



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	化学療法耐性卵巣癌に対するEZH2阻害剤の相乗効果に関する検討 [全文の要約]
Author(s)	遠藤, 大介
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2282 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12541号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66000
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Endo_summary.pdf



学 位 論 文 (要 約)

化学療法耐性卵巣癌に対する EZH2 阻害剤の相乗効果に関する検討

(Studies in the synergistic effect of EZH2 inhibitor on
chemoresistant ovarian cancer)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

遠 藤 大 介

学 位 論 文 (要 約)

化学療法耐性卵巢癌に対する EZH2 阻害剤の相乗効果に関する検討

(Studies in the synergistic effect of EZH2 inhibitor on
chemoresistant ovarian cancer)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

遠 藤 大 介

【緒言】

卵巣癌は女性性器悪性腫瘍のなかで最も死亡数の多い疾患である。女性の癌関連死亡原因としては世界第 6 位、本邦第 9 位となっており、近年増加傾向となっている。最新の統計では、世界の年間罹患数は約 240,000 人、死亡数は約 150,000 人、本邦では年間罹患数 9,400 人、死亡数 5,000 人である。標準治療は手術療法と化学療法を組み合わせた集学的治療であり、化学療法は、プラチナ製剤とタキサン製剤の併用療法で、TC 療法 (Paclitaxel + Carboplatin)、等が主に行われる。卵巣癌の進行期分布は約 70%がⅢ期・Ⅳ期の進行癌症例であり、試験開腹術での腫瘍生検、病理学的診断、術前化学療法 (neoadjuvant chemotherapy (NAC)) が選択される。初回化学療法の奏効率は比較的良好で、70~80%は感受性であるが、一旦寛解に至っても、80~90%の症例で転移・再発を来すため長期生存率は不良である。最近の報告では、進行癌症例における初回治療終了後の無増悪生存期間と全生存期間は中央値でそれぞれ 12 か月、30 か月であり、再発症例の化学療法耐性獲得に対する新たな治療戦略が望まれている。2013 年によりやく分子標的薬 Bevacizumab の卵巣癌への適応拡大が承認されたため一定の予後改善が見込まれるが、長期投与により耐性を生じることが問題となっている。また、BRCA1、BRCA2 の変異がある高悪性度卵巣漿液性癌患者に対するポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP) 阻害剤オラパリブの第 3 相臨床試験が進行中であり結果が待たれるところである。このように一部期待される薬剤はあるものの、分子標的薬の臨床応用は他癌腫に比べて少数に留まる。以上の理由から新規治療標的のさらなる探索は極めて重要な課題と考えられている。

主としてエピジェネティックな転写抑制に関与するポリコームタンパク質複合体 (PRC2) の構成タンパクの一つであり、ヒストン H3K27 メチル化活性を有する Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) は、多くの癌で過剰発現が報告されており、細胞増殖や浸潤に関与しているとされる。Ezh2 ノックインマウスに対する EZH2 の強制発現は骨髄増殖性疾患を引き起こすとの報告もある。EZH2 阻害剤は悪性リンパ腫をはじめ、いくつかの悪性腫瘍で効果が認められ一部で臨床試験が行われているが、卵巣癌での報告は少なくその有効性については不明な点が多い。クロマチンリモデリング複合体の構成分子である Brahma-related gene 1 (BRG1)、Integrase Interactor 1 (INI1) などとも発現亢進あるいは欠損が大腸癌や脳腫瘍 (atypical teratoid/rhabdoid tumor)、悪性ラブドイド腫瘍などの癌で予後と関連しているという報告が相次いでいるが、卵巣癌との関連についての報告は少ない。

本研究では、初発腫瘍と再発腫瘍の比較検討の重要性に鑑み、初発、化学療

法後あるいは再発後の腫瘍がペアとして揃う多数の症例を抽出した。また、卵巣癌において、エピジェネティックな転写調節因子である EZH2 の発現や BRG1、INI1 の欠損と予後との相関を臨床病理学的に検討し、なかでも選択的 EZH2 阻害剤の一つである GSK343 の卵巣癌に対する効果および作用機序の解明、GSK343 と Paclitaxel (PTX)の併用による相乗効果の有無を検討することを目的とした。

【実験結果】

1) EZH2 発現と卵巣癌臨床予後との関連

卵巣癌組織標本における EZH2 の発現と全生存期間 (OS)との相関について検討した。特に、初発腫瘍での発現の有無と、NAC 後の摘出腫瘍での発現の有無それぞれで予後を比較した。陽性率スコア 0、1 を低発現群 (Low)、2、3 を高発現群 (High)とし、初発腫瘍での Low 対 High、化学療法後腫瘍での Low 対 High の比較では、後者において高発現群の予後が有意に不良であった($P = 0.045$)。この結果から、EZH2 が化学療法後腫瘍の潜在的な悪性度の高さに関連していることが示唆された。一方、BRG1、INI1 に関しては初発腫瘍での発現欠損の有無と卵巣癌臨床予後との明らかな相関は認められなかった。

2) EZH2 阻害剤による卵巣癌細胞株での H3K27me3 の抑制

各種卵巣癌細胞株における EZH2 の発現量と PTX 耐性が発現に与える影響、GSK343 の阻害効果を検証するため、KF28、KF28/Tx、Tu-OM-1、Tu-OM-1/Tx、SKOV-3、SKOV-3/Tx、RMG-1、OVISE、OVTOKO を用いてウェスタンブロッティング法による解析を行った。各細胞の PTX 耐性株を/Tx と表記した。GSK343 は EZH2 と total Histone H3 の発現には大きな変化はもたらさなかった。一方、H3K27 トリメチル化 (me3)は卵巣癌の組織型によらず GSK343 の用量依存的に抑制された。

