

第 61 回日本産科婦人科学会・学術講演会

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

京都大学医学部婦人科学産科学教室

助教 松村 謙臣

Development of Chemosensitivity Biomarkers and Identification of Specific Molecular Target in Ovarian Cancer: Genome-wide Approach Using Bioinformatics

Noriomi MATSUMURA

Department of Gynecology and Obstetrics, Kyoto University, Graduate School of Medicine, Kyoto

緒 言

単一の遺伝子を題材としてがんの研究を行う場合、がんの全体像との関わりがよくわからず、いわば「木を見て森を見ず」となって、結果的に研究をがん治療の臨床につなげていけないことがしばしばある。「森全体を見る」、すなわち、構成要素である遺伝子ではなく、その集合体としてのがんの全体像を把握することが、研究成果をがんの臨床へ反映させるために重要と考えられる。がんの全体像を把握するためには、ゲノムワイドなデータを扱う Bioinformatics が有用である。“Real biology”での実験材料に相当するのは、Bioinformatics ではマイクロアレイなどのデータであり、Web上にたくさん公開されている。そして実験手段に相当する解析ソフトも、ほとんどがフリーで入手可能である。

しかしこれまで Bioinformatics は、臨床や生物学に精通していない統計学者ばかりが用いているという状況があり、がんの臨床に反映される研究がほとんどない。そこで今回、産婦人科医の視点

から Bioinformatics を利用し、“Real biology”と融合させることによって、卵巣がんの臨床につなげていく研究を目指した。特に卵巣がんの薬物療法に結びつける研究のために、mRNA 発現をゲノムワイドに検出するマイクロアレイを利用し、1)卵巣漿液性腺癌の予後に関与する遺伝子群、2)卵巣明細胞腺癌の遺伝子発現プロファイル、3)卵巣癌の DNA メチル化とシグナル伝達の 3つのテーマで解析を行った。

1) 卵巣漿液性腺癌の予後に関与する
遺伝子群から

[背景と目的-1]

がんの予後には、増殖、浸潤、転移、抗がん剤感受性などががんのさまざまな性質が関わっている。そこで Bioinformatics を利用して、遺伝子群の機能を解析し、卵巣がんの予後に及ぼす影響を調べた。

共同研究者の Berchuck et al.は、マイクロアレイを用いて、漿液性卵巣がんⅢ、Ⅳ期のうち、3年以内に死亡した予後不良症例と、7年以上生存

Key Words: Bioinformatics, Taxane, Clear cell carcinoma, DNA methylation, TGF-beta signaling pathway

した予後良好症例の間で発現の異なる遺伝子群を統計学的に選び出した¹⁾。予後良好群で高発現している遺伝子の中に転写因子である YY1 が含まれており、YY1 は E2F など、別の重要な転写因子の働きを調節するため、腫瘍の性格を大きく変える可能性があると考え、本研究では YY1 に着目した²⁾。

[方法-1]

漿液性卵巣がん臨床サンプル 88 症例のマイクロアレイデータを Affymetrix U133A gene chip によって解析した。Website からも NCI60³⁾ など細胞株のマイクロアレイデータを入手して解析した。解析ソフトとして、Cluster 3.0, Java Treeview 1.0, R, Binary Regression⁴⁾, GSEA⁵⁾ を用いた。そして、in vitro で卵巣癌細胞株 BG1 を用いて、YY1 siRNA が抗がん剤感受性に与える影響を調べた。

[結果と考察-1]

まず、卵巣がん組織において、YY1 の mRNA 発現を定量的 RT-PCR で調べると、マイクロアレイでの YY1 発現と正の相関を示し ($r=0.57, p<0.0001$)、さらに YY1 のタンパク発現を免疫組織染色で調べると、腫瘍細胞の核内に発現を認め、その強さもマイクロアレイでの YY1 発現とよく相関していることがわかった ($r=0.35, p<0.05$)。

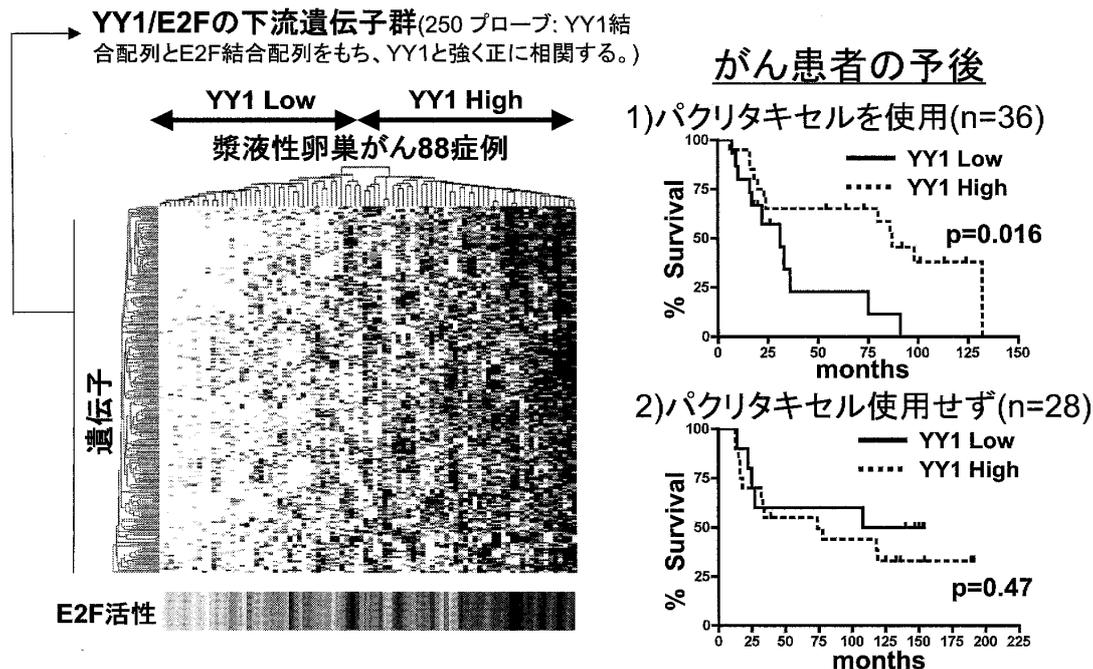
漿液性卵巣がん 88 症例のマイクロアレイデータにおいて、YY1 発現とゲノムの全遺伝子の発現との相関を調べ、その相関性に基づいて全遺伝子を分類すると、プロモーター領域に YY1 結合配列と E2F 結合配列の両方をもつ遺伝子は YY1 と正に相関することがわかった ($p<0.0001$)。YY1 は E2F と結合し、プロモーター領域に YY1 結合配列と E2F 結合配列の両方をもつ下流遺伝子の発現を亢進させ、結果的に E2F の働きを活性化することが知られている⁶⁾。今回の卵巣がんにおける解析結果はこの報告と合致しており、卵巣がんにおいても、YY1 は E2F と一緒に働いている可能性が考えられた。

