

令和 1 年 7 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 490

氏名 増田 健太

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: オックスフォード大学 (国名: 英国)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

治療抵抗性卵巣癌の新規代謝制御機構の解明

3. 派遣期間: 平成 29 年 7 月 1 日 ~ 平成 31 年 6 月 30 日 (730 日間)

4. 受入機関名及び部局名

Professor AHMED, Ahmed Ashour

Nuffield Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Oxford

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

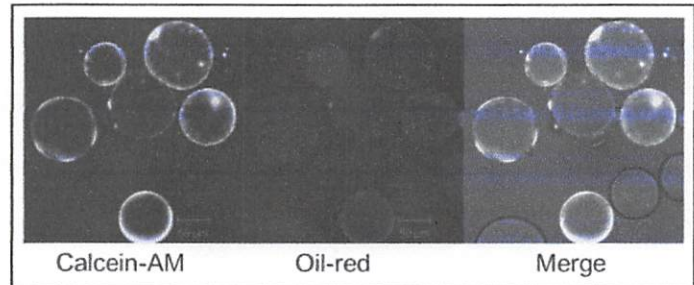
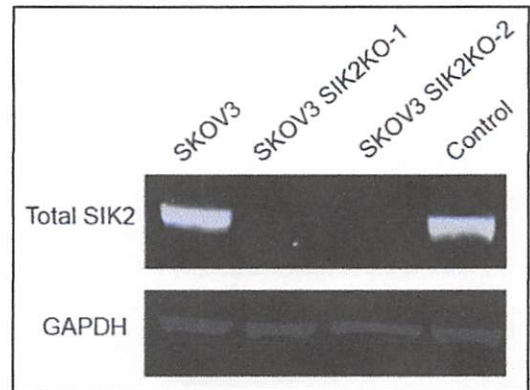
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

研究実施状況

卵巣がん、特に最も頻度の高い組織型である High-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC) は婦人科がんにおいて最も予後の悪い癌である。早期発見が困難であり、進行がんで発見されることが多い。特に、腹膜や大網をはじめとする、脂肪に富んだ腹腔内組織に転移しやすいことが知られている (Sehoul J et al. J. Surg. Oncol. 99, 424-427, 2009)。HGSOC は手術や化学療法を組み合わせた一次治療に対する反応は良好で、一旦は寛解状態に至るものの、その後 8 割の患者は 2 年以内に腹腔内再発を来することが報告されている (Vaughan S et al. Nat. Rev. Cancer. 11, 719-725. 2011)。その後、腹腔内の転移巣は徐々に増大し、腹腔内癒着などを経て腸管の閉塞を来し、致命的な状態に陥る。転移形式について、他のがんとは大きく異なり、卵巣がんが腹腔外に転移することは稀である (Pradeep S et al. Cancer Cell 26, 77-91, 2014)。以上のような卵巣がんの生物学的特性は、脂肪組織が卵巣癌の転移や再発のメカニズムに関与している可能性を示唆している。また化学療法後に一旦は癌が消失するものの、その後再発にいたる事実、化学療法後に微小残存病変が存在していることを示唆している。そこで本研究では、卵巣癌における脂肪組織と癌細胞との関係性を解明すること、また化学療法後の微小残存病変に対する解析を進めることを目的とした。

まず卵巣癌と脂肪細胞との関係性についての解析を行った。受け入れ研究室である Ahmed 研究室では、salt-inducible kinase 2 (SIK2) が卵巣がん細胞の増殖・生存に重要な働きをしていることを見出し (Ahmed AA et al. Cancer Cell 18, 109-121, 2010)、腹腔内への転移を促進する働きをしていることを報告している (Miranda F et al. Cancer Cell 30, 1-17, 2016)。上記論文により、SIK2 は重要な治療標的となることが示されているが、HGSOC のうち SIK2 を高発現しているものは 40% に過ぎない。つまり卵巣がんの転移において、未だに解明されていない重要な機序が存在していると考えられる。また卵巣がんが転移する過程において、SIK2 がいかに活性化されるかも明らかとなっていなかった。そこでまずは SIK2 を切り口として、脂肪細胞が卵巣がんの増殖・生存に及ぼす影響について調べ、その後新たなメカニズムの探索へとアプローチをすることとした。具体的には、成熟脂肪細胞と卵巣癌細胞との共培養による実験を行った。まず卵巣癌細胞株 SKOV3, OVCAR8 細胞を親株として、CRISPR-Cas9 システムを用いて、SIK2 をノックアウトした細胞株を作成した (右上図)。続いて、脂肪細胞が卵巣がん細胞の増殖に及ぼす影響における SIK2 の機能を解析するため、手術で摘出した大網組織の一部を処理し、成熟脂肪細胞を回収した。成熟脂肪細胞の vitality は Calcein-AM にて、回収率は oil-red 染色にて確認した。 (右下図)



