

博士論文

ヒストン修飾を標的とした  
卵巣明細胞癌の新規治療薬の開発

児嶋 真千子

ヒストン修飾を標的とした  
卵巣明細胞癌の新規治療薬の開発

所属：東京大学大学院 博士課程 医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻

指導教官：藤井 知行

申請者：児嶋 真千子

目次

略語一覧

要旨

第1章 序文

< 1 > 背景

- (1) 卵巣明細胞癌の疫学と治療法
- (2) ヒストン修飾について
- (3) ヒストンメチル化酵素 WHSC1 と EZH2
- (4) 卵巣癌と分子標的薬について

< 2 > 本研究の目的

第2章 対象と方法

- (1) 臨床組織検体と卵巣癌細胞株
- (2) 薬剤
- (3) 定量的 PCR 法

(4) ウェスタンブロット法

(5) 免疫組織学的染色

(6) 遺伝子サイレンシング

(7) 細胞増殖抑制試験

(8) 細胞周期解析

(9) 統計解析

### 第3章 結果

(1) OCCC 臨床検体における 9 つのヒストンメチル化酵素発現解析

(2) OCCC 臨床検体における WHSC1 の免疫組織学的染色

(3) OCCC 細胞株における WHSC1 ノックダウンの効果

3-1 細胞増殖抑制試験

3-2 細胞周期解析

(4) OCCC 細胞株における EZH2 ノックダウンや阻害による影響

4-1 EZH2 ノックダウンが WHSC1 の発現にもたらす影響

## 4-2 EZH2 選択的阻害剤の効果

### 第4章 考察

(1) OCCC におけるヒストンメチル化酵素の発現解析

(2) OCCC における WHSC1 の機能解析

### 第5章 結論

参考文献

謝辞

## 略語一覽

**WHSC1: Wolf-Hirschhorn syndrome candidate gene-1**

**EZH2: enhancer of zeste homolog 2**

**OCCC: ovarian clear cell carcinoma**

**MMSET: multiple myeloma SET (Suppressor of variegation, Enhancer of Zeste, Trithorax) domain**

**NSD2: nuclear SET domain-containing 2**

**ARID1A: AT rich interactive domain 1A**

**PI3KCA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha**

**mTOR: mammalian Target of Rapamycin**

**SWI/SNF: SWItch/Sucrose Non-Fermentable**

**BAF250a: BRG-associated factor 250a**

**SUV39H2: suppressor of variegation 3-9 homolog 2**

**DOT1L: Disruptor of telomeric silencing 1-like**

**PRMT5: Protein arginine N-methyltransferase 5**

**SMYD2 : SET and MYND (Myeloid-Nervy-DEAF1) domain-containing protein 2**

**SMYD3 : SET and MYND domain-containing protein 3**

**SETD7: SET domain containing 7**

**SETD8: SET domain containing 8**

**SETD1A: SET domain containing 1A**

**EHMT2: Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2**

**H3K36me2: dimethylation of lysine 36 of histone H3**

**H3K27me3: trimethylation of lysine 27 of histone H3**

**PRC2: Polycomb repressive complex2**

**PCR: polymerase chain reaction**

**MTTassays:3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide assays**

**siRNA: small interfering ribonucleic acid**

**FACS: fluorescence activated cell sorting**

**GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase**

**IHC: immunohistochemistry**

**PBS: phosphate buffered saline**

**DAB: diaminobenzidine**

**siNC: negative control siRNA**

**WST:5-[2,4-Bis(sodiooxysulfonyl)phenyl]-3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazole-3-ium**

**NEK7: never-in-mitosis A -related kinase 7**

**ANOVA: analysis of variance**



## 要旨

卵巣明細胞癌は、化学療法に抵抗性を示すことから有効な治療法の確立が望まれている。ヒストンメチル化酵素は多くの癌腫で癌化、癌の進展に影響を及ぼすと報告されている。本研究は卵巣明細胞癌において発現が亢進しているヒストンメチル化酵素 WHSC1 を同定し、細胞増殖に関与することも明らかにした。また、臨床検体における mRNA の発現量から、卵巣明細胞癌の治療標的と考えられているヒストンメチル化酵素 EZH2 と WHSC1 との間に正の相関関係があることを示した。さらに卵巣明細胞癌細胞株において、EZH2 のノックダウン及び EZH2 選択的阻害剤による WHSC1 発現の影響を調べ、EZH2 と WHSC1 間の相互作用を明らかにした。上記結果より WHSC1 が卵巣明細胞癌の治療標的となり得る事が分かった。

## 第1章 序文

### 背景

#### (1) 卵巣明細胞癌の疫学と治療法

日本では年間約 1 万人の女性が新たに卵巣癌と診断され、卵巣癌による死亡数は約 4500 人である（国立がん研究センターがん情報サービス [https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/summary.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html)）。卵巣癌の罹患者数は年々増加傾向にある。

卵巣癌の 9 割は上皮性癌であり、その大半を漿液性癌が占める。卵巣明細胞癌（Ovarian clear cell carcinoma : OCCC）は 1973 年に世界保健機関（WHO）によって卵巣癌の組織学的サブタイプの 1 つとして定義された。日本では、OCCC の症例数は漿液性癌に次いで 2 番目に多く、上皮性卵巣癌全体の約 25% を占める。これは西欧諸国における OCCC の症例数が 5-10% であることに比べきわめて高い(1)。OCCC は他の組織型とは違う特徴をいくつか有する。卵巣癌は自覚症状に乏しいため、4 割近くがⅢ期以上の進行癌で診断されるのに対し、OCCC は約半数がⅠ期で診断され、進行例は少ない。また子宮内膜症を背景に発症することが多いのもきわめて特徴的な点である(2)。一般に、子宮内膜症は月経の回数が増えると発生頻度が増加することが分かっており、そのため、未産や晩産化

が進んでいる本邦では OCCC 罹患のリスクが高まると考えられる。また、OCCC は上皮性卵巣癌の標準治療であるプラチナ製剤を用いた化学療法に耐性があることが知られており、そのため漿液性癌や類内膜癌と比較して予後不良である (1, 3, 4)。

OCCC はその分子生物学的特徴も、他の組織型と比べ異なる点が多い。例えば、上皮性卵巣癌の大半を占める漿液性癌では高頻度で *TP53* の変異を認めるが、OCCC では変異の頻度は低い(5, 6)。一方、OCCC に高頻度に認められる遺伝子変異としては、*ARID1A* の変異と *PIK3CA* の変異が挙げられる(7)。*PIK3CA* の変異は OCCC 患者の 40%に認め(8)、*PI3KCA* がコードする PI3K の下流に存在する mTOR 複合体が OCCC において高頻度に活性化していることが報告されている。*ARID1A* は SWI-SNF クロマチンリモデリング複合体の重要な構成因子である BAF250a をコードする遺伝子で、*ARID1A* 変異は OCCC 患者の 50%以上が有する変異である(9-11)。このように、OCCC は特別な分子生物学的特徴を有し、そのため、その組織型に対応した治療法の確立が必要である。

## (2) ヒストン修飾

ヒストンには H1、H2A、H2B、H3、H4 の 5 種類が存在し、真核生物の核の中では、DNA はコアヒストンと呼ばれる 4 つのヒストン (H2A、H2B、H3、H4) から成るヒストン 8 量体に巻き付いて、ヌクレオソームを形成している。このヌクレオソームが連なった構造がクロマチンである。発生や分化の過程において、「DNA の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の発現や機能を変化させ、かつその状態を細胞分裂後も記憶し、継承するしくみ」をエピジェネティクスという。エピジェネティクス機構は広義には DNA メチル化、ヒストン修飾、非翻訳 RNA による修飾などに分類され、中でも DNA メチル化とヒストン修飾に伴うクロマチン構造の変換がエピジェネティクス制御の根幹であり、これらが互いに影響を及ぼしあって多彩な遺伝子発現を制御調整している (図 1)。

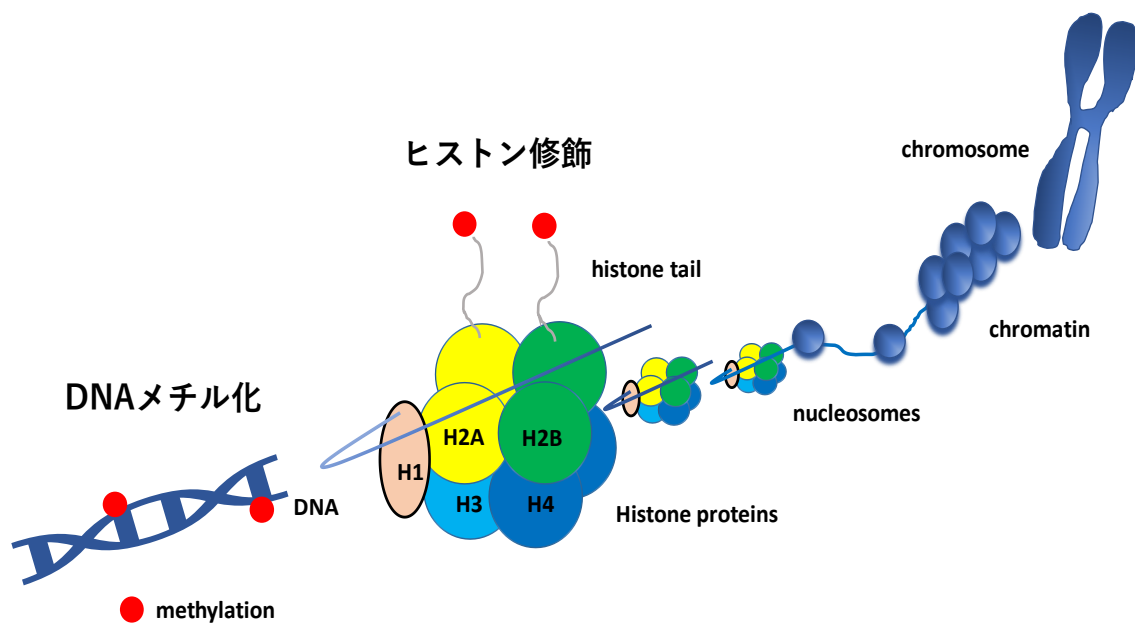


図1 エピジェネティクス機構

代表的なエピジェネティクス機構を示す。ヒストン8量体にDNAが巻き付き、ヌクレオソームを形成する。規則正しく配列したヌクレオソームはクロマチンを構成する。エピジェネティクスは、「DNA塩基配列の変化を伴わずに細胞分裂後も継承される遺伝子発現あるいは細胞表現型の変化をつかさどる現象」と定義される。DNAメチル化とヒストン修飾は互いに影響を及ぼしあい多彩な遺伝子発現を調節している。

エピジェネティクス制御のうち、ヒストン修飾にはヒストンのメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ポリADPリボシル化、およびスモイル化があり、これらの化学修飾は遺伝子の転写活性やクロマチン動態に影響を与える

(12)。特にヒストンメチル化はより複雑な修飾をしている。例えばヒストンのアセチル化が基本的に遺伝子活性を促進する方向に働くのに対し、メチル化は修飾する位置(リジン残基/アルギニン残基)やメチル化の段階(モノ、ジ、トリ)によってその作用を変え、多段階の遺伝子調節を行っている。ヒストンのメチル化/脱メチル化は、ヒストンメチル化酵素/脱メチル化酵素によってなされる。メチル化修飾の機能は長い間不明であったが、2000年に Jenuwein 等のグループがヒストンメチル化酵素を同定して以来、メチル化修飾の機能解析は急速に進んだ。近年では発がんおよびがんの進行におけるヒストンメチル化調節異常の可能性が多く報告され(13)、ヒストンメチル化酵素が様々な癌腫の発癌、進展に重要な役割を果たすことが報告されている(14)。例えばヒストンメチル化酵素の一つである SUV39H2 は、癌細胞の治療抵抗性に関わる事が報告されている(15)。また子宮体癌においては、ヒストンメチル化酵素 EZH2 の発現が亢進し、予後と負の相関があること、さらに子宮体癌に対して EZH2 選択的阻害剤が新規治療薬となる可能性が示された(16)。このように、ヒストンメチル化調節異常をもたらす酵素群は癌治療において非常に重要な治療標的となり得ると考えられる。しかし、OCCC に対するヒストンメチル化異常についての報告は少ないのが現状である。

### (3) ヒストンメチル化酵素 WHSC1 と EZH2

ヒストンメチル化酵素 Wolf-Hirschhorn syndrome candidate gene-1 (WHSC1) は別名 Nuclear receptor binding SET Domain Protein 2 (NSD2) や Multiple Myeloma SET Domain Containing Protein (MMSET) と呼ばれ、SET ドメイン含有タンパク質ファミリーのひとつとして、ヒストン H3 のリジン 36 番をジメチル化する (図 2)。リジン 36 番のメチル化は、転写が活性化しているゲノム領域に集積し、WHSC1 以外にも SMYD2 など複数の H3K36 メチル化酵素が報告されている。この修飾を特異的に認識する因子としては DNA 損傷修復に関わるものが複数報告されている。