そこで、YY1 結合配列と E2F 結合配列をもつ遺伝子のうち、YY1 と強く正に相関するものを YY1/E2F 下流遺伝子群とし、それで漿液性卵巣がんを分類した(図 1)。図は縦軸が遺伝子、横軸が

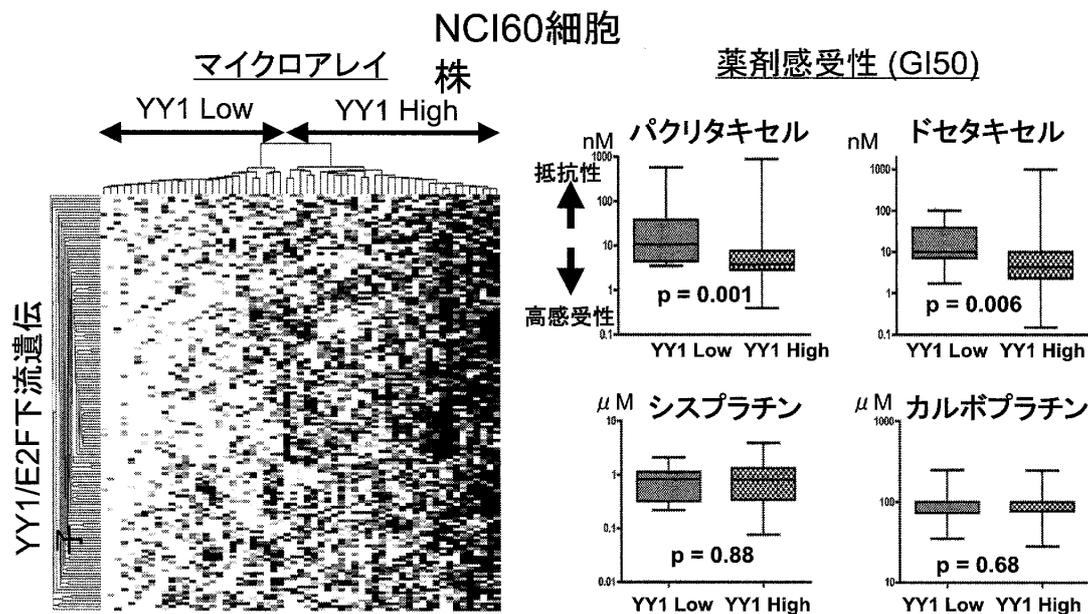
卵巣腫瘍サンプルを表している。遺伝子や腫瘍はクラスタリングによって並べられていて、枝の高さが低いほどパターンが似ていることを意味している。腫瘍は大きく 2 つに分類され、それぞれ YY1 Low クラスタ および、YY1 High クラスタ と名付けた。マイクロアレイデータから Binary Regression にて E2F 活性の値を計算すると、YY1/E2F 下流遺伝子群の発現と強く相関しており、これは YY1 が E2F の作用を強める可能性を示唆している。術後に抗がん剤投与を受けた卵巣がん患者において、YY1 Low/High の分類と、患者の生存期間に関連があるかどうか調べた。パクリタキセルを使用した 36 症例では、YY1/E2F 下流遺伝子の発現が高い群で予後良好であった。一方、パクリタキセルを使用しなかった 28 症例では、YY1/E2F 下流遺伝子の発現は、予後と相関しなかった。すなわち、パクリタキセルを用いた場合にのみ、YY1/E2F 下流遺伝子の発現が高いと予後がよいことから、YY1/E2F の働きは、特にパクリタキセルの感受性に関連があると考えられた。

次にさまざまな臓器のがんに由来する 60 種類の細胞株 NCI60 のマイクロアレイデータを解析した(図 2)。NCI60 も YY1/E2F 下流遺伝子によって 2 つに分類された。NCI60 の細胞株では、薬剤感受性データも公開されており、パクリタキセルとドセタキセルでは、YY1/E2F 下流遺伝子の発現が高い細胞群で高感受性を示したが、シスプラチン、カルボプラチンではこの分類による差を認めず、YY1/E2F 下流遺伝子の発現が高いと、タキサンに高感受性を示すが、プラチナ感受性との関連はないことがわかり、これは漿液性卵巣がんにおける予後のデータと合致していた。

タキサンは微小管の過剰形成により細胞分裂を阻害する薬剤であるため、YY1/E2F と微小管の関連について調べた。微小管を構成する遺伝子群は、GO5874 microtubule として分類されており、まず Web 上のマイクロアレイデータで、E2F 強制発現による変化を調べた。遺伝子群全体の動きを GSEA というソフトを用いて検討すると、E2F は微小管遺伝子群の発現を有意に亢進させること



【図1】 漿液性卵巣がんの YY1/E2F シグナル亢進例はパクリタキセル使用群で予後良好である



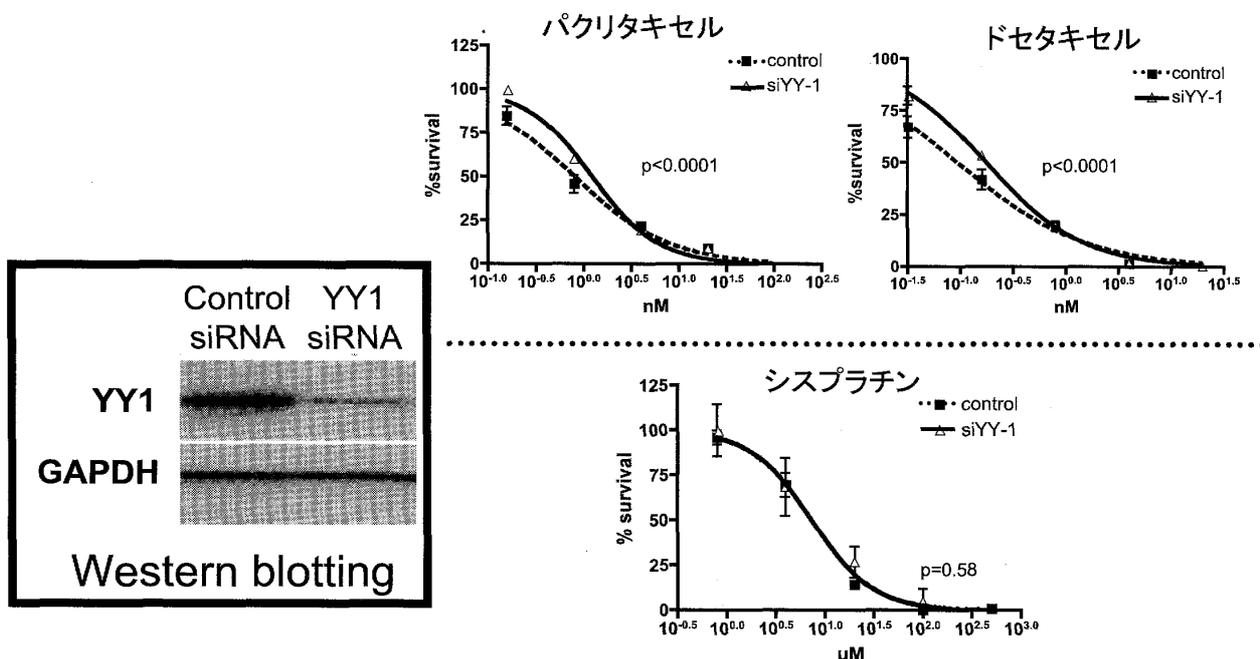
【図2】 種々の臓器のがんでも YY1/E2F シグナル亢進とタキサン高感受性が相関する