3) GSK343 と PTX 併用による卵巣癌細胞株の増殖阻害効果

臨床病理学的検討およびウェスタンブロッティング法による解析の結果から、EZH2 阻害は癌細胞増殖抑制や PTX 感受性増強の効果をもたらすのではないかと仮定した。この仮説を確かめるために、GSK343、PTX およびその併用投与下で、卵巣癌細胞株 KF28、Tu-OM-1 の細胞生存アッセイを行った。GSK343 と PTX の併用投与は、非投与およびそれぞれの単剤投与と比較してより強い細胞障害性を示し、この傾向はそれぞれの PTX 耐性株においてより明らかとなった。さらに、MTT 細胞障害性アッセイにおいて、GSK343 投与により耐性株での PTX 感受性の増強が明らかになった。

4) PTX 耐性株異種移植片モデルにおける GSK343 と PTX の相乗効果

薬剤非投与群、GSK343 単剤群、PTX 単剤群、GSK343/PTX 併用群の 4 群で統計学的検討を行った。各群間の多重比較検定では非投与群と併用群でのみ統計学的有意差が認められた。併用においても忍容性は良好であった。組織学的評価では、腫瘍の中央部では広く壊死に至っていたことから、腫瘍の壊死率を統計学的に解析した。壊死率は併用群で上昇する傾向を示した。また、各腫瘍の悪性度を Ki-67 インデックスで推定したところ、インデックスは併用群で有意差をもって低下した。これらの結果から、*In vivo* においても GSK343 と PTX の併用が腫瘍の増殖を阻害することが示唆された。

5) EZH2 により増強される化学療法抵抗性関連遺伝子の cDNA マイクロアレイ解析による推定

EZH2 阻害剤が腫瘍増殖を抑制する機序に関連する新たな治療標的を探索するために、卵巣癌細胞株から得られた total RNA を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行った。GSK343 投与により変動する遺伝子のうち、KF28/Tx と Tu-OM-1/Tx で共通して亢進する 17 遺伝子を候補遺伝子として抽出した。この中には、遺伝子データベースや文献的な考察の結果、癌抑制遺伝子や、癌幹細胞性に関わるとの報告がある遺伝子が含まれており、潜在的な治療標的となる可能性が示唆された。

【考察】

化学療法により感受性の腫瘍細胞は死滅し、少数の化学療法に抵抗性のクローンが生き残り、転移・再発の母地となることが考えられ治療後の腫瘍では悪性度の強いクローンが多くを占めていると考えられる。EZH2 発現亢進は予後不良と関連するとの報告があることから、治療後の腫瘍で EZH2 の発現が亢進していることが予想された。本研究ではまず、卵巣癌組織検体における EZH2 発現と患者予後の相関を検討した。初発腫瘍と治療後腫瘍では予後との相関に違いがあった。初発腫瘍での EZH2 発現と予後には有意な相関が見られなかったのに対して、治療後腫瘍での EZH2 発現が強い症例は有意に予後不良であった。

卵巣癌で最も頻度の高い漿液性癌、および一般に化学療法感受性の低い粘液性癌の細胞株を用いて行った細胞生存アッセイと MTT アッセイで、GSK343 は単剤でも PTX と同等かそれ以上の細胞増殖抑制効果をもたらした。さらに、GSK343/PTX 併用がそれぞれの単剤と比較して細胞増殖をより強く抑制することが明らかになった。また、この傾向は PTX 耐性株においてより明らかだったことから、耐性株の異種移植片モデルを用いて抗腫瘍効果を確かめる根拠とな

った。

In vivo では、併用群のみが統計学的に有意な腫瘍抑制効果を示し、治療終了後も効果が持続することが示唆された。また、重要なことに明らかな体重減少や活動性の低下はみられず、併用における忍容性も担保されと考えられた。これらの結果から、EZH2 阻害剤は複数の組織型の卵巣癌に対して新たな治療薬として使用できる可能性を秘めており、化学療法耐性を獲得した薬剤と併用で用いることによりその耐性を解除するという観点から非常に重要であると考えられる。

【総括及び結論】

1) 本研究から得られた新知見

- 卵巣癌細胞株を用いた *in vitro* および *in vivo* の解析により、GSK343 と PTX 併用はそれぞれの単剤投与よりも統計学的に有意な腫瘍抑制効果を示し、治療終了後も効果が持続することが示唆された。
- 明らかな体重減少や活動性の低下といった治療の有害事象はみられず、併用における忍容性も担保されと考えられた。

2) 新知見の意義

現在、再発進行卵巣癌の治療薬はタキサン系薬剤およびプラチナ製剤の併用化学療法に限られており、また、ベバシズマブ以外の有効な分子標的薬も実用化されていない。すでに悪性リンパ腫などで臨床試験が進行している EZH2 阻害剤が、卵巣癌に対しても有効であることが本研究から示唆され、また、従来の化学療法との併用により更なる効果の増強あるいは化学療法耐性の解除ができる可能性も示されたことから、これまで治療困難とされてきた再発卵巣癌の治療成績改善が期待される。

3) 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

PTX 感受性細胞株と耐性細胞株で *in vivo* での EZH2 阻害剤投与比較実験を行い、EZH2 阻害剤が PTX 耐性解除に真に有効であるかを確認する。また、cDNA マイクロアレイの結果から選択した候補遺伝子を RNA 干渉法などを用いてノックダウンし、EZH2 阻害が抗癌剤耐性を解除する分子メカニズムの解明を目指す。