

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17592

研究課題名（和文）乳癌におけるCRISPRゲノム編集によるCDK4/6阻害剤の網羅的耐性機序の解明

研究課題名（英文）Comprehensive evaluation of resistance mechanism of the CDK4/6 inhibitor by CRISPR/Cas9 gene editing in ER-positive breast cancer

研究代表者

永山 愛子（NAGAYAMA, Aiko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：00573396

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：ホルモン受容体陽性乳癌のモデルMCF7を用い、Cas9を導入し、その安定発現と酵素活性を確認した。Whole genome knockout libraryを用いてCRISPR/Cas9によるゲノム編集を行った細胞とCDK4/6阻害剤の一種であるpalbociclibとの共培養を約2週間行った。最終産物の細胞からgDNAを抽出し、各sgRNAに付随するバーコードをPCRで増幅させ、NGSによる解析を行った。現在は解析結果確認中であるが、既報にて確認されているRbのノックアウト株が細胞増殖を認めるなど耐性候補遺伝子同定のアッセイが機能したことを示唆する結果が確認されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はHR陽性乳癌におけるサイクリン依存性キナーゼ（CDK）4/6阻害剤の耐性遺伝子を同定することを目的とする。近年、内分泌療法とCDK4/6阻害剤の併用が無増悪生存期間の延長を示し、標準治療となった。しかし、薬剤耐性の発現と腫瘍再増大が臨床上的問題となっている。そこで、CRISPR/Cas9のゲノム編集技術を用いてWhole-genome knockout screenを行うことで耐性遺伝子を網羅的に探索し、癌細胞におけるCDK4/6阻害剤耐性の原理を明らかにする。本研究の手法を用いることで、新規耐性遺伝子を発見し、薬剤耐性克服の一助となる知見を得ることが可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：We utilized MCF7, a model of hormone receptor-positive breast cancer, and transfected Cas9. The stable expression of Cas9 and enzymatic activity were confirmed. The cells were co-cultured with palbociclib, one of approved CDK4/6 inhibitors, for about 2 weeks. The gDNA was extracted from the final product cells, and the barcode associated with each sgRNA was amplified by PCR and analyzed by NGS. The results of the analysis are currently being confirmed, but the preliminary data showed that knockout of Rb induced cell proliferation, which was confirmed in the previous reports. This result suggested that the assay for identifying candidate genes for the resistance worked.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 ゲノム編集 CRISPR/Cas9 CDK4/6阻害剤 細胞周期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

女性の悪性新生物で罹患率が最も高い乳癌は全世界的に主要な死因の一つである。特に日本人女性においては比較的若年の 40 歳代から 60 歳代にかけての発症が多く、転移再発への病期進行がもたらす社会的なインパクトは非常に大きい。乳癌のうち約 7 割はホルモン受容体 (HR) 陽性乳癌であり、特にエストロゲン受容体 (ER) を介したシグナル伝達によって増殖するという生物学的特徴が最も重要な知見とされてきた。

1960 年代に抗エストロゲン剤であるタモキシフェンが開発されて以降、ER を標的とした新たな内分泌療法が HR 陽性乳癌の治療成績を徐々に改善してきたが、内分泌療法への感受性低下が起きるため、生命予後の大きな改善は達成されてこなかった。近年、転移再発性の HR 陽性乳癌において、CDK4/6 阻害剤と内分泌療法の併用が、前向きランダム化比較試験で約 10 か月の無増悪生存期間 (PFS) の改善傾向を示し、標準治療として確立した。(図 1. Finn, R. S. et al. 2016. N Engl J Med 375(20)) 転移再発性乳癌の治療として、PFS が 2 年を超えたことは非常に大きなインパクトを持って受け入れられた。しかし、癌細胞の薬剤への耐性獲得と腫瘍の再増大を認めた後の予後は悪く、いかに CDK4/6 阻害剤の有効な患者を選別するか、また耐性獲得を克服するかが重要な課題であることは明白である。

無秩序な増殖を繰り返す癌において、細胞周期の制御は重要な治療標的となる。

CDK は 20 のファミリーで形成される酵素であり、そのうち CDK4/6 は特異的に癌抑制遺伝子である Rb をリン酸化し、G1 から S 期へ細胞周期を進める働きがある。CDK4/6 阻害剤であるパルボシクリブは Rb のリン酸化を阻害することで転写因子である E2F の活性化を抑え、抗腫瘍効果をあらわす (図 2)。申請者は癌細胞において極めて複雑に制御される細胞周期に働きかける CDK4/6 阻害剤の耐性メカニズムに興味を持った。

