

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：82412

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K23928

研究課題名(和文) CRISPR遺伝子スクリーニングによる神経芽腫に対する新規創薬ターゲットの同定

研究課題名(英文) Genome-wide CRISPR/Cas9 screening for drug target discovery in neuroblastoma

研究代表者

大嶋 宏一 (Oshima, Koichi)

埼玉県立小児医療センター (臨床研究部)・血液腫瘍科・医長

研究者番号：60525377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPRスクリーニングで見出したATR分子の阻害がALLと神経芽腫でどのような役割を果たすのか検証した。まず、細胞株に対するATR阻害剤と神経芽腫治療に用いられるマホスファミド(MAF)の併用治療効果を分子学的に評価するために、MAFとATR阻害剤を用いて細胞処理し、ウェスタンブロッティングで評価したところ、ATR阻害はMAFによるATRリン酸化を阻害し、H2AXの蓄積が増加した。次に細胞株に対するATR阻害剤によるMAFのDNA損傷効果の増強が、殺細胞効果に繋がるかどうかを検証するために、in vitro細胞生存アッセイを行ったところ、ATR阻害剤がMAFの殺細胞効果を増強した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出した、「ATR阻害剤が神経芽腫治療で用いられるマホスファミドの殺細胞効果を増強する」という発見は、今後、さらに複数の神経芽腫細胞株やマウスを用いた患者由来がんモデルにて確認作業を行った後に、神経芽腫患者に対する臨床応用に発展する可能性がある。さらには、神経芽腫だけではなく、脳腫瘍や骨軟部腫瘍など、予後が未だに不良な他疾患に対しても、本研究で用いた包括的なスクリーニングを実施することによって、新たな治療レジメンの開発および創薬ターゲットの同定へと発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of inhibition of ATR molecules found in CRISPR screening in ALL and neuroblastoma. First, to molecularly evaluate the efficacy of the combination treatment of ATR inhibitors and mahosphamide (MAF) used to treat neuroblastoma in cell lines, we treated cells with MAF and ATR inhibitors and evaluated them by Western blotting. ATR inhibition inhibited ATR phosphorylation by MAF, resulting in an increase in H2AX accumulation. Next, in vitro cell survival assays were performed to test whether the enhancement of the DNA-damaging effect of MAF by ATR inhibitors on cell lines could lead to cell-killing effects.

研究分野：小児血液・腫瘍

キーワード：神経芽腫 CRISPR スクリーニング ATR阻害剤

1. 研究開始当初の背景

小児がんの中で最も頻度が高い疾患は急性リンパ性白血病であるが、頭蓋外固形腫瘍の中で最も頻度が高いのは神経芽腫であり、交感神経系組織が存在する副腎髄質や傍脊髄・傍大動脈部に原発する腫瘍である。手術療法や放射線療法などに加え、強力な化学療法を中心とする治療法の進歩により、1歳未満の小児だけではなく、1歳以上の小児においても本疾患の予後は改善しつつある。しかし、現在においても高リスク神経芽腫患者では5年生存率が約50%であり、さらに再発患者の全生存率は約20%と極めて不良である。これは、5年生存率が90%を超えつつある急性リンパ性白血病とは対照的である。高リスク神経芽腫や再発神経芽腫は、しばしば化学療法抵抗性であり、骨髄破壊的治療および造血幹細胞移植、放射線療法、免疫療法およびレチノイン酸を含む、より強力な救助療法にも関わらず、治癒が得られる可能性は未だに低い。以上より、神経芽腫の病態進行、再発および化学療法抵抗性の機序を解明することが本疾患研究の最優先事項である。

