

2019年度シニア・リサーチフェロー  
**研究成果報告書**

2020年 4月28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 2019年 4月 1日  
至 2020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る。そのため、その機序を解明することは臨牞性意義が大きい。術前化学療法により治療抵抗性、感受性細胞が優位に残存していると考えられる卵巣がん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の同定を目的として研究を進めた。

本年度は検体の入手および遺伝子変異解析、DNAメチル化解析を進めた。結果として、5箇所の卵巣がん特異的エンハンサー領域のメチル化を治療抵抗性因子の候補として同定した。バリデーションコホートにおいてそのうちの1つである染色体8番に存在するエンハンサーのメチル化が同定された。今後残りの領域についてもバリデーションを進め、同定されたエンハンサー領域メチル化による治療抵抗性機序の解明を行う。

### 2)序

#### 研究に至った経緯

卵巣がんは治療感受性の良い腫瘍であるが、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、再発後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。

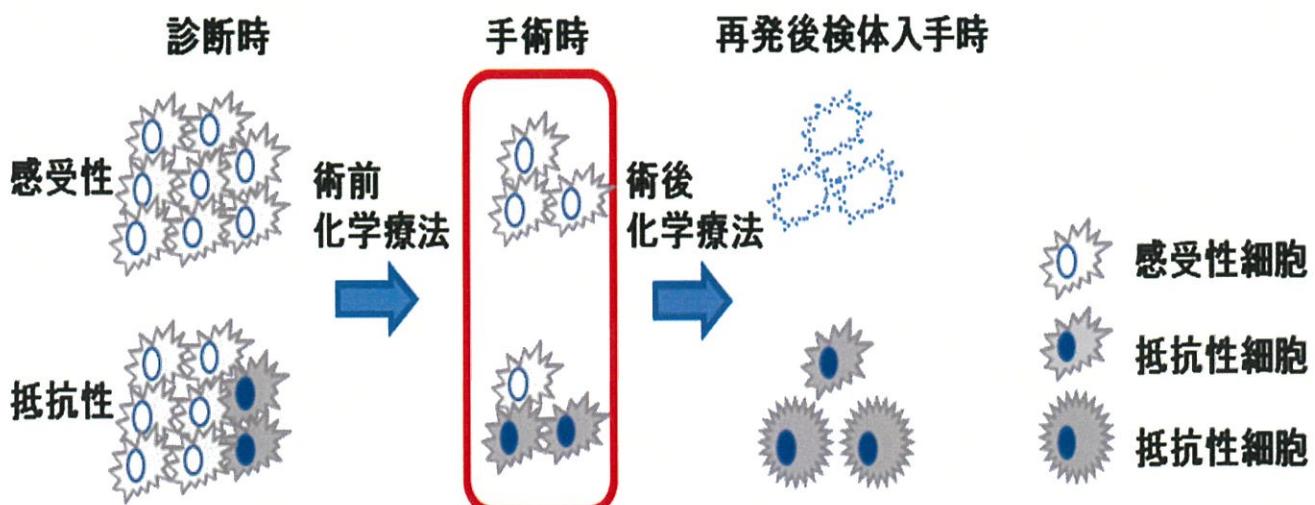


図1 申請者が考察した卵巣癌における臨床経過での細胞の変化モデル

卵巣がんは遺伝子変異の少ないがん腫とされており、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する。その知見を元に将来の新薬の開発につなげる。

### 3)研究方法

#### 3-1.研究概要

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)将来的には薬剤開発につなげることを計画している。(図 1)。2019 年度には 1) の screening cohort を終え、2) の validation cohort の一部まで達成した。

