

令和2年度シニア・リサーチフェロー  
研究成果報告書

2021年6月6日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団  
理 事 長 堀 田 知 光 殿

報告者氏名： 江畠貴大



研究課題：術前化学療法後卵巣癌のジェネティックおよびエピジェネティック網  
羅的解析

研究期間： 自 2020年 4月 1日

至 2021年 3月 31日

研究指導者：氏名 牛島俊和



公益財団法人 がん研究振興財団

## (1)シニア・リサーチフェロ一期間中の研究について

### 1) 要旨

卵巣がんにおいて治療抵抗性は非常に重要な問題であり、その機序を解明する意義は大きい。本研究では、治療抵抗性細胞が優位に残存していると考えられる術前化学療法後の卵巣がん手術時検体を用いて遺伝子変異および網羅的DNAメチル化解析を行い、治療感受性を規定する因子を同定することを目的とした。令和元年度までに、網羅的DNAメチル化解析を行い、メチル化の有無が予後因子となる候補領域5個を同定した。令和2年度は、これらの候補領域のバリデーションを行った。その結果、染色体8番NKX3-1近傍のエンハンサーのメチル化が予後不良と関連した。今後さらに他施設から収集した検体を用いた再バリデーションを行い、同定された遺伝子及びエンハンサー領域のメチル化による治療抵抗性機序の解明を行う。また、付随研究としてメチル化レベルを用いて検体の腫瘍細胞率を推定できるマーカーを3つ同定した。

### 2) 序

卵巣がんは治療感受性の高い腫瘍であるが、進行期では70-80%の症例は再発をきたし、予後が悪い。そのため治療抵抗性は重要な問題であるが、その機序は不明確な部分が多い。

治療抵抗性機序の解明を行うためには、感受性、抵抗性細胞がそれぞれ優位に存在する良質な検体を得ることが不可欠である。そのためには、術前化学療法後の残存腫瘍検体が有用であると考えた。手術時の検体では、感受性の場合は感受性細胞がまだ残存しており、抵抗性の場合は抵抗性細胞が優位に残存している症例が含まれると考えられる(図1)。一方、診断時の検体では感受性細胞が優位に多く、再発時の検体は期間や他治療の影響により不均一な集団になっている可能

性があることからいざ  
れも抵抗性機序の解析  
は困難であると考え  
た。

卵巣がんは遺伝子  
変異の少ないがん腫と

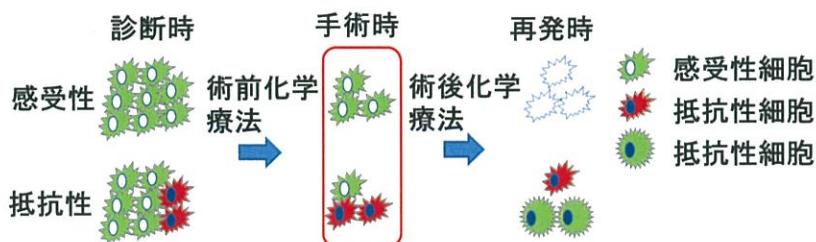


図1. 申請者が考察した卵巣癌における臨床経過での細胞の変化モデル

されており、DNA修復関連遺伝子やTP53以外にドライバー遺伝子変異は少ない。そこで、本研究では、DNAのメチル化に着目し、卵巣高異型度漿液性腺癌において治療抵抗性に関与するエンハンサーやプロモーター領域のメチル化を同定し、その機能と化学療法抵抗性に関する機序を明らかにすることを目的とした。得られた知見は将来の新薬の開発につながることが期待できる。

### 3) 実験方法

#### 3-1. 臨床情報および検体の入手

国立がん研究センター中央病院および都立駒込病院、順天堂大学医学部付属病院において2011年から2018年の期間に卵巣高異型度漿液性腺癌と診断され、術前化学療法を施行した症例を診療録より抽出した。手術検体のHE染色標本のレビューを行い、適切な腫瘍量および腫瘍細胞率が得られる検体を選出し、結果として国立がんセンター中央病院の診療録より選択基準を満たす103例が同定され、病理レビューの結果90例が選出された。DNA抽出後の定量結果より75例が最終的に適合した。30例をscreening cohort, 45例をvalidation cohortとして解析を行った。都立駒込病院、順天堂大学医学部付属病院より64検体を入手し、re-validation cohortとして解析を行う。

#### 3-2. DNA抽出およびbisulfite処理

上記にて得た検体をQIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen)を用いてDNA抽出を行った。DNA抽出後PicoGreenにて定量を行い、5ngを遺伝子変異解析に用いて、残検体はメチル化解析を行うためEZ DNA methylation Kit (Zymo)を用いてbisulfite処理を行った。

