

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2021  
課題番号：20K18090  
研究課題名(和文) CRISPRスクリーニングによる放射線増感ターゲットの探索と前立腺癌への治療応用  
  
研究課題名(英文) CRISPR screens identify novel targets that sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation.  
  
研究代表者  
波多野 浩士 (Hatano, Koji)  
  
大阪大学・医学系研究科・講師  
  
研究者番号：60762234  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、前立腺癌の治療選択においてがんゲノムの重要性が高まっている。本研究では、前立腺癌細胞株を用いてCRISPR/cas9システムを用いた網羅的ノックアウト・スクリーニングを行い、放射線増感ターゲット遺伝子の探索を行った。前立腺癌細胞株(PC3, 22RV1, LNCaP)において、共通して放射線増感効果を示すトップランクの候補を同定した。放射線増感遺伝子をノックアウトした前立腺癌細胞株を樹立し Colonyアッセイにて検証した。同細胞株では放射線治療後のDNA修復が遅れることを H2AXアッセイ、コメットアッセイにて確認した。今後はマウスモデルでの実験を追加し前立腺癌への治療応用を目指す。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌の治療においてがんゲノムの重要性が高まっている。放射線治療は前立腺癌に対する有効な治療法であり、近年骨転移を来した去勢抵抗性前立腺癌に対するRI内用療法が注目されている。しかし、RI内用療法単独の治療効果は限定的で治療後の再発が問題となる。放射線治療に影響を及ぼすがんゲノムの研究は、治療選択や新たな治療法の確立のためにも意義深い。本研究において、申請者らは放射線治療の感受性に影響を与えるターゲット遺伝子を同定した。この放射線増感ターゲット遺伝子を前立腺癌特異的に抑制することで、正常組織への副作用を軽減しつつ癌への放射線治療効果を高める新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, cancer genomics has become important in the selection of treatment for prostate cancer. We performed a comprehensive knockout screen using the CRISPR/cas9 system in prostate cancer cell lines to identify radiosensitizing target genes. We identified top-ranked candidate genes that commonly exhibit radiosensitizing effects in the prostate cancer cell lines (PC3, 22RV1, and LNCaP). By the colony formation assay, the radiosensitization efficacy was confirmed using prostate cancer cells in which radiosensitization target genes are knocked out. The DNA repair after radiation therapy was delayed in the knock-out cells which was confirmed by the H2AX assay and the Comet assay. Radiosensitivity was restored by knock-in of radiosensitizing target genes into the knock-out cell lines. We are planning additional experiment using mouse model in order to aim for therapeutic application to prostate cancer.

研究分野：泌尿器科学

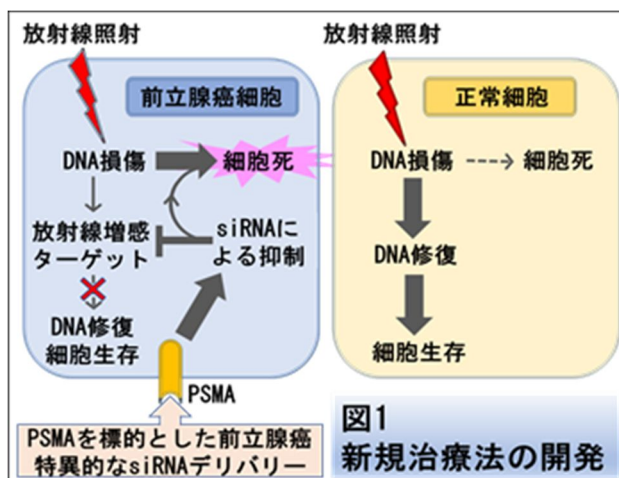
キーワード：前立腺癌 放射線治療

## 1. 研究開始当初の背景

放射線治療は局所浸潤あるいは骨転移を来たした前立腺癌に対して適応となる。近年、RI 内用療法が注目を集めており、骨転移を有する去勢抵抗性前立腺癌に対して塩化ラジウム 223 の治療効果が示された。さらに、前立腺癌に高発現する PSMA に着目した <sup>177</sup>Lu-PSMA 内用療法に対する有効例が報告されている。しかしながら、RI 内用療法単独の治療効果は奏功期間が限定的であり、治療後の再発が問題となる。去勢抵抗性前立腺癌では AR や TP53 の変異を約 50-60% と高頻度に認めるが、近年、BRCA1、BRCA2、ATM など DNA 修復遺伝子の変異を約 20% に認めることが報告された (Robinson D et al, Cell. 2015;161(5):1215-8.)。去勢抵抗性前立腺癌における塩化ラジウム 223 の治療効果は既報の DNA 修復遺伝子の変異を有する群で優位に高かったが、DNA 修復遺伝子の変異を認めない患者の中にも著効例がみられた (Isaacsson Velho P et al, Eur Urol. 2019;76(2):170-6.)。すなわち既報の DNA 修復遺伝子以外にも放射線増感ターゲットとなりうる遺伝子が存在する可能性が高い。これまでに DNA-PK、ATR、WEE1 など DNA 修復遺伝子の阻害剤が開発され癌に対する放射線増感効果が報告されている。しかしながら、臨床試験において癌への特異的なデリバリーを行わずにこれらの阻害剤を投与し放射線治療と併用すると、癌周囲の正常組織に対する強い放射線障害を惹起する結果となった (Brown JM, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2019;103(5):1182-3.)。したがって癌特異的な薬剤デリバリー法の開発が必須であり、“周囲の正常組織を傷害することなく、いかに癌に対する治療効果を高められるか” が今後の課題である。