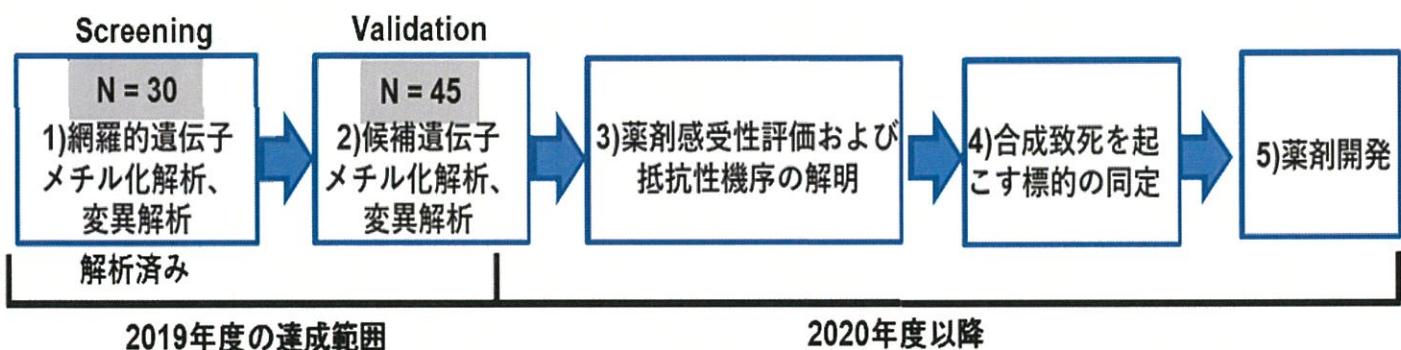


図 2:研究概要

#### 3-2.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、病理科アーカイブに保存されている手術検体の FFPE ブロックより 10 $\mu\text{m}$  切片を 5-20 枚入手した。

#### 3-3.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、5 $\mu\text{g}$  を遺伝子変異解析に用いて、残検体はメチル化解析のため EZ DNA methylation Kit (Zymo)を用いて bisulfite 処理を行った。

#### 3-4.遺伝子変異解析

Ion Ampliseq 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 の変異解析を行う。

### 3-5.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。既報の論文(*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

Screening cohortにおいて同定された領域に対してPyrosequencingを行うためのプライマーを設計する。Screening cohort同様、 $\beta > 0.6$  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抽出する。

## 4)結果

### 4-1.症例について

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。

### 4-2.Screening cohort

#### 1)遺伝子変異解析

30例の解析の結果を下記に示す(図2)。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	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	■	■	■	■					■		■	■	■	■	■	■				■		■	■	■	■	■			■	

表1:遺伝子変異解析結果

■ : 変異陽性

#### 2)DNA メチル化解析

スクリーニングの結果、5か所の卵巣がん特異的なエンハンサー領域がメチル化の有無により

有意に予後の差がある候補として同定された(図2)。Chr12:78,114,145を含むエンハンサーにおいてはメチル化症例で予後が良く、ほかの領域についてはメチル化症例では予後不良であった。候補領域のメチル化の有無によるKaplan-Meier曲線を示す(図3)。

