

シンポジウム3 卵巣がんの新たな戦略—基礎から、そして臨床から—

(1) 卵巣癌における化学療法感受性バイオマーカーの開発と組織型による分子標的の同定—治療個別化に向けた Bioinformatics の応用—

京都大学 松 村 謙 臣

【目的】

卵巣癌患者の予後を改善するため、患者ごとの薬物療法の個別化、すなわちオーダーメイド治療が求められている。そのためには、抗癌剤の作用メカニズムに基づき感受性を予測し患者ごとに最適な抗癌剤を選択すること、および、個々の癌で標的となるシグナル伝達機構を解明し新規分子標的薬剤による個別化を目指すことが不可欠である。近年のDNAマイクロアレイとBioinformatics技術の発達により、癌で生じている多くの遺伝子の複合的な異常を正確に把握し、臨床に反映させることが可能となってきた。本研究では、卵巣癌治療の個別化を目指し、マイクロアレイを利用した研究を行った。

【方法】

<研究1：卵巣癌におけるパクリタキセル感受性バイオマーカーの同定とその分子メカニズム>

7年以上の長期生存24例と3年以内の短期死亡33例の進行漿液性卵巣癌計57例のマイクロアレイデータをwebsiteより入手した。プロモーター領域の転写因子結合モチーフ解析を用いて、E2Fのcofactorとして働く転写因子YY1の下流遺伝子を同定した。2種の卵巣癌細胞株(HEY, BG1)を用いて、siRNAを用いたYY1のknockdownが、シスプラチン感受性、パクリタキセル感受性に与える影響を調べた。また培養細胞にE2F3を過剰発現させたマイクロアレイデータをwebsiteより入手し、微小管を構成する遺伝子群(GO#5874 microtubuleに含まれる遺伝子)の発現変化を検討した。

<研究2：卵巣明細胞腺癌の発生メカニズムに基づく新規分子標的療法剤の同定> 卵巣癌99例

(漿液性腺癌41例、類内膜腺癌37例、粘液性腺癌13例、明細胞腺癌8例)のマイクロアレイデータをwebsiteより入手した。また、卵巣癌39細胞株(漿液性腺癌13株、類内膜腺癌4株、粘液性腺癌4株、明細胞腺癌13株、未分化癌5株)を用いてマイクロアレイ解析を行った。それらのデータセットにおいて、SAM (Significance Analysis of Microarrays)により、明細胞腺癌を特徴付ける遺伝子群を抽出し、RT-PCRで確認した。不死化OSE細胞株を用いて、チョコレート嚢腫内溶液、あるいはFeを添加して、マイクロアレイを行った。他臓器癌のデータセットをwebsiteより入手して解析した。

<研究3：卵巣癌播種性転移の分子メカニズムに基づく新規分子標的療法剤の同定> 43種類の卵巣癌細胞株にDecitabineを添加しマイクロアレイを施行した。Decitabineによる発現上昇の程度の大きい遺伝子群をメチル化候補遺伝子群と定義し、Methylation specific PCRによりメチル化の頻度を調べた。卵巣癌細胞株(SKOV4, HEY, A2008, OVCAR3)のTGFβ活性を、リン酸化SMAD2/3抗体を用いたWestern blottingおよび、SMAD3レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイで評価した。卵巣漿液性腺癌Ⅲ期およびⅣ期の原発巣46例と大網転移巣28例のマイクロアレイデータセットをwebsiteより入手した。培養ヒトfibroblastにTGFβを添加したデータセットを用いて、Binary regression法により臨床サンプルのTGFβ活性を評価した。

【成績】

<研究1> YY1は予後良好の進行卵巣癌で高

発現していた ($p<0.001$)。卵巣癌において YY1 と正に相関する遺伝子には YY1 結合モチーフや E2F 結合モチーフをもつ遺伝子が集まり (それぞれ $p<0.0001$)、YY1/E2F はその下流遺伝子の発現を亢進させていることが判明した。そのターゲット遺伝子群の発現亢進は、パクリタキセルを使用した症例では予後良好と相関した ($p<0.05$) が、パクリタキセルを使用していない症例では予後との関連がなかった。卵巣癌細胞株において YY1 を knockdown すると、パクリタキセルに対して抵抗性となった ($p<0.01$) が、シスプラチンに対する感受性は変化しなかった。微小管を構成する遺伝子群においては、YY1 結合モチーフを持つ頻度が高く ($p<0.01$)、E2F3 過剰発現により発現が亢進し、YY1/E2F による微小管障害剤特異的な感受性との関連が示唆された。本研究により、卵巣癌の摘出標本で YY1 発現を調べることで、パクリタキセルを使用すべきか否かを決定し、化学療法のレジメンを選択できる道が開けた。

＜研究 2＞ 卵巣癌組織および細胞株のデータから、明細胞腺癌を特徴付ける 230 遺伝子 (Clear Cell Signature) (発現上昇 229 遺伝子と発現低下 1 遺伝子) を同定し、RT-PCR で 10 個の遺伝子が実際に明細胞腺癌組織で高発現していることを確認した。Clear Cell Signature は、不死化 OSE 細胞にチョコレート囊胞内溶液あるいは Fe を添加することによって発現が上昇した ($p<0.001$)。Clear Cell Signature には腎臓の発生に関連した遺伝子

が集まり ($p<0.01$)、クラスタリングによって卵巣明細胞腺癌は腎細胞癌に極めて類似していることが明らかとなった。したがって、腎細胞癌に対し有用なマルチキナーゼ阻害剤 Sorafenib と Sunitinib は、明細胞腺癌の治療にも有用である可能性があると考えられる。

＜研究 3＞ 卵巣癌細胞株 43 種類のいずれかで Decitabine 添加後の発現上昇が顕著なメチル化候補 360 遺伝子を同定し、その中の 20/20 遺伝子 (100%) で実際にメチル化を認めた。メチル化候補遺伝子には、TGF β 経路に関わる遺伝子が集まっていた ($p<0.01$)。卵巣癌細胞株に Decitabine を添加すると、TGF β 活性が亢進した。大網播種性転移巣では、原発巣に比して、メチル化候補遺伝子群の協調した発現上昇および、TGF β 経路の活性化が認められた ($p<0.01$)。このことより、卵巣癌の進展においては、エピジェネティックに制御された遺伝子の協調した発現上昇が TGF β 経路の活性化をもたらして、播種性転移を促すと考えられた。近年開発された TGF β 阻害剤は、卵巣癌の播種性転移に対して有用と考えられる。

【結論】

マイクロアレイを用いて、卵巣癌のパクリタキセルに対する感受性メカニズム、さらに、卵巣明細胞腺癌の発生や卵巣癌の播種性転移に関わる分子機構が明らかになった。これらの知見は、患者ごとに最適な化学療法剤を選択し、新たな分子標的治療薬を探索するために有用と思われる。