WHSC1 は多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma ; MM) における t(4;14)(p16.3;q32.3) 転座の副産物として最初に同定された(17)。4 番染色体短腕に位置するとされ、Wolf-Hirschhorn syndrome (発育不良、形態異常、精神遅滞を特徴とする疾患) の原因遺伝子と考えられている(18)。また、WHSC1 は肺癌や膀胱癌、肝細胞癌 (19, 20) など、さまざまな癌で発現の亢進を認めた報告がある(21, 22)。

婦人科癌領域では、WHSC1 は卵巣漿液性癌や子宮内膜癌、子宮頸癌で過剰発現と予後との関連性が報告されている。漿液性卵巣癌患者の約 50% で WHSC1 が発現上昇し、予後不良と相関することが報告されている(23)。子宮内膜癌で

は免疫組織学的染色のデータに基づき、WHSC1は有意な発現上昇を認め、さらに予後不良と有意な相関関係を示した(24)。子宮頸癌でも臨床検体や細胞株において発現が上昇し、予後不良と相関を認めたことから、予後因子および治療標的になりうると報告されている(25, 26)。このように婦人科癌領域においてもWHSC1は新たな治療標的として注目されているが、これまでにOCCCにおけるWHSC1の発現解析と機能解析の報告はない。

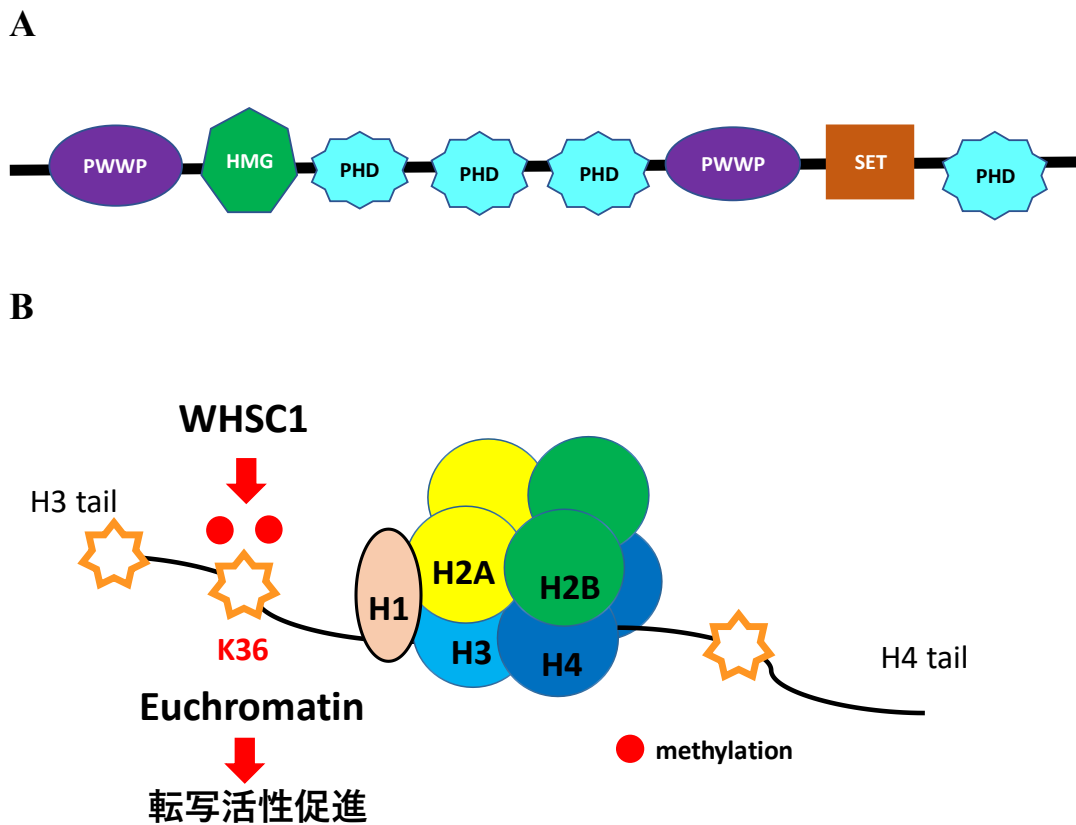


図2 WHSC1の構造とメチル化



- A) WHSC1 の構造を示す。
- B) WHSC1 はヒストン H3 のリジン 36 番をジメチル化し、クロマチン構造をユークロマチンに変化させ、遺伝子転写活性を促進させる。

ヒストンメチル化酵素 *enhancer of zeste homolog 2* (EZH2) は、ポリコームタンパク質と呼ばれる遺伝子発現調節タンパク質複合体の構成要素の一つである。ヒストン H3 のリジン 27 番をトリメチル化することにより負の遺伝子制御を行っている (図 3) (27)。EZH2 は現在までにさまざまな癌種で発現の亢進が報告されており(28)、治療標的として期待されている。EZH2 を選択的に阻害する化合物もすでに報告されており(29, 30)、その中で、EZH2 選択的阻害剤である GSK126 (図 4) は、複数の癌種の細胞増殖を有意に阻害すると報告されている(31)。さらに、EZH2 の阻害は *ARID1A* 変異 OCCC 細胞において合成致死性を誘導することが分かっており (図 5)、EZH2 阻害剤に対する感受性は *ARID1A* 変異状態と相関する(32)。

また、EZH2 は WHSC1 を協調的に制御していると報告があり、WHSC1 は EZH2 の下流遺伝子として機能している可能性が示唆されている(33, 34)。

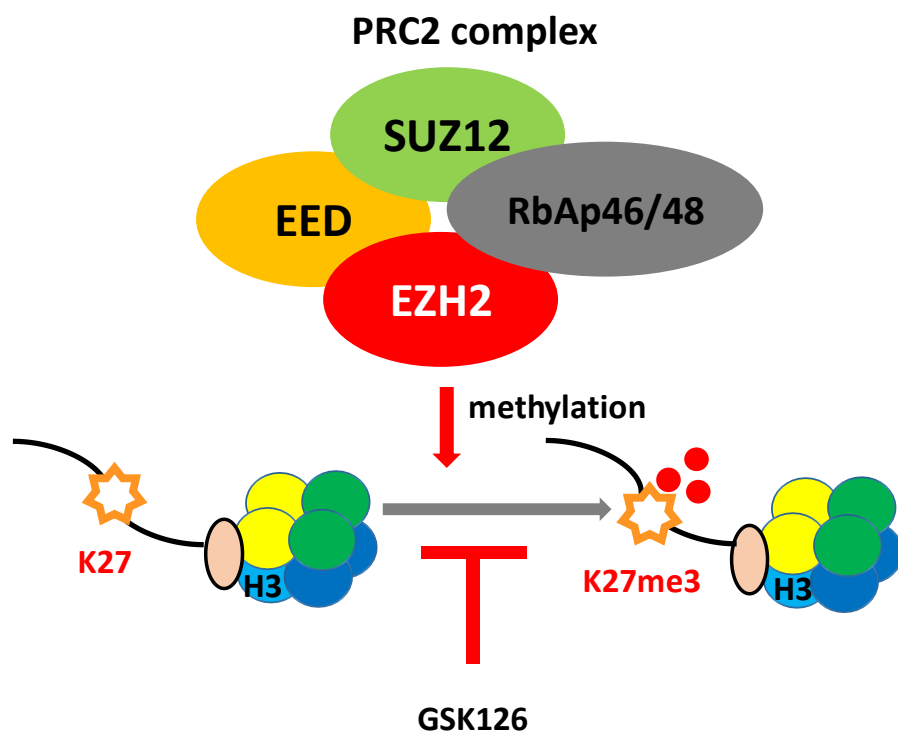


図3 EZH2はPRC2複合体を形成し、リジン27番をトリメチル化する

EZH2はEED,SUZ12,RbAp46/48とともにPRC2複合体を形成している。  
 ヒストンH3のリジン27番をトリメチル化することで転写を抑制している。  
 EZH2選択的阻害剤GSK126はEZH2のメチル化を抑制する。

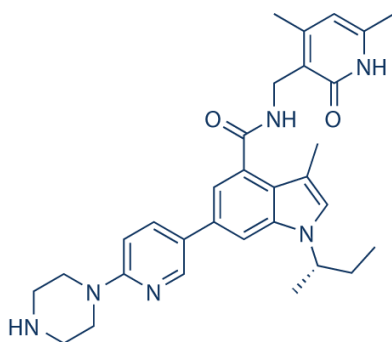


図4 EZH2選択的阻害剤GSK126の構造 ([www.selleck.co.jp](http://www.selleck.co.jp)より)

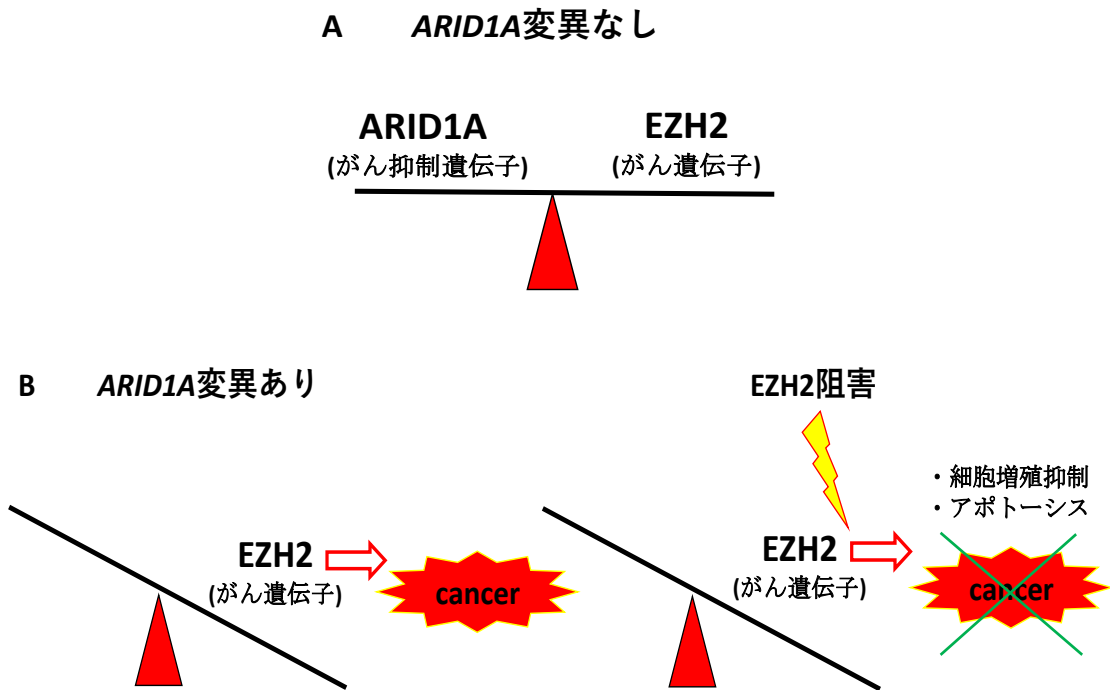


図 5 *ARID1A* 変異 OCCC において **EZH2** 阻害は合成致死性に働く

- A) *ARID1A* 変異がない場合は、ホメオスタシスバランスが保たれている。
- B) *ARID1A* が変異すると、がん抑制遺伝子としての機能を失い、バランスが発癌に傾く。そこに **EZH2** 阻害が加わることで、合成致死性に働く。

### (3) 卵巣癌と分子標的治療

分子標的治療薬は標的にする分子によって、血管新生阻害薬、EGFR 阻害薬、HER2 阻害薬、ALK 阻害薬、BCR-ABL 阻害薬、mTOR 阻害薬、膜状分化抗原標的薬などに大別され、1990 年代後半に世界で初めてトラスツズマブが再発・転移乳がんの治療に承認されて以降、さまざまな分子標的薬が研究・開発されている。現在、世界では 100 種類（2019 年 2 月時点）(35)の分子標的薬が承認されており、本邦の婦人科がん領域においては血管内皮細胞増殖因子（VEGF）に対するモノクローナル抗体であるベバシズマブが 2013 年 11 月に、PARP 阻害剤であるオラパリブが 2018 年 4 月に保険収載されている。

これまでに行われた卵巣癌の分子標的薬に対する主な臨床試験の結果を以下に示す（表 1）。(36-43)

表1 ベバシズマブ、オラパリブに対する臨床試験の主な結果

ベバシズマブ	対象	介入	結果
GOG218 試験	Ⅲ・Ⅳ期	TC <sup>※1</sup> 療法+ベバシズマブ 15mg/kg を 21 サイクル	介入群は TC 療法のみの群に比べ PFS が延長 (HR0.72)
ICON7 試験	I～Ⅳ期	TC 療法+ベバシズマブ 7.5mg/kg を 17-18 サイクル	介入群は TC 療法のみの群に比べ PFS が延長 (HR0.81)
OCEANS 試験	白金製剤感受性再発症例	GC <sup>※2</sup> 療法にベバシズマブを併用	介入群は GC 療法のみの群に比べ PFS が延長 (HR0.48)
AURELIA 試験	白金製剤抵抗性再発症例	単剤化学療法にベバシズマブを併用	介入群は単剤化学療法の群に比べ PFS が延長 (HR0.48)

