

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06979

研究課題名(和文) 合成致死に基づいたBAP1変異がんにおける細胞増殖機構の分子基盤の確立

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms of cell proliferation in BAP1-mutated cancer using synthetic lethal phenotypes

研究代表者

村上 優子(渡並優子)(Murakami-Tonami, Yuko)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：70405174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞においてBAP1(BRCA1 associated protein1)遺伝子変異に対して合成致死表現型を示した遺伝子のうちUSP1とCHK2を解析した。

その結果以下のことが明らかとなった。(1)脱ユビキチン化酵素USP1の標的タンパク質として報告があるFANCD2はin vitroでBAP1も脱ユビキチン化された、(2)悪性中皮腫細胞株でBAP1をノックダウンするとS期が遅れた、(3)BAP1変異細胞を用いた担がんマウスにおいてUSP1/CHK2を阻害するとがんの増殖が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BAP1遺伝子はがん抑制遺伝子であるため、その変異によって起こるがんに対する抗がん剤開発では直接標的にしにくいという問題がある。そこで合成致死表現型を用い、将来的に標的になる可能性がある分子標的の探索をするとともに、候補遺伝子の新しい機能を解析した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed USP1 and CHK2 among the genes that showed synthetic lethal phenotype for BAP1 mutation in cultured cells. The following results were obtained. (1) FANCD2, which has been reported as a target protein of the deubiquitinating enzyme USP1, is also deubiquitinated in BAP1 in vitro, (2) knockdown of BAP1 in malignant mesothelioma cell lines delays the S phase, and (3) inhibiting USP1/CHK2 blocks cancer growth in tumor-bearing mice using BAP1 mutant cells.

研究分野：がん

キーワード：合成致死 悪性中皮腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

[BAP1 (BRCA1 associated protein 1)]

BAP1 (BRCA1 associated protein 1) はがん抑制遺伝子および転移抑制に関与する遺伝子であり、多くのがんでその不活化変異が同定されている。実際、悪性中皮腫の約 25%、ぶどう膜黒色腫の約 45%、腎細胞がんの約 15%および乳がんや肺がん、食道がん、卵巣がんにおいて BAP1 の変異があることがわかっている。BAP1 はショウジョウバエ calyso (ユビキチン加水分解酵素) のホモログであり、polycomb repressive deubiquitinase (PR-DUB) 複合体を形成し、ヒストン H2A の脱ユビキチン化を介して転写抑制に関与することが示されている (*Nature*, 465: 243, 2010)。一方、BAP1 は p53 抑制因子として知られる YY1 (Ying Yang 1)、細胞周期を制御する E2F1, p53 などの転写因子と結合し、転写を促進させるという報告もある (*Clin Cancer Res*, 18: 4485, 2012)。また、BAP1 は DNA 相同組み換え修復に関与する E3 ユビキチンリガーゼである BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1) や BARD1 (BRCA1 associated RING domain protein 1) と相互作用しているという報告があるが (*Oncogene*, 16: 1097, 1998) BRCA1 を脱ユビキチン化する訳ではなく DNA 損傷応答での機能については明らかになっていない点が多い。

[合成致死 (synthetic lethal)]

遺伝学用語で、遺伝子 A, B それぞれ単独の遺伝子変異では細胞の生存に影響を及ぼさないが、両者とも変異したときに細胞死を招く場合、その二つの変異は合成致死であるという。この現象を利用し、がんの原因遺伝子の変異と合成致死表現型を示す遺伝子を解析することで、その遺伝子の阻害剤はがん細胞特異的に死滅させる分子標的薬として開発できると期待できる。合成致死の概念ががんに関連づけられたのは、乳がんにおいて BRCA1 変異と DNA 修復に関わる PARP1 変異が合成致死であるという報告が最初であり (*Nature*, 434: 913, 2005) (*Nature*, 434: 917, 2005)、PARP1 阻害剤が BRCA1 変異型の卵巣がんの治療に有効であることも示されている (*Nat Rev Clin Oncol*, 7: 508, 2010)。BAP1 変異に関しては現在までのところ合成致死を示す遺伝子の組み合わせの報告はない。