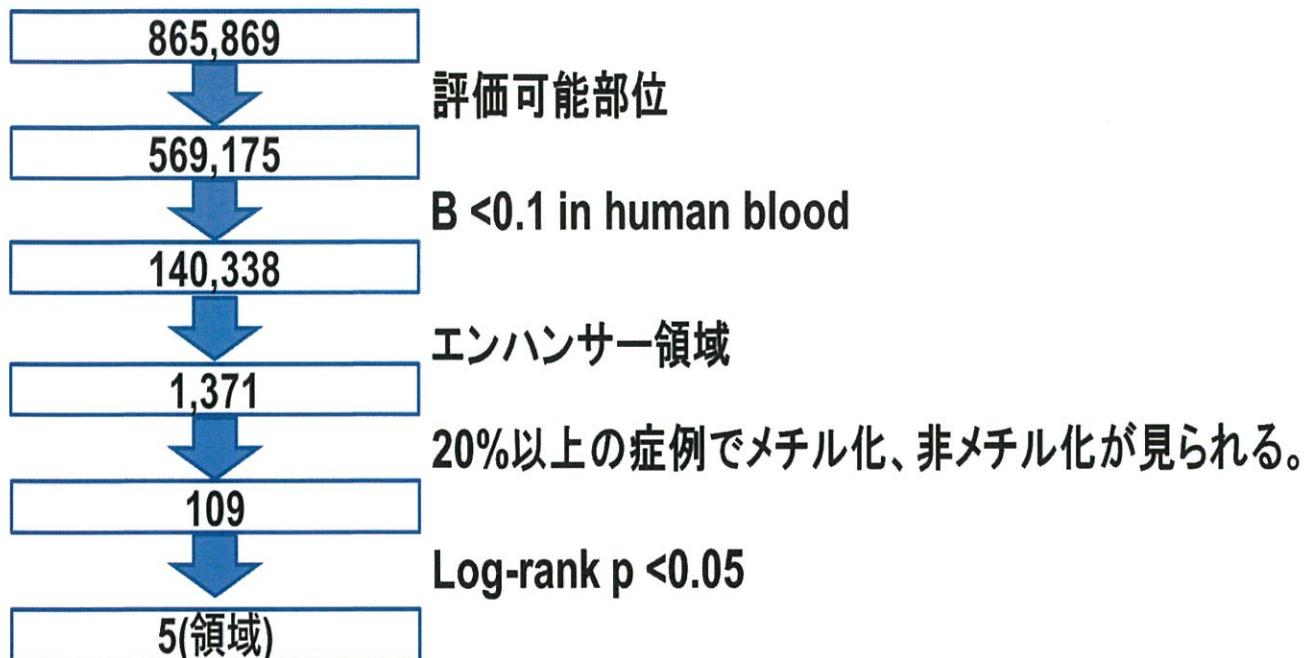


図2 メチル化領域のスクリーニング

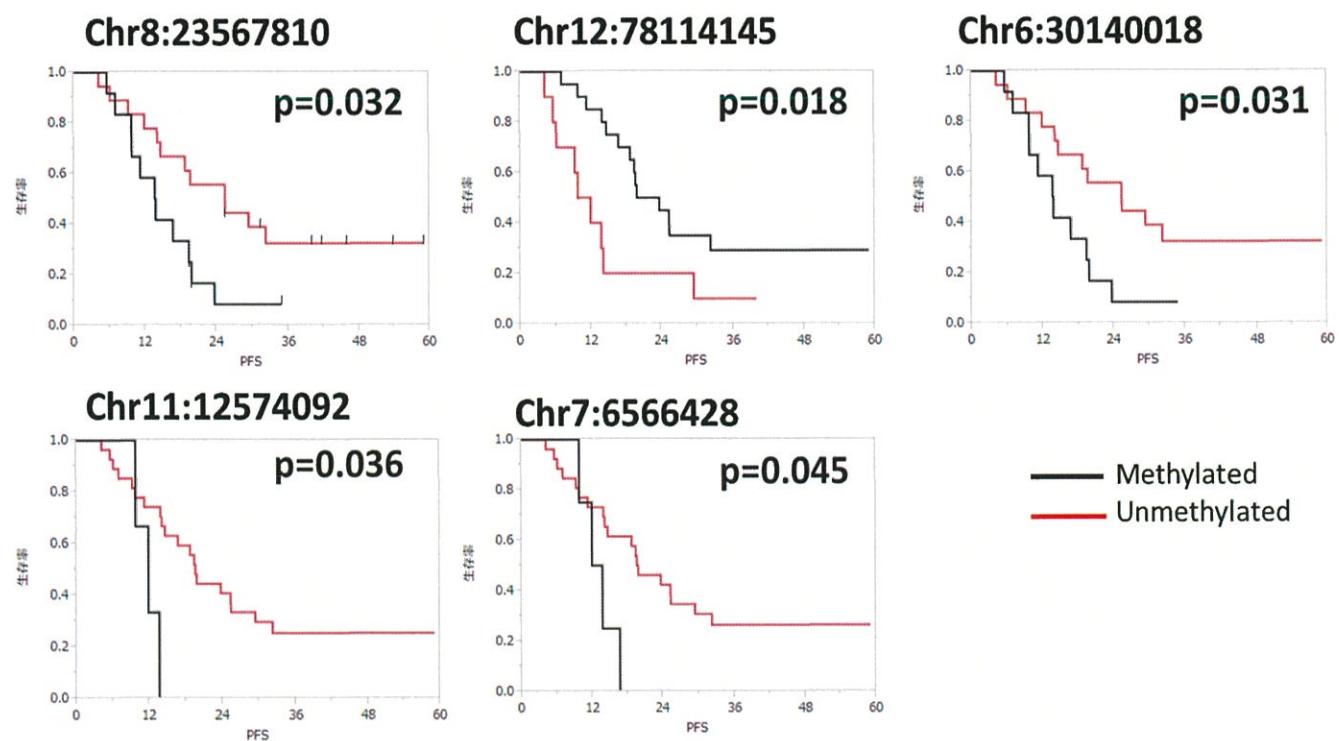


図3 スクリーニングコホートにおける候補領域のメチル化の有無によるKaplan-Meier曲線

#### 4-3. Validation cohort

上記候補領域中、2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。その結果、スクリ

スクリーニングコホートと同様に Chr8:23567810 のメチル化が有意な予後不良因子として同定された(図4)。他領域については現在メチル化レベルの測定を進行中である。

