

211. 卵巣癌ゲノムの脆弱性を標的とした新規治療法の開発

吉原 弘祐

新潟大学 医学部 産科婦人科学教室

Key words : 卵巣癌, 脆弱性, ゲノム, コピー数異常, マグネシウム代謝

緒言

卵巣癌において、2004 年度より治療ガイドラインが発行され、標準的治療が確立されているが、標準的治療を受けた進行症例の半数以上が再発し、5 年生存率は 30%前後であり、卵巣癌は依然として予後不良な疾患である。また、これまでに卵巣癌の分子生物学的特徴を明らかにする研究が複数報告されているものの、本疾患に対し承認されている分子標的薬は限られており、他の癌種に比ベトランスレーショナルリサーチが順調に進んでいるとは言い難く、卵巣癌の予後改善を目指した分子生物学的特徴に基づいた治療戦略の開発は急務である。

我々は、The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network の Pan-Cancer study project [1] に参加し、ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームに代表される OMICS データの統合解析により、卵巣癌のうち最も頻度の高い組織型である高異型度漿液性卵巣癌の分子基盤の構築に尽力してきた。具体的に、高異型度漿液性卵巣癌では、①ほぼ全例で *TP53* 体細胞変異を認めるが、*TP53* 遺伝子以外には 10%以上の症例で反復するような体細胞変異を認めず、②*TP53* 体細胞変異に伴うゲノム不安定性により、全ゲノムで著明な遺伝子増幅・欠失に代表されるコピー数異常を呈しているが、他癌種との癌ゲノム比較解析により、高異型度漿液性卵巣癌はコピー数異常によって分子生物学的に特徴付けられることが明らかになった [2]。

癌ゲノムコピー数異常に対する治療戦略としては、*HER2* 遺伝子増幅乳癌に対する分子標的薬トラスツマブが代表的であるが、遺伝子変異に対する分子標的薬に比べ、コピー数異常を対象とした分子標的薬の臨床応用は進んでいないのが現状である。特に、遺伝子欠失は直接治療標的とすることが難しく、遺伝子欠失に注目した治療戦略の開発はあまり検討されてこなかった。Muller らは、膠芽腫において *ENO1* のホモ接合性欠失 (homozygous deletion) を有している症例では、*ENO1* のパラログである *ENO2* を阻害することで腫瘍選択的に細胞死を誘導する合成致死性を明らかにしている [3]。つまり、細胞の恒常性維持に必須の遺伝子のホモ接合性欠失によって遺伝子機能が失われている場合、類似性の高い遺伝子 (パラログ) が代償して働いて細胞生存を維持していると考えられ、この「癌の脆弱性」を標的とすることで、腫瘍特異的に細胞死を誘導できることが明らかになった。

そこで我々は、「卵巣癌における著明なコピー数異常」と「癌の脆弱性」に注目し、ホモ接合性欠失を伴う卵巣癌に対するパラログ遺伝子の抑制により、新規の卵巣癌特異的治療法を開発し、卵巣癌の予後改善につなげることを目的とした。

方法

1. 卵巣癌におけるホモ接合性欠失遺伝子の検索

The Cancer Genome Atlas (TCGA) に登録されている高異型度漿液性卵巣癌 562 症例と膠芽腫 563 症例の Affymetrix Genome-Wide human SNP6 array data に対し、GISTIC v2 algorithm を用いた網羅的コピー数解析を実施し、卵巣癌におけるホモ接合性に欠失している遺伝子を探索した。欠失遺伝子の中から、1. パラログ遺伝子を有するもの、2. 細胞の恒常性維持に関与する機能を有するもの、3. ホモ接合性欠失と遺伝子発現との間に相関関係が確認できるもの、と 3 つのフィルタリングを行うことで、治療標的候補遺伝子を抽出した。パラログ遺伝子のリストは、Ensembl (<http://www.ensembl.org>) よりダウンロードし [4]、細胞の機能に関する情報は、KEGG

(https://www.genome.jp/kegg/kegg_ja.html) を利用した。また、Affymetrix GeneChip HT-HG_U133A microarray で取得された網羅的遺伝子発現データを TCGA data portal よりダウンロードし、遺伝子のコピー数と発現量との相関を検討した。

