

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18610

研究課題名（和文）CRISPRスクリーニングによる前立腺癌のPARPとの合成致死遺伝子の網羅的探索

研究課題名（英文）Identification of synthetic lethal genes with PARP in prostate cancer

研究代表者

石津谷 祐 (Ishizuya, Yu)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00783854

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：3種の前立腺癌細胞株を用いたゲノムワイド機能喪失型スクリーニングにより、Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) と合成致死を示す遺伝子候補を得た。相同組み換え修復に限らず、DNA損傷やDNA複製に関連した遺伝子群が同定された。これらの遺伝子はPARPと同時に阻害することで相乗効果を示し、治療標的として有望である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

去勢抵抗性前立腺癌に対するPARP阻害療法は有望な治療法であるものの、現時点での治療対象は相同組み換え修復欠損を有する症例に限定されており、奏効期間も限られている。当研究ではPARPと合成致死を示す新たな遺伝子を明らかとした。PARPと同時に阻害することで、これまで無効と考えられた症例にも奏効する可能性があり、新規治療につながるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：By genome-wide loss-of-function screening using three prostate cancer cell lines, we obtained gene candidates for synthetic lethal with PARP. Genes related to DNA damage and DNA replication were identified in addition to homologous recombination repair. These genes show synergistic effects when they are simultaneously inhibited by PARP and are promising therapeutic targets.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 合成致死 DNA損傷

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌(Castration-Resistant Prostate Cancer : CRPC)のうち DNA2 本鎖切断に対する相同組み換え修復欠損(Homologous recombination deficiency : HRD)がある症例に対して Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) 阻害剤が新規治療薬として注目されている。しかし、有効な症例に限られていること、治療効果と HRD の有無が必ずしも一致しないこと、有効な症例でも獲得耐性により奏効期間が限られていることが課題として残されている。

CRPC の癌ゲノム解析により、約 20%の症例で HRD が存在することが判明し、PARP 阻害剤の臨床試験が実施されている。PARP 阻害剤の 1 つであるオラパリブは、第 II 相試験で HRD 有りの症例が、HRD 無しの症例でより有効性が高いことが示されたため HRD 症例のみを対象とした第 III 相試験が行われている。一方で、必ずしも PARP 阻害剤の効果は HRD の有無と一致せず、HRD 有りでも無効な症例や HRD 無しでも有効な症例が存在する。HRD の有無以外に PARP 阻害剤の効果を規定する未知の因子が存在することが示唆される。また、PARP 阻害剤が有効であった症例も耐性獲得により長期奏効が得られていないが、その耐性メカニズムは十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

前立腺癌において PARP と合成致死を示す新たな遺伝子を同定し、新規治療標的としての妥当性を評価することを主目的とする。同時に、PARP 阻害剤の耐性の原因となり得る遺伝子変異を同定することを副目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) CRISPR スクリーニングによる PARP との合成致死遺伝子候補の同定

4 種の前立腺癌細胞株(DU145, 22Rv1, LNCaP)にレンチウイルスベクターを用いて Cas9 を導入し、Cas9 安定発現前立腺癌細胞株を樹立した。

Cas9 安定発現前立腺癌細胞株に、レンチウイルスベクターを用いて 18,010 遺伝子を標的とする計 90,709 種の sgRNA を含んだ CRISPR ライブラリー(Tzelepis K, et al. Cell Rep.2016)を導入し、ゲノムワイド変異細胞ライブラリーを樹立した。この細胞ライブラリーを PARP 阻害剤の存在下、および非存在下(対照群)で 14 日間培養した。各細胞群より抽出したゲノム DNA に含まれる sgRNA 配列を次世代シーケンサーで読み、各 sgRNA の存在数を 2 群で比較することで、ノックアウトされると PARP 阻害剤存在下で細胞が生存しない遺伝子 = PARP との合成致死遺伝子の候補を得た。同時に、ノックアウトされると PARP 阻害剤存在下で細胞が生存する遺伝子 = PARP 阻害剤耐性の原因となる遺伝子の候補も抽出した。単一の前立腺癌細胞株ではなく、遺伝的背景の異なる 3 種の前立腺癌細胞株を用い、複数の細胞株で共通する遺伝子を候補遺伝子として抽出した。

#### (2)前立腺癌細胞株における候補遺伝子の PARP との合成致死性の検証

(1)で得られた候補遺伝子を前立腺癌細胞株で個別にノックアウトし、PARP と合成致死を示す、すなわち PARP 阻害剤の感受性が増強することを検証した。候補遺伝子の中に Druggable な遺伝子が存在すれば、その標的薬剤と PARP 阻害剤の併用が有効であるか検証した。