成熟脂肪細胞との共培養の結果、SKOV3 細胞と比較して SIK2KO 細胞では共培養による細胞増殖が約 50% 抑制された。つまり SIK2 は脂肪細胞による卵巣癌の増殖に関与しているものの、一方では SIK2 に非依存的な機序が存在し、脂肪細胞と卵巣がん細胞とのクロストークにおいて重要な働きをしている可能性が示唆された。

続いて、SIK2 を標的とした治療戦略について検討を行った。これまでの報告により、SIK2 が卵巣がんの転移を抑制する重要な治療標的となることは既に示されているが、有力な阻害剤は得られていなかった。そこで The Beatson Institute for Cancer Research との共同研究を開始し、新たな SIK2 阻害剤の開発を行った。共同研究によって得られた新たな SIK2 を阻害する新規化合物、および既に報告されている SIK2 阻害剤を用いて、SIK2 に関連するバイオマーカーの探索を試みた。卵巣がん細胞株 SKOV3 細胞を用いて、3 種類の SIK2 阻害剤の投与後に見られる遺伝子発現の変化を解析するため、RNA-seq を行った。手順は、SKOV3 細胞株に阻害剤 A, B, C もしくは DMSO を投与し、24 時間後に細胞を回収。RNA を抽出後、illumina Platform のライブラリー調整をしたのち、sequence を行い、differential expression 解析を行った。コントロールの DMSO 投与群と比較して、SIK2 阻害剤投与後に発現の上昇した遺伝子、発現の低下した遺伝子のうち、2.5 倍以上の変化があったものを抽出し、それぞれの化合物間を比較した。結果は、既知の SIK2 阻害剤と比較して、新規化合物でもほぼ同等の RNA 発現の変化が見られた。さらに最も変化の大きかった上位 10 遺伝子を選択し、qPCR にて validation を行った結果、qPCR でも RNA-seq で得られた発現変化を確認することができた。続いて、これらの遺伝子発現変化が、薬剤のオフターゲット効果ではなく、真に SIK2 阻害に依存していることを確認するために、SIK2 の siRNA 導入及び SIK2KO 細胞株に対して遺伝子発現を解析したところ、10 遺伝子のうち、2 遺伝子で SIK2 の siRNA 導入及び SIK2KO でも SIK2 阻害剤の投与と同様の変化が見られ、SIK2 の新たな下流分子となることを同定した。

続いて、卵巣癌の微小残存病変に対する解析を行った。卵巣癌の術前化学療法を行う患者より研究同意を得て、化学療法投与前と化学療法投与後で卵巣癌検体を摘出し、遺伝子発現を比較した。非癌細胞の混在を除外するために、LCM法(Laser capture microdissection)を用いて癌細胞のみを採取し、RNA-seq解析を行った。20例のうち、化学療法の感受性が良好で、微小残存病変と判断された2例を解析したところ、微小残存病変では特定の分子や代謝経路の発現が上昇しており、新たな治療標的となり得る分子を同定することが出来た。

この2年間を通して、主に SIK2 という分子を切り口として、脂肪細胞と卵巣がん細胞との関係性を解析してきた。SIK2 は、受け入れ研究室にてこれまでに解析が行われていた分子であったため、抗体、細胞、遺伝子発現ベクターなどの実験に必要な材料は容易に手に入れることができた。そういった実験準備期間がなかったこともあり、幸いなことに、限られた時間であったが、予想以上の研究成果が得られたと思う。また微小残存病変の解析に関しては、ヒト臨床検体を用いた実験を多く行うことができ、安定した実験が可能となったことはこの2年間の成果であった。またこの2年間で、受け入れ研究者である Ahmed 教授との度重なる Discussion を経て、彼がどのように研究をすすめ、ラボをマネジメントしているかということを感じることができたことも、留学でしか得られなかった経験だろうと感じている。今後、留学中で学んだことを活かして、自分自身の日本での研究を発展させたいと考えている。

成果の発表・関係学会への発表状況

ポスター発表 AstraZeneca-Oxford Cancer Symposium(Oxford, UK) 2018年9月

また成果発表とは異なるが、2018年6月26日 JSPS ロンドンにて行われた第2回英国サイババルセミナーへ参加し、在英日本人研究者との交流を行った。