#### 3-3. 遺伝子変異解析

Ion Ampli-seq panel (ion)にて遺伝子変異解析パネルを設計し、卵巣がんに変異頻度の高いとされるTP53, BRCA1, BRCA2, RAD51Cの変異解析を行った。

#### 3-4. DNAメチル化解析

##### 1) Screening cohort

HumanMethylationEPIC BeadChipを用いてゲノム網羅的DNAメチル化解析を行った。既報(*Nature Genetics* 2017;49(10):1428-1436)より卵巣がん特異的なエンハンサー領域を同定し、その領域に含まれる個々のプローブにおいて腫瘍細胞率で補正後 $\beta > 0.6$ をメチル化と定義してメチル化の有無により2群に分けてlog-rank検定を行った。P value<0.05をカットオフとして有意差のあるプローブを抽出した。

##### 2) Validation cohort及びRe-validation cohort

Screening cohortにおいて同定された候補領域に対してPyrosequencingを行うためのプライマーを設計し、HumanMethylationEPIC BeadChipとほぼ同様の結果が得られることを確認した後、Screening cohort同様に $\beta > 0.6$ をメチル化と定義してメチル化の有無により2群に分けてlog-rank検定を行い、P value<0.05をカットオフとして有意差のあるプローブを同定した。

##### 3) 腫瘍細胞率マーカーの分離

網羅的メチル化解析から得られた結果のうち、ヒトの正常白血球および卵管上皮細胞でメチル化を認めるプローブを除外し、卵巣がん細胞株および臨床検体でメチル化を認める遺伝子領域のプローブを抽出した。その候補領域において pyrosequencing 用のプライマーを設計できたものを候補として同定した。

#### 4) 結果

##### 4-1. 研究進行状況

本研究全体では 1)screening cohort で候補遺伝子を得たのち、2)validation cohort で確認し、3)その遺伝子による抵抗性機序を解明し、4)合成致死を起こしうる標的を同定し、5)将来的に薬剤開発につなげることを計画している(図 2)。令和元年度までに 1)の screening cohort を終えており、今年度は 2)の validation cohort を終え、3)の re-validation cohort の一部まで達成した。

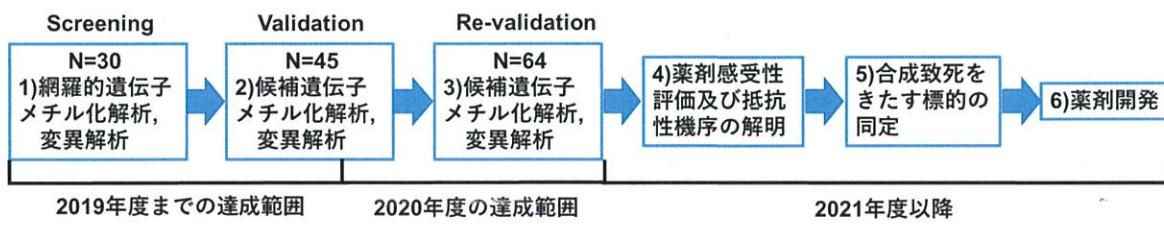


図 2. 研究概要

##### 4-2. スクリーニングによる候補の同定

###### 1) 遺伝子変異解析

30 例について、ターゲットシークエンス法により突然変異を解析した結果を下記に示す(図 3)。*BRCA1* は 26.7%, *BRCA2* は 6.7%, *TP53* は 53.3% の症例に変異を認めた。これらの変異の有無により予後の差は認めなかった。*RAD51C* 遺伝子変異症例は認めなかった。

No Gene \ No	1	2	4	7	9	11	12	13	14	16	18	19	22	23	24	25	27	28	29	32	34	35	36	37	39	41	43	44	46	47
BRCA1	■					■				■	■										■	■	■	■						
BRCA2																														
RAD51C																														
TP53	■	■	■	■																■	■	■	■	■	■	■				

図 3 遺伝子変異解析結果 ■:変異陽性

###### 2) DNA メチル化解析

30 例について Infinium 解析を行い、全ての CpG 部位についてそれらのメチル化状態と予後の関連をスクリーニングした。その結果、5 か所の卵巣がん特異的なエンハンサー領域の

