

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 5月27日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462537

研究課題名(和文) 新規網羅的スクリーニング法による卵巢癌薬剤耐性遺伝子の検索

研究課題名(英文) Search for drug resistance genes in ovarian cancer cells by new exhaustive genome screening method

研究代表者

野村 弘行(NOMURA, HIROYUKI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50327590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、薬剤耐性遺伝子をゲノムワイドで同定可能な新規遺伝子スクリーニング法を用いて、卵巢癌細胞株における薬剤耐性遺伝子の同定を試みることを目的とした。また、ストレス応答・薬剤耐性に関連する遺伝子マーカーと一塩基多型(SNP)との関連性の検証を行った。薬剤耐性遺伝子スクリーニングのための卵巢癌細胞株の薬剤耐性コロニーの作成と基礎的なデータを得ることができ、実験系の条件設定の検証を行うことができた。しかしながら、一部の組織型由来の細胞株ではコロニーの安定した樹立が困難であり、本手法の適用に課題を残した。また、タキサン代謝関連遺伝子上のSNPと抗がん剤感受性との相関が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify drug resistance gene in ovarian cancer cell line using a novel wide gene screening method. We also examined the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and genetic markers involved in stress response or drug resistance. We were able to obtain drug-resistant colonies of ovarian cancer cell lines for screening drug resistant genes and obtain basic data, and to verify experimental condition setting. However, it was difficult to stably establish colonies in cell lines derived from some histological types, leaving a problem in applying this method widely. In addition, a correlation between SNPs on taxane metabolism-related genes and sensitivity to cytotoxic drugs was suggested.

研究分野：産婦人科学

キーワード：薬剤反応性 抗がん剤 卵巢癌

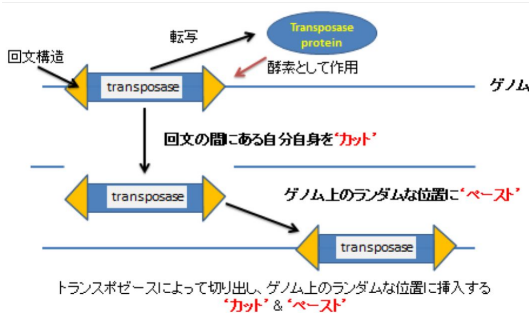
1. 研究開始当初の背景

卵巣癌に対しては可及的腫瘍減量術後に初回化学療法としてパクリタキセル+カルボプラチン併用療法 (Paclitaxel+Carboplatin; TC療法) が標準的に行われる。卵巣癌は初回化学療法には比較的奏効するものの、半数以上の症例でその後再発をきたす。また、再発例では初回治療からの経過期間に応じて薬剤感受性が異なることが臨床的に知られ、治療法の選択が行われる。このような背景から、薬剤耐性メカニズムを解明することは、卵巣癌の治療戦略上、きわめて重要である。さらに、薬剤耐性が治療開始前に予測可能となれば、薬剤選択の点からも非常に有用である。そこで我々は、卵巣癌における薬剤耐性遺伝子を同定するために、以下に示す新しい網羅的検索手法を用いることとした。

トランスポゾンとは、ゲノム上を完全にランダムに移動(transposition)できる塩基配列であり、図1に示すように両側の回文構造の間に自分自身を切り出し (= カット)、ゲノム上のランダムな位置に挿入 (= ペースト) する働きを持つトランスポゼースという酵素を併せ持っている。

<図1> トランスポゾン

ゲノム上を完全にランダムに移動(transposition)できる塩基配列



このトランスポズンを導入した細胞 (transposon tagged cell: TTC) に薬剤投与を行い、薬剤耐性コロニーを形成した場合、その細胞が高発現している遺伝子が投与薬剤に対する耐性遺伝子である可能性が考えられる。

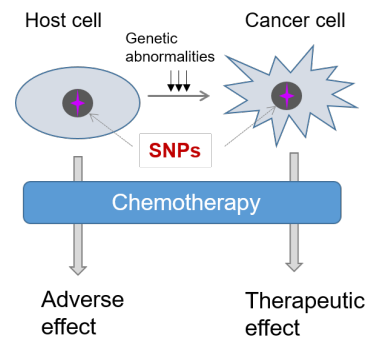
また、複数のコロニーで同一の遺伝子発現が増強されていれば、その遺伝子が薬剤耐性遺伝子である可能性はさらに高まる。本手法を用いてすでに乳癌細胞株において複数の耐性遺伝子候補リストが得られており、この中には既知の薬剤耐性遺伝子が含まれていることから、本手法の妥当性・確実性は高いと考えられる。