がわかった (FDR q value = 0.160 < 0.250). さらに、微小管遺伝子群のプロモーター領域を調べると、YY1 結合配列をもつ頻度が有意に高いこともわかった (p < 0.001). したがって、微小管遺伝子群の発現は YY1/E2F により制御されていると考えられ、これがタキサン特異的な化学療法感受性と関

連している可能性がある。

卵巣がん細胞株のうち YY1 高発現の BG1 を用いて、siRNA で YY1 の発現を抑制した時に、抗がん剤の効果がどのように変化するか調べた (図 3). YY1 の発現を抑制すると、パクリタキセル、ドセタキセルへは抵抗性となったが、一方で、シ

BG1卵巣癌細胞株



【図 3】 卵巣癌細胞において、YY1 発現抑制はタキサン抵抗性をもたらし、シスプラチン感受性へは影響を与えない

シスプラチンに対する感受性は変化しなかった。したがって、YY1 の発現抑制は、タキサン特異的な抵抗性をもたらし、YY1 がタキサン感受性に機能的に関与していることがわかった。

まとめとして、今回の研究は卵巣がんの予後を分ける遺伝子リストの報告を見たことから始め、YY1 が予後良好群で高発現していることに着目し、Bioinformatics を利用して機能解析を行った結果、YY1 がタキサン高感受性をもたらし予後に関与していることが明らかになり、そのメカニズムとして、YY1/E2F シグナルによる微小管遺伝子群の発現亢進の可能性が示唆された。本研究の成果は、タキサン感受性のバイオマーカーおよび、タキサン耐性機序の研究へとつなげていけると思われる。

2) 卵巣明細胞腺癌の遺伝子発現プロファイルから

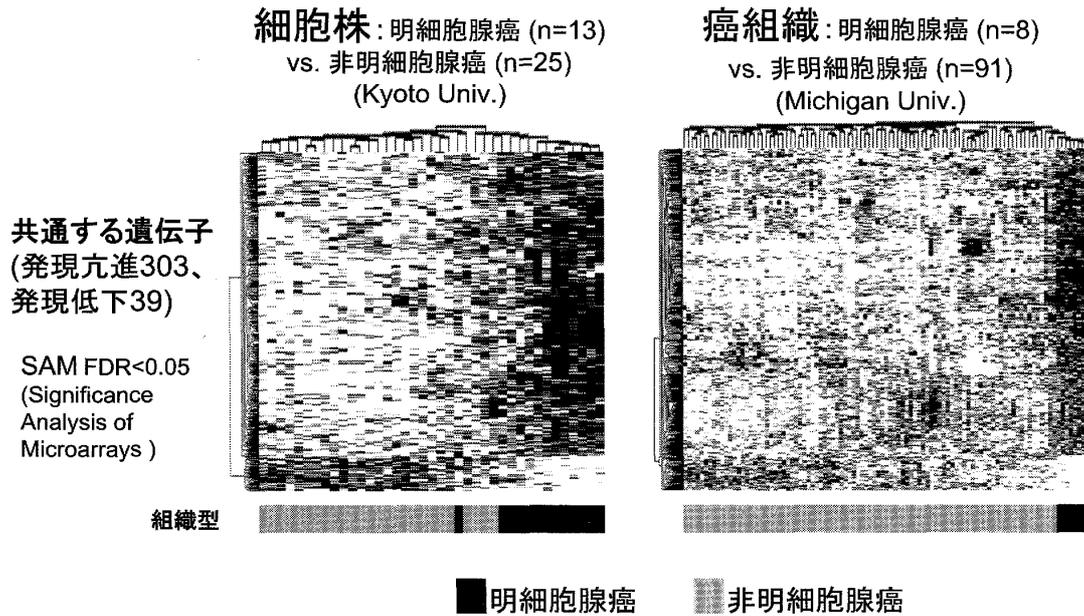
[背景と目的-2]

これまで、がんに対する薬物療法は、臓器ごとに確立されてきたが、卵巣がんには薬剤感受性の

異なる多様な組織型が存在し、とりわけ卵巣明細胞腺癌は、日本で急増しており、既存の抗がん剤に耐性である⁷⁾。今後は組織型ごとに個別化した治療を行うことが求められており、最近では分子標的薬など、抗腫瘍薬の選択肢が増えてきていることから、最適な薬物療法をどうやって探すのかが大きな問題となっている。そこで本研究は、卵巣明細胞腺癌の遺伝子発現プロファイルから生物学的特徴をとらえ、新規の薬物療法を探索することを目的とした。

[方法-2]

明細胞腺癌 13 細胞株を含む 38 細胞株で Affymetrix U133A gene chip を用いてマイクロアレイを行い、さらに Website から卵巣がん組織⁸⁾⁹⁾ や NCI60³⁾ のデータを手に入して、明細胞腺癌と他の組織型を分ける遺伝子を同定した。マイクロアレイ解析のために、SAM¹⁰⁾、R、Cluster 3.0、Java Treeview 1.0、Binary Regression⁴⁾、GATHER¹¹⁾、COMBAT¹²⁾ を用いた。そして RT-PCR で遺伝子発現を検証し、予測された薬剤の抗腫瘍効果を in vivo で検討した。



【図4】細胞株と癌組織のマイクロアレイによる、明細胞腺癌を特徴づける遺伝子群“Clear Cell Signature”の抽出

[結果と考察-2]

まず、明細胞腺癌を特徴づける遺伝子群を抽出する目的で、がん細胞株と癌組織のデータセットから、明細胞腺癌とその他の組織型を分ける共通の342遺伝子をSAMによって抽出した(図4)。その遺伝子でクラスタリングすると、明細胞腺癌が他の組織型と区別されていることがわかった。これらの遺伝子を、明細胞腺癌を特徴づける遺伝子群ということで“Clear Cell Signature”と名付けた。そのClear cell signatureで、websiteからとってきた別の2つのマイクロアレイデータをクラスタリングしてみると、やはり明細胞腺癌を同定し、再現性が高いことがわかった(図5)。さらに、細胞株と癌組織において、RT-PCRによるmRNA発現の検証を行い、明細胞腺癌とそれ以外の間で、Clear Cell Signature 遺伝子の発現量が異なることを確認した。その中には、Tsuchiya et al. が報告し、現在明細胞腺癌のマーカーとみなされているHNF1 β も含まれていた¹³⁾。