メチル化の有無と予後とが有為に関連する領域として同定された(図4)。候補領域のメチル化の有無による Kaplan-Meier 曲線を示す(図5)。

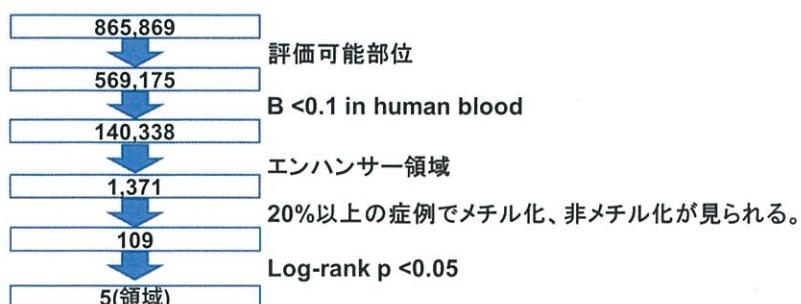


図4. メチル化領域のスクリーニング

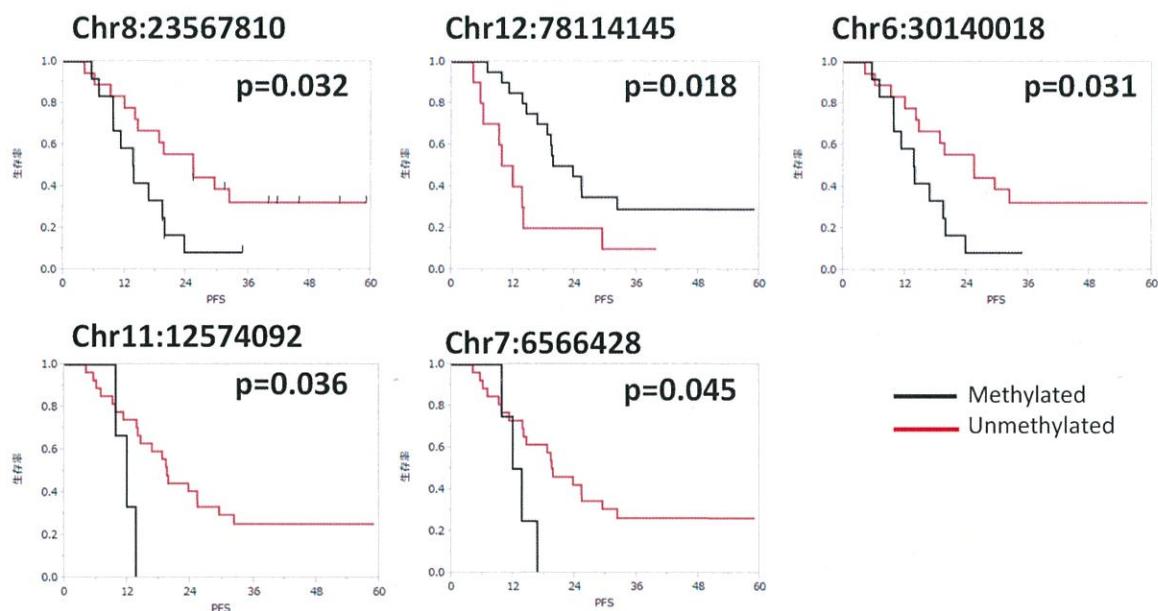


図5. スクリーニングコホートにおける候補領域のメチル化の有無による Kaplan-Meier 曲線

#### 4-3. バリデーションによる確認

上記候補の 5 領域について pyrosequencing 法により DNA メチル化レベルを測定した。その結果、HumanMethylationEPIC と pyrosequencing の値はよく一致していた。バリデーションコホートにおいて、スクリーニングコホートと同様に Chr8:23567810 のメチル化と予後不良とは有為に関連した(図6)。

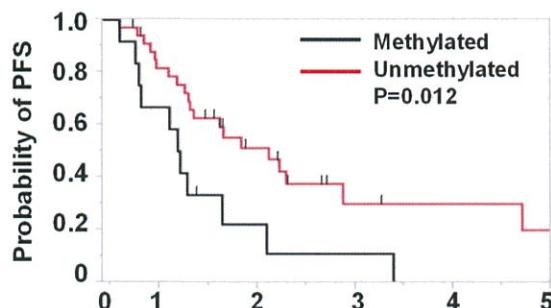


図6. バリデーションコホートにおける Chr8:23567810 のメチル化の有無による Kaplan-Meier 曲線

#### 4-4. 腫瘍細胞率マーカーの分離

30例の臨床検体および14個の卵巣がん細胞株についてメチル化レベルが臨床検体で0.2、細胞株で0.8以上のCpG部をスクリーニングし

た。その結果、卵巣がん細胞特異的にメチル化された遺伝子の候補としてSIM1, OTX2, ZNF154のメチル化が同定された(図7)。病理学的な腫瘍細胞率とこれらのマーカーのメチル化レベルの相関は下記の通りであった(図8)。