近年のゲノムの網羅的解析研究によって、高リスク神経芽腫のゲノム異常について多くの知見が得られつつあるが、主なものは1) *MYCN* 遺伝子増幅などのゲノムコピー数の異常、2) 他のがんに比較して、エクソンの体細胞変異率が低い、これまで *ALK*, *ATRX*, *PTPN11*, *ARID1B* や *ARID1A* などの変異が報告されている、3) テロメア延長を促進する *TERT* 遺伝子近傍の染色体再構成、である。このような神経芽腫に対する分子学的な理解の進歩にも関わらず、高リスク神経芽腫や再発神経芽腫が化学療法抵抗性を示すメカニズムはほとんど分かっていない。さらに、化学療法抵抗性を示す神経芽腫サンプル間およびサンプル内の著明な不均一性と、主に6種類の薬剤を組み合わせる複雑な化学療法レジメンの使用が、化学療法抵抗性を惹起する特異的なメカニズムの解明をさらに困難にしている。

本研究の仮説は、高リスク神経芽腫や再発神経芽腫において、臨床的パターンおよび遺伝学的な不均一性にも関わらず、限定された数の共通のメカニズムが化学療法抵抗性に寄与する、というものである。また、ゲノム解析や治療開発研究がより進んでいる急性リンパ性白血病に対して有効である治療戦略が神経芽腫にも応用可能である、という仮説も立てた。

2. 研究の目的

神経芽腫の研究において、“*MYCN* 遺伝子増幅の有無”に止まらず、それを超える化学療法抵抗性の病態理解が、本研究の最終的な目的である新たな創薬ターゲットの同定につながる。しかし、上述の仮説を検証するためには、神経芽腫サンプルの詳細な表現型解析と化学療法抵抗性の分子学的メカニズムの探索を可能とする新たな実験プラットフォームの開発および導入が必要である。そこで、神経芽腫細胞株とすでに樹立済みの急性リンパ性白血病細胞株を用いて、共通して治療に用いられる薬剤を用いた CRISPR/Cas9 スクリーニングを実施する。これによって、化学療法抵抗性に寄与しうる特異的な薬剤に対する耐性の表現型と遺伝子変異やパスウェイ異常を結びつけることが可能となる。

これまで、がんに対する CRISPR/Cas9 技術を用いたスクリーニングはいくつかの報告があるが、急性リンパ性白血病に対する有用性も報告されている¹。

3. 研究の方法

細胞培養

細胞培養は、37°C、5%CO₂の加湿環境下で行った。HEK293T 細胞は Genecopoeia、REH 細胞は Thermo Fisher Scientific 社から購入し、RCH および HPB 細胞は Adolfo Ferrando lab から提供された。HEK293T 細胞は、10%胎児ウシ血清 (FBS)、100 U/ml ペニシリン G および 100 μg/ml ストレプトマイシンを添加した DMEM 培地で培養した。REH と RCH 細胞は、10% FBS、100 U/ml ペニシリン G および 100 μg/ml ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培地で培養した。

使用薬剤

マホスファミド (MAF) は Santa Cruz Biotechnology 社から購入し、dimethylsulfoxide (DMSO) で溶解した。

in vitro 細胞生存アッセイおよび薬剤感受性試験

in vitro での細胞株の細胞生存率と薬剤感受性は、Cell Proliferation Kit I (Roche 社) を用いてテトラゾリウム塩 MTT の代謝還元を測定することにより、評価した。この実験では、各

抗がん剤の段階希釈系列を用いて 72 時間または 96 時間培養した後の薬剤感受性を評価した。

ウェスタンブロッティング

以下の抗体を用いてウェスタンブロッティングを標準的な方法で実施した。
 P-ATR (Thr1989) (1:1,000; 58014, Cell Signaling Technology), ATR (C-1) (1:250; sc-515173, Santa Cruz Biotechnology), P-CHK1 (Ser345; 133D3) (1:500; 2348, Cell Signaling Technology), CHK1 (G-4) (1:500; sc-8408, Santa Cruz Biotechnology), P-RPA32 (S33) (1:1,000; A300-246A, Bethyl Laboratories), RPA32 (9H8) (1:1,000; ab2175, abcam), γ H2AX (Ser139) (1:2,000; 613402, Biolegend) and Vinculin (VIN-11-5) (1:2,000; NB120-11193, Novus Biologicals)。