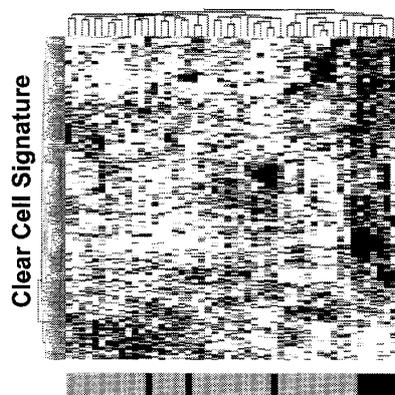
Clear Cell Signatureのうち、発現上昇している遺伝子をGATHERで解析してみると、GO:0001822 kidney development (p=0.006)や、GO:0046626 insulin receptor signaling pathway (p=0.004)といった性質をもつ遺伝子が多く集まって

おり、さらに、プロモーター領域にV\$HNF1_01という、HNF1 β の結合配列をもつ、HNF1 β の下流遺伝子が多いことがわかった(p=0.001)。HNF1 β のmutationは、腎低形成と降 β 細胞の機能異常による糖尿病を引き起こす¹⁴⁾ことが知られていて、明細胞腺癌の生物学的特徴として、“腎臓”および“糖代謝”がキーワードになると考えられた。

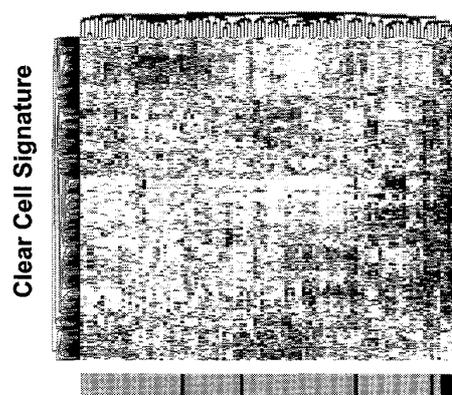
他臓器癌と比較したときの、明細胞腺癌の位置づけを調べるために、さまざまな臓器由来の60細胞株を含むNCI60と、卵巣癌38細胞株のデータをCOMBATによってmergeして、計98サンプルとしてClear Cell Signatureでクラスタリングした(図6)。その結果、明細胞腺癌は遺伝子群の発現パターンがきわめて腎細胞癌に類似していることがわかった。

腎細胞癌の中では淡明な細胞質をもつ癌細胞からなる「明細胞癌」という組織型が75%を占めていて、増殖が遅く、既存の抗がん剤にきわめて耐性という特徴がある。そのため、新規薬剤の臨床試験が次々に行われてきた。最近、キナーゼ阻害剤であるSorafenib(ネクサバル[®])が腎細胞癌に非常に有用であることがわかり¹⁵⁾、2008年4月に日本で承認された。SorafenibはEGFR, PDGFR, VEGFR, c-KITといったチロシンキナーゼ型レセ

癌組織: 明細胞腺癌 (n=9)
vs. 非明細胞腺癌 (n=41)
(MD Anderson Cancer Center)



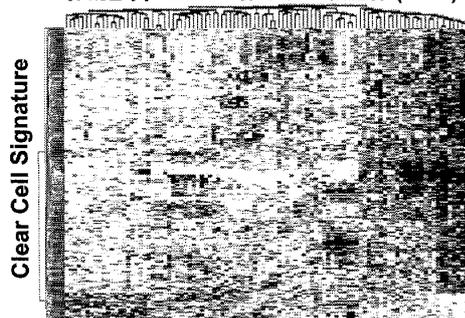
癌組織: 明細胞腺癌 (n=9)
vs. 非明細胞腺癌 (n=102)
(Expression Project for Oncology)



■ 明細胞腺癌 ■ 非明細胞腺癌

【図5】他のマイクロアレイデータセットにおいても，“Clear Cell Signature”は明細胞腺癌を同定する

細胞株 NCI60+卵巣癌38細胞株 (n=98)



由来臓器
Ovary Kidney Ovary (Clear cell)

【図6】腎細胞癌における“Clear Cell Signature”の発現パターンは、明細胞腺癌と類似している

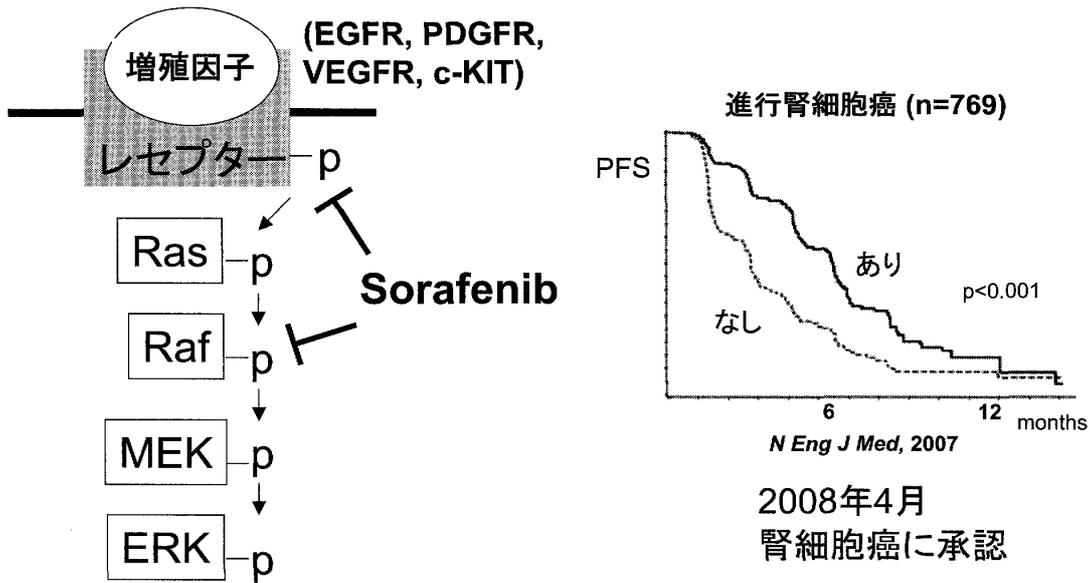
プターや、Rafのキナーゼ活性を阻害する(図7).