2. 卵巣癌細胞株における標的遺伝子のホモ接合性欠失の検索

Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE、<https://portals.broadinstitute.org/ccle>) に登録された卵巣癌細胞株の Affymetrix Genome-Wide human SNP6 array data をダウンロードし、GISTIC v2 でコピー数推定を行った。同様に CCLE より網羅的遺伝子発現データを入手し、卵巣癌細胞株における標的遺伝子のコピー数異常の有無と遺伝子発現変化を確認し、候補遺伝子についてホモ接合性欠失を認める細胞株および野生型細胞株を抽出した。

3. 卵巣癌細胞株における標的遺伝子のホモ接合性欠失の確認

候補遺伝子に対してホモ接合性欠失細胞株、野生型細胞株から RNA、タンパク質を抽出し、real-time RT-PCR 法および Western blot 法を用いて標的候補遺伝子の mRNA 及びタンパク質の発現レベルを確認した。同時に標的遺伝子のパラログの mRNA 及びタンパク質の発現レベルを確認した。

4. パラログ遺伝子の発現抑制による標的遺伝子欠失細胞株への特異的変化の確認

パラログ遺伝子に特異的な siRNA (Qiagen) を設計後、標的候補遺伝子のホモ接合性欠失細胞株及び野生型細胞株に導入し、パラログ遺伝子の短期発現抑制に伴う細胞増殖への影響を検討した。

結果および考察

1. 卵巣癌におけるホモ接合性欠失遺伝子の同定

網羅的コピー数解析により、卵巣癌の 1%以上の症例でホモ接合性欠失を認める遺伝子を 4,107 個同定した。そのうち、パラログ遺伝子を有する遺伝子は 3,060 個であり、代謝に関わる機能を持った遺伝子だけを選択すると、182 遺伝子まで絞り込むことが可能であった。さらにホモ接合性欠失細胞株、ヘテロ接合性欠失細胞株、野生型細胞株において候補遺伝子発現を調べ、ホモ接合性欠失群で著明に mRNA 発現が減少している 73 個の遺伝子を抽出した。

2. ホモ接合性に標的遺伝子が欠失している卵巣癌細胞株の同定

CCLE に登録されている 48 種類の卵巣癌細胞株の Affymetrix Genome-Wide human SNP6 array data を用いて GISTIC v2 を行い、各細胞株における 73 個の候補遺伝子のコピー数を検討した結果、41 個の遺伝子が少なくとも 1 つ以上の卵巣癌細胞株でホモ接合性に欠失していた。また CCLE に登録されている卵巣癌細胞株において、パラログ遺伝子がコピー数正常であることを確認できた *TUSC3* と *ATP6V1B2* が候補遺伝子として抽出された (表 1)。2 つの候補遺伝子のうち、*ATP6V1B2* と *ATP6V1B1* は相同性が高いために、*TUSC3* と *MAGT1* に注目して機能解析を行った。

3. *TUSC3* 欠失卵巣癌における治療標的としての *MAGT1* 遺伝子

TUSC3 欠失卵巣癌細胞株 (JHOS-4、KURAMOCHI) と *TUSC3* 野生型卵巣癌細胞株 (OVSANO、SKOV-3、OVCAR3、ES-2) について *TUSC3* mRNA 発現を realtime RT-PCR で評価した。*TUSC3* 欠失卵巣癌細胞株では、*TUSC3* 野生型卵巣癌細胞株に比し有意に *TUSC3* mRNA 発現が低下していた (unpaired t-test, $P < 0.001$) が、*MAGT1* mRNA 発現は 2 群間で差を認めなかった。そこで *TUSC3* 欠失および野生型卵巣癌細胞株からそれぞれ JHOS-4 と OVCAR3 を選択し、*TUSC3*、*MAGT1* mRNA およびタンパク質発現を realtime RT-PCR と Western blot 法で確認した (図 1a および 1b)。

