

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659769

研究課題名(和文) 卵巣癌におけるエピゲノム変異制御因子と標的分子の同定

研究課題名(英文) The regulatory factor to aberrant epigenetic state in ovarian cancer and target molecule.

研究代表者

八重樫 伸生 (YAEGASHI, Nobuo)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00241597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌におけるDNAメチル化異常を起こす制御因子を同定し、遺伝子診断や分子標的治療の開発を目的とした。卵巣癌細胞では、メチル基供与体の合成酵素遺伝子MAT2Aの発現が2-3倍亢進し、MAT2AのRNAi及び阻害剤(シクロロイシン)の機能抑制実験では、細胞増殖が有意に抑制された。またMAT2A遺伝子の下流で働くRB1遺伝子の発現が著明に低下した。これらの結果より、卵巣癌のMAT2Aの過剰発現はRB1を介し、癌化を促進する可能性が示唆され、シクロロイシンが治療薬として使用できる可能性とMAT2Aの発現量が卵巣癌の悪性度を評価するための新規腫瘍マーカーとなりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human ovarian cancer (HOC) is characterized by complex genetic and epigenetic alterations. We found that MAT2A (methionine adenosyltransferase 2A), which act as a synthetase of the methyl donor was highly expressed and heavily hypomethylation in the promoter. Experiment of MAT2A siRNA and inhibit cyclorocicene was effective on the HOC growth. We found that the target molecule of MAT2A was tumor suppressor gene, RB1. This finding is that RB1 is the new tumor marker of HOC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巣癌 分子標的遺伝子 DNAメチル化

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌では、癌化の比較的早期からゲノムワイドなエピジェネティックな修飾の変異が起こる。この修飾は、主に DNA のメチル化、ヒストンのメチル化やアセチル化といった化学修飾であり、栄養・環境で変化しうる可塑性を持ち合わせる特徴を有する。DNA メチル化やヒストンのメチル化には、メチル化基質 (SAM) の合成酵素 MAT2A (methyonine adenosyltransferase 2A) が必須である事が報告された (Chi P. Nat Rev Cancer. 2010)。また、DNA メチル化酵素 (DNMTs) は、メチル基の獲得には、必須の分子として既に知られている (Kaneda. Nature, 2004 他)。そのため、MAT2A と DNMTs は、メチル化の制御因子で、その発現の亢進は DNA およびヒストンのメチル化の異常さらには、細胞癌化を誘導する可能性が十分予想される。そのため、エピゲノム変異の制御因子の解明は、基礎的研究にとどまらず、がんの予防、早期診断、あるいは新たな癌治療薬の開発にも繋がる事が期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、卵巣癌化に伴い、ダイナミックに変化する DNA のメチル化、ヒストンのメチル化を制御する因子 (MAT2A、DNMTs) に着目し、卵巣癌のエピゲノム変異の原因究明と標的分子の同定を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 卵巣癌細胞株:

ヒト卵巣癌細胞株及び卵巣表面上皮細胞株の、計 13 株を培養した。

#### (2) 卵巣癌患者の登録:

東北大学医学部産婦人科、および関連病院において手術を施行した卵巣癌患者 (症例数 46 例) 年齢、組織型、進行期別に分類した。

#### (3) 発現解析:

Real-time PCR により定量解析を行った。

#### (4) エピゲノム解析:

DNA メチル化の解析: 細胞から抽出した DNA は Bisulphite 処理後 PCR を行い (Bisulphite-PCR 法)、クローニングベクターを用いシーケンスを行った。少なくとも 10

個のクローンについて解析し、PCR 領域内の全てのメチル化部位について解析した。

#### (5) siRNA 強制発現用ベクターの作製と細胞の樹立:

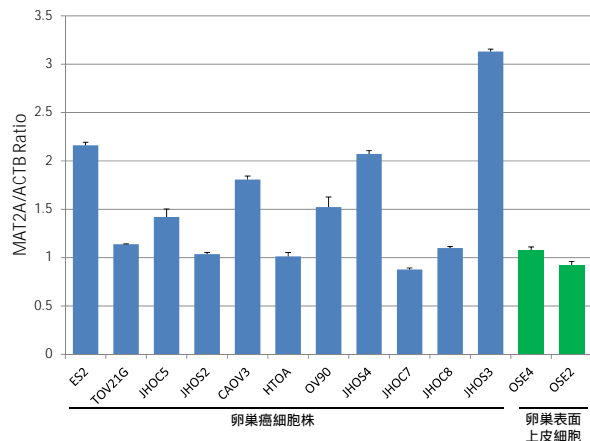
ノックダウン用の siRNA を複数設計し、ベクターにクローニングし、卵巣癌細胞株 (SKOV, PA1) にトランスフェクションした。ノックダウン効率は、Real-time PCR によって測定した。複数設計した siRNA のうち、正常卵巣組織と同程度まで遺伝子の発現を抑制可能なものを以降の解析に用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 卵巣癌における MAT2A 遺伝子過剰発現