また、卵巣がんのマイクロアレイデータからE2F活性とRas活性を計算すると、類内膜腺癌と漿液性腺癌はE2F活性が高く、明細胞腺癌と粘液性腺癌はRas活性が比較的高いことがわかった(図8). E2Fは増殖能、Rasはキナーゼ活性と関連が深く、類内膜腺癌と漿液性腺癌は増殖型、明細胞腺癌と粘液性腺癌はキナーゼ型と分類できる可能性がある。そして、増殖型の類内膜腺癌と漿液性腺癌にはタキサンなどの抗がん剤、キナーゼ型

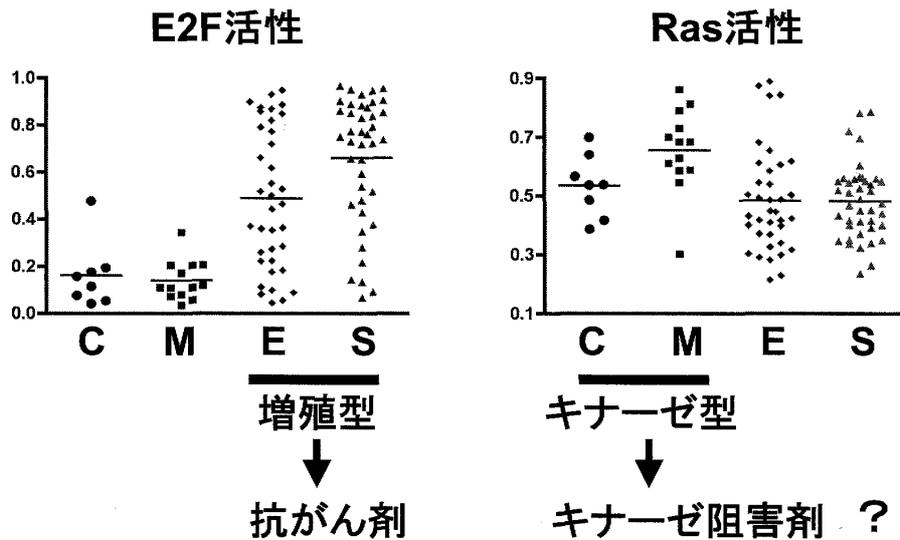
の明細胞腺癌と粘液性腺癌にはSorafenibのようなキナーゼ阻害剤が有用である可能性が考えられた。

卵巣明細胞腺癌由来の細胞株RMG-2はヌードマウスに接種すると、淡明な細胞質を有する腺がん細胞からなる腫瘍を形成する。この細胞株をヌードマウスの皮下に 5×10^6 個接種し、長径が1cmとなった時点で、Sorafenib 40mg/kgを毎日経口投与したところ、著明な抗腫瘍効果を認めた($p < 0.001$)。コントロール群は腫瘍が増大し、中心部の壊死が著明であったが、Sorafenib治療群では腫瘍が縮小して、壊死の部分が痂皮状になり、ほとんどそれを残すのみになった。この結果は、Sorafenibが卵巣明細胞腺癌の治療薬として有望であることを示している。

まとめとして、卵巣明細胞腺癌の遺伝子発現プロファイルをもとに、その生物学的特徴を調べた結果、腎細胞癌と類似していること、さらに、キナーゼ型のがんであることが示唆された。そして腎細胞癌に用いられているキナーゼ阻害剤Sorafenibが卵巣明細胞腺癌に有用であることを動物実験で示し、現在臨床試験を予定している。



【図7】 マルチキナーゼ阻害剤 Sorafenib(ネクサバル®)は腎細胞癌に有効である



【図8】 卵巣がんの組織型分類によって、シグナル活性のパターンが異なる

3) 卵巣癌の DNA メチル化と シグナル伝達解析から

[背景と目的-3]

がんにおいて、DNA メチル化の異常ががんの発生や進展に影響を与えることが知られているが、ゲノムワイドな DNA メチル化パターンの意義については、卵巣がんも含めあまり検討されていない。遺伝子のプロモーター領域にメチル化があると、RNA が転写されない。そこで脱メチル化

剤 5Aza-dC を添加すると、DNA が脱メチル化され、RNA が転写される。したがって、マイクロアレイを用いて元のサンプルと比較することによって、DNA メチル化をゲノムワイドに予測できる¹⁶⁾。本研究では卵巣がんにおける DNA メチル化をゲノムワイドに調べ、その生物学的意義を、シグナル伝達およびがんの進展という点から明らかにし、新規薬物療法を見出すことを目的とした。

[方法-3]

卵巣がんにおけるメチル化遺伝子を、5Aza-dC

【表 1】メチル化候補 360 遺伝子の性質

遺伝子の働きのカテゴリー分類	
GO:0009653[3]: morphogenesis	} 器官形成
GO:0009887[4]: organogenesis	
GO:0007275[2]: development	
GO:0042127[5]: regulation of cell proliferation	} 増殖制御
GO:0008285[6]: negative regulation of cell proliferation	
GO:0006928[4]: cell motility	} 細胞運動
GO:0016477[5]: cell migration	
GO:0001525[6]: angiogenesis	} 血管新生
GO:0007155[4]: cell adhesion	} 細胞接着
GO:0030155[4]: regulation of cell adhesion	
GO:0006954[5]: inflammatory response	} 免疫
GO:0006955[4]: immune response	

ゲノムと比べて集まっているもの ($p < 0.01$).

を添加してマイクロアレイを用いて同定した. メチル化アッセイは Methylation specific PCR (MS-PCR) および Bisulphite-modified pyrosequencing によって行った. シグナル伝達は Binary Regression⁴⁾ およびルシフェラーゼアッセイで調べた. 卵巣がんの原発巣および大網転移巣の組織を, 免疫組織染色および Website より入手したマイクロアレイデータによって解析した. 予測された薬剤のマウス卵巣がん細胞株 HM-1 に対する効果を in vitro および in vivo で調べた. その他, マイクロアレイ解析には, Cluster 3.0, Java Treeview, R, GATHER¹¹⁾ を用いた.

