

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462544

研究課題名(和文) 薬剤耐性再発卵巢がんの新規治療標的の同定

研究課題名(英文) Searching for new targets for treatment of chemoresistant ovarian cancer.

研究代表者

山口 聡子 (YAMAGUCHI, Satoko)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40609872

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)：薬剤耐性再発卵巢がんにおける新たな治療標的を同定するために、機能的スクリーニングを行った。RNA干渉を利用した次世代shRNAライブラリーを用いて、発現を抑制することで、薬剤耐性卵巢癌細胞の増殖を抑制したり、プラチナ製剤に対する感受性を高める遺伝子を探索した。また、薬剤耐性の機序の一つであると考えられているがん幹細胞の性質を反映するスフェロイド形成能が高い卵巢癌細胞株で微小管重合阻害薬のエリブリンメシル酸塩が増殖抑制に有効であること、この作用が、がん幹細胞の性質に関わるテロメラーゼの触媒サブユニットであるhTERTを介していることを見出し発表した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify new targets for treatment of chemoresistant ovarian cancer. To achieve this aim, we performed a functional screening, taking advantage of a next generation shRNA library based on RNA interference. We screened for the genes whose inhibition results in growth inhibition or high sensitivity to cisplatin in chemoresistant ovarian cancer cells. Cancer stem cells (CSCs) are considered to be one of the reasons for chemoresistance. We also found that eribulin mesylate, a compound that modulates microtubule dynamics, has high activity against ovarian cancer cells that exhibit high spheroid formation efficiency, a characteristic that might reflect cancer stem cell-like phenotype. We demonstrated that eribulin mesylate is likely to target telomerase catalytic subunit (hTERT), which has been reported to promote CSC-like traits.

研究分野：卵巢癌

キーワード：卵巢癌 薬剤耐性 機能的スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは、婦人科がんの中で最も死亡数の多いがんであり、我が国では、その罹患数・死亡数は、ともに年々増加傾向にある。卵巣がんは、早期発見が困難であるため、約7割が進行した状態で発見され、進行卵巣がんでは、プラチナ製剤とタキサン系薬剤の組み合わせによる化学療法が標準治療となっている。進行卵巣がんの予後はタキサン系薬剤の導入以降の約20年間ほとんど改善がみとめられていない。初回治療時の奏率が8割以上と高いにも拘らず、再発率も約8割と非常に高く、再発時には化学療法抵抗性となる場合が多い。特にkey drugであるプラチナ製剤に耐性となった再発卵巣がんの予後は極めて不良であり、このような卵巣がんに対する新規薬剤の開発が急務であると考えられた。

再発および薬剤耐性獲得の機序の一つとして、がん幹細胞(CSC)の存在が示唆されており、がんの根治にはCSCの根絶が必要と考えられているが、その具体的な機構については明らかにされていなかった。近年、テロメラーゼの触媒サブユニットであるテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)が、がん幹細胞の性質に重要であることがわかってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、薬剤耐性卵巣癌に対する新たな治療法につながる治療標的の同定である。具体的には、以下の通りである。

(1)次世代 shRNA ライブラリーを用いて、機能抑制により薬剤耐性卵巣癌細胞株の増殖が抑制される、またはプラチナ製剤感受性が高まる遺伝子を同定し解析する。

(2)卵巣癌細胞株で、がん幹細胞の性質を反映すると考えられるスフェロイドの形成能を解析する。既知の薬剤のうち、このスフェロイド形成能が高い卵巣癌細胞株の増殖を抑制する薬剤を同定し、作用機序を解明する。

3. 研究の方法

(1)次世代 shRNA ライブラリーを用いたスクリーニング
薬剤耐性再発卵巣がんにおける新たな治療法的を同定するために、機能的スクリーニングを行った。プラチナ製剤耐性再発卵巣癌から樹立された細胞株2種に、ターゲットとなる遺伝子発現を抑制する次世代 shRNA ライブラリー(DECIPHER)を導入した。この shRNA ライブラリーは、5,043の mRNA に対する27,500配列の RNAi 構造を一度の感染で導入でき、次世代シーケンスによるクローンの定が可

能である。具体的には、遺伝子 X の Gain-of-function が薬剤耐性を誘導する場合、RNAi による遺伝子 X の発現抑制により細胞が感受性化することを利用する。

shRNA 導入直後と shRNA 発現後の細胞 shRNA 発現後、感受性株には有効であるが耐性細胞株には無効な低濃度のプラチナ製剤存在下と非存在下で培養した細胞を比較し、発現後に有意に減少している(機能欠損で死滅する) shRNA およびプラチナ製剤存在下で有意に減少してい

Pooled RNAi library screening for drug targets in platinum-resistant cancer cells

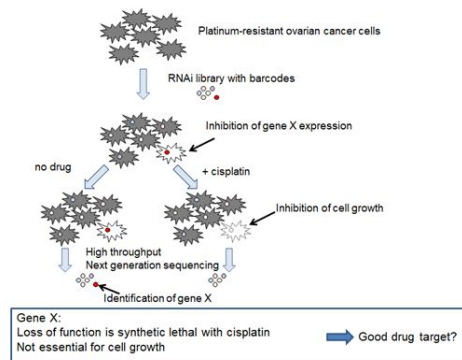


図1. プラチナ耐性の原因となる遺伝子のスクリーニング

る shRNA とその標的遺伝子を解析した。からは細胞の増殖に関わる遺伝子からはプラチナ耐性の原因となる遺伝子(図1)が期待された。

(2)薬剤耐性卵巣癌細胞株への既知薬剤の影響

複数の卵巣癌細胞株で、がん幹細胞の性質を反映すると考えられる、無血清培地でのスフェロイド形成能を評価した。これらの細胞株で、複数の既知の薬剤に対する感受性を解析し、特にスフェロイド形成能が高い細胞株に対して増殖抑制作用の強い薬剤を同定した。がん幹細胞の機能に関わると考えられる遺伝子・蛋白にこのような薬剤がどのように作用するかを解析した。