※1 TC 療法：パクリタキセル(Paclitaxel)とカルボプラチン(Carboplatin)併用療法

※2 GC 療法：ゲムシタビン(Gemcitabine)とシスプラチン(Cisplatin)併用療法

オラパリブ	対象	介入	結果
SOLO2 試験 (ランダム化第Ⅲ相試験)	白金製剤感受性再発症例	化学療法後の部分奏功以上の症例にオラパリブ群とプラセボ群に 2:1 に無作為割り付け	オラパリブ群の PFS19.1 カ月に対し、プラセボ群 5.5 カ月 (HR0.3 )
Study19 試験 (ランダム化第Ⅱ相試験)	白金製剤感受性再発漿液性卵巣癌症例	化学療法後の維持療法としてオラパリブ群とプラセボ群を無作為割り付け	オラパリブ群の PFS8.4 カ月に対し、プラセボ群 4.8 カ月 (HR0.35 )

上記に示した通り、明細胞癌に特化した分子標的薬は開発されていない。

卵巣癌は多様な組織型とそれに応じた分子生物学特性があるため、それぞれに個別に対応した治療法の確立が必須である。

## < 2 >本研究の目的

本研究の目的は OCCC の細胞株や臨床検体を用いて、発現が亢進しているヒストンメチル化酵素を同定し、同定された酵素の機能解析を行うことで、OCCC に対する新たな分子標的薬の開発につなげることである。そのために以下の項目を明らかにすることとした。

- ① OCCC 細胞株と臨床検体を使用して、正常卵巣組織と比較し発現が亢進しているヒストンメチル化酵素を同定
- ② 上記において同定されたヒストンメチル化酵素の細胞増殖に及ぼす影響
- ③ 同定されたヒストンメチル化酵素の機能解析

## 第2章 対象と方法

本研究に関する実験は2016年4月～2019年3月に行ったものである。

### (1) 臨床組織検体と OCCC 細胞株

23人のOCCC患者の組織検体と3人の正常卵巣検体を使用した(表2)。これらの組織検体はすべて東京大学医学部附属病院において手術時に採取したものであり、患者の同意と倫理委員会の承認(倫理委員会申請番号G0683-(18))を受けた上で研究に用いた。正常卵巣については子宮頸癌や子宮体癌の手術時に摘出した検体を用いた。検体は採取後すぐに液体窒素内で急速凍結し、RNA抽出までの間-80度の冷凍庫で保存した。

OCCC細胞株としてはOVISE(JCRB1043),OVTOKO(JCRB1048)およびRMG-1(JCRB0172)を使用した。これらはすべてJapanese Collection of Research Bioresources Cell Bank(Ibaraki, Osaka, Japan)より購入した。OVISEとOVTOKOについては*ARID1A*変異株であり、RMG1は*ARID1A*野生型細胞株である。OVTOKO、OVISEは10%FBS添加RPMI1640溶液で、37°C5%CO<sub>2</sub>下で培養した。RMG-1は20%FBS添加Ham's F12溶液を用い、同条件で培養管理した。

これらの細胞株について International Cell Line Authentication Committee (ICLAC) のデータベースで cross-contaminated や誤認細胞でないことを確認した。また、研究の前後で、MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (LT07-218, Lonza, Tokyo, Japan)を用いてこれらの細胞株にマイコプラズマ感染がないことを確認した。

**表 2 OCCC 臨床検体 23 例と正常卵巣検体 3 例の患者背景**

No.	Age(years)	Histologic Diagnosis	stage(TNM)
1	60-69	clear cell carcinoma	pT1c1N0M0
2	50-59	clear cell carcinoma	pT3cN0M0
3	50-59	clear cell carcinoma	pT1c3N0M0
4	70-79	clear cell carcinoma	pT1c2N0M0
5	40-49	clear cell carcinoma	pT3cN0M0
6	40-49	clear cell carcinoma	pT3bN1M0
7	50-59	clear cell carcinoma	pT1c3N0M0
8	40-49	clear cell carcinoma	pT1c1N0M0
9	40-49	clear cell carcinoma	pT1c1N0M0
10	50-59	clear cell carcinoma	pT1aN0M0
11	40-49	clear cell carcinoma	pT3bN1M0
12	70-79	clear cell carcinoma	pT1c2N0M0
13	50-59	clear cell carcinoma	pT3bN1M1
14	50-59	clear cell carcinoma	pT1c3N0M1
15	60-69	clear cell carcinoma	pT1c1N0M0
16	50-59	clear cell carcinoma	pT1bN0M0
17	60-69	clear cell carcinoma	pT1c3N0M0
18	50-59	clear cell carcinoma	pT1c3N0M0
18	50-59	clear cell carcinoma	pT2aN0M0
20	50-59	clear cell carcinoma	pT1aN0M0



21	30-39	clear cell carcinoma	pT1c3N0M0
22	60-69	clear cell carcinoma	pT1c2N0M0
23	70-79	clear cell carcinoma	pT3cN0M0
N1	30-39	normal	
N2	60-69	normal	
N3	50-59	normal	

## (2) 薬剤

EZH2 選択的阻害剤は Active Biochemicals (Maplewood, NJ, USA)から購入した GSK126 を使用した。

## (3) total RNA 抽出、逆転写および定量的 PCR

手術時に採取した凍結検体を O.C.T compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) で包埋処理し、クリオスタット (Leica CM1520) を用い一枚 500  $\mu$ m の厚さの切片を作成した。1 検体につき 50~100 スライスの切片を MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics, IN, USA) に入れ、MagNA Lyser (Roche) を用い

でホモジナイズした。ホモジナイズ後の上清から total RNA を抽出するには RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)を使用した。細胞株からの total RNA 抽出にも同キットを使用した。逆転写には ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) を使用し、相補的 DNA を作成した。

9 種類のヒストンメチル化酵素およびハウスキーピング遺伝子 GAPDH の mRNA 発現量は定量的リアルタイム PCR で測定した。その際に用いた特異的プライマーは以下の通りである (表 3) (15, 19, 44-48)。リアルタイム PCR は One-Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa Bio, Tokyo, Japan) を用い、Light Cycler instrument (Roche, Basel, Switzerland)を使用して行った。定量解析については、GAPDH の mRNA 発現量で標準化し、Second Derivative Method を用いて行った。実験系は 3 回繰り返し、データは平均値を用いた。

表 3 プライマー配列

Gene name	Primer Sequence	
GAPDH (housekeeping gene)	Forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	Reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTTC
WHSC1	Forward	TCGAAGCAGCTCTTGTGTCTAAG
	Reverse	TTTGGACCACACCAAATCACCAAC
EZH2	Forward	CGCTTTTCTGTAGGCGATGT
	Reverse	TGGGTGTTGCATGAAAAGAA
SMYD2	Forward	ATCTCCTGTACCCAACGGAAG
	Reverse	CACCTTGGCCTTATCCTTGTC
SMYD3	Forward	TTCCCGATATCAACATCTACCAG
	Reverse	AGTGTGTGACCTCAATAAGGCAT
SETD8	Forward	TCTTGTGATTCCACCAATGCAG
	Reverse	CCTTCGGACAGGGTAGAAATCC
SETD1A	Forward	AAGGTGTACCGCTATGAT
	Reverse	CCAATATAGAACTCGTCCAG
SUV39H2	Forward	TGGGGTGTAAGACCCTTGTTG
	Reverse	ATTCCCTTGTTGTCATAGAAC
EHMT2	Forward	GGAGGAAGCTGAACTCAGGAGG
	Reverse	GACTGAAGTCATCACCCACCAC
SETD7	Forward	GACACAAGGCAAATCACTCC
	Reverse	TGGTCATAGCCATAGGCAAC

#### (4) 免疫組織学的染色

卵巣明細胞癌組織検体および正常卵巣における WHSC1 の発現状況を免疫組織学的染色にて確認した。手順は、まず脱パラフィン化を行い、次に 20 分間のマイクロウェーブ法で抗原賦活化処理した。抗 WHSC1 抗体(200 倍希釈; ab75359, Abcam)は 4°Cで一晩反応させた。その後 PBS で洗浄し、2 次抗体反応を行い、DAB で染色した。さらに短時間ヘマトキシリン染色し、カバーガラスをのせ観察した(49)。

#### (5) 遺伝子ノックダウン

WHSC1 および EZH2 それぞれに特異的な siRNA と、比較対象のための negative control siRNA (siNC; Sigma Aldrich MISSION siRNA Universal Negative Control SIC-001-25) を 100nM の濃度で Lipofectamine-RNAi MAX transfection reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて OCCC 細胞株へトランスフェクションした(50)。処理時間は目的に応じ 48-96 時間とした。トランスフェクションに先立ち、ウエスタンブロットや FACS 解析用には 6 ウェルプレートに

OCCC 細胞を 1 ウェルに  $1 \times 10^5$  個ずつ散布し、細胞増殖抑制試験用には 24 ウェルプレートに  $2 \times 10^4$  個ずつ散布した。24 時間培養後、それらに siRNA を導入した。使用した siRNA の配列情報を以下に示す (表 4) (19, 45)。

表 4 siRNA 配列情報

siRNA Name	Sequence	
siWHSC1#1	Sense:	5'-CAGAUCUACACAGCGGAUA -3'
	Antisense:	5'-UAUCCGCUGUGUAGAUCUG -3'
siWHSC1#2	Sense:	5'-GUUAAUUGGCAUAUGGAAU-3'
	Antisense:	5'-AUUCCAUAUGCCAAUUAAC-3'
siEZH2#1	Sense:	5'-CUAACCAUGUUUACAACUA-3'
	Antisense:	5'-UAGUUGUAAACAUGGUUAG-3'
siEZH2#2	Sense:	5'-GACAGAAGAGGGAAAGUGU-3'
	Antisense:	5'-ACACUUUCCCUCUUCUGUC-3'

#### (6) 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験は WST 法を用いて行った。24 ウェルプレートに  $2 \times 10^4$  個の細胞培養開始から 24 時間後に WHSC1 特異的 siRNA を用いて 48-96 時間処理した。その後 Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Tokyo, Japan)を加え、 Epoch™

Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA)にて吸光度測定を行った(51)。試験はそれぞれ3回繰り返した。

### (7) ウェスタンブロット法

WHSC1 特異的 siRNA や選択的 EZH2 阻害剤 GSK126 で処理した OCCC 株よりタンパクを抽出し、ウェスタンブロット法に用いた。電気泳動には SDS-PAGE を使用、転写にはトランスブロット Turbo ブロットティングシステム (BioRad) を使用した(52, 53)。1次抗体は4°Cで一晩反応させた。

使用した一次抗体は以下の通りである (表 5)。

表 5 使用抗体一覧

抗 WHSC1 抗体	75359, Abcam, Cambridge, UK
抗 EZH2 抗体	PA0575, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany
抗 H3K36me2 抗体	2901, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
抗 H3K27me3 抗体	9733, Cell Signaling Technology
抗- $\beta$ -actin 抗体	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

バンドの検出については ECLselect Western Blotting detection kit (GE Healthcare Life Science,Piscataway,NJ,USA)を用いて X 線下で感光し、ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare,Buckinghamshire,England,UK) で検出した。

#### (8) フローサイトメトリー

6 ウェルプレートを用い、 $1 \times 10^5$ /well の細胞を 24 時間培養した後に、WHSC1 特異的 siRNA で 48-72 時間処理した後、トリプシンで細胞をはがし、PBS で洗浄、氷冷した 70%エタノールで処理した。4°Cの冷蔵庫で一晩インキュベートした細胞を PBS 洗浄し RNase A (0.25 mg/mL; Sigma-Aldrich)を加えたのち 37°Cで 30 分間インキュベートした。さらに、propidium iodide を加え、4°Cで 30 分暗所反応させ、細胞周期解析を行った。DNA content は FACS Calibur HG (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) で測定し、CellQuest Pro ver. 3.1. (Becton Dickinson).で解析した。