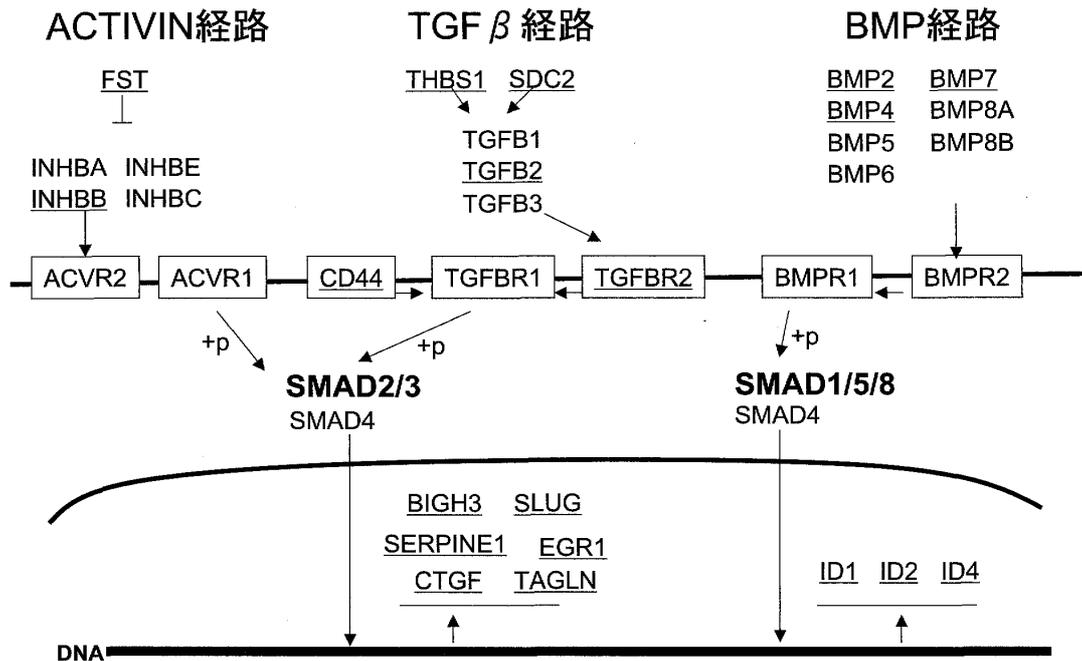
【結果と考察-3】

卵巣がん 43 細胞株に脱メチル化剤 5Aza-dC を添加し, 無添加群と比較して, メチル化候補 360 遺伝子を同定した. そのうち 27 遺伝子を選び, 実際にメチル化アッセイを行い, すべての遺伝子でメチル化を確認した. それらのメチル化候補遺伝子群を, 遺伝子の働きによってカテゴリー分類すると, 器官形成, 増殖制御, 細胞運動, 血管新生, 細胞接着, 免疫といった働きをもつ遺伝子が集まっていた(表 1). さらにシグナル経路別の分類では, TGF β スーパーファミリー経路に属する遺伝子が多く集まっていることがわかった ($p = 0.007$).

実際に TGF β スーパーファミリーのシグナル経路に属する遺伝子のメチル化を, 卵巣がんの細胞株, 初代培養細胞, がん組織において, Methylation specific PCR で調べた(図 9). 今回実際に卵巣がんではメチル化を認められた遺伝子に下線を引いて示している. リガンド, レセプター, 下流遺伝子など, さまざまな遺伝子がメチル化され, 卵巣がんにおいて, TGF β スーパーファミリー経路とメチル化の関連は深いと思われた.

さらに, TGF β 経路の活性とメチル化の関連について検討した. まず TGF-beta receptor 2 (TGFBR2) において, Bisulphite-modified pyrosequencing でプロモーター領域にある 8 カ所の CpG サイトのメチル化を定量的に調べ, メチル化と遺伝子発現の相関を調べた. いずれの CpG サイトにおいても TGFBR2 発現が低いほどメチル化が多いことがわかり (いずれも $p < 0.01$), メチル化は遺伝子発現を抑制していると考えられた.

次に卵巣がん細胞株に脱メチル化剤 5Aza-dC を添加し, TGF β 経路の活性の変化を調べた. マイクロアレイデータを用いて Binary regression で調べると, 43 細胞株において 5Aza-dC 添加で TGF β 経路の活性が亢進することがわかった ($p < 0.001$). さらに OVCAR3 細胞株において, SMAD3-ルシフェラーゼアッセイで調べると, や



【図9】 卵巣がんにおける TGFβ スーパーファミリー経路のメチル化

はり 5Aza-dC 添加により TGFβ 経路の活性が亢進することがわかった ($p < 0.01$).

このように、TGFβ 経路の多数の遺伝子がメチル化され、脱メチル化によりその活性が亢進することから、メチル化は TGFβ 経路の活性を制御していることがわかった。がんが転移をきたす際、メチル化をはじめとするエピジェネティックな変化が関与しうることが、最近散発的に報告されている。また TGFβ 経路の活性化は、がん細胞に Epithelial mesenchymal transition (EMT) という変化を生じて、転移を亢進させることも知られている。

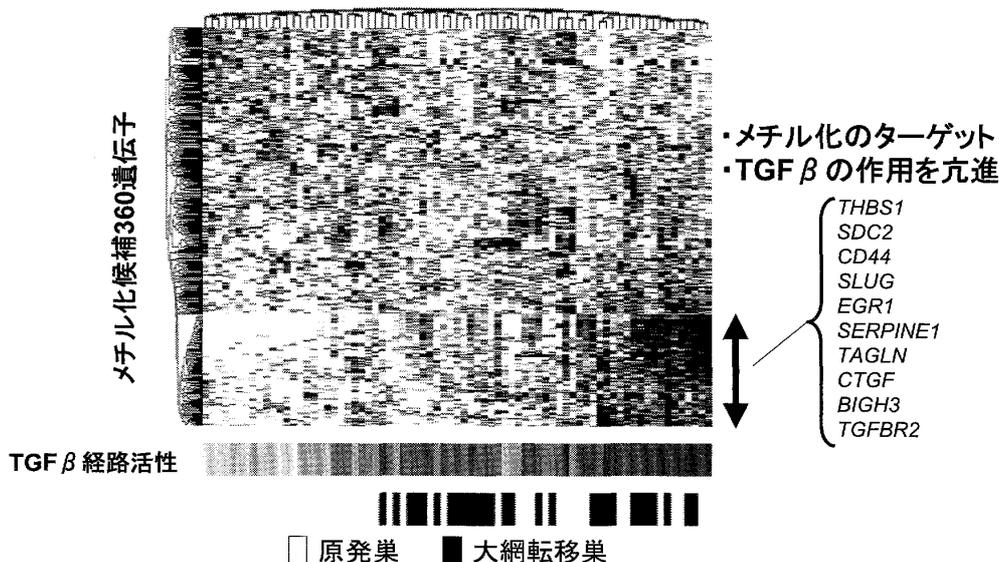
そこで、今回同定したメチル化遺伝子群の発現や、TGFβ 経路の活性が、卵巣がんの原発巣と大網転移巣でどのように異なるか検討した(図 10)。Website から得られた、Ⅲ、Ⅳ期の漿液性卵巣がんの、卵巣原発巣あるいは大網転移巣サンプルについて、メチル化候補 360 遺伝子でクラスタリングすると、協調した発現パターンを示す約 100 個の遺伝子がクラスターとして同定され、そこには今回実際にメチル化を認めた、TGFβ の作用を亢進させる遺伝子が多く含まれていた。その発現はマイクロアレイデータから計算した TGFβ 経路の活性と強く相関しており、さらに、大網転移巣に

