

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 児嶋真千子

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。卵巣癌の罹患者数は年々増加傾向にある。卵巣明細胞癌 (Ovarian clear cell carcinoma : OCCC)は、日本で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。OCCCは他の組織型とは異なる特徴を有し、例えば、多くの卵巣癌が進行期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特徴的である。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も知られており、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。また、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く、例えば、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く、一方で *ARID1A* 変異や *PIK3CA* 変異が高頻度で見られる。このように、組織型によって特徴が異なる卵巣癌では、組織型ごとに対応した治療法の確立が必要である。

エピジェネティクスとは「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」と定義される。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。近年、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ており、ヒストン修飾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考えられる。

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。WHSC1は肺癌や膀胱癌、肝細胞癌など、さまざまな癌で発現の亢進を認めた報告がある。婦人科癌領域では、WHSC1は卵巣漿液性癌や子宮内膜癌、子宮頸癌で発現の亢進と予後との関連性が報告されている。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。

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。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、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、その中で、EZH2 選択的阻害剤である GSK126 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。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、EZH2 阻害剤に対する感受性は ARID1A 変異状態と相関する。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。

本研究では OCCC の新たな分子標的薬の開発を目的として、ヒストンメチル化調節異常に着目し、以下の 3 つの項目について検討した。

- 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 ①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について。
- ③ 同定されたヒストンメチル化酵素の機能解析。

まず初めに、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。その結果、正常卵巣組織と比較して WHSC1 と SMYD2 が統計学的有意差をもって発現の上昇を認めた。そのうち WHSC1 の方が SMYD2 と比較し、より高い発現量を示したことに加え、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に EZH2 があり、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。次に OCCC 組織における WHSC1 のタンパク質発現レベルを確認するために、WHSC1 の免疫組織学的染色を行った。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、染色を認めなかった。続いて 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、WHSC1 特異的 siRNA (siWHSC1) を使用して、WHSC1 の発現をノックダウンした。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ト法にて確認し、同様に WHSC1 のヒストンマークである H3K36me2 の発現レベルの低下も確認した。細胞増殖抑制試験では、WHSC1 ノックダウン後の ARID1A 変異 OCCC 細胞株における有意な細胞増殖抑制が認められたが ($p < 0.01$)、ARID1A 野生型 OCCC 細胞 (RMG-1) では増殖抑制効果は観察されなかった。次に WHSC1 が細胞増殖にもたらす影響を検討するため、フローサイトメトリーによって OCCC 細胞の細胞周期解析を行った。WHSC1 ノックダウン群ではコントロール群と比較して S 期の細胞割合の増加を認めた。さらに OCCC 細胞における WHSC1 と EZH2 の発現の相関関係を調べたところ、WHSC1 と EZH2 の mRNA レベルには正の相関関係を認めた。EZH2 と WHSC1 の相互作用を調べるために、siRNA を用いて EZH2 をノックダウンし、OCCC 細胞株における WHSC1 の発現レベルを確認した。EZH2 ノックダウンにより mRNA お

よびタンパクレベルで WHSC1 発現は有意に減少した。これらの結果と一致して、EZH2 のヒストンマークである H3K27me3 と WHSC1 のヒストンマークである H3K36me2 のタンパクレベルが低下していることをウエスタンブロッティング法で確認した。一方、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。最後に、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ところ、GSK126 添加後の WHSC1 や H3K36me2 の mRNA およびタンパク発現レベルは GSK126 の濃度依存的に低下することが分かった。

これらの結果をまとめると、

- ① OCCC 臨床検体において、正常卵巣と比較し、ヒストンメチル化酵素 WHSC1 は有意に発現が亢進していた。
- 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た。
- ③ EZH2 のノックダウンや EZH2 選択的阻害剤 GSK126 は WHSC1 の発現を抑制した。

本研究では、OCCC において正常卵巣に比べ発現の亢進を認めるヒストンメチル化酵素を明らかにした。WHSC1 は婦人科癌領域でも予後不良の因子として注目され、新たな治療標的として期待されているが、OCCC での報告はなかった。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、WHSC1 の過剰発現を明らかにした。WHSC1 の mRNA 発現レベルと病期の分類の間に有意差は認められなかったが、本研究の結果から WHSC1 が OCCC 発癌の初期段階で発現が高く、疾患が進行してもなお高発現を維持している可能性が示唆された。次に、WHSC1 のノックダウン後の細胞増殖抑制効果を明らかにした。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。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。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が示唆された。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。WHSC1 のノックダウンが細胞周期に何らかの影響を与え、WHSC1 抑制後の抗腫瘍効果に関与している可能性が考えられた。

EZH2 はこれまで様々な癌種での発現の亢進が報告されており、治療標的として期待されているヒストンメチル化酵素のひとつである。さらに、EZH2 と WHSC1 は相互作用が報告されている。本研究においても RT-PCR による発現分析で、WHSC1 と EZH2 の間に mRNA レベルで有意な正の相関関係を示し、EZH2 選択的阻害剤である GSK126 は、OCCC 細胞株の WHSC1 発現を抑制することを示した。また、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た。この結果から ARID1A 変異状態が 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。また、

GSK126 が EZH2 を阻害する事により WHSC1 発現を抑制し、OCCC 細胞増殖を阻害した可能性が示唆された。

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。