## (9) 統計学的解析

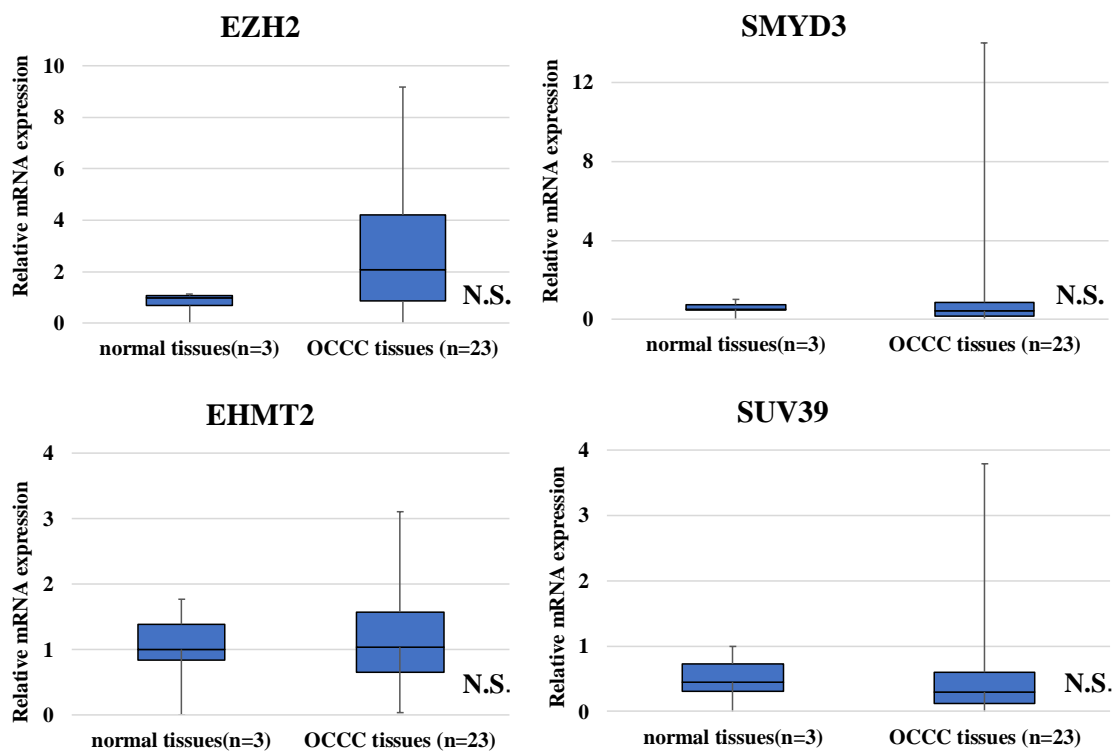
統計学的解析は JMP Pro. v.14 (SAS, Cary, NC, USA)で行った。実験系は3回繰り返し施行し、各データは平均値で表した。WHSC1 と EZH2 の相関係数は CORREL function を用いて計算した。2群の比較にはTテストを用い、3群以上の比較には一元配置分散分析(ANOVA)と Tukey 試験を用いた。P 値は 0.05 未満を有意差ありとした。



### 第3章 結果

#### (1) OCCCにおけるヒストンメチル化酵素発現解析

OCCCの臨床検体23例と正常卵巣3例において、9つのヒストンメチル化酵素についてRT-PCRで発現解析を行った(図6)。その結果、正常卵巣組織と比較してWHSC1とSMYD2の統計学的有意差をもって発現の上昇を認めた。



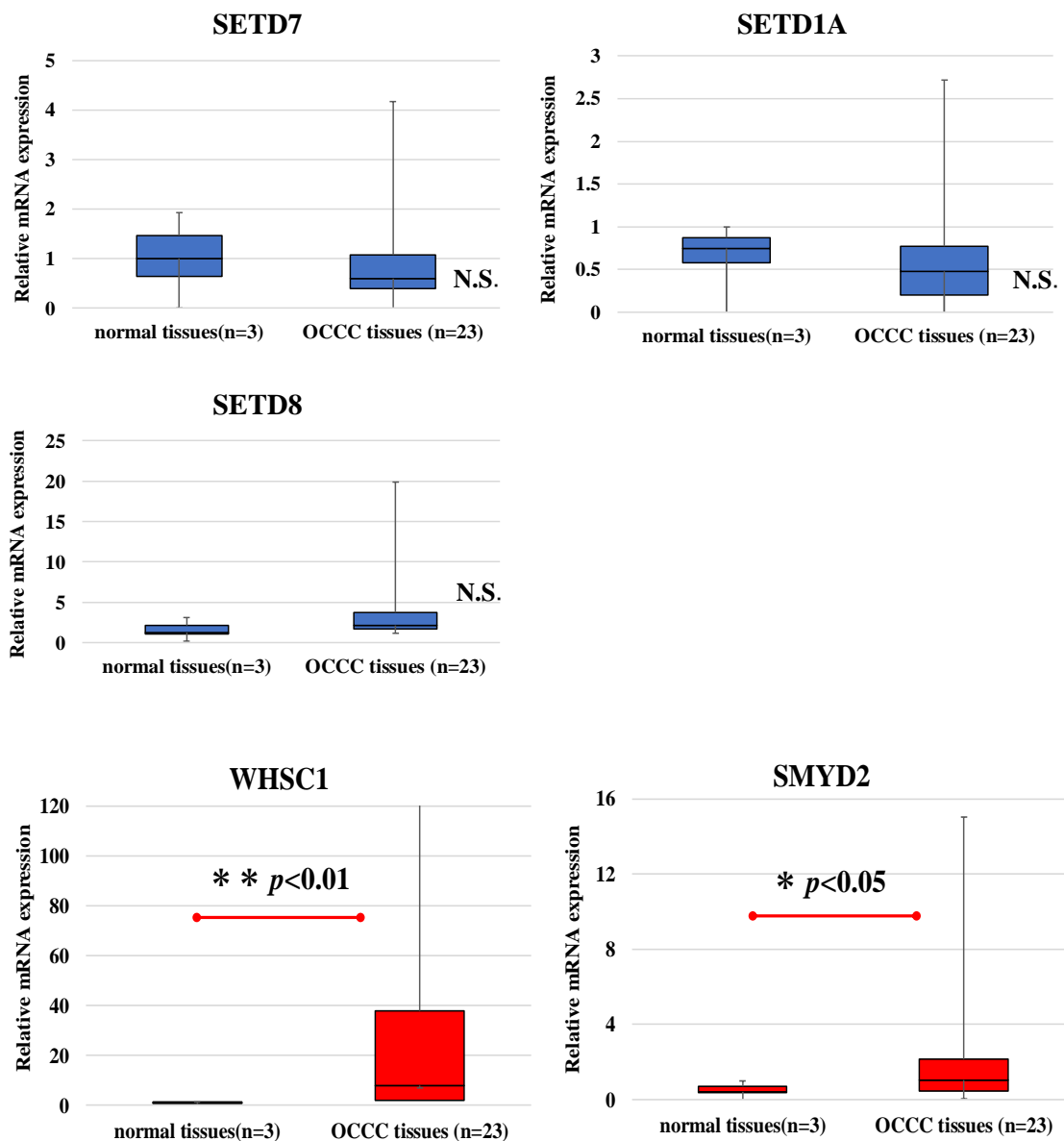


図 6 OCCC 臨床検体におけるヒストンメチル化酵素の発現解析

OCCC23 症例と正常卵巣 3 例に対し、リアルタイム PCR で 9 つのヒストンメチル化酵素の発現解析を行った。正常卵巣の mRNA 発現量で標準化し、定量解析した。WHSC1 と SMYD2 が統計学的に有意な発現上昇を示した。

(WHSC1 :  $p=0.0071$ , SMYD2 :  $p=0.0238$ )

RT-PCR の結果で OCCC における過剰発現を認めた二つのヒストンメチル化酵素のうち、WHSC1 の方がより高い発現量と強い統計学的有意差を示した。その結果に加え、WHSC1 との相互作用が報告されているヒストンメチル化酵素 EZH2 の選択的阻害剤がすでに臨床試験の段階にあることから、WHSC1 に着目して解析を進めることとした。

まず、WHSC1 の RT-PCR の mRNA の発現量によって 2 グループに分け、それぞれ年齢とステージ分類による解析を行ったが、特に差は認めなかった (表 6-1,2)。

表 6-1 OCCC 臨床検体 23 症例の患者背景

進行期	I	II	III	IV	年齢	≥60	<60
n	14	1	6	2	n	7	16
%	61	4	26	9	%	30	70

実験に用いた OCCC 検体 23 症例の患者背景を年齢と病期に分けて示した。年齢は 60 歳未満が 16 例、60 歳以上が 7 例であった。病期はステージ I が 14 例、ステージ II が 1 例、ステージ III が 6 例、ステージ IV が 2 例であった。

表 6-2 WHSC1 の発現量と年齢、ステージとの関係

Relative expression level	≥ Median	< Median	P value
年齢	53.9	57.7	0.713
stage	I:8 III:3 IV:1	I:7 II:1 III:2 IV:1	0.581

WHSC1 の発現量の中央値を基準に、中央値未満 (<Median) と中央値以上 (≥Median) の 2 群に分けた。この 2 群間に年齢や病期分類の分布の違いはなかった。

## (2) OCCC 臨床検体における WHSC1 の免疫組織学的染色

次に OCCC 組織における WHSC1 のタンパク発現レベルを確認するために、WHSC1 の抗体を使用して免疫組織学的染色分析を行った。OCCC 臨床検体では核において強い WHSC1 の染色を示したが、正常組織では染色が弱いか、染色していなかった (図 7)。この事からリアルタイム PCR と同様に OCCC 臨床検体において正常卵巣と比較して WHSC1 の発現が上昇していることが分かった。

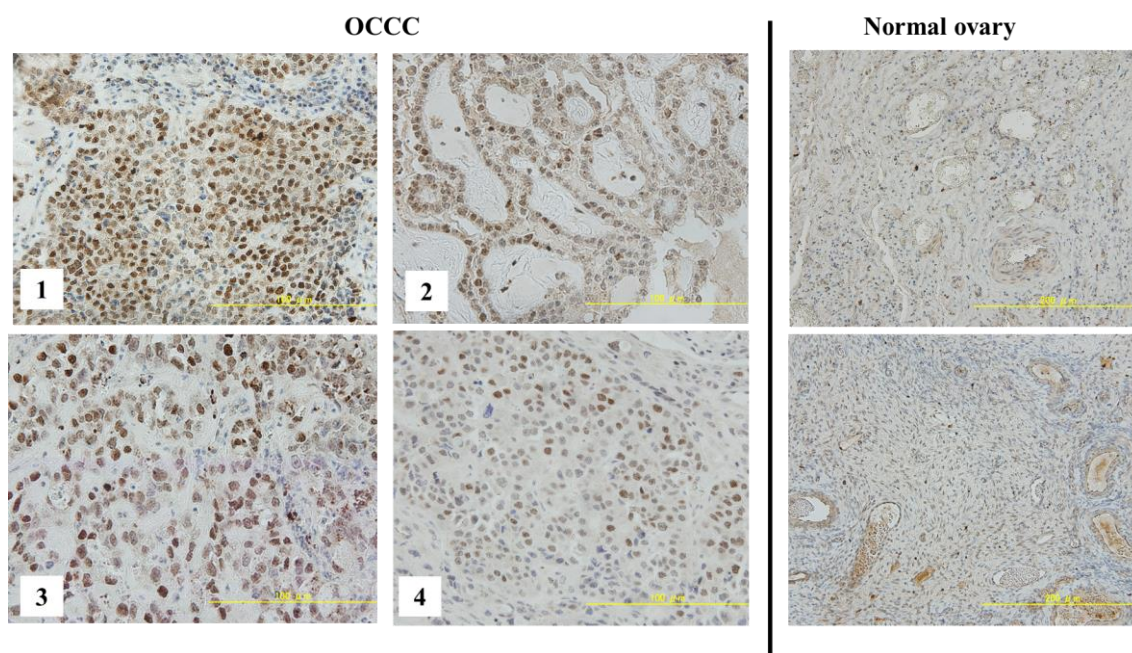


図 7 免疫組織学的染色

WHSC1 の mRNA を測定した OCCC 臨床検体と正常卵巣組織について免疫組織学的染色を行った。OCCC 検体では核の濃染が観察された。上記に示した OCCC 検体の患者背景は以下の通りである。

1. Age 50-59, stage pT3cN0M0
2. Age 40-49, stage pT1c1N0M0
3. Age 50-59, stage pT1aN0M0
4. Age 50-59, stage pT3bN1M1

### (3) OCCC 細胞株における WHSC1 ノックダウンの効果

#### 3-1 細胞増殖抑制試験

WHSC1 は H3K36 のジメチル化により OCCC 細胞の成長を促進すると考えられる。WHSC1 が OCCC 細胞の増殖に関与しているかどうかを調べるため、OCCC 細胞株の WHSC1 を標的とする siRNA を使用して、WHSC1 の発現をノックダウンし、細胞増殖にもたらす影響を調べた。OCCC 細胞株における WHSC1 のノックダウンはウエスタンブロッティング法にて確認した。同様に H3K36me2 の発現レベルの低下も確認した (図 8A および B)。細胞増殖抑制試験により、WHSC1 ノックダウン後の *ARID1A* 変異 OCCC 細胞株のコントロール群と比較し、有意な増殖抑制が認められた。一方、*ARID1A* 野生型 OCCC 細胞である RMG-1 細胞では増殖抑制効果は観察されなかった (図 9A および B)。