おいて、遺伝子クラスターの発現が高く、かつ TGFβ 経路の活性が高いことがわかった。

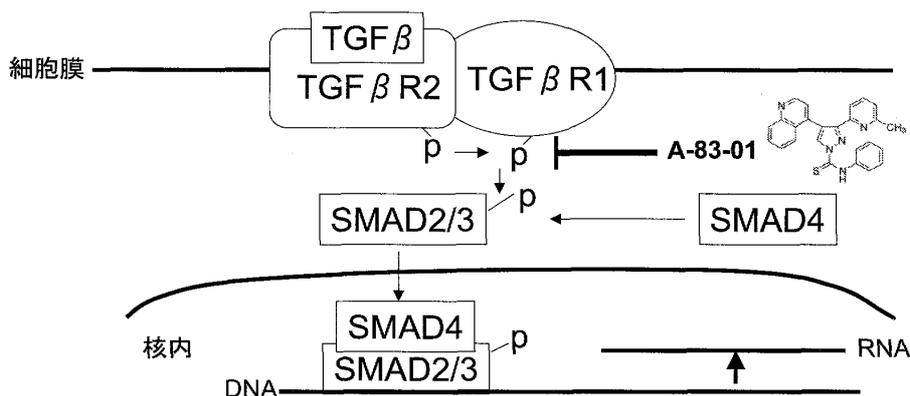
このクラスターに含まれている、TGFβ のレセプターである TGFBR2 発現および、TGFβ 経路の活性を、原発巣と転移巣のペアで免疫組織染色によって比較した。すると、マイクロアレイの結果と合致して、TGFBR2 タンパクは、大網転移巣で発現亢進しており ($p < 0.01$)、TGFβ 経路活性化の指標であるリン酸化 SMAD2 も、やはり大網転移巣で発現亢進していた ($p < 0.01$)。そこで、転移巣で活性化している TGFβ 経路を阻害することが、卵巣がん転移の治療に有用である可能性が考えられた。

TGFβ 経路の阻害剤として、TGF-beta receptor 1 (TGFBR1) のキナーゼ活性を阻害する A-83-01 という分子量 421 の化合物が知られており(図 11)、実際にマウス卵巣がん細胞株 HM-1 に添加すると、その下流にあるリン酸化 SMAD2 の量を減少させることがわかった。そこで、A-83-01 を用いて HM-1 細胞の転移形質に与える影響を *in vitro* で検討した。まずスクラッチテストで、細胞運動を調べた。細胞が confluent となった状態から一定の溝をつけて、その溝をどれだけ埋めていくかで細胞の運動距離を調べたところ、A-83-01 の添

III-IV期の漿液性卵巣癌75症例 原発巣および大網転移巣
(Expression project for oncology)



【図 10】 大網転移では、メチル化遺伝子群は発現亢進し、TGFβ 活性が高い



【図 11】 TGFβ 経路阻害剤 A-83-01 (TGFβR1 のキナーゼ活性阻害剤)

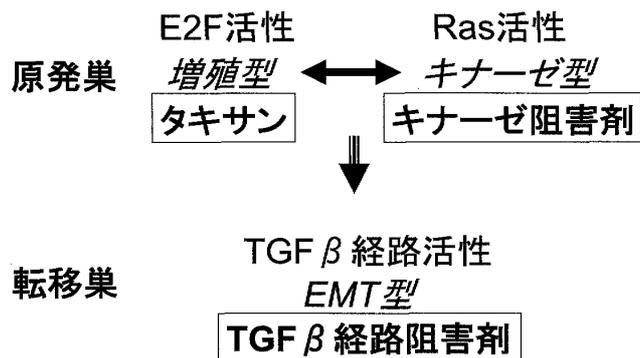
加により、細胞の運動が有意に抑制されることがわかった ($p < 0.05$)。さらにマトリゲルにおける細胞浸潤を調べたところ、細胞浸潤も A-83-01 の添加により抑制されることがわかった ($p < 0.05$)。

次に、マウスの卵巣がん腹膜播種モデルを用いて *in vivo* の検討を行った。HM-1 細胞を B6C3F1 マウスの腹腔内に接種すると、10 日目頃より著明な腹水をきたし、骨盤腹膜、腸間膜、大腸表面、横隔膜下などに播種性転移を生じる。この HM-1 細胞を腹腔内に接種し、その翌日より A-83-01 を週 3 回腹腔内に投与した。すると、A-83-01 は有意にマウスの生存期間を延長した ($p < 0.05$)。

まとめとして、卵巣がんにおけるゲノムワイドな DNA メチル化とシグナル伝達やがんの進展との関連を調べた。その結果、メチル化が TGFβ 経路の活性を抑制していることが明らかになった。そして、卵巣がんの転移巣では、メチル化遺伝子群の高発現および TGFβ 経路の活性化が認められ、TGFβ 経路の阻害剤が卵巣がん転移の治療薬として有望と思われた。

まとめと結語

卵巣がんのシグナル活性と薬物療法について、今回の 3 つの研究から考えられたシエーマを示す



【図12】 卵巣がんのシグナル活性と薬物療法

(図12). 今回, Bioinformatics によって卵巣がんの全体像を見て, 産婦人科医としての視点から Biology と融合させることをめざして研究を行い, その結果, YY1/E2F シグナルが活性化しているがんにはタキサン, 卵巣明細胞腺癌には Sorafenib, 播種性転移には TGFβ 経路阻害剤が有用である可能性を示した. 今後はマイクロアレイデータに加え, 次世代シーケンサーを利用した transcriptome や genome データが公開されるので, そのようなデータを活用し, 臨床医の視点から新たな診断, 治療方法を生み出す研究が求められるようになると思われる.

謝 辞

発表の機会を与えて頂いた本学会学術集会長の嘉村敏治教授, 本シンポジウムの座長の労をお執り頂いた杉山徹教授, 小林 浩教授に厚く御礼申し上げます.