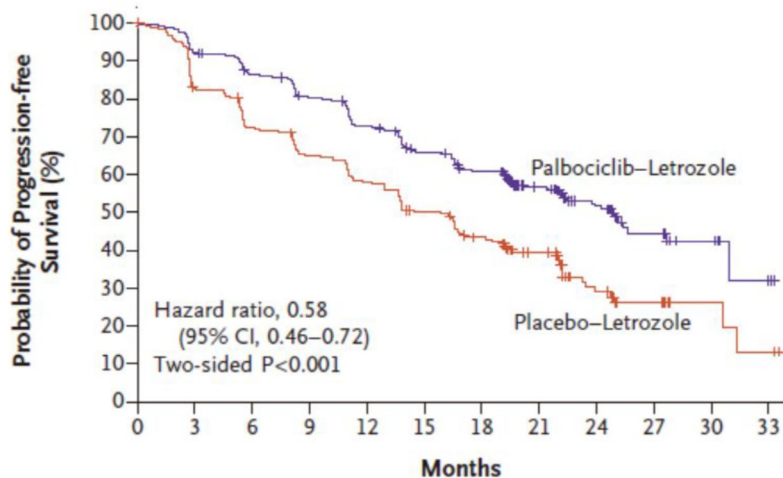


図 1. 第三相試験で CDK4/6 阻害剤であるパルボシクリブの上乗せは 10.3 か月の PFS 延長効果を認めた。(PFS 24.8 か月 vs 14.5 か月, HR 0.58, p<0.001)

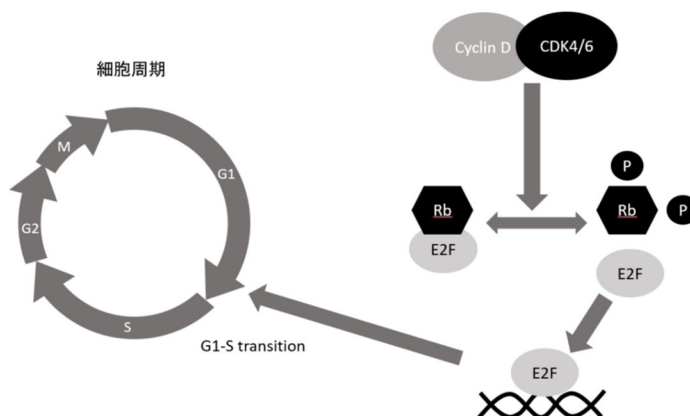


図 2. サイクリン依存性キナーゼ (CDK) による細胞周期の制御。サイクリン D が CDK4/6 と結合することで Rb がリン酸化され、細胞は G1-S チェックポイントを超えて S 期への進行が実現する。

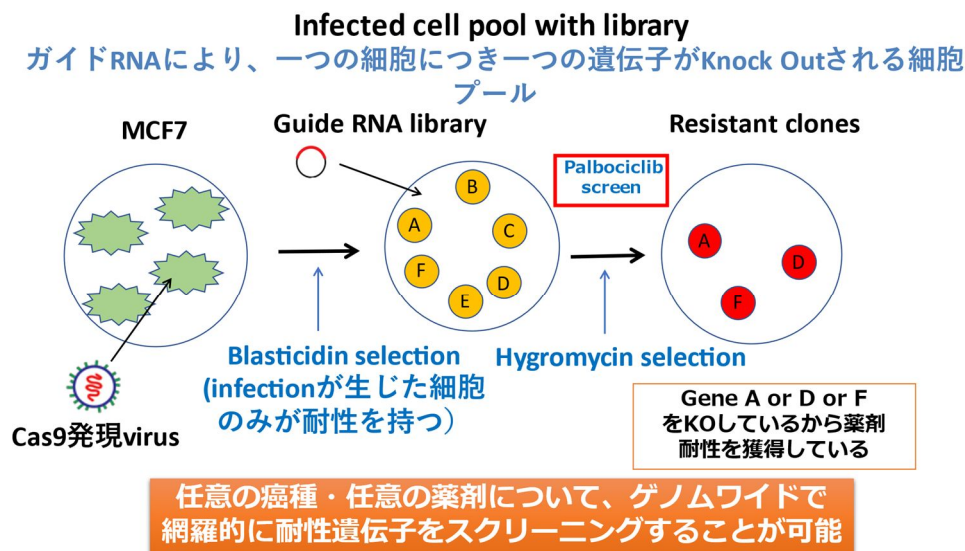
2. 研究の目的

本研究は、HR 陽性乳癌における CDK4/6 阻害剤の耐性メカニズムの網羅的解析と新規耐性メカニズムの同定を目的とする。CRISPR/Cas9 のゲノム編集技術を用いて whole-genome knockout screen を行うことで、生体内の heterogeneity をより正確に模倣し、網羅的な耐性遺伝子の探索が可能となる。その結果に基づいて、臨床検体における CDK4/6 阻害剤の効果予測・耐性予測バイオマーカーを同定し、薬剤耐性を克服する併用療法開発へつなげる知見を得たい。