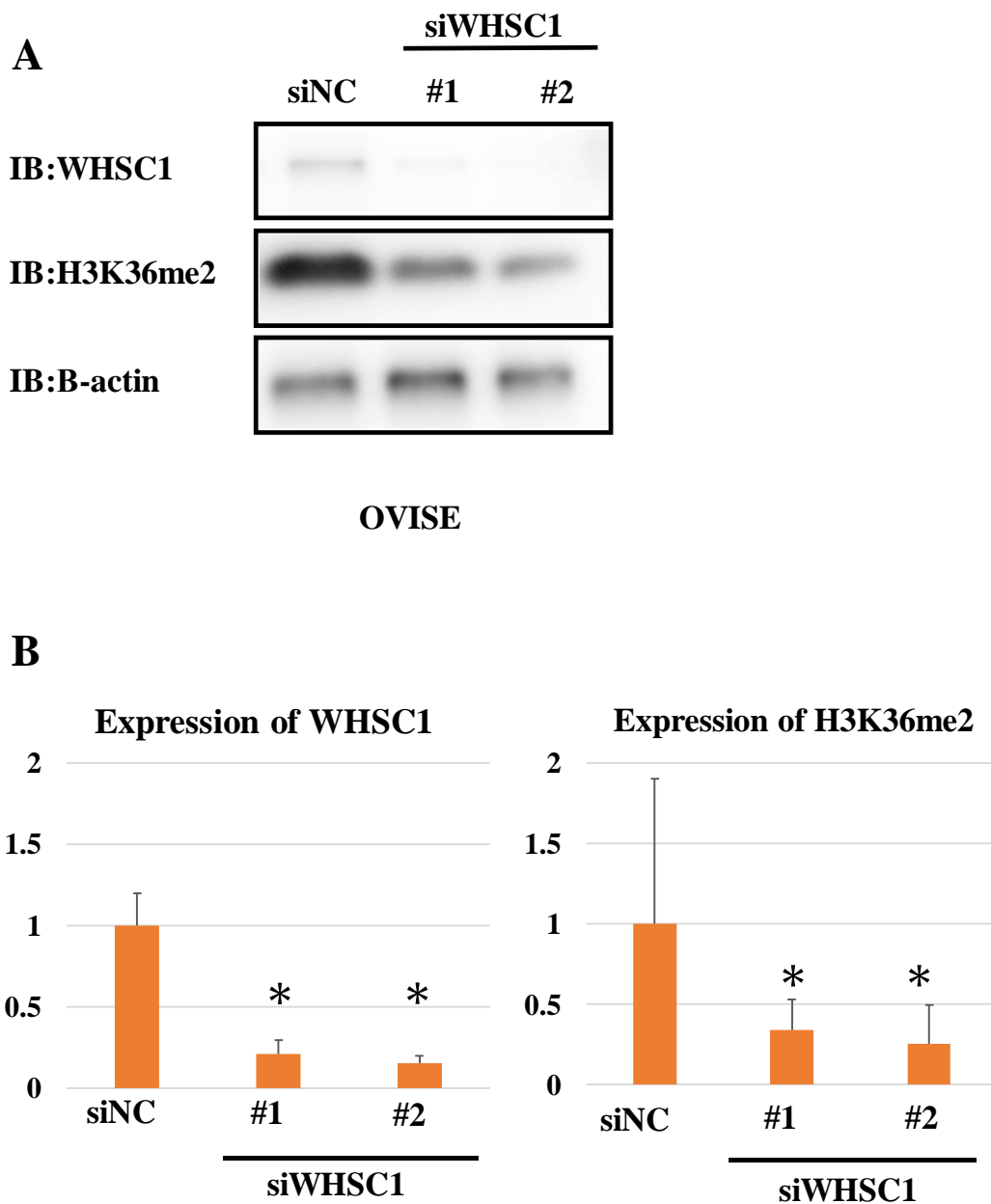


図 8 WHSC1 のノックダウン

A)OCCC 細胞株 (OVISE) において WHSC1 特異的 siRNA を用いて WHSC1 をノックダウンした。WHSC1 およびそのヒストンマークである H3K36me2 の低下をウエスタンブロッティング法で確認した。

B)画像処理ソフトイメージJを用いてバンドを定量化し、β アクチンの値で補正した後、有意差を確認した (\* $p < 0.05$ )。

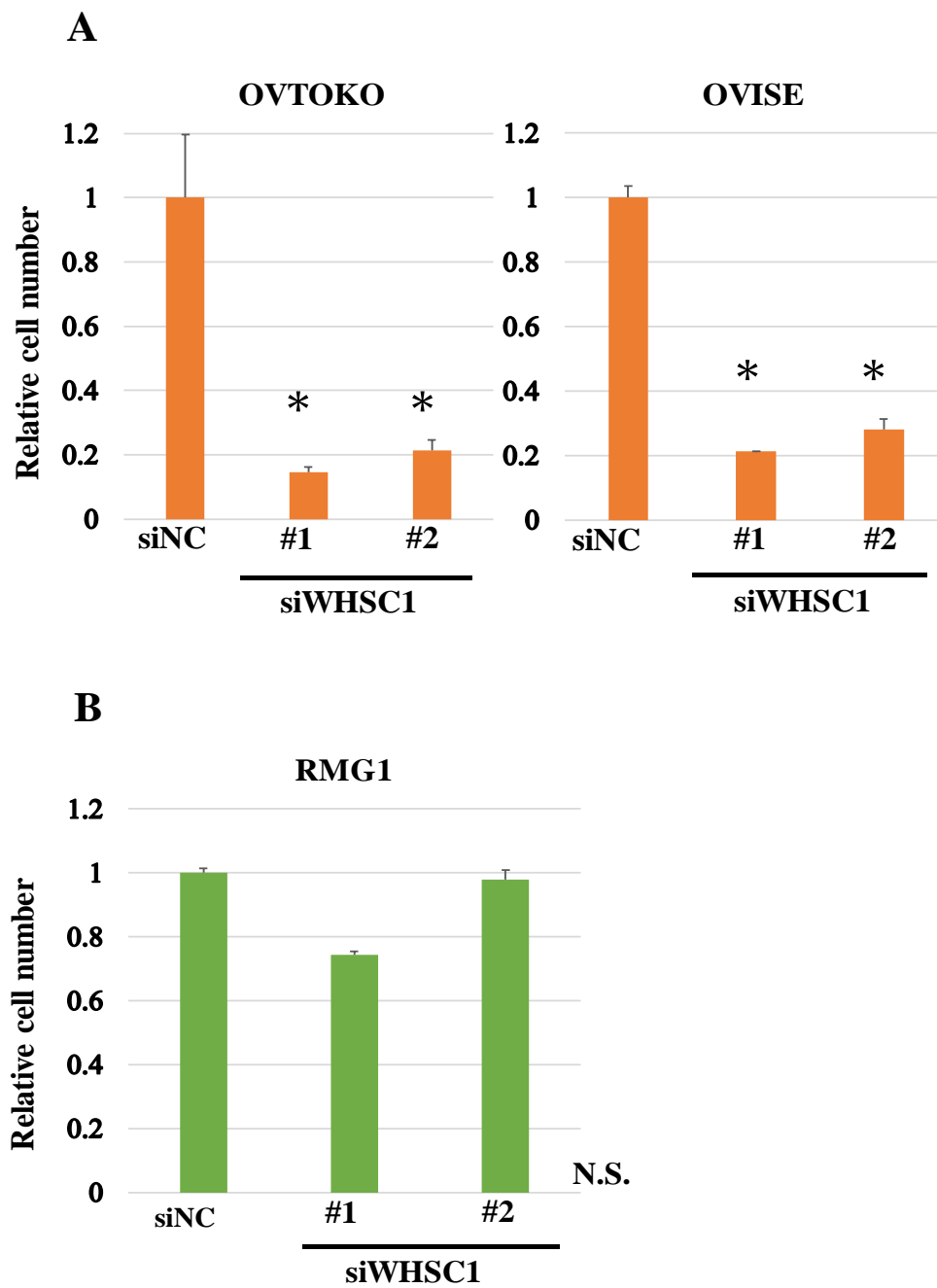


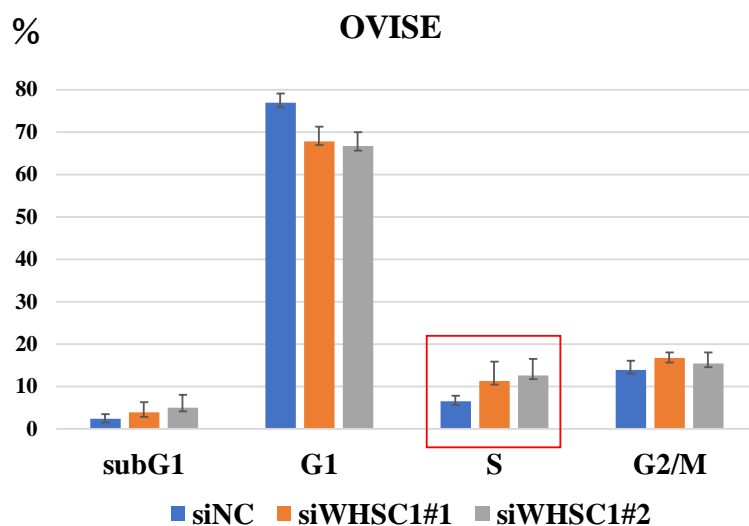
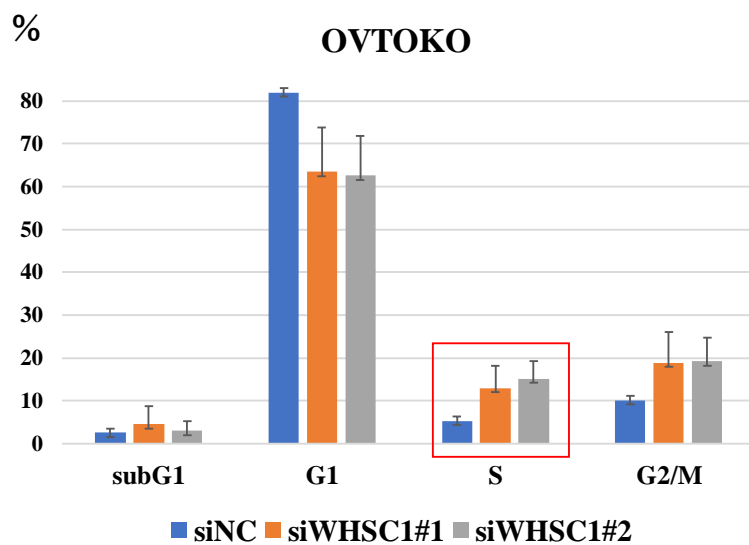
図9 細胞増殖抑制試験 (MTT アッセイ)

WHSC1 ノックダウンにより、*ARIDIA* 変異株 (A) での細胞増殖抑制が確認されたが (\* $p < 0.01$ )、siNC 処理群や *ARIDIA* 野生株 (B) での細胞増殖は抑制されなかった。



### 3-2 細胞周期解析

WHSC1 ノックダウンが細胞周期に与える影響を調べるためフローサイトメトリーを用いて OCCC 細胞の細胞周期解析を行った。先の細胞増殖抑制試験で、*ARID1A* 変異株でのみ WHSC1 ノックダウンによる細胞増殖抑制効果が確認されたため、細胞周期解析以降の実験系はすべて *ARID1A* 変異 OCCC 細胞株 (OVTOKO, OVISE) を使用した。OCCC 細胞株に WHSC1 特異的 siRNA およびコントロール siRNA (siNC) をトランスフェクションし、フローサイトメトリーで分析した。OVTOKO ではコントロール群で S 期の細胞割合が 5.36% であったのに対し、WHSC1 ノックダウン後には 12.96%(siWHSC1#1)、15.17% (siWHSC1#2) と増加を認めた。OVISE においてもコントロール群で 6.53% であった S 期の細胞割合が WHSC1 ノックダウン後には 11.27%(siWHSC1#1)、12.56% (siWHSC1#2) と増加した (図 10)。