共同研究者

京都大学: 万代昌紀講師, 山村省吾大学院生, 山口 建大学院生, 濱西潤三大学院生, 馬場長助教, 大浦智紀大学院生(医療統計学) 柴山真紀実験助手, 小西郁生教授, 藤井信吾名誉教授(京都医療センター院長)

Duke University: Dr. Susan K. Murphy, Dr. Andrew Berchuck, MS. Zhiqing Huang, Dr. Jeffrey T. Chang (Bioinformatics)

Singapore University: 森 誠一准教授

文 献

1) Berchuck A, Iversen ES, Lancaster JM, Pittman

J, Luo J, Lee P, Murphy S, Dressman HK, Febbo PG, West M, Nevins JR, Marks JR. Patterns of gene expression that characterize long-term survival in advanced stage serous ovarian cancers. *Clin Cancer Res* 2005; 15: 3686—3696

- 2) Matsumura N, Huang Z, Baba T, Lee PS, Barnett JC, Mori S, Chang JT, Kuo WL, Gusberg AH, Whitaker RS, Gray JW, Fujii S, Berchuck A, Murphy SK. Yin yang 1 modulates taxane response in epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 210—220
- 3) Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein JN. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 2000; 24: 236—244
- 4) Bild AH, Yao G, Chang JT, Wang Q, Potti A, Chasse D, Joshi MB, Harpole D, Lancaster JM, Berchuck A, Olson JA Jr, Marks JR, Dressman HK, West M, Nevins JR. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 2006; 19: 353—357
- 5) Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 25: 15545—15550
- 6) Schlisio S, Halperin T, Vidal M, Nevins JR. Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function. *EMBO J* 2002; 1: 5775—5786
- 7) Itamochi H, Kigawa J, Terakawa N. Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99: 653—658
- 8) Wu R, Hendrix-Lucas N, Kuick R, Zhai Y, Schwartz DR, Akyol A, Hanash S, Misek DE, Katabuchi H, Williams BO, Fearon ER, Cho KR. Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways. *Cancer Cell* 2007; 11: 321—333

- 9) Zorn KK, Bonome T, Gangi L, Chandramouli GV, Awtrey CS, Gardner GJ, Barrett JC, Boyd J, Birrer MJ. Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 15: 6422—6430
- 10) Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 24: 5116—5121
- 11) Chang JT, Nevins JR. GATHER: a systems approach to interpreting genomic signatures. *Bioinformatics* 2006; 22: 2926—2933
- 12) Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 2007; 8: 118—127
- 13) Tsuchiya A, Sakamoto M, Yasuda J, Chuma M, Ohta T, Ohki M, Yasugi T, Taketani Y, Hirohashi S. Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 beta as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* 2003; 163: 2503—2512
- 14) Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 1997; 17: 384—385
- 15) Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simentov R, Bukowski RM. TARGET Study Group. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 11: 125—134
- 16) Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 223—231

Synopsis

Expression of the genomic genes, not a single gene, in cancer cells may be relevant to clinical features of individual cancers. In order to link findings of basic research with the treatment of ovarian cancer, genome-wide analysis using bioinformatics is thought to be necessary. In this research, we analyzed the following three subjects using bioinformatics to improve drug treatment against ovarian cancer.

1) Biomarker of chemo-sensitivity

A transcript factor *YY1* was one of genes that discriminate between good and poor prognosis in patients with serous ovarian cancer. In the microarray dataset of 88 serous ovarian cancers, genes having both *YY1* binding sites and E2F binding sites positively correlated with *YY1*, which is consistent with a previous report that *YY1* increases E2F activity. Hierarchical clustering by the genes having both *YY1* and E2F binding sites which positively correlate with *YY1* classified ovarian cancers into the two clusters, “*YY1* Low” cluster and “*YY1* High” cluster. In serous ovarian cancer patients who received paclitaxel, *YY1* High showed better survival than *YY1* Low, though in patients who did not receive paclitaxel, this classification did not correlate with patient's survival. NCI60 cell lines, derived from cancers of various organs, were analyzed in a similar way, and *YY1* Low cells were resistant to paclitaxel and docetaxel than *YY1* High cells, while this classification did not correlate with platinum sensitivity. The siRNA knock-down of *YY1* in BG1 ovarian cancer cell line resulted in resistance to paclitaxel and docetaxel, while it did not affect on the sensitivity to cisplatin. Therefore, we conclude that *YY1* increases E2F activity and confers taxane sensitivity in ovarian cancer.

2) Novel treatment of ovarian clear cell carcinoma

This study aims to find a novel therapeutic drug against ovarian clear cell carcinoma (CCC) based on the biologic features detected by gene profiling. Microarray analysis using both ovarian cancer cell lines (13 CCC and 25 non-CCC) and ovarian cancer tissues (8 CCC and 91 non-CCC) identified “Clear Cell Signature” which discriminates between CCC and non-CCC. The Clear Cell Signature, comprising of 303 upregulated and 39 downregulated genes, was reproducible in the two other microarray datasets. The Clear Cell Signature contained *HNF1β* and genes having *HNF1* binding sites. Mutation of *HNF1β* is known to cause renal hypoplasia. Hierarchical clustering of the merged dataset of 38 ovarian cancer cell lines and NCI60 indicated that CCC was strikingly similar to renal cell carcinoma. Because Sorafenib is effective against renal cell carcinoma, we examined the *in vivo* anti-tumor effect of Sorafenib against RMG-2 CCC cell line inoculated on nude mice. Sorafenib caused the RMG-2 tumor to shrink significantly. We conclude that Sorafenib may be useful against CCC.

3) DNA methylation and signal pathway

DNA methylation is relevant to carcinogenesis and cancer progression. However, there are few studies that analyzed genome-wide DNA methylation in ovarian cancer. In this research, we aimed to analyze how the genome-wide DNA methylation affects on the signal pathway and phenotypes in ovarian cancer. Forty-three ovarian cancer cell lines were treated by 5Aza-dC, followed by microarray analysis. Reactivated 360 genes were assumed as methylation candidate genes, and they enriched genes belonging to TGF-beta signal pathway. Demethylation by 5Aza-dC significantly upregulated the TGF-beta pathway activity detected by Binary Regression and SMAD3-luciferase assay in ovarian cancer cell lines. Because cancer metastasis is supposed to be associated with epigenetic changes and TGF-beta pathway deregulation, expression of the 360 methylation candidate genes and TGF-beta activity were analyzed in primary sites and omental metastasis of ovarian cancer samples. Hierarchical clustering by the 360 genes identified a definite gene cluster of approximately 100 genes, which contain multiple genes known to activate TGF-beta signal pathway. TGF-beta activity detected by Binary Regression positively correlated with the expression of the gene cluster. Furthermore, immunohistochemical analysis for the paired samples of primary site and

omental metastasis showed increased expression of TGFBR2 and phosphorylated SMAD2 in omental metastasis. Treatment with A-83-01, an inhibitor of TGFBR1 kinase, suppressed expression of phosphorylated SMAD2 in HM-1 mouse ovarian cancer cell line, and also significantly inhibited migration and invasion of HM-1. Furthermore, *in vivo* treatment with A-83-01 prolonged survival of mice in the HM-1 peritoneal metastasis model. Therefore, we conclude that inhibition of TGF-beta signal pathway may be useful in the treatment of ovarian cancer metastasis.

In summary, using bioinformatics, we found that 1) ovarian cancers with activated YY1/E2F signal are sensitive to taxane, 2) Sorafenib is effective against CCC, 3) TGF-beta inhibitor may be useful to treat ovarian cancer metastasis. These results show that a genome-wide approach using bioinformatics may be useful to develop a novel diagnostic and therapeutic modality against ovarian cancer.