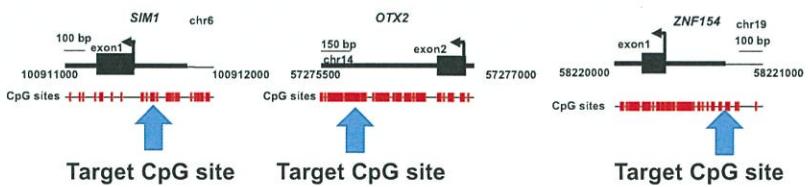


図7. 腫瘍細胞率マーカーとして同定されたメチル化領域

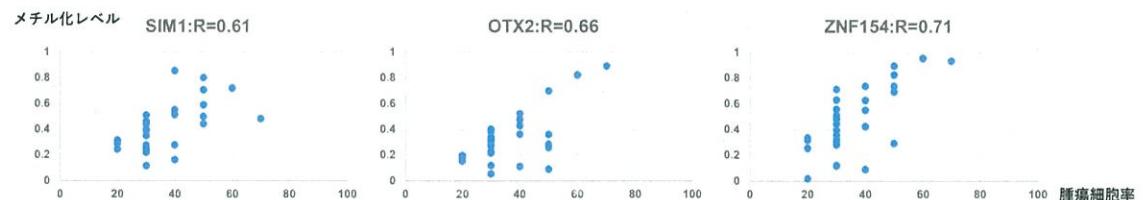


図8. 腫瘍細胞率マーカーのメチル化レベルと腫瘍細胞率

#### 5) 考察

本研究において染色体8番NFKB1近傍領域のエンハンサーのメチル化が予後不良因子としてバリデーションされた。このメチル化が更に他の症例でバリデーションされ、予後への影響の大きさも明らかになれば、予後不良な患者を選定し治療方針の変更につなげができるようになる可能性がある。

エンハンサーのメチル化は標的遺伝子のプロモーター領域との相互作用を阻害することで制御する遺伝子の発現低下につながるとされる(Blood 2017;16;129:13-25)。このエンハンサーは近傍にある遺伝子NFKB1の制御に関与する可能性が考えられる。NFKB1は前立腺がんにおいて欠失変異が見られる転写因子であり、G9aヒストンメチル化酵素と作用することで前立腺の分化に関わるとされ、欠失変異により脱分化や腫瘍増殖が促進されると報告されている。(Science 2016;24;352:1576-80)。卵巣がんにおいてNFKB1の欠失変異の報告はほとんどないが、本研究の結果からエンハンサーのメチル化により発現低下が起きている可能性がある。

しかし、複数の領域を候補として解析しているためそれでもなお偽陽性である可能性も否定できない。そこで真に差のある候補を同定するため、他施設での症例64例を追加し、現在再バリデーションを行っている。

腫瘍細胞率マーカーを用いることでDNAしかない検体についても、検体中の腫瘍細胞率含有率が推定可能になる。また、病理医の負担を軽減し、評価を簡便に行うことができる。

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

### 1) バイオマーカーとしての応用

本研究により、特定のエンハンサー領域のメチル化により予後、治療感受性が規定される可能性が示された。卵巣がんは遺伝子変異の少ないがん腫であるため、予後予測として用いられている遺伝子変異は *BRCA1,2* などの DNA 修復関連遺伝子のみである。他の因子によるバイオマーカーの開発が望まれるため、今後他施設症例による再バリデーションを行い、予後予測に有用なバイオマーカーとして確立することで臨床応用を目指す。また、腫瘍細胞率の評価は遺伝子変異解析、メチル化解析において不可欠である。現在、病理学的な評価がスタンダードとして行われているが、煩雑なこと、病理医によって評価にばらつきが出ることなどの問題があり、今回の腫瘍細胞率マーカーを使用することで評価の一助になると考えられる。

### 2) 同定したマーカーによる新規薬剤開発

本研究結果はエンハンサーのメチル化により制御する遺伝子 *NKX3-1* の発現が低下し、治療抵抗性を獲得することを示唆している。卵巣がんにおける意義は不明であるが knockdown, knockout, overexpression することにより 1)細胞内代謝解糖系および酸化的リン酸化経路のメタボリックシフトやメタボローム解析による代謝産物量の変化などの細胞内代謝の評価、2)リン酸化タンパク抗体アレイによる活性化している経路の同定、およびその下流経路への影響の評価などを行うことで抵抗性獲得の機序を解明する。また、標的遺伝子の遺伝子発現の低下の結果として代償的に特定の経路に依存している可能性が考えられる。そこで、その経路を同定し阻害することで合成致死を起こし得ることを利用し将来の新薬の開発につなげたい。