**図 10 細胞周期解析**

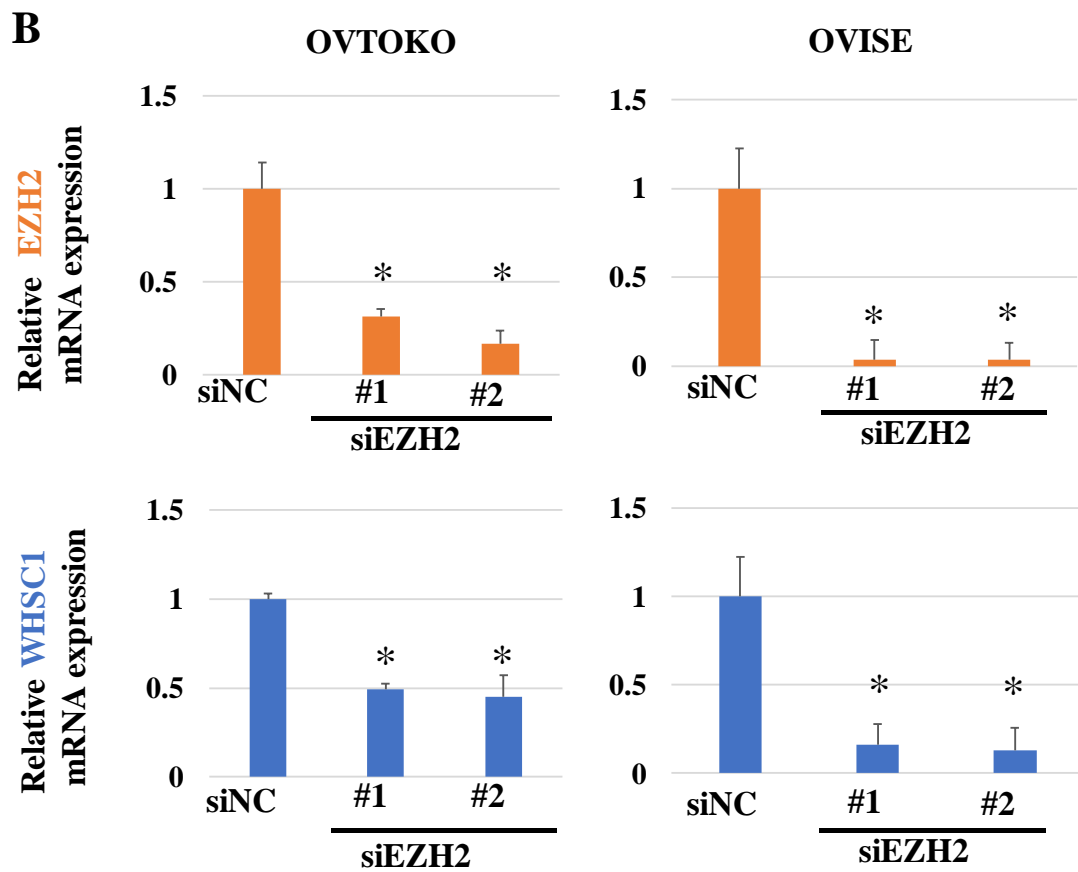
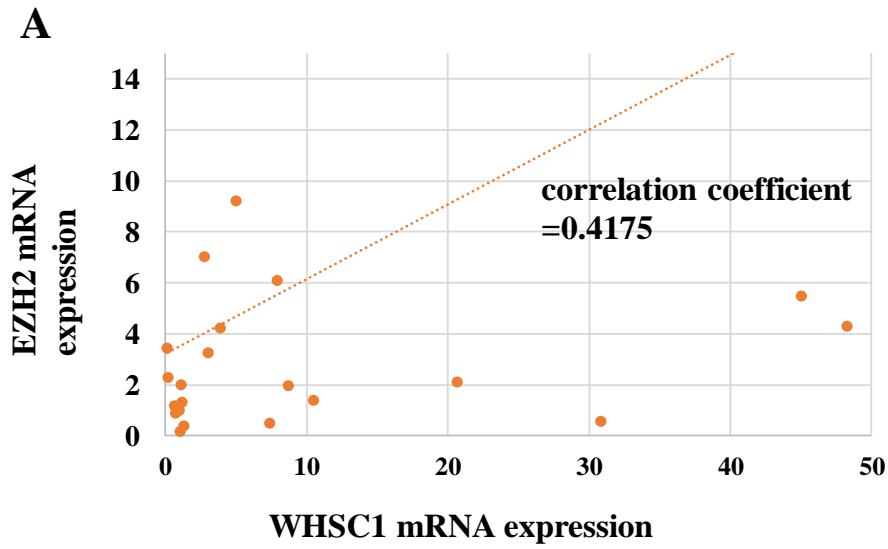
フローサイトメトリーにて WHSC1 ノックダウン後の OCCC 細胞株 (OVTOKO, OVISE) の細胞周期を解析した。OCCC 細胞株に 2 種類の WHSC1 特異的 siRNA (siWHSC1#1, #2) またはコントロール siRNA (siNC) をトランスフェクションし、48 時間後にフローサイトメトリーで解析した。実験系は 3 回繰り返し、データは平均値および標準偏差で表した。OVTOKO、OVISE 両細胞株とも、WHSC1 ノックダウン群ではコントロール群に比較し、S 期細胞の割合の増加を認めた。

#### (4) OCCC 細胞株における EZH2 ノックダウンによる影響

##### 4-1 EZH2 ノックダウンが WHSC1 の発現にもたらす影響

OCCC 細胞における WHSC1 と EZH2 の発現の相関関係を調べるために、23 の OCCC 臨床検体における発現を RT-PCR で分析した。WHSC1 と EZH2 の mRNA レベルの間には相関係数=0.4175 の正の相関関係を認めた (図 11A)。

EZH2 と WHSC1 の機能的関係を調べるために、siRNA (siEZH2 #1、#2) を使用して EZH2 をノックダウンし、OCCC 細胞株の WHSC1 の発現レベルを確認した。OCCC 細胞では EZH2 ノックダウンにより mRNA およびタンパク質レベルでの WHSC1 発現が有意に減少した (図 11B および C)。これらの結果と一致して、WHSC1 のヒストンマークである H3K36me2 と EZH2 のヒストンマークである H3K27me3 のレベルが低下していることがわかった (図 11C)。しかし、WHSC1 のノックダウンは EZH2 および H3K27me3 の発現レベルに影響を及ぼさなかった (図 11D、図 12)。



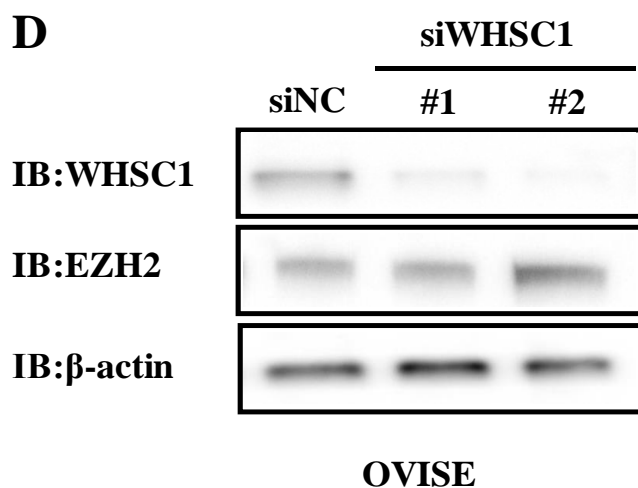
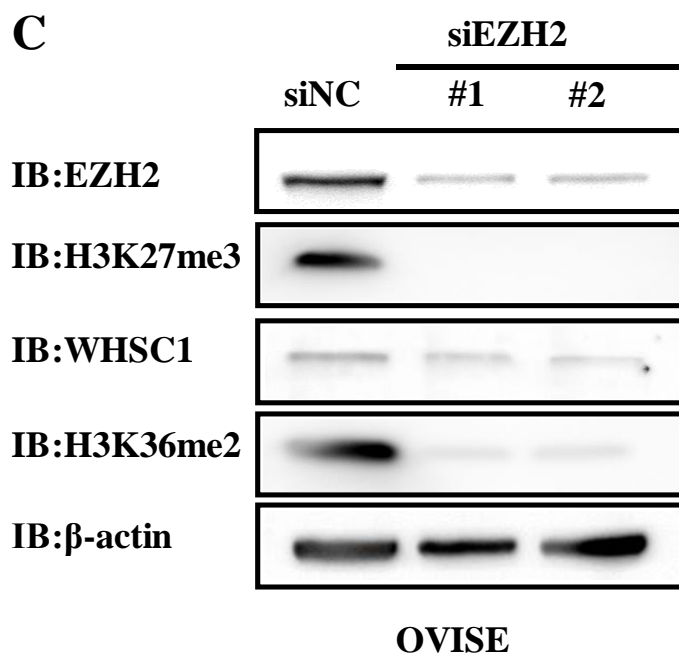


図 11 EZH2 との相関関係と、EZH2 のノックダウンが WHSC1 の発現にもたらす影響

A) リアルタイム PCR で調べた EZH2 と WHSC1 の mRNA 発現量を用いて相関係数を計算した。相関係数は 0.4175 で正の相関を示した。

- B) OCCC 細胞株 (OVTOKO, OVICE) に EZH2 特異的 siRNA をトランスフェクションし、EZH2 をノックダウンした。EZH2 ノックダウン後の WHSC1 の発現量をリアルタイム PCR で測定したところ、発現の低下を認めた。
- C) OVICE 細胞株を用いて EZH2 をノックダウンし、ウエスタンブロッティング法で H3K27me3, WHSC1, H3K36me2 の発現の低下を確認した。
- D) OVICE 細胞株を用いて WHSC1 をノックダウンし、ウエスタンブロッティング法で EZH2 の発現を確認したところ、EZH2 は発現低下を認めなかった。

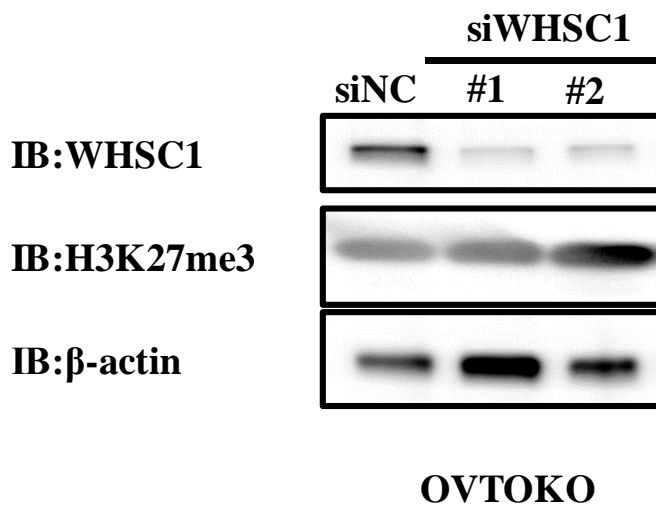


図 12 WHSC1 ノックダウン後の H3K27me3 発現の変化

OVTOKO 細胞株において WHSC1 ノックダウン後の EZH2 のヒストンマーク H3K27me3 の変化をウエスタンブロッティング法で調べた。WHSC1 をノックダウンしても H3K27me3 の発現低下は示さなかった。

## 4-2 EZH2 選択的阻害剤の効果

さらに、選択的 EZH2 阻害剤 GSK126 が WHSC1 や H3K36me2 の発現にもたらす効果を調べた。24 時間培養後の OCCC 細胞株に DMSO および 1 $\mu$ M～20 $\mu$ M の濃度の GSK126 を添加後、72h～96h 培養し、total RNA やタンパクを回収した。GSK126 の添加濃度については事前に求めた 50%阻害濃度 (IC50) 値を参考に決めた (表 6)。mRNA レベルの発現については RT-PCR で、タンパクの発現量についてはウエスタンブロッティング法で調べたところ、WHSC1 発現および H3K36me2 レベルは GSK126 の濃度依存的に低下することが分かった (図 13A および B)。

表 6 GSK126 の IC50 の算出

cell line	OVTOKO	OVISE
IC50( $\mu$ M)	8.16	10.21

OCCC 細胞株に 0.4%DMSO、6 段階の濃度の GSK126 を添加し、8 日間培養後、MTT アッセイを行って GSK126 を含まない培地 (0.4% DMSO) で培養した細胞で標準化することで細胞生存率を求め、それをもとに IC50 ( $\mu$ M) 値を算出した。実験系は 3 回行って平均値で表示した。