2. 研究の目的

研究当初、目的は以下のように設定した。

- (1) BAP1 過剰発現株およびコントロールの細胞株を用い、BAP1 と合成致死表現型を示す遺伝子を同定する。
- (2) BAP1 と合成致死を示す分子機構を明らかにすることで、BAP1 の DNA 損傷応答に関する新規機能を解明する。
- (3) 合成致死を示す遺伝子に関して、新規分子診断マーカーとしての有用性を検討するとともに、この遺伝子が治療標的となるかどうか *in vivo* モデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

目的に沿い、以下のように実験をおこなった。

- (1) 遺伝子を野生型 BAP1 過剰発現悪性中皮腫細胞株 (H28-BAP1) および親株である BAP1 変異悪性中皮腫細胞株 (H28) において、以下の二つから抽出した遺伝子を個別にノックダウンした。
 - ・悪性中皮腫患者予後データおよびがん組織の発現アレイデータから推測される、BAP1 変異に対して合成致死表現型を示す可能性のある 700 あまりの遺伝子のうち、DNA 損傷応答・関連するクロマチン修飾因子の一群
 - ・ゲノムワイドな shRNA ライブラリースクリーニングを行い、H28 では細胞が増殖せず、H28-BAP1 では細胞が増殖されると考えられた候補遺伝子群
- (2) (1) で選んだ候補遺伝子のうち、DNA 修復に関わる脱ユビキチン化酵素 USP1 と CHK2

キナーゼについて集中して解析を進めた。

- (3) 6週齢のNOGマウスに BAP1 変異肺がん細胞株 H226 を胸腔内移植し尾静脈より CHK2 阻害剤である PV1019 を投与、または H226 に shUSP1 を処理したのち胸腔内移植し、その後の細胞増殖について IVIS を用いて検討した。

4. 研究成果

研究期間中に以下の成果が得られた(数字は目的に対応)

- (1) 遺伝子を野生型 BAP1 過剰発現悪性中皮腫細胞株(H28-BAP1)および親株である BAP1 変異悪性中皮腫細胞株(H28)において、以下の二つから抽出した遺伝子を個別にノックダウンした。

- ・悪性中皮腫患者予後データおよびがん組織の発現アレイデータから推測される、BAP1 変異に対して合成致死表現型を示す可能性のある 700 あまりの遺伝子のうち、DNA 損傷応答・関連するクロマチン修飾因子の一群
- ・ゲノムワイドな shRNA ライブラリースクリーニングを行い、H28 では細胞が増殖せず、H28-BAP1 では細胞が増殖されたと考えられた候補遺伝子群

その結果から、DNA 修復に関わる脱ユビキチン化酵素 USP1 と CHK2 キナーゼに注目して解析を進めることとした。また、肺がんの BAP1 変異細胞株である H226 と BAP1 野生型の細胞株 H1299 について ML323 (USP1 阻害試薬) と PV1019 (CHK2 阻害試薬) を培地に加えたところ、BAP1 変異株である H226 のほうがよりそれらの試薬の感受性が高いことが明らかとなった。すなわち、悪性中皮腫以外の BAP1 変異株についても、スクリーニングから得られた候補遺伝子産物の阻害が合成致死表現型を示すことが明らかとなった。

- (2)

- ・候補遺伝子の一つ USP1 は脱ユビキチン化酵素であり、また BAP1 も立つユビキチン化酵素である。共通の脱ユビキチン化標的を探索するため、質量分析による同定を試みたが、明確な候補を得ることはできなかった。
- ・USP1 の脱ユビキチン化の標的である FANCD2 については、蛍光変更を用いた *in vitro* の脱ユビキチン化アッセイで BAP1 も脱ユビキチン化可能であることを明らかとした。
- ・HeLa 細胞において BAP1 をノックダウンすると S 期の進行が遅くなるという報告があるが (Cancer Res, 2019) BAP1 変異悪性中皮腫細胞および BAP1 をノックダウンした正常中皮細胞において DNA 複製の速度を検討した。予備的な結果であるが、BAP1 をノックダウンすることで S 期が遅延することが示唆された。

- (3)

- ・マウス担がん実験では、CHK2 阻害剤である PV1019 投与でコントロールに比べて有意にがんが小さくなることが確認された。また、shUSP1 で処理した細胞の増殖も見られなかった。つまり、培養細胞での BAP1 変異と CHK2 キナーゼ阻害による合成致死性および BAP1 変異と USP1 阻害による合成致死性は、個体レベルでも保たれていることが明らかとなった。
- ・予後マーカーとしての有用性の検討は行うことができなかった。