4. 研究成果

(1)次世代 shRNA ライブラリーを用いたスクリーニング
RNAi を導入する実験を計3回ずつ行い、結果を検討した。については、プラチナ非存在下に比較してプラチナ存在下で3回とも減少している RNAi 配列が、同一の mRNA に対して複数同定されたものは無く、全体として再現性が乏しいと考えられたが、については、発現前と比較して発現後に3回とも減少がみられた RNAi 配列が、同一の mRNA に対して複

数同定されたのは、計 47 種の mRNA で、うち 7 種の mRNA は 2 種類の株で共通して同定された。これらの mRNA に対する siRNA を用いて増殖抑制の確認を行い、機能解析を行った。

(2) 薬剤耐性卵巣癌細胞株への既知薬剤の影響

プラチナ耐性の卵巣癌細胞株の一部に対して、微小管重合阻害薬であるエリブリンメシル酸塩が増殖抑制に有効であることを見出した。エリブリン感受性の卵巣癌細胞株では、がん幹細胞の性質を反映するスフェロイド形成能が高かった(図 2)。

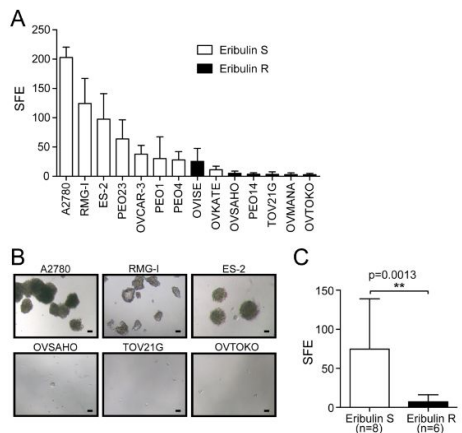


図2. エリブリン感受性の卵巣癌細胞株ではスフェロイド形成能が高い

さらに、これらの細胞株では、がん幹細胞の原因の一つと考えられているテロメラーゼの触媒サブユニットである hTERT の発現量が高いこと(図 3)、hTERT の発現抑制によりエリブリン感受性が低下すること(図 4)を見出した。以上のことから、エリブリンは薬剤耐性の卵巣癌細胞株で hTERT の機能を抑制することで抗がん作用を発現すると考えられた。以上の成果をとりまとめ、論文発表した(Yamguchi et al, 2014)。

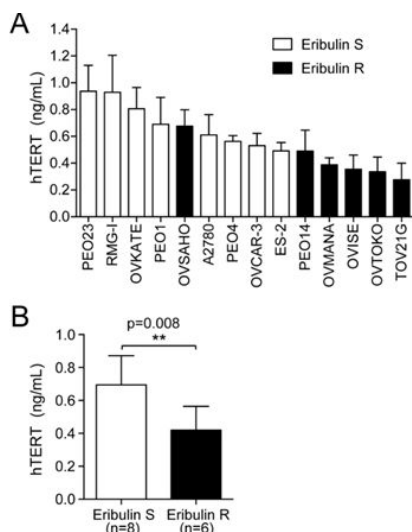


図3 エリブリン感受性株ではTERTの発現が高い

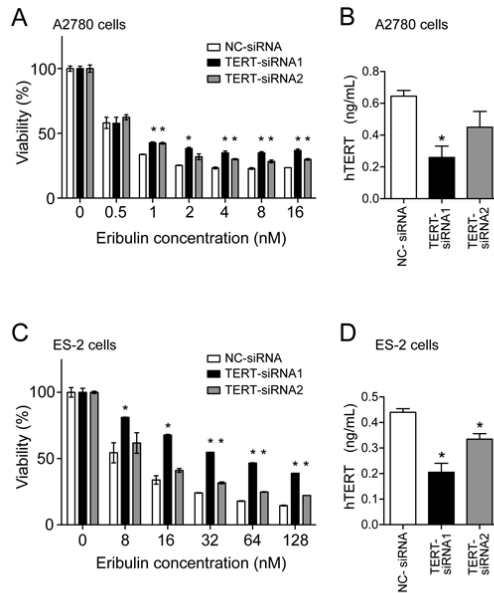


図4 TERTの発現抑制によりエリブリン感受性が低下する

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 1 件)

Satoko Yamaguchi, Yoshiko Maida, Mami Yasukawa, Tomoyasu Kato, Masayuki Yoshida, Kenkichi Masutomi (2014) Eribulin Mesylate Targets Human Telomerase Reverse Transcriptase in Ovarian Cancer Cells. PLoS One. 査読有, Nov 6;9(11):e112438. doi:10.1371/journal.pone.0112438

〔学会発表〕(計 2 件)

Satoko Yamaguchi, Searching for new treatments for ovarian cancer. 10th HiHa International Workshop Cell Cycle Control and Beyond. 2017 April 4th, Hiroshima.

毎田佳子, 安川麻美, 山口聡子, 加藤友康, 増富健吉 TERT を標的とした新たな卵巣癌分子標的治療の可能性。日本婦人科がん分子標的研究会 2015年 7月 17日-18日、長野県松本市

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口聡子 (YAMAGUCHI, Satoko)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：40609872

(2) 研究分担者

毎田佳子 (MAIDA, Yoshiko)
金沢大学・大学院医薬保健学総合研究科・
教授
研究者番号：20397219

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()