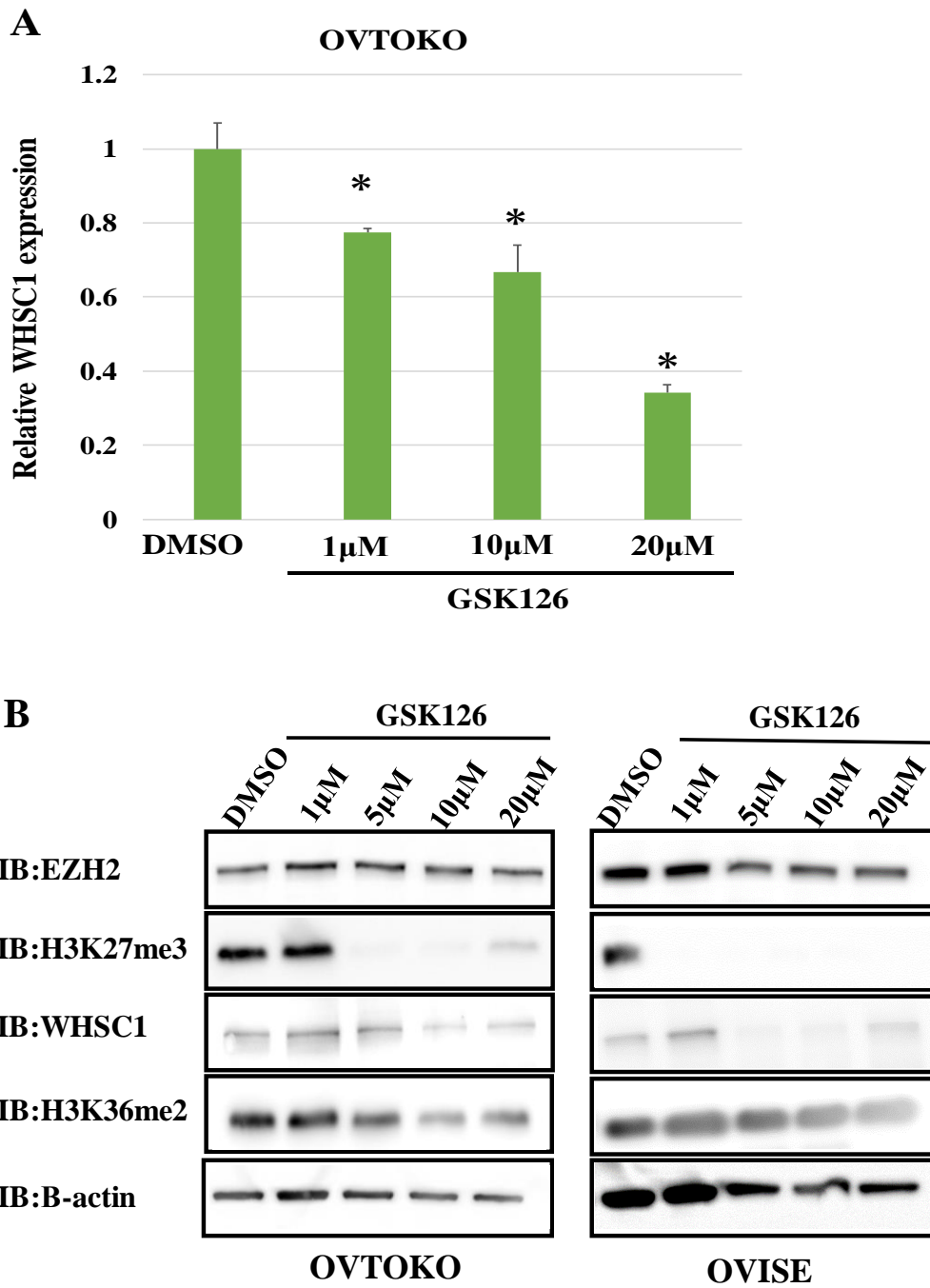


図 13 EZH2 選択的阻害剤 GSK126 がもたらす効果

OCCC 細胞株における EZH2 選択的阻害剤 GSK126 添加後の効果を調べた。



A)OVTOKO 細胞株に 0.4%DMSO、1 $\mu$ M~20 $\mu$ M の GSK126 をそれぞれ添加し、96h 培養後に totalRNA を回収した。リアルタイム PCR で WHSC1 の mRNA レベルの発現量を測定した。DMSO 群に比べ、GSK126 添加群では用量依存的に発現レベルの減少を認めた。有意差は ANOVA 後の多重解析を用いて計算し、いずれも  $p < 0.01$  を示した。

B)OVTOKO・OVISE 細胞株に 0.4%DMSO、1~20 $\mu$ M の GSK126 を添加し、72h 培養後にタンパクを回収した。回収したタンパクを用い、ウエスタンブロッティング法で EZH2 および WHSC1、またそれぞれのヒストンマークである H3K27me3、H3K36me2 の発現レベルについて調べた。WHSC1、H3K27me3、H3K36me2 の発現は GSK126 の用量依存的に減少を認めた。

## 第4章 考察

### (1) OCCCにおけるヒストンメチル化酵素の発現解析

本研究では、まず初めに OCCC において発現の亢進を認めるヒストンメチル化酵素を調べた。9つのヒストンメチル化酵素について、OCCC の臨床検体と正常卵巣検体を用いて、それぞれの mRNA レベルを定量的 RT-PCR で調べたところ、2つのヒストンメチル化酵素の発現が正常卵巣に比べ有意に高いことが明らかになった。

そこで本研究では、OCCC 臨床検体を用いた免疫組織学的染色を行い、正常卵巣に比べ OCCC 組織で WHSC1 の発現が強いことを明らかにした。前述の通り、発現レベルと病期分類との間に統計的有意差は認められなかった。WHSC1 の発現は OCCC 発癌の初期段階で高く、疾患が進行してもなお高発現を維持している可能性があるが、それを明らかにするにはさらなる検討が必要である。また、今回の発現解析の問題点の一つとして、OCCC は子宮内膜症を発症母地とすると考えられており、正常な卵巣組織が発現解析において OCCC のコントロールになり得ない可能性がある(11)。子宮内膜症における WHSC1 の発現解析や病態にもたらす影響を明らかにした研究はないが、子宮内膜症の発症とヒストン修飾異常の関連性についてはいくつか報告がある。例えば、子宮内膜

症病変においてはヒストン H3 のリジン 9 番と 16 番の低アセチル化、またヒストン H3 リジン 4 番、9 番、27 番の高メチル化が特徴として見られる(54, 55)。特にリジン 27 番のトリメチル化の亢進は、その責任遺伝子であるヒストンメチル化酵素 EZH2 の子宮内膜症病変における異常発現がもたらすと考えられており(56)、潜在的な治療標的となりうることが予想され、さらなる検討が期待される。

また、OCCC に特徴的な遺伝子変異の一つである *ARID1A* の変異は癌近傍の子宮内膜症上皮にもみられると報告がある(10)。これは *ARID1A* の突然変異が子宮内膜症の悪性形質転換の初期イベントであることを示唆している。

これらの報告から、子宮内膜症におけるヒストン修飾調節異常の解明が子宮内膜症の病態解明のみならず、OCCC を含む悪性形質転換のメカニズム解明や新規治療法の開発につながる可能性を秘めていると考えられる。

## (2) OCCC における WHSC1 の機能解析

本研究では、WHSC1 のノックダウン後の細胞増殖抑制効果を示した。

WHSC1 は H3K36 のジメチル化を介して遺伝子の活性化に寄与し、クロマチン動態を変化させ、細胞増殖を促進している可能性がある。WHSC1 によって調節される下流遺伝子に関してはいくつかの報告があり、たとえば、NIMA 関連キナーゼ-7 (NEK7) は H3K36 ジメチル化を介して WHSC1 によって調節される事が報告されている。また、WHSC1 は NEK1 の調節を通じて細胞増殖を増加させる(57)。最近の報告では、WHSC1 の過剰発現と PTEN (phosphatase and tensin homolog) の loss-of-function が協同的に働き、腫瘍転移を促進させる事が報告されている(58)。

細胞周期解析では WHSC1 のノックダウンが S 期の細胞の割合を増加させることを示したが、既報でも WHSC1 の減少により、S 期の細胞の割合が増加することが示されている。これは WHSC1 ノックダウンによる DNA 複製の抑制に起因する S 期の進行の遅延または停滞が S 期の細胞を潜在的に増加させる可能性を示唆している(59)。G1 / S 停止は S 期の細胞の割合の減少を示すことが一般的であるが、本研究では再現性をもって既報と同様の結果を得た。よって本研究の結果は WHSC1 のノックダウンが細胞周期に何らかの影響を与える可

能性があることを示した。FACS 分析で WHSC1 のノックダウンが SubG1 細胞の割合を増加させないことが示されたため、WHSC1 ノックダウンの抗腫瘍効果はアポトーシスによるものではないと考えられる。したがって、WHSC1 抑制後の抗腫瘍効果のメカニズムについてはさらなる解析が必要であると考え

る。

WHSC1 およびその他の NSD ファミリーメンバーに対する選択的阻害剤についての報告は非常に少ない。以前の報告で、*in vivo* の実験系で MCTP-39 (3-hydrazinylquinoxaline-2-thiol) が前立腺癌の増殖を阻害することが示されたが、WHSC1 活性を直接阻害しているという結論には至っていない(60)。また、ヒストン H4 配列に由来するノルロイシン含有ペプチドである PTD2 が WHSC1 に対して親和性を示し、阻害化合物としての可能性が報告されているが、今後のさらなる検証が必要である(61)。一方で、開発が進んでいるヒストンメチル化酵素阻害剤もある。ヒストンメチル化酵素 EZH2、DOT1L、PRMT5 の阻害剤は既に臨床試験が実施されている。特に EZH2 阻害剤の開発は日本でも実施されている。EZH2 阻害剤 Tazemetostat は再発又は難治性の EZH2 遺伝子変異を有する B 細胞性非ホジキンリンパ腫の患者に対し第 II 相試験が、EZH1/2 阻害

剤 Valemetostat は再発又は難治性成人 T 細胞白血病などの患者に対し第 II 相試験が本邦でも実施されている。

本研究において RT-PCR による発現プロファイル分析は、WHSC1 と EZH2 の mRNA レベルの間に、有意な正の相関関係を示した。さらに、以前の報告と一致し、EZH2 ノックダウンまたは阻害が H3K36me2 を減少させることを示した。また、本研究では EZH2 選択的阻害剤である GSK126 が OCCC 細胞株の WHSC1 発現を抑制することを示した。さらに、WHSC1 のノックダウンが *ARID1A* 野生型細胞の細胞増殖を減少させなかったことを示し、*ARID1A* 変異状態が EZH2 と同様の WHSC1 抑制の抗腫瘍効果に関与している可能性があると考えられた。

これらの結果は、GSK126 が EZH2 のメチル化を阻害する事により、下流の WHSC1 発現を抑制し、OCCC 細胞の増殖を阻害した可能性を示唆している。

しかし、現段階では H3K36me2 が WHSC1 発現を介して EZH2 によって調節されていることの解明までには至っていない。そのため、WHSC1 の発現とは無関係に、H3K36me2 が EZH2 によって調節された可能性も否定できない。さらなる研究が不可欠である (図 14)。

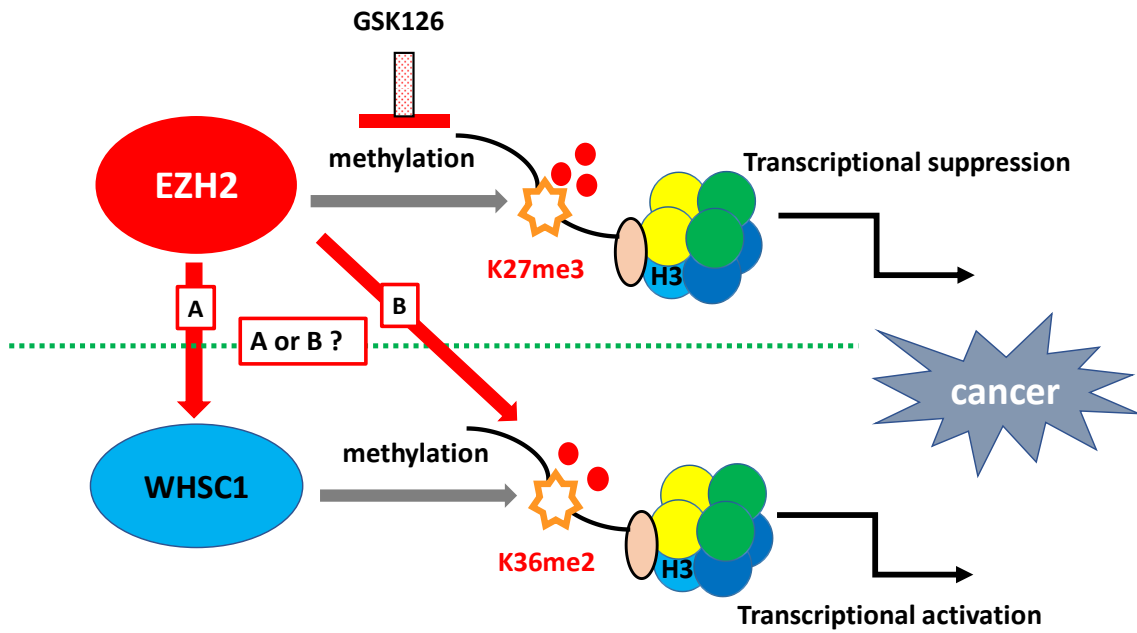


図 14 本研究の概念図

本研究の結果から、WHSC1 が EZH2 の下流遺伝子として機能している可能性が示された。しかし、現段階では H3K36me2 が WHSC1 発現を介して EZH2 によって間接的に調節されているのか（経路 A）、もしくは WHSC1 の発現とは無関係に、EZH2 によって直接調節されているのか（経路 B）は不明確である。さらなる研究が不可欠である。