薬剤耐性遺伝子の探索は従来より様々な手法がとられてきているが、その結果や解釈は一致をみていない。本手法はヒトゲノム上の全遺伝子を網羅可能である点、そしていかなる癌種・いかなる薬剤を用いても耐性遺伝

子の検討が可能にあることから、従来にはないアプローチでの卵巣癌薬剤耐性遺伝子の検索が可能になるものと考えられた。

また近年、薬物代謝に関与する一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) も数多く見出され、SNP解析は薬物療法における個別化医療としての応用が期待されている。肺癌や乳癌では、抗癌剤の毒性と治療効果が相関し、これを規定する因子としてのSNPの存在が報告されている。このことは癌宿主である個体の特性を規定している生物学的・遺伝的因子が、癌細胞の特性をも共通して規定しており、薬剤耐性・感受性にも影響を与えている可能性を示唆するものである (図2)。

<図2> 一塩基多型と薬剤耐性・感受性



以上の観点から、さらにSNPに着目することで、治療効果を予測する新規手法の構築のみならず、がんの治療の個別化につながる知見になることが期待される。

2. 研究の目的

薬剤耐性遺伝子をゲノムワイドで同定するという本システムは従来にはない新しい手法である。このトランスポズンを用いた手法により、複数の卵巣癌細胞株と薬剤の組み合わせを用いて、卵巣癌薬剤耐性に関与する遺伝子の同定を試みる。

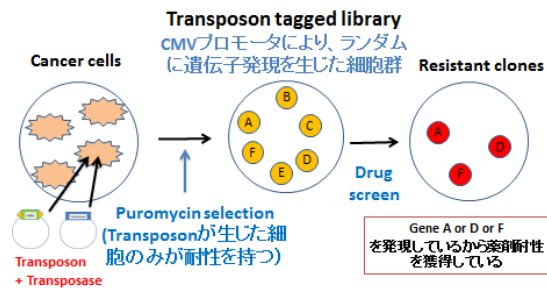
また、抗癌剤の耐性、感受性に関与するSNPが正常幹細胞より癌幹細胞に受け継がれ、抗癌剤の効果および副作用に関与するという仮説を立て、ストレス応答・薬剤耐性に関与する遺伝子マーカーとSNPとの関連性を検証する。

卵巣癌治療において薬物療法は極めて重要な位置づけにあり、その治療過程における薬剤耐性化、病勢増悪は臨床的に重要な問題である。本研究により卵巣癌薬剤耐性遺伝子を同定および薬剤耐性化メカニズムを解明し、卵巣癌患者それぞれの遺伝子発現状況に応じた最適な薬剤選択、新たな治療開発、さらに卵巣癌個別化治療にむけた知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

卵巣癌の代表的な組織型である、漿液性腺癌、明細胞腺癌、類内膜腺癌、粘液性腺癌といった生物学的特性が異なる各種組織型由来の卵巣癌細胞株に、トランスポゾンシステムを用いて CMV プロモーターとピューロマイシン耐性遺伝子を導入し、transposon tagged cell (TTC)を樹立する(図3)。

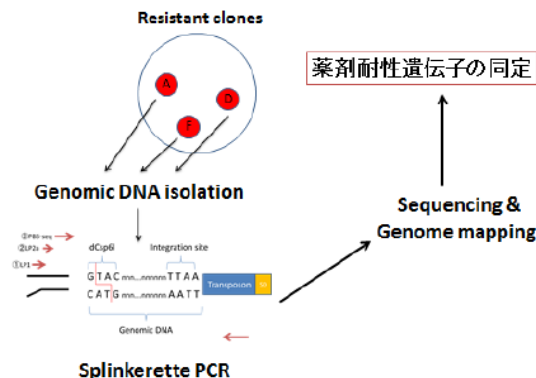
<図3> transposon tagged cell の樹立と薬剤耐性コロニーの獲得