### 4. 研究成果

#### (1) CRISPR スクリーニングによる PARP との合成致死遺伝子候補の同定

CRISPR スクリーニングにおいてOlaparib処理により有意に生存細胞が減少した遺伝子群の Gene Ontology 解析を行ったところ 3 種の細胞株(DU145, 22Rv1, LNCaP)いずれも DNA repair が最上位であり、DNA replication や double-strand break repair がそれに続いた(図 1)。False Discovery Rate <0.1, を基準とし、3 種の細胞株から複数の PARP との合成致死遺伝子の候補、その機能不全が PARP 阻害剤耐性の原因となる遺伝子の候補を同定した。候補遺伝子のうち複数の細胞株で共通すること、前立腺癌組織において一定頻度で機能不全があると報告されていること条件とし、LIG1 を PARP との合成致死遺伝子として、TP53 を PARP 阻害剤耐性と関連する遺伝子として抽出した。

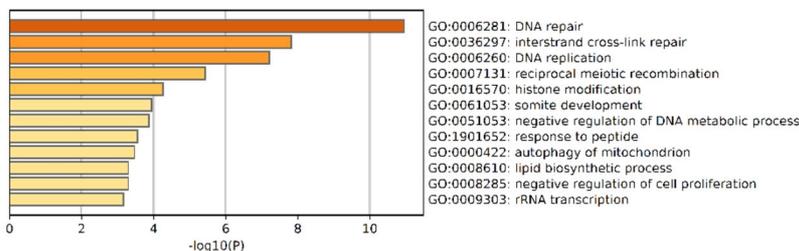


図 1. DU145 細胞において Olaparib 処理細胞で dropout する遺伝子の Gene ontology 解析

#### (2) 前立腺癌細胞株における候補遺伝子の PARP との合成致死性の検証

LIG1, TP53 に対する複数の gRNA を用い、前立腺癌細胞株においてこれらの遺伝子の機能を抑制

し、PARP 阻害剤(Olaparib, veliparib)に対する感受性の変化を増殖抑制試験で評価した。LIG1 の抑制により前立腺癌細胞株の PARP 阻害剤に対する感受性は増強し、LIG1 と PARP の合成致死性が示された(図 2)。また、TP53 機能を有する前立腺癌細胞株(LNCaP, 22Rv1)の TP53 の機能を gRNA で抑制したところ、PARP 阻害剤耐性となった。

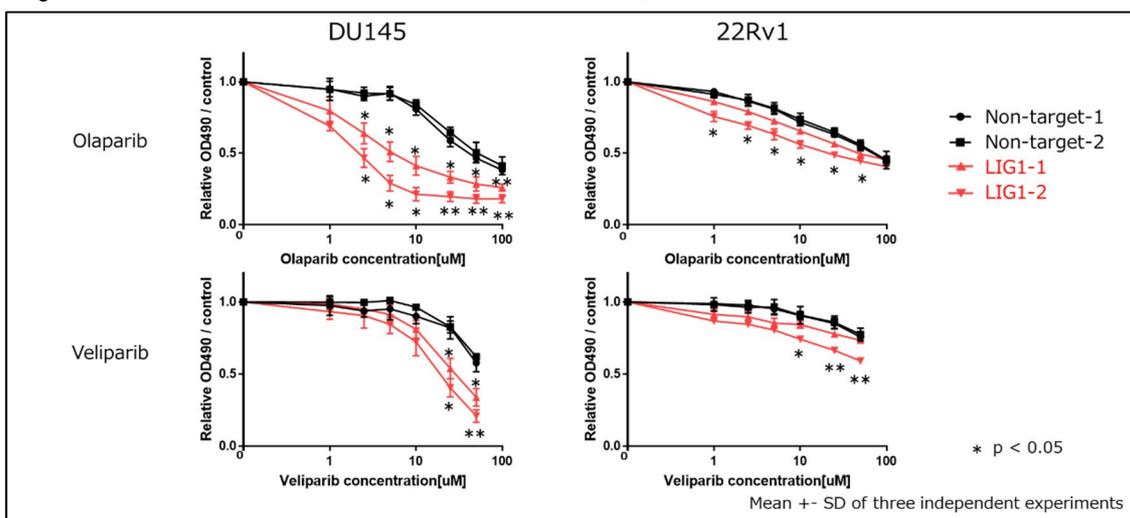


図 2. LIG1 抑制が PARP 阻害剤による前立腺癌細胞株の増殖抑制効果に与える影響

以上より、LIG1 は PARP と同時に阻害することで相乗効果が得られる可能性、LIG1 機能不全症例に対して PARP 阻害剤が奏効する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石津谷祐、他
2. 発表標題 CRISPRスクリーニングによる前立腺癌におけるPARPの合成致死遺伝子の網羅的探索
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石津谷祐、他
2. 発表標題 ゲノムワイドCRISPRスクリーニングによる 前立腺癌におけるPARPの合成致死遺伝子の同定
3. 学会等名 第29回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------