次に *MAGT1* に対して siRNA を設計し、*MAGT1* に対する抑制効果を確認した。siRNA (10 nM) 処理 48 時間後に細胞株を回収し、RNA/タンパク質を抽出した。JHOS-4 (図 1c および d) および OVCAR3 において、siRNA による *MAGT1* mRNA/タンパク質発現抑制効果を確認できたため、siRNA 後の細胞生存への影響を CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay により評価した。興味深いことに、*TUSC3* 欠失卵巣癌細胞株である JHOS-4 では著明な細胞増殖抑制効果を認めた ($P < 0.05$) が、*TUSC3* 野生型卵巣癌細胞株である OVCAR3 では細胞増殖抑制効果を認められなかった (図 1e)。

本研究において、卵巣癌症例のゲノムデータとトランスクリプトームデータを利用した統合解析により、卵巣癌細胞株の脆弱性に関与する遺伝子候補を抽出し、*in vitro* 実験系で脆弱性を証明することが可能であった。今回対象とした *TUSC3* と *MAGT1* は細胞膜に局在するマグネシウムイオン輸送体であり、細胞の生存に不可欠なマグネシウムイオンの恒常性に関与することが知られている。*TUSC3* がホモ接合性欠失している細胞では、同じマグネシウムイオン輸送体ファミリーである *MAGT1* が代償性に機能し、細胞の生存に寄与している可能性がある。*in vitro* において *MAGT1* の発現抑制により *TUSC3* がホモ接合性欠失している卵巣癌細胞株に選択的に細胞増殖抑制効果を認めたことから、*MAGT1* は卵巣癌の新規治療標的になる可能性がある (図 1f)。卵巣癌で最も頻度の高い組織型で予後不良な高異型度漿液性卵巣癌において、7.5%の頻度で *TUSC3* 遺伝子のホモ接合性欠失を認め、また他の癌腫においても *TUSC3* 遺伝子のホモ接合性欠失を一定の頻度で認めることから、*MAGT1* 阻害薬は合成致死メカニズムに基づいた癌の個別化治療の選択肢の一つになると期待される。