この TTC に卵巣癌薬物療法で用いられる各種薬剤投与を至適量で行い、薬剤耐性コロニーを獲得する。

これを単離培養したのちゲノム DNA を抽出し、PCR 法によりトランスポゾン導入部分の DNA を増幅する。これを TOPO cloning 法により、プラスミドへクローニングを行ったものをシーケンスにより塩基配列を決定、耐性コロニーで高発現している候補遺伝子を同定する。これら候補遺伝子を、遺伝子データベースを用いて解析を行い、耐性遺伝子として可能性の高いものを卵巣癌細胞株へ導入し、MTT assay 法にて耐性の評価を行うとともに、臨床検体を用いて遺伝子発現状況と耐性の相関性について評価を行う(図4)。

<図4> 薬剤耐性遺伝子の同定

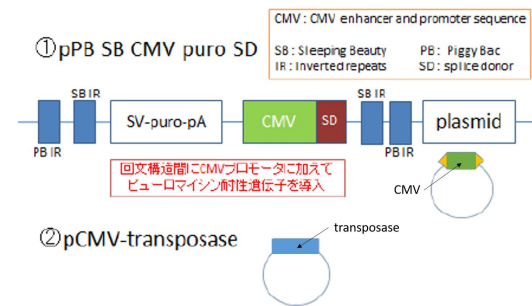


化学療法の耐性・感受性を予測しうる一塩基多型(SNP)としては、癌幹細胞、epithelial mesenchymal transition (EMT)、およびストレス応答・薬剤耐性等と関連したゲノム情報から選別することで臨床的な意味づけを行っていく。

4. 研究成果

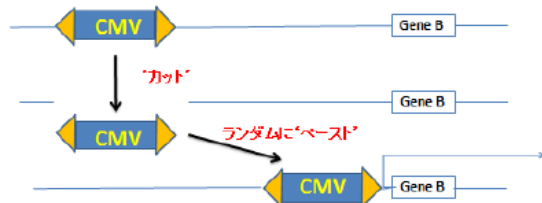
準備段階として、トランスポゾンから2つのプラスミドを作製した。1つはトランスポゾンの回文構造間に転写活性因子である CMV プロモーターとピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミド (pPB-SB-CMV-puro-SD)であり(図5:)、もう1つはトランスポゼンを発現ベクターへ組み込んだプラスミドである(図5:)。これらプラスミドを細胞に導入することで、CMV プロモーターをゲノム上のランダムな位置に「カット&ペースト」し、一つ一つの細胞がランダムな遺伝子を高発現する「細胞プール」を得ることができるようになる(図3)。CMV プロモーターは約 50Kbp をカバーすることができることから、全ゲノムを網羅することが可能となると考えられた。

<図5> プラスミドの作成



次の段階として、卵巣癌の中で最も多くを占める代表的な組織型である漿液性腺癌の細胞株を選択し、CMV プロモーターが挿入された細胞プールである、transposon tagged cell を作成した(図6)。卵巣癌治療において治療薬剤として標準的に用いられるパクリタキセルとカルボプラチンを選択し、これを添加した培地の transposon tagged cell より、薬剤耐性コロニーの作成を行った。

<図6> CMV プロモーターの組み込み



次の段階として、卵巣癌のその他の代表的組織型である明細胞腺癌、類内膜腺癌、粘液性腺癌の細胞株に対し、上記と同様の手順(システム)を用いて、transposon tagged cell の樹立を試みた。こちらについても同様に、パクリタキセルとカルボプラチンを添加

した培地の transposon tagged cell から薬剤耐性コロニーの作成を行った。

また、卵巣癌治療においてセカンドライン以降に用いる各種薬剤や治療上有望とされている新規分子標的治療薬剤についても選定作業を行い、条件設定を試みた。

以上の成果としては、薬剤耐性遺伝子スクリーニングの実施のための薬剤耐性コロニーの作成と基礎的なデータを得ることができた。また実験系の条件設定につき、新たな検証を行うことができた。しかしながら、卵巣癌各種組織型由来の細胞株を用いた transposon tagged cell の樹立に際しては、導入効率が予想より低く安定した樹立が困難であり、細胞株によっては本手法の適用に関して課題を残した。

パクリタキセルおよびカルボプラチンの薬物反応に相関しうる SNP としては、プラチナ代謝関連遺伝子、タキサン代謝関連遺伝子、ドキシソルピシン代謝関連遺伝子、修復遺伝子、解毒関連遺伝子を中心に探索した。その結果、タキサン代謝関連遺伝子に関わる SNP が、その他の SNP に比較してより多く抽出された。このことから、特定の SNP の有無といったゲノム情報を調べるのが化学療法時の薬物反応の予測につながる可能性があることが示唆された。