また、当初の目的には設定していなかったが、悪性中皮腫において BAP1 変異と合成致死表現型を示すものを化合物側から同定するために、名古屋大学 ITbM 低分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行なった。ライブラリー本体と同確率でヒット化合物が得られるミニライブラリー 3000 化合物を検討し、BAP1 変異悪性中皮腫細胞でのみ細胞増殖抑制効果が高い化合物を 1 種類取得した。この候補化合物について、構造活性相関を調べるためのサブライブラリーを作成し 2 次スクリーニングを行い、活性に重要な部分の特定を試みた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hong Nhung Nguyen, Koya Suzuki, Yasuaki Kimura, Takatsugu Hirokawa, Yuko Murakami-Tonami, and Hiroshi Abe	4. 巻 100
2. 論文標題 Synthesis and Biological Evaluation of NMDI-14 Derivatives as anti-Mesothelioma Agents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heterocycles	6. 最初と最後の頁 253 - 266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3987/COM-19-14191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Murakami-Tonami Y	4. 巻 65
2. 論文標題 Synthetic lethality in the search for novel molecular targets in cancer therapeutics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 292-296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shishido Y, Tomoike F, Kuwata K, Fujikawa H, Sekido Y, Murakami-Tonami Y, Kameda T, Abe N, Kimura Y, Shuto S, Abe H	4. 巻 20
2. 論文標題 A Covalent Inhibitor for Glutathione S-Transferase Pi (GSTP1-1) in Human Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chembiochem	6. 最初と最後の頁 900-905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.201800671	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hiroshi Murakami, Seiji Kosuge, Takatomi Yamada, Hirofumi Aiba, Yuko Murakami
2. 発表標題 Phosphorylation of Mei4 by Cds1 in the meiotic DNA replication checkpoint linking pre-meiotic DNA replication and meiotic recombination in fission yeast
3. 学会等名 EMBO Workshop on 10th International Fission Yeast Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Kotoko Yamatani, Tomohiko Ai, Kaori Saitoh, Haeun Yang, Koya Suzuki, Atsushi Hori, Yuko Murakami-Tonami, Weiguo Zhang, Bing Carter, Sonoko Kinjo, Kazuho Ikeo, Kazuhiro Katayama, Yoshikazu Sugimoto, Hironori Harada, Takashi Miida, Neil P. Shah, Marina Konopleva, Yoshihide Hayashizaki, Michael Andreeff, Yoko Tabe
2. 発表標題	CAGE transcriptome analysis reveals BCL2A1 upregulation in FLT3-ITD/D835 dual mutated AML cells harboring complex co-mutations
3. 学会等名	61st ASH (American Society of Hematology) Meeting (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Haeun Yang, Yoko Tabe, Kaori Saitoh, Kotoko Yamatani, Rodrigo Jacamo, Helen Ma, Vivian Ruvolo, Qi Zhang, Vinitha Kuruvilla, Natalia Baran, Junichi Imoto, Kazuho Ikeo, Kaori Moriya, Yuko Murakami-Tonami, Koya Suzuki, Takashi Miida, Michael Andreeff, Christopher Vellano, Joseph R. Marszalek, Marina Konopleva
2. 発表標題	OxPhos inhibition induces formation of tunneling nanotubes in AML cells and facilitates mitochondrial transfer from BM stroma to AML that contributes to microenvironment-mediated drug-resistance of AML
3. 学会等名	61st ASH (American Society of Hematology) Meeting (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	鈴木浩也、向井智美、田部陽子、三井田孝、関戸好孝、村上（渡並）優子
2. 発表標題	LATS2変異を有した悪性腫瘍における合成致死を基盤とした細胞死誘導機構の検討
3. 学会等名	第23回日本がん分子標的治療学会学術総会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	鈴木 浩也、山岸 良多、向井 智美、田部 陽子、三井田 孝、村上 浩士、関戸 好孝、村上（渡並）優子
2. 発表標題	LATS2変異を有した悪性腫瘍における合成致死を基盤とした細胞死誘導機構の検討
