovarian Clear Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 1999~1999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm12121999	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 Machino Hidenori, Kaneko Syuzo, Komatsu Masaaki, Ikawa Noriko, Asada Ken, Nakato Ryuichiro, Shozu Kanto, Dozen Ai, Sone Kenbun, Yoshida Hiroshi, Kato Tomoyasu, Oda Katsutoshi, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki, von Keudell Gottfried, Saloura Vassiliki, Hamamoto Ryuji	4. 巻 5
2. 論文標題 The metabolic stress-activated checkpoint LKB1-MARK3 axis acts as a tumor suppressor in high-grade serous ovarian carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02992-4	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 該当する

1. 著者名 Hamamoto Ryuji, Takasawa Ken, Shinkai Norio, Machino Hidenori, Kouno Nobuji, Asada Ken, Komatsu Masaaki, Kaneko Syuzo	4. 巻 24
2. 論文標題 Analysis of super-enhancer using machine learning and its application to medical biology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Briefings in Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 bbad107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bib/bbad107	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 Machino Hidenori, Dozen Ai, Konaka Mariko, Komatsu Masaaki, Nakamura Kohei, Ikawa Noriko, Shozu Kanto, Asada Ken, Kaneko Syuzo, Yoshida Hiroshi, Kato Tomoyasu, Nakayama Kentaro, Saloura Vassiliki, Kyo Satoru, Hamamoto Ryuji	4. 巻 55
2. 論文標題 Integrative analysis reveals early epigenetic alterations in high-grade serous ovarian carcinomas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental & Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 2205 ~ 2219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s12276-023-01090-1	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 該当する

1. 著者名 Takasawa Ken, Asada Ken, Kaneko Syuzo, Shiraishi Kouya, Machino Hidenori, et al.	4. 巻 56
2. 論文標題 Advances in cancer DNA methylation analysis with methPLIER: use of non-negative matrix factorization and knowledge-based constraints to enhance biological interpretability	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Experimental & Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 646 ~ 655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s12276-024-01173-7	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hidenori Machino
2. 発表標題 Integrative analysis revealed early epigenetic changes in high-grade serous ovarian carcinogenesis
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 Hidenori Machino
2. 発表標題 Epigenetic dysregulation of AP-1 and GATA family genes induces epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 Hidenori Machino
2. 発表標題 Comprehensive transcription factor motif analysis focusing on mutational signatures in multiple cancer types
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Hidenori Machino
2. 発表標題 複数がん種のmutational signatureに着目した包括的転写因子モチーフ解析
3. 学会等名 日本メディカルAI学会
4. 発表年 2023年～2024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			
米国	National Cancer Institute			
米国	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center			