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2件)

Yoshihama T, Nomura H, Iwasa N, Kataoka F, Hashimoto S, Nanki Y, Hirano T, Makabe T, Sakai K, Yamagami W, Hirasawa A, Aoki D. Efficacy and Safety of Dose-Dense Paclitaxel plus Carboplatin as Neoadjuvant Chemotherapy for Advanced Ovarian, Fallopian Tube, or Peritoneal Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2017;47:1019-1023. (査読有)

Yoshihama T, Chiyoda T, Kataoka F, Nomura H, Iguchi Y, Hashimoto S, Yamagami W, Tominaga E, Susumu N, Tsuda H, Aoki D. Effectiveness of third-line chemotherapy in recurrent ovarian cancer patients. *Eur J Gynaecol Oncol* 2015;36:424-427. (査読有)

[学会発表](計7件)

Nomura H, Yoshihama T. Treatment strategy for ovarian cancer in Japan. The 1st meeting of JSPS-STINT Bilateral Joint Research Projects "Monitoring tumor-specific circulating DNA in the

blood for early detection of ovarian cancer". 2016.

Nomura H, Yoshihama T. Current anti-cancer drugs for ovarian cancer treatment. The 1st meeting of "Genomics, Bioinformatics, and Systems Medicine to Facilitate Therapy of Ovarian Cancer". 2016.

岩佐 尚美, 野村 弘行, 片岡 史夫, 南木 佳子, 吉浜 智子, 中平 直希, 山上 亘, 平沢 晃, 進 伸幸, 青木 大輔. SNP 解析を用いた卵巣癌化学療法の毒性および効果予測. 第1回 日本産科婦人科遺伝診療学会学術講演会. 2015.

岩佐 尚美, 野村 弘行, 片岡 史夫, 吉浜 智子, 中平 直希, 橋本 志歩, 二宮 委美, 山上 亘, 進 伸幸, 田中 守, 青木 大輔. パクリタキセル+カルボプラチン併用療法(TC療法)のがん種非特異的効果予測因子としての一塩基多型の抽出. 第67回 日本産科婦人科学会学術講演会. 2015.

山上 亘, 片岡 史夫, 坂井 健良, 真壁 健, 二宮 委美, 和田 美智子, 野村 弘行, 進 伸幸, 津田 浩史, 西尾 和人, 田中 守, 青木 大輔. Copy number assay による sorafenib の卵巣癌への有効性の探索. 第67回 日本産科婦人科学会学術講演会. 2015.

中平 直希, 片岡 史夫, 野村 弘行, 千代田 達幸, 有馬 宏和, 橋本 志歩, 岩佐尚美, 山上 亘, 冨永 英一郎, 進 伸幸, 青木 大輔. 再々発卵巣癌に対する 3rd line 化学療法のプラチナ感受性に関する検討. 第56回 日本婦人科腫瘍学会学術講演会. 2014.

田中 英雄, 片岡 史夫, 野村 弘行, 津田 浩史, 進 伸幸, 高野 政志, 板橋 広明, 紀川 純三, 斉藤 広子, 三木 義男, 吉村 泰典, 青木 大輔. マルチトランスフェクションプレートを用いた上皮性卵巣癌の新規分子標的の探策. 第66回 日本産科婦人科学会学術講演会. 2014

[図書](計1件)

Nomura H, Iwasa N, Yoshihama T, Nanki Y, Aoki D. Springer. *Frontiers in Ovarian Cancer Science*. 2017, 1-13.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obgy.med.keio.ac.jp/04research/06gy2.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

野村 弘行 (NOMURA, Hiroyuki)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
研究者番号：50327590

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

片岡 史夫 (KATAOKA, Fumio)
山上 亘 (YAMAGAMI, Wataru)
千代田 達幸 (CHIYODA, Tatsuyuki)
井口 蓉子 (IGUCHI, Yoko)
橋本 志歩 (HASHIMOTO, Shiho)
岩佐 尚美 (IWASA, Naomi)
中平 直希 (NAKADAIRA, Naoki)
吉浜 智子 (YOSHIHAMA, Tomoko)
南木 佳子 (NANKI, Yoshiko)
同前 愛 (DOZEN, Ai)
早乙女 啓子 (SAOTOME, Keiko)
田中 英雄 (TANAKA, Hideo)