3. 学会等名	第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 小菅清二、山田貴富、村上優子、饗場浩文、村上浩士
2. 発表標題 分裂酵母における DNA 複製と相同組換え開始を制御する Cds1 キナーゼと転写因子 Mei4 の機能解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 香里, 梁 夏恩, 鈴木 浩也, 村上 優子, 三井田 孝, 田部 陽子
2. 発表標題 急性骨髄性白血病における酸化的リン酸化阻害による代謝抑制効果とミトコンドリア移動
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 浩也、山岸 良多、向井 智美、田部 陽子、三井田 孝、村上 浩士、関戸 好孝、村上(渡並) 優子
2. 発表標題 LATS2変異を有した悪性中皮腫に対する合成致死誘導機構の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上(渡並) 優子、佐藤 綾人、鈴木 浩也、三井田 孝、村上 浩士、関戸 好孝
2. 発表標題 悪性中皮腫原因遺伝子変異に対する新規合成致死標的の探索
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 祐希、Zheng Ti、伏原 大地、新美 結士、中本 航介、橋谷 文貴、木村 康明、日吉 貴子、齋木 由利子、堀井 明、鈴木 哲朗、村上 優子、阿部 洋
2. 発表標題 リン酸フルオリド型プロドラッグの開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上（渡並）優子
2. 発表標題 合成致死表現型を指標とした新規悪性中皮腫治療薬標的の探索
3. 学会等名 先進ゲノム支援 拡大班会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 共有結合型GST阻害剤の開発
2. 発表標題 藤川遥加, 宍戸裕子, 木村康明, 友池史明, 村上優子, 青木正博, 阿部洋
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuko Murakami-Tonami, Shinichi Kiyonari, Yoko Tabe, Kenji Kadomatsu, Takashi Miida, Yoshitaka Sekido
2. 発表標題 Identification of the genes which show synthetic lethal phenotype with BAP1 mutations in malignant mesothelioma cells
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 香里、梁 夏恩、村上(渡並) 優子、鈴木 浩也、三井田 孝、田部 陽子
2. 発表標題 急性骨髄性白血病における酸化的リン酸化阻害の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小菅 清二、山田 貴富、饗場 浩文、村上 優子、村上 浩士
2. 発表標題 分裂酵母 DNA複製チェックポイントキナーゼ Cds1による転写因子 Mei4のリン酸化を介した減数分裂相同組換えの制御機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上(渡並) 優子、天野美希、小木曾杏奈、清成信一、紅朋浩、田部陽子、金田典雄、門松健治、三井田孝、村上浩士、関戸好孝
2. 発表標題 悪性中皮腫におけるBAP1遺伝子変異に対する合成致死遺伝子の網羅的探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kotoko Yamatani, Yoko Tabe, Kaori Saitoh, Haeun Yang, Yuko Tonami-Murakami, Koya Suzuki, Weiguo Zhang, Sonoko Kinjo, Kazuho Ikeo, Kaoru Mogushi, Masaki Hosoya, Shigeo Yamaguchi, Hironori Harada, Takashi Miida, Neil P. Shah, Yoshihide Hayashizaki, Marina Konopleva, Michael Andreeff
2. 発表標題 Upregulation of Bcl-2 confers resistance to FLT3 inhibition in FLT3-ITD AML with secondary acquired mutations.
3. 学会等名 61st American Society of Hematology Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoko Tabe, Kotoko Yamatani, Haeun Yang, Kaori Saito, Yuko Tonami-Murakami, Koya Suzuki, Weiguo Zhang, Sonoko Kinjo, Kazuho Ikeo, Masaki Hosoya, Kaoru Mogushi, Shigeo Yamaguchi, Hironori Harada, Takashi Miida, Neil P. Shah, Yoshihide Hayashizaki, Marina Konopleva, Michael Andreeff
2. 発表標題 Combined targeting of Bcl-2 and XPO1 overcomes acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in FLT3-ITD/TKD double mutant AML.
3. 学会等名 61st American Society of Hematology Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上(渡並)優子
2. 発表標題 悪性中皮腫におけるBAP1遺伝子変異に対する合成致死遺伝子の網羅的探索
3. 学会等名 先進ゲノム支援拡大班会議
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 LATS2変異疾患のための分子標的及びその利用	発明者 村上優子・鈴木浩也・三井田孝・関戸好孝・向井智美・山	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-191790	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 悪性中皮腫の治療剤	発明者 村上優子・佐藤綾人・三井田孝・関戸好孝	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-210554	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------