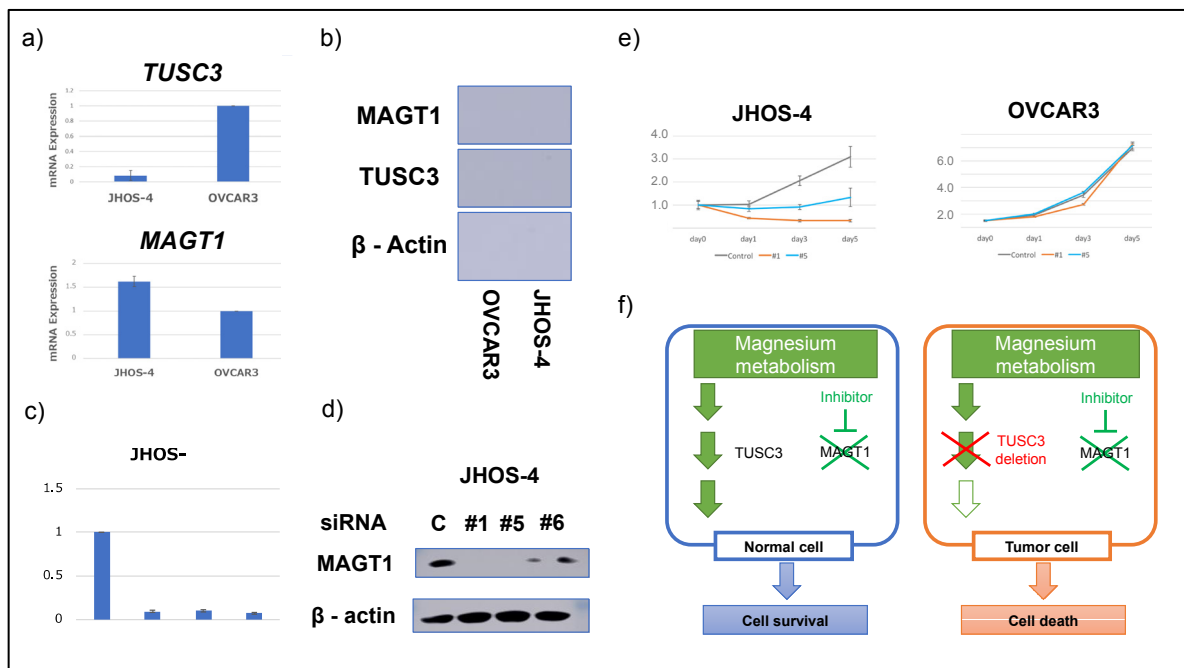


図 1. *TUSC3* 遺伝子欠失に注目した卵巣癌脆弱性の検証

- TUSC3* 欠失および野生型の卵巣癌細胞株における *TUSC3*/*MAGT1* mRNA 発現 (a) およびタンパク質発現 (b)。JHOS-4 では *TUSC3* の mRNA 発現は著明に低下し、タンパク質レベルでは発現を確認できなかった。
- siRNA による *MAGT1* mRNA (c) およびタンパク質 (d) 発現抑制。
- MAGT1* 発現抑制による細胞増殖抑制効果の検証。*TUSC3* 遺伝子のホモ接合性欠失細胞株では *MAGT1* 発現抑制により細胞増殖抑制効果を確認できたが、*TUSC3* 遺伝子野生型細胞株では細胞増殖に影響を認めなかった。
- TUSC3* 遺伝子欠失に注目した卵巣癌脆弱性。マグネシウム代謝系において *TUSC3* 欠失腫瘍細胞では、*MAGT1* 活性を阻害することで細胞死を誘導することが可能である。

表 1. ホモ接合性欠失を認める候補遺伝子

ホモ接合性に欠失している遺伝子	染色体	頻度	%	パラログ	パラログの欠失	卵巣癌細胞株 (CCLE)
<i>EPHX2</i>	8p21.2	45/562	8	<i>EPHX3</i> , <i>EPHX4</i>	+	JHOM2B, KURAMOCHI EFO21, JHOS4,
<i>TUSC3</i>	8p22	42/562	7.5	<i>MAGT1</i>	-	JHOM2B, KURAMOCHI, ONCODG1
<i>ATP6V1B2</i>	8p21.3	42/562	7.5	<i>ATP6V1B1</i>	-	JHOS4, JHOM2B, KURAMOCHI
<i>EXTL3</i>	8p21.1	36/562	6.4	<i>EXT1</i> , <i>EXT2</i> , <i>EXTL1</i> , <i>EXTL2</i>	+	JHOM2B

ホモ接合性欠失を認める遺伝子のうち、パラログ遺伝子が報告されていて、CCLEに登録されている卵巣癌細胞株においてもホモ接合性欠失を認めるものを表1に示している。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立遺伝学研究所人類遺伝研究部門の井ノ上逸郎教授、新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞医学遺伝子制御講座（産婦人科）大学院生の杉野健太郎である。

文 献

- 1) Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KR, Ozenberger BA, Ellrott K, Shmulevich I, Sander C, Stuart JM. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet.* 2013 Oct;45(10):1113-20. doi: 10.1038/ng.2764. PMID: 24071849
- 2) Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat Genet.* 2013 Oct;45(10):1127-33. doi: 10.1038/ng.2762. PMID: 24071851
- 3) Muller FL, Colla S, Aquilanti E, Manzo VE, Genovese G, Lee J, Eisenson D, Narurkar R, Deng P, Nezi L, Lee MA, Hu B, Hu J, Sahin E, Ong D, Fletcher-Sananikone E, Ho D, Kwong L, Brennan C, Wang YA, Chin L, DePinho RA. Passenger deletions generate therapeutic vulnerabilities in cancer. *Nature.* 2012 Aug 16;488(7411):337-42. doi: 10.1038/nature11331. PMID: 22895339
- 4) Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fitzgerald S, Gil L, Girón CG, Gordon L, Hourlier T, Hunt S, Johnson N, Juettemann T, Kähäri AK, Keenan S, Kulesha E, Martin FJ, Maurel T, McLaren WM, Murphy DN, Nag R, Overduin B, Pignatelli M, Pritchard B, Pritchard E, Riat HS, Ruffier M, Sheppard D, Taylor K, Thormann A, Trevanion SJ, Vullo A, Wilder SP, Wilson M, Zadissa A, Aken BL, Birney E, Cunningham F, Harrow J, Herrero J, Hubbard TJ, Kinsella R, Muffato M, Parker A, Spudich G, Yates A, Zerbino DR, Searle SM. Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D749-55. doi: 10.1093/nar/gkt1196. Epub 2013 Dec 6. PMID: 24316576