卵巣癌細胞株を用い、メチル化基質合成酵素遺伝子 (MAT2A) とメチル化酵素遺伝子 (DNMTs) の発現量を、正常卵巣上皮細胞株と比較した。その結果、卵巣癌細胞株では、正常卵巣組織と比較し、2-3 倍に高発現していることが判明した (図 1)。

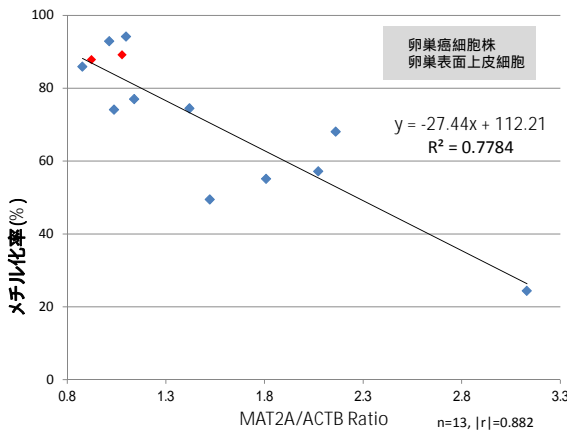
同様に、DNMTs、特に DNMT2 に発現量の差が認められた。卵巣癌組織においても、同様の傾向が見られたが、年齢、組織型、進行期分類で有意な差が見られなかった。



(図 1)

## (2) MAT2A 遺伝子のエピゲノム解析

MAT2A 遺伝子のプロモーター及びジーンボディについて、DNA メチル化の解析を行った(図2)。その結果、発現量とジーンボディのメチル化率に負の相関が認められた(相関係数 = 0.77)。



(図2)

## (3) RNAi を用いたノックダウン実験

siRNA を用いた MAT2A、DNMTs ノックダウン細胞株を樹立した。この細胞株を用いて、MAT2A、DNMTs の発現量の変化が癌細胞の増殖能および遊走能・浸潤能に与える影響を、in vitro で解析した。その結果、細胞増殖が有意に抑制されることを見出した。さらに、MAT2A の阻害剤であるシクロロイシンを添加して卵巣癌細胞の培養を行ったところ、濃度依存的に細胞増殖が抑制された。これらの結果は、MAT2A 遺伝子の過剰発現が卵巣癌細胞の増殖を促進することを示すとともに、シクロロイシンが卵巣癌の治療薬として使用できる可能性を示唆するものである。

また、卵巣癌における MAT2A 遺伝子のターゲットを探索するため、Real-time PCR 法を用いて数十種類の癌遺伝子および癌抑制遺伝子の発現定量解析を行った。その結果、癌抑制遺伝子としてよく知られている RB1 遺伝子の発現が卵巣癌において有意に抑制されていることを見出した。さらに、RB1 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化を解析したところ、高メチル化状態であることが明らかとなった。以上から、MAT2A 遺伝子の過剰発現は RB1 遺伝子のプロモーター領域の高メチル化を引き起こし、癌化を促進する可能性が

示唆された。

今後の研究の推進方策として、MAT2A の阻害剤投与実験を行うことで、MAT2A 阻害剤の臨床応用への可能性を探る必要がある。

## (4) MAT2A の標的遺伝子 RB の発現量解析とエピゲノム解析

46例の卵巣癌組織を用いて MAT2A およびターゲット遺伝子 RB1 の発現を解析し、検証した。その結果、卵巣癌組織のほぼ全例で MAT2A の発現増加は観察され、組織分類では、漿液性卵巣癌で最も発現の亢進がみられた。さらに、卵巣癌進行期が悪い症例では、MAT2A の発現量が有意に増加していることが明らかとなった。一方で RB1 の発現はほとんどの卵巣癌で減少しており、一部の検体で DNA のメチル化異常、遺伝子欠損、および遺伝子変異が見られることを確認した。また、正常組織では MAT2A の発現増加および RB1 の発現減少は認められなかった。これらの結果より、MAT2A 遺伝子の過剰発現が RB1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化異常を引き起こし、癌化を誘導する可能性が示唆され、MAT2A の発現量が卵巣癌の悪性度を解析するための新規腫瘍マーカーとなりうることが示唆された。今後さらに、摘出卵巣癌組織症例を増やし、MAT2A、DNMTs の標的遺伝子の発現量解析とエピゲノム解析を行う必要がある。さらに、患者基本情報に照らし合わせ、年齢、組織型、進行期、生命予後などについて、詳細な統計学的な検定を行ない、メチル化異常の発症機序について検討する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Shoji T, Takatori E, Kaido Y, Omi H, Yokoyama Y, Mizunuma H, Kaiho M, Otsuki T, Takano T, Yaegashi N, Nishiyama H, Fujimori K, Sugiyama T.