3. 研究の方法

【研究計画 1】乳癌細胞株を用いた CRISPR/Cas9 knockout screen

Cas9 を安定的に発現する HR 陽性乳癌細胞株 MCF7 を作成する。薬剤の至適濃度を決定するため、異なる濃度の CDK4/6 阻害剤の一種であるパルボシクリブを用いて、Cas9-MCF7 の増殖阻害実験を行う。Cas9-MCF7 にレンチウイルスをベクターとした whole-genome library を感染させる。Hygromycin を用いて感染細胞のみを選択した後、細胞を vehicle 群、薬物投与群に分ける。パルボシクリブの濃度を用いて約 3 週間培養を行う。培養後の細胞から DNA を抽出し、それぞれの guide RNA に付随したバーコードを PCR 増幅させ、次世代シーケンサーの解析により耐性遺伝子を同定する。



#### 【研究計画 2】CDK4/6 阻害剤感受性の確認、臨床検体バイオマーカー探索

CRISPR/Cas9 knockout screen で同定された耐性遺伝子を含むカスタムライブラリーを作成し、異なる HR 陽性乳癌細胞株のモデル (T47D) で secondary screen を行い、耐性遺伝子の同定を確認する。CRISPR/Cas9 ゲノム編集で耐性遺伝子を knockout し、パルボシクリブでの IC50 を確認する。In vivo では、耐性遺伝子を knockout した MCF7 の xenograft マウスモデルをパルボシクリブで治療し、耐性の有無を評価する。

#### 4. 研究成果

ホルモン受容体陽性乳癌のモデル MCF7 を用い、Cas9 を導入し、その安定発現と酵素活性を確認した。Whole genome knockout library を用いて CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行った細胞と CDK4/6 阻害剤の一種である palbociclib との共培養を約 2 週間行った。最終産物の細胞から gDNA を抽出し、各 sgRNA に付随するバーコードを PCR で増幅させ、NGS による解析を行った。現在は解析結果確認中であるが、既報にて確認されている Rb のノックアウト株が細胞増殖を認めるなど耐性候補遺伝子同定のアッセイが機能したことを示唆する結果が確認されている。

本研究において最も特筆すべき独自性は、CRISPR/Cas9 knockout screen を用いた網羅的解析によって、従来の仮説にとらわれない耐性遺伝子を同定しようという初の試みにあると考える。従来の薬剤耐性のモデルは、細胞株に低濃度の薬剤を長期間暴露することで耐性株を樹立する方法がとられてきた。しかしながら、この手法では単一の耐性メカニズムを再現するにすぎず、仮説の検証に基づいた研究では新規性に富んだ耐性メカニズム同定が困難という短所があった。

近年開発された CRISPR/Cas9 はシンプルな RNA 誘導型のゲノム編集技術であり、約 2 万個の全遺伝子を pooled screen で迅速かつ正確にノックアウトすることを可能にした。この技術では、特定の染色体標的部位に対して特異的な sgRNA をガイドに、Cas9 ヌクレアーゼ存在下で染色体上に DNA 二本鎖切断を起こすことで変異体をノックアウトへと導く。従来からある shRNA や siRNA と比較して、効率的かつ最小限の off-target effect でゲノム編集が可能となるのが最大の特徴である。CDK4/6 阻害剤を用いた CRISPR/Cas9 knockout screen は報告がない。

CDK4/6 阻害剤耐性の原因として、effector 分子である Rb 欠損や CDK2 が活性化されることによる bypass activation が耐性の原因と報告されたが、臨床検体では CDK4/6、Cyclin D1、RB1 といった細胞周期に直接働きかける分子の発現は治療効果との相関を認めず、遠隔転移における Cyclin E1 (CDK2 を活性化し、G1-S 移行を誘導する) の高発現が唯一薬剤耐性との相関を示した。これらはいずれも仮説検証的な研究であり、複雑なネットワークで制御されている細胞周期の網羅的な耐性メカニズムの探索は困難であったため、本研究のもたらす知見は新たな耐性メカニズムの同定を可能にすると考えられる。

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
研究協力者	林田 哲  (Hayashida Tetsu)  (80327543)	慶應義塾大学・外科学教室・専任講師   (32612)	
研究協力者	高橋 麻衣子  (Takahashi Maiko)  (50348661)	慶應義塾大学・腫瘍センター・助教   (32612)	
研究協力者	関 朋子  (Sek i Tomoko)  (70528900)	慶應義塾大学・外科学教室・助教   (32612)	

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