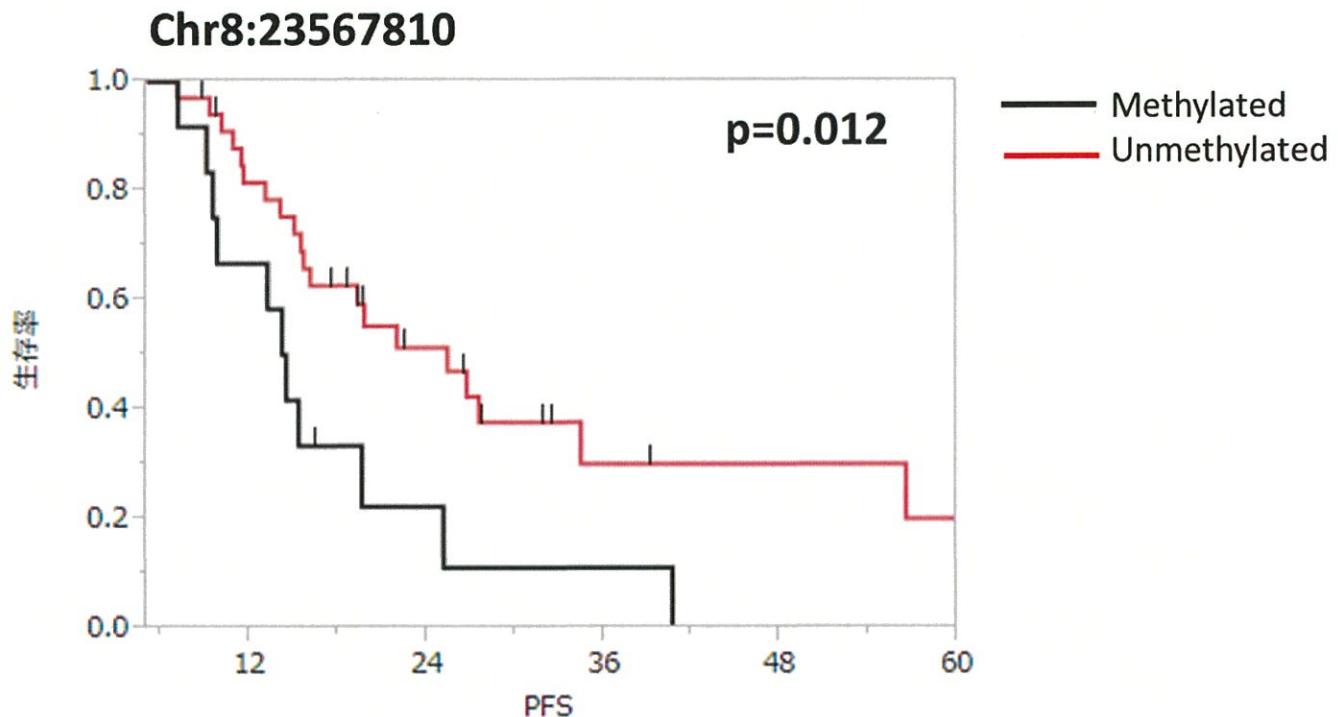


図4 バリデーションコホートにおける Chr8:23567810 のメチル化の有無による Kaplan-Meier 曲線

## 5) 考察

### 5-1. 症例選択および遺伝子変異解析について

一般的に BRCA1 および BRCA2 の遺伝子変異は卵巣がんにおいて予後良好因子とされているが、今回の解析では有意差は認めなかった。術前化学療法が著効した症例では予後が良いとされているが、このような症例は今回の解析では十分な量の検体が得られないため、除外となっている影響が考えられる。対象期間内において術前化学療法を施行した全症例において診断時の検体を用いて変異解析を行い、変異の有無により予後を比較することで確認できると考えられる。

### 5-2. メチル化解析について

今回スクリーニングコホートでは網羅的な解析を行っているため、偽陽性は必発である。そのためバリデーションコホートを設け、染色体 8 番に存在する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。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。他施設での症例を追加し、リバリデーションを行い真に差のある領域を同定することを検討している。

### 5-3. エンハンサー領域のメチル化の生物学的な意義について

今回の検討では候補領域のエンハンサーのメチル化の多くが予後不良因子として同定されてい

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。そのため、制御する遺伝子の発現低下が腫瘍の生存にとって有利に働き、治療抵抗性、予後不良となる可能性が考えられる。

(2) シニア・リサーチフェロ一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。そのため、他の因子によるバイオマーカーの開発が望まれる。DNA のメチル化は mRNA やタンパク質の発現と比較して 1)非腫瘍細胞の混入の影響を受けにくい、2) 化学的に安定であり検体の質の影響を受けにくい、3) 発現の準備状況がわかるため将来の治療への影響が予想できる、4) 定性化によるカットオフを用いるため発現の差が小さくても検出できるなどの利点があるため、バイオマーカーとして有用である。そのため、今後他施設症例によるリ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。

### 2)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。このエンハンサーが制御する標的遺伝子を同定し、その遺伝子 knock down, 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。