公開データ (ChIP-Atlas; <https://chip-atlas.org>) を使用して、WHSC1 のプロモーター領域でどのヒストン修飾シグナルが増加したかを確認したところ、H3K4me3 や H3K27ac などの転写のヒストンマークは、WHSC1 のプロモーター領域で活性化されていたが、H3K27me3 は増加していなかった。また、以前の報告では、WHSC1 の上方制御のメカニズムは、癌細胞における WHSC1 の転写抑制につながる miRNA の抑制を介して EZH2 によって誘導されると報告されている(33)。これらの報告から、WHSC1 が EZH2 によるヒストン修飾以外のメカニズムで間接的に制御されていることが示唆される。それを確認するためには、H3K27me3 を使用して WHSC1 のプロモーター領域を確認する ChIP-seq 法を行うことが本研究の発展につながると考えられる。

最後に、本研究の限界として、OCCC における WHSC1 の治療可能性を調べるために、細胞株ベースおよび患者由来の腫瘍異種移植片を使用した in vivo 実験が必要になる場合があること、WHSC1 を治療標的とした場合、感受性を予測するバイオマーカーはまだ特定されていないことが挙げられる。ARID1A 変異がバイオマーカーなり得る可能性があるが、さらなる検討が必要と考える。本研究の結果をもとにさらに発展させ、OCCC の新たな分子標的薬開発へとつなげていきたい。



## 第5章 結論

今回、OCCC に対するヒストンメチル化酵素の発現解析、WHSC1 の機能解析を行い、以下の項目を明らかにした。

- ① OCCC 臨床検体において、正常卵巣と比較して、ヒストンメチル化酵素 WHSC1 の発現が有意に亢進していた。
- ② WHSC1 のノックダウンは H3K36 ジメチル化の減少を介し、細胞増殖抑制効果をもたらし、OCCC における治療標的となり得る事が分かった。
- ③ EZH2 のノックダウンや EZH2 選択的阻害剤は WHSC1 の発現を抑制し、WHSC1 が EZH2 の下流で制御されている遺伝子である事が分かった。

以上のことから、OCCC において WHSC1 は腫瘍増殖に関与し、WHSC1 を直接的に、または間接的に標的とする治療の開発は OCCC の有望な治療戦略となると考えられる。本研究をさらに発展させることで、OCCC の新たな分子標的治療の臨床応用につながると期待される。

## 参考文献

1. Mabuchi S, Sugiyama T and Kimura T: Clear cell carcinoma of the ovary: molecular insights and future therapeutic perspectives. *J Gynecol Oncol* 27: e31, 2016.
2. Ishibashi H, Takano M, Miyamoto M, et al.: Role of endometriosis as a prognostic factor for post-progression survival in ovarian clear cell carcinoma. *Mol Clin Oncol* 7: 1027-1031, 2017.
3. Crotzer DR, Sun CC, Coleman RL, Wolf JK, Levenback CF and Gershenson DM: Lack of effective systemic therapy for recurrent clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* 105: 404-408, 2007.
4. Takano M, Sugiyama T, Yaegashi N, et al.: Low response rate of second-line chemotherapy for recurrent or refractory clear cell carcinoma of the ovary: a retrospective Japan Clear Cell Carcinoma Study. *Int J Gynecol Cancer* 18: 937-942, 2008.
5. Network CGAR: Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474: 609-615, 2011.
6. Ho ES, Lai CR, Hsieh YT, et al.: p53 mutation is infrequent in clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* 80: 189-193, 2001.

7. Gurung A, Hung T, Morin J and Gilks CB: Molecular abnormalities in ovarian carcinoma: clinical, morphological and therapeutic correlates. *Histopathology* 62: 59-70, 2013.
8. Kuo KT, Mao TL, Jones S, et al.: Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* 174: 1597-1601, 2009.
9. Anglesio MS, Wiegand KC, Melnyk N, et al.: Type-specific cell line models for type-specific ovarian cancer research. *PLoS One* 8: e72162, 2013.
10. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, et al.: ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med* 363: 1532-1543, 2010.
11. Jones S, Wang TL, Shih Ie M, et al.: Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* 330: 228-231, 2010.
12. Margueron R, Trojer P and Reinberg D: The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* 15: 163-176, 2005.
13. Varier RA and Timmers HT: Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1815: 75-89, 2011.
14. Hamamoto R, Saloura V and Nakamura Y: Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 15: 110-124, 2015.

15. Sone K, Piao L, Nakakido M, et al.: Critical role of lysine 134 methylation on histone H2AX for gamma-H2AX production and DNA repair. *Nat Commun* 5: 5691, 2014.
16. Oki S, Sone K, Oda K, et al.: Oncogenic histone methyltransferase EZH2: A novel prognostic marker with therapeutic potential in endometrial cancer. *Oncotarget* 8: 40402-40411, 2017.
17. Bennett RL, Swaroop A, Troche C and Licht JD: The Role of Nuclear Receptor-Binding SET Domain Family Histone Lysine Methyltransferases in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 72017.
18. Battaglia A, Carey JC and South ST: Wolf-Hirschhorn syndrome: A review and update. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 169: 216-223, 2015.
19. Toyokawa G, Cho HS, Masuda K, et al.: Histone lysine methyltransferase Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 is involved in human carcinogenesis through regulation of the Wnt pathway. *Neoplasia* 13: 887-898, 2011.
20. Zhou P, Wu LL, Wu KM, et al.: Overexpression of MMSET is correlation with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res* 19: 303-309, 2013.
21. Hudlebusch HR, Santoni-Rugiu E, Simon R, et al.: The histone

methyltransferase and putative oncoprotein MMSET is overexpressed in a large variety of human tumors. *Clin Cancer Res* 17: 2919-2933, 2011.

22. Hudlebusch HR, Skotte J, Santoni-Rugiu E, et al.: MMSET is highly expressed and associated with aggressiveness in neuroblastoma. *Cancer Res* 71: 4226-4235, 2011.

23. Yang S, Zhang Y, Meng F, et al.: Overexpression of multiple myeloma SET domain (MMSET) is associated with advanced tumor aggressiveness and poor prognosis in serous ovarian carcinoma. *Biomarkers* 18: 257-263, 2013.

24. Xiao M, Yang S, Chen J, et al.: Overexpression of MMSET in endometrial cancer: a clinicopathologic study. *J Surg Oncol* 107: 428-432, 2013.

25. Wu J, Luo M, Duan Z, et al.: WHSC1 acts as a prognostic indicator and functions as an oncogene in cervical cancer. *Onco Targets Ther* 12: 4683-4690, 2019.

26. Yin Z, Sun Y, Ge S and Sun J: Epigenetic activation of WHSC1 functions as an oncogene and is associated with poor prognosis in cervical cancer. *Oncol Rep* 37: 2286-2294, 2017.

27. Cao R, Wang L, Wang H, et al.: Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298: 1039-1043, 2002.

28. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, et al.: The polycomb group protein

EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419: 624-629, 2002.

29. Knutson SK, Wigle TJ, Warholik NM, et al.: A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat Chem Biol* 8: 890-896, 2012.

30. Wu C, Jin X, Yang J, et al.: Inhibition of EZH2 by chemo- and radiotherapy agents and small molecule inhibitors induces cell death in castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget* 7: 3440-3452, 2016.

31. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, et al.: EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 492: 108-112, 2012.

32. Bitler BG, Aird KM, Garipov A, et al.: Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers. *Nat Med* 21: 231-238, 2015.

33. Asangani IA, Ateeq B, Cao Q, et al.: Characterization of the EZH2-MMSET histone methyltransferase regulatory axis in cancer. *Mol Cell* 49: 80-93, 2013.

34. Popovic R, Martinez-Garcia E, Giannopoulou EG, et al.: Histone methyltransferase MMSET/NSD2 alters EZH2 binding and reprograms the myeloma epigenome through global and focal changes in H3K36 and H3K27 methylation. *PLoS Genet* 10: e1004566, 2014.

35. 日本がん分子標的学会: News Letter.第 23-1 号, 2019.

36. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, et al.: Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* 365: 2473-2483, 2011.
37. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, et al.: A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med* 365: 2484-2496, 2011.
38. Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, et al.: OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol* 30: 2039-2045, 2012.
39. Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, et al.: Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 32: 1302-1308, 2014.
40. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, et al.: Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18: 1274-1284, 2017.
41. Friedlander M, GebSKI V, Gibbs E, et al.: Health-related quality of life and patient-centred outcomes with olaparib maintenance after chemotherapy in patients with

platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT Ov-21): a placebo-controlled, phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 19: 1126-1134, 2018.

42. Ledermann J, Harter P and Gourley C: Correction to *Lancet Oncol* 2014; 15: 856.

Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 16: e158, 2015.

43. 日本婦人科腫瘍学会: 卵巣癌治療ガイドライン 2015 年版.2015.

44. Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, et al.: SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol* 6: 731-740, 2004.

45. Takawa M, Masuda K, Kunizaki M, et al.: Validation of the histone methyltransferase EZH2 as a therapeutic target for various types of human cancer and as a prognostic marker. *Cancer Sci* 102: 1298-1305, 2011.

46. Cho HS, Hayami S, Toyokawa G, et al.: RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation. *Neoplasia* 14: 476-486, 2012.



47. Salz T, Li G, Kaye F, Zhou L, Qiu Y and Huang S: hSETD1A regulates Wnt target genes and controls tumor growth of colorectal cancer cells. *Cancer Res* 74: 775-786, 2014.
48. Cho HS, Kelly JD, Hayami S, et al.: Enhanced expression of EHMT2 is involved in the proliferation of cancer cells through negative regulation of SIAH1. *Neoplasia* 13: 676-684, 2011.
49. Ikeda Y, Oda K, Ishihara H, et al.: Prognostic importance of CDK4/6-specific activity as a predictive marker for recurrence in patients with endometrial cancer, with or without adjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* 113: 1477-1483, 2015.
50. Fukuda T, Oda K, Wada-Hiraike O, et al.: The anti-malarial chloroquine suppresses proliferation and overcomes cisplatin resistance of endometrial cancer cells via autophagy inhibition. *Gynecol Oncol* 137: 538-545, 2015.
51. Chuwa AH, Sone K, Oda K, et al.: Significance of survivin as a prognostic factor and a therapeutic target in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 141: 564-569, 2016.
52. Kashiyama T, Oda K, Ikeda Y, et al.: Antitumor activity and induction of TP53-dependent apoptosis toward ovarian clear cell adenocarcinoma by the dual PI3K/mTOR inhibitor DS-7423. *PLoS One* 9: e87220, 2014.

53. Miyasaka A, Oda K, Ikeda Y, et al.: Anti-tumor activity of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, in cultured endometrial carcinoma cells. *BMC Cancer* 14: 179, 2014.
54. Colon-Diaz M, Baez-Vega P, Garcia M, et al.: HDAC1 and HDAC2 are differentially expressed in endometriosis. *Reprod Sci* 19: 483-492, 2012.
55. Monteiro JB, Colon-Diaz M, Garcia M, et al.: Endometriosis is characterized by a distinct pattern of histone 3 and histone 4 lysine modifications. *Reprod Sci* 21: 305-318, 2014.
56. Colon-Caraballo M, Torres-Reveron A, Soto-Vargas JL, et al.: Effects of histone methyltransferase inhibition in endometriosis. *Biol Reprod* 99: 293-307, 2018.
57. Saloura V, Cho HS, Kiyotani K, et al.: WHSC1 promotes oncogenesis through regulation of NIMA-related kinase-7 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Mol Cancer Res* 13: 293-304, 2015.
58. Li N, Xue W, Yuan H, et al.: AKT-mediated stabilization of histone methyltransferase WHSC1 promotes prostate cancer metastasis. *J Clin Invest* 127: 1284-1302, 2017.
59. Evans DL, Zhang H, Ham H, et al.: MMSET is dynamically regulated during

cell-cycle progression and promotes normal DNA replication. *Cell Cycle* 15: 95-105, 2016.

60. Aytes A, Giacobbe A, Mitrofanova A, et al.: NSD2 is a conserved driver of metastatic prostate cancer progression. *Nat Commun* 9: 5201, 2018.

61. Morrison MJ, Boriack-Sjodin PA, Swinger KK, et al.: Identification of a peptide inhibitor for the histone methyltransferase WHSC1. *PLoS One* 13: e0197082, 2018.

## 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導・ご協力いただきました、東京大学医学部産科婦人科学教室の藤井知行教授、大須賀穰教授、曾根献文助教、東京大学医学部生体物理医学専攻統合ゲノム学分野の織田克利教授、また国立がん研究センター研究所がん分子修飾制御学分野の浜本隆二分野長、金子修三先生に心より感謝申し上げます。

また、実験計画・実験手技につきご指導・ご協力いただいた、東京大学医学部産科婦人科学教室の大木慎也先生、久木田麻子先生、町野英徳先生、本城晴紀先生、川田淑子先生、檜山智子先生、浅田佳代先生、谷川道洋先生、森繭代先生、鶴賀哲史先生、長阪一憲先生、松本陽子先生、平池修先生、富田香織様に心より御礼申し上げます。