A phase I study of irinotecan and pegylated liposomal doxorubicin in recurrent ovarian cancer (Tohoku Gynecologic Cancer Unit 104 study).

Cancer Chemother Pharmacol. (査読有)  
73(5):895-901. 2014. doi:

10.1007/s00280-014-2418-8.

Yokoyama Y, Futagami M, Watanabe J, Sato N, Terada Y, Miura F, Sugiyama T, Takano T, Yaegashi N, Kojimahara T, Kurachi H, Nishiyama H, Fujimori K, Tase T, Mizunuma H.

Redistribution of resistance and sensitivity to platinum during the observation period following treatment of epithelial ovarian cancer.

**Mol Clin Oncol.** (査読有) 2(2):212-218. 2014. PubMed PMID: 24649335

Sugawara J, Suenaga K, Hoshiai T, Sato T, Nishigohri H, Nagase S and Yaegashi N. Efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin in severe postpartum hemorrhage with disseminated intravascular coagulation.

**Clin Appl Thromb/Hemost,** (査読有) 19(5):557-61. 2013. doi: 10.1177/1076029612443305.

Metoki H, Ohkubo T, Obara T, Akutsu K, Yamamoto M, Ishikuro M, Sakurai K, Iwama N, Katagiri M, Sugawara J, Hirose T, Sato M, Kikuya M, Yagihashi K, Matsubara Y, Yaegashi N, Mori S, Suzuki M, Imai Y, and the BOSHI Study Group.

Daily serial hemodynamic data during pregnancy and seasonal variation: the BOSHI study.

**Clin Exp Hypertens,** (査読有) 34(4):290-6. 2012. doi: 10.3109/10641963.2012.681086.

Suzuki N, Sugawara J, Kimura Y, Nagase S, Okamura K and Yaegashi N.

Assessment of maternal heart-rate variability during labor using wavelet based power spectral analysis.

**Gynecol Obstet Invest,** (査読有) 74(1):35-40. 2012. doi:10.1159/000336064.

Hiroki E, Suzuki F, Akahira JI, Nagase S, Ito K, Sugawara J, Miki Y, Suzuki T, Sasano H, Yaegashi N.

MicroRNA-34b functions as a potential tumor suppressor in endometrial serous adenocarcinoma.

**Int J Cancer.** (査読有) 15;131(4):E395-404. 2012  
doi: 10.1002/ijc.27345.

Shoji T, Takatori E, Omi H, Kumagai S, Yoshizaki A, Yokoyama Y, Mizunuma H, Fujimoto T, Takano T, Yaegashi N, Tase T, Nakahara K, Kurachi H, Nishiyama H, Sugiyama T.

Phase II clinical study of the combination chemotherapy regimen of irinotecan plus oral etoposide for the treatment of recurrent ovarian cancer (Tohoku Gynecologic Cancer Unit 101 Group Study)  
**International Journal of Gynecologic Cancer.** (査読有) 21(1):44-50. 2011, doi: 10.1097/IGC.0b013e3181ffbe9f.

Yamamoto S, Kasajima A, Takano M, Yaegashi N, Suzuki M, Kuzuya K, Kigawa J, Tsuda H, Kurachi H, Kikuchi Y, Sugiyama T, Tsuda H, Moriya T.

Validation of the histological grading for ovarian clear-cell adenocarcinoma: a retrospective multi-institutional study of Japan Clear Cell Carcinoma Study Group  
**International Journal of Gynecologic Pathology,** (査読有) 30(2):129-138. 2011.  
doi: 10.1097/PGP.0b013e3181f71264.

〔学会発表〕(計2件)

北谷和之、八重樫伸生  
卵巣がん転移を標的とした創薬 第12回  
日本婦人科分子標的研究会  
奈良 2013/7/5

Tadao Takano, Hideki Tokunaga, Takeo Otsuki, Kosuke Yoshinaga, Satoru Nagase, Hitoshi Niikura, Kisyoshi Ito, Takashi Takeda, Nobuo Yaegashi, Tadahiro Shoji, Toru Sugiyama, Toshio Fujimoto, Yukihiro Terada, Kenji Nakahara, Tomohisa Kurachi, Takashi Mastumoto, Masamichi Hiura, Shinya Sato, Muneaki Shimada, Jyunzo Kigawa

Paclitaxel plus carboplatin for advanced  
or recurrent carcinosarcomas of the uterus.  
Japanese Uterine Sarcoma Group and Tohoku  
Gynecologic Cancer Unit Study.  
ESGO, Milano(Italy) 2011/9/11-14

6 . 研究組織

(1)研究代表者

八重樫 伸生 (YAEGASHI, NOBUO)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 00241597

(2)研究分担者

大槻 健郎 (OTSUKI, TAKEO)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤  
講師  
研究者番号 : 40531330