4. 研究成果

ヒトのゲノム DNA は常に内的および外的な要因により損傷の危機にさらされている。DNA の損傷はその要因にかかわらず細胞の生存に脅威を与え、がんをはじめとする様々な疾患を引き起こす原因となりうる。これらの DNA 損傷による脅威に対抗するため、生物は DNA 損傷チェックポイント機構を獲得し、DNA 損傷時には二つの経路が活性化されることが知られている^{2,3}。一つが、ATM (ataxia-telangiectasia mutated) - Chk2 (checkpoint kinase 2) - p53 と至る経路で、主に DNA の二重鎖切断の際に活性化され、主に G1/S チェックポイントで機能している。ATM と Chk2 は、p53 のリン酸化を通して転写因子である p53 を安定化させる。p53 は p21 などの転写を制御することで、細胞周期停止を引き起こす。多くのがん細胞では、このシグナル伝達経路は、遺伝子変異などによって不活性化されている。もう一方の経路である ATR (ATM-and Rad3-related) - Chk1 (checkpoint kinase 1) - Cdc25A 経路は、主に S 期の DNA 複製チェックポイントと G2/M チェックポイントで機能しているが、がん細胞ではこのシグナル伝達経路はむしろ亢進している。つまり、がん細胞では、正常細胞に比較して本経路への依存度が高いと考えられている。したがって、DNA 障害を引き起こす抗がん剤や放射線治療等と本経路を阻害する薬剤 (Chk1 阻害剤や ATR 阻害剤) を併用すれば、全ての DNA 損傷チェックポイントの不活性化につながり、致命的な染色体不安定性による “mitotic catastrophe” と呼ばれる分裂期細胞死をがん特異的に引き起こすことが期待されている。

神経芽腫では体細胞性の遺伝子変異が少ないが、構造変異 (structural variations; SVs) やコピー数多型 (copy number alterations; CNAs) を含む体細胞性の染色体異常が多いことが特徴である⁴⁻⁶。ALK, PTPN11, ATRX, NRAS などの頻度が高い体細胞遺伝子変異に加えて⁴⁻⁶、共通の遺伝的特徴として、染色体 1p の欠失、17q の一部増加、異数性などがある^{7,8}。2p の増加は、ALK や MYCN のコピー数の増加をもたらすことが多い。11q の欠失は DNA 損傷応答遺伝子である ATM, CHK1, MRE11, H2AX を破壊し、神経芽腫における追加となるリスク因子として使用されることがある^{4,6}。

今回我々は、神経芽腫細胞ではないが、ALL 細胞株を用いた CRISPR スクリーニングで見出した ATR 分子の阻害 (図 1) が ALL および神経芽腫においてどのような役割を果たすのか検証することにした。

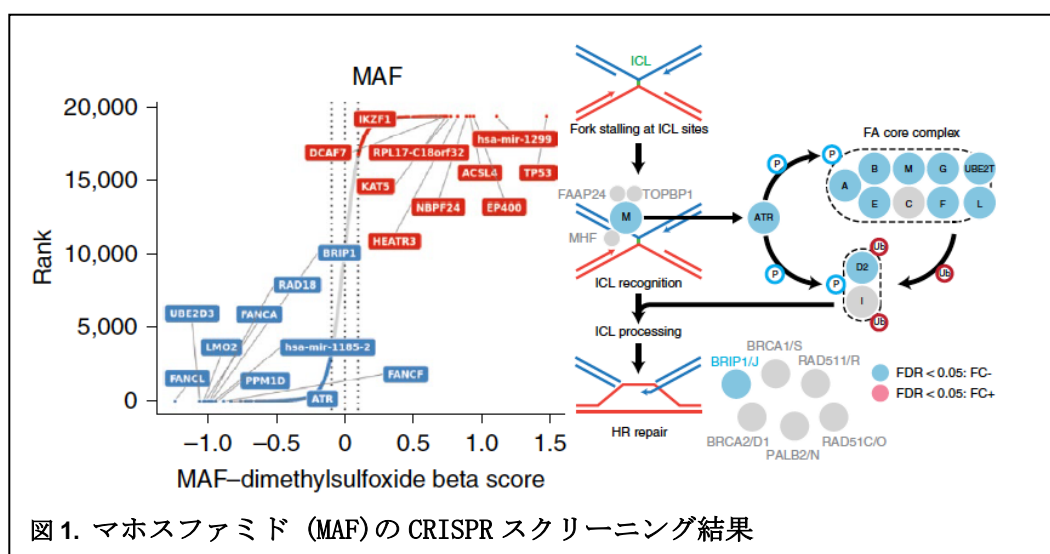
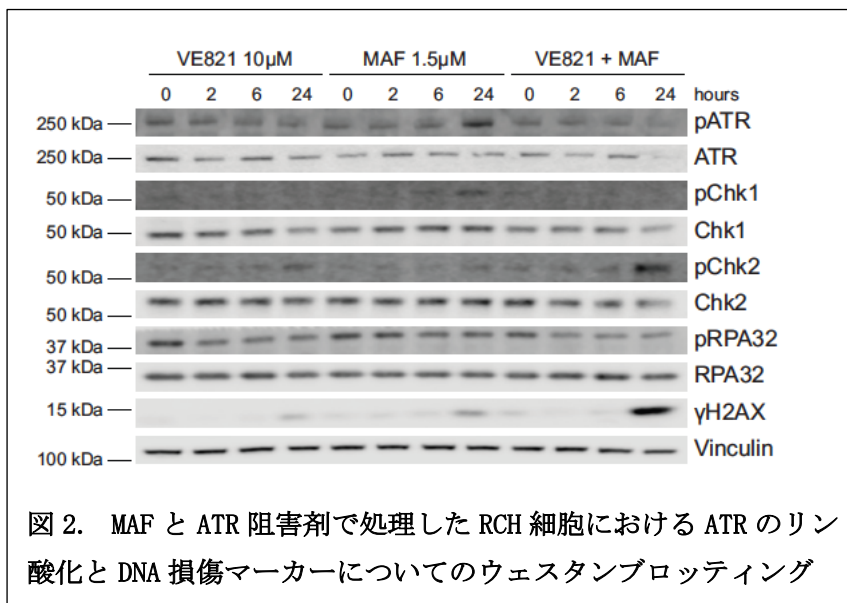
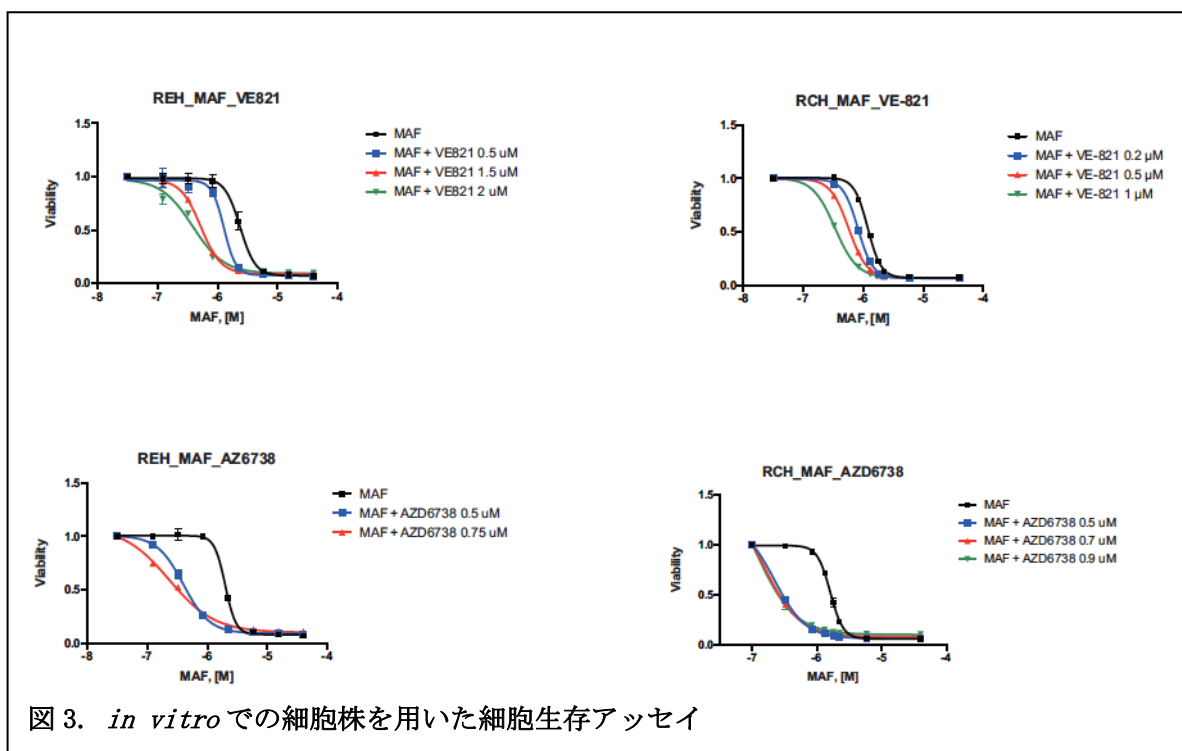


図 1. マホスファミド (MAF) の CRISPR スクリーニング結果

細胞株に対する ATR 阻害剤とマホスファミド(MAF)の併用治療における治療効果を分子学的に評価するために、RCH 細胞を MAF 単独、VE821 (ATR 阻害剤)単独、または MAF + VE821 の 3 通りの方法で治療し、ウェスタンブロッティングで評価したところ、ATR を阻害することによって MAF による ATR のリン酸化が阻害され、 γ H2AX の蓄積が示すように DNA 損傷が増加し、その結果、治療に対する反応が増強されることが判明した(図 2)。



上述のような、RCH 細胞に対する ATR 阻害剤による MAF の DNA 損傷効果の増強が、殺細胞効果に繋がるかどうかを検証するために、2 種類の細胞株 (REH および RCH 細胞) と 2 種類の ATR 阻害剤 (VE821 と AZD6738) を用いて *in vitro* 細胞生存アッセイを行った。両方の細胞株の実験において、2 種類友の ATR 阻害剤が MAF の殺細胞効果を増強することが確認することができた(図 3)。



神経芽腫細胞に対しても、ATR 阻害剤の有効性については神経芽腫モデルマウスを用いた複数の研究で示されており^{9,10}、本研究の成果が神経芽腫細胞でも確認できる可能性は高いと考えている。神経芽腫に対する key drug の一つであるシクロホスファミドの治療効果を増強しうる ATR 阻害剤の臨床応用を今後目指していきたいと考えている。

<引用文献>

1. Oshima K, Zhao J, Pérez-Durán P, et al. Mutational and functional genetics mapping of chemotherapy resistance mechanisms in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Nature Cancer*. 2020;1(11):1113-1127.
2. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*. 2017;66(6):801-817.
3. Menolfi D, Zha S. ATM, ATR and DNA-PKcs kinases-the lessons from the mouse models: inhibition not equal deletion. *Cell Biosci*. 2020;10:8.
4. De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, et al. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res*. 2010;16(17):4353-4362.
5. Grobner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*. 2018;555(7696):321-327.
6. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet*. 2013;45(3):279-284.
7. Attiyeh EF, London WB, Mosse YP, et al. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2005;353(21):2243-2253.
8. Bown N, Cotterill S, Lastowska M, et al. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1999;340(25):1954-1961.
9. Szydzik J, Lind DE, Arefin B, et al. ATR inhibition enables complete tumour regression in ALK-driven NB mouse models. *Nature Communications*. 2021;12(1).
10. Roeschert I, Poon E, Henssen AG, et al. Combined inhibition of Aurora-A and ATR kinase results in regression of MYCN-amplified neuroblastoma. *Nat Cancer*. 2021;2(3):312-326.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] 計1件 (うち査読付論文1件)

1. 著者名 大嶋 宏一	4. 巻 63
2. 論文表大 The role of CRISPR screening in leukemia research	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の項 1580-1585
掲載論文のDOI 10.11406/rinketsu.63.1580	査読の有無 有
オープンアクセス なし	国際共著 該当しない

6. 研究組織

研究分担者なし

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

なし

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

なし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------