## 2. 研究の目的

申請者らはこれまでに 810 種類の microRNA を用いた機能的スクリーニングを行い、放射線感受性を高める microRNA として miR-890、miR-744-3p を同定した (Hatano K et al, Nucleic Acids Res. 2015;43(8):4075-86.)。CRISPR スクリーニングは癌における新規治療ターゲットの網羅的探索と検証における有用性が示されており、本研究では CRISPR/cas9 システムを用いたゲノムワイドな網羅的スクリーニングにより放射線増感ターゲット遺伝子を探索する。放射線感受性には、従来知られている DNA 修復機構に加えて、癌の微小環境、腫瘍免疫など様々なメカニズムが関与することが近年報告されているがその詳細は解明されていない。



Prostate-specific membrane antigen (PSMA) は前立腺癌に特異的に高発現する膜タンパクであり、前立腺癌の原発巣、骨転移、さらに去勢抵抗性癌においても高発現するため前立腺癌特異的な診断および治療に有用である。本研究では、PSMA を標的として siRNA を前立腺癌特異的にデリバリーすることで放射線治療の効果増強を目指す。申請者らはジョンスホプキンス大学泌尿器科・Lupold 博士と共同研究を行い、“前立腺癌特異的に高発現する PSMA に結合する RNA アプタマーの開発”を行ってきた (Ni X et al, J Clin Invest. 2011;121(6):2383-90.)。RNA アプタマーは前立腺癌細胞膜上の PSMA と結合すると癌細胞内部にとりこまれ、RNA 切断酵素である Dicer により修飾をうけて siRNA としての効力を発揮する。本研究では前立腺癌に特異的に高発現する PSMA を標的として放射線増感ターゲット遺伝子に対する siRNA をデリバリーすることで、正常細胞への影響を最小限に抑え、癌に対する放射線治療効果を高める画期的新薬の開発を行う。

## 3. 研究の方法

申請者らは 4 種の前立腺癌細胞株 (PC3, 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。CRISPR スクリーニングにあたり、sgRNA が導入された細胞で標的遺伝子が確実にノックアウトされることを確認するため、それぞれの細胞株について複数のクローンの Cas9 機能効率を評価し、高効率にノックアウトを実現するクローンを選定した。次に 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 種類の遺伝子を標的とする計 90,709 種類の sgRNA を含んだ CRISPR ライブラリーを導入する (Tzelepis K, et al. Cell Rep. 2016;17(4):1193-1205.)。多重感染度を低く設定

して、1つの細胞につき1つの遺伝子がノックアウトされた、ゲノムワイド変異細胞ライブラリーを樹立する。この細胞ライブラリーを放射線治療群(4Gy, 6Gy)および無治療群にわけて11日間培養する。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解析し、各sgRNAの存在数をコントロール細胞群と比較することで、ノックアウトされると放射線治療への増感効果を示すターゲット遺伝子の候補を得ることができる。CRISPRスクリーニングによって得られたトプランクの放射線増感ターゲット遺伝子に対して、siRNAによる個々の遺伝子ノックダウンを行い、複数の前立腺癌細胞株を用いてClonogenic assayにより放射線感受性を検証する。

臨床応用にむけて次に課題となるのがsiRNAのデリバリー法である。本研究では、前立腺癌に高発現するPSMAを標的として前立腺癌選択的にsiRNAを導入可能なRNAアプタマーもしくはリポソームを開発する。RI内用療法に併用するためにはsiRNAを全身の癌転移巣にデリバリーする必要があるため、静脈投与により全身の遠隔転移巣にsiRNAをデリバリーする。申請者らは既にPSMA特異的な薬剤デリバリーを実証するためのマウスモデルを確立している(Mukherjee A and Hatano K, et al. Mol Cancer Ther. 2016;15(10):2541-50.)。マウス前立腺腫瘍モデルとしては、前立腺癌細胞株を用いた皮下腫瘍モデルに加えて、去勢抵抗性前立腺癌の患者検体より樹立したPDX (Patient-derived tumor xenograft) モデルを用いる。申請者らは、前立腺腫瘍による排尿障害改善のために経尿道的な前立腺切除術を行う去勢抵抗性前立腺癌患者のうち、同意を得られた患者の腫瘍検体を用いてマウスPDXモデルの作成を行っている。マウスPDXモデルは超免疫不全マウス(NOD/SCIDg)の腎被膜下に前立腺腫瘍組織を移植して作成する(Lawrence MG, et al. Prostate. 2015;75(13):1475-83.)。マウスPDXモデルを用いることでより実臨床に即した治療効果の検証が可能となる。本研究ではマウス前立腺腫瘍モデルを用いて、経静脈的にPSMAを標的とした前立腺癌選択的なsiRNAデリバリーを行い放射線治療との併用効果について検討する。

#### 4. 研究成果

はじめにCRISPR/cas9システムを用いた網羅的ノックアウト・スクリーニングにより放射線増感ターゲット遺伝子の探索を行った。申請者らは、3種の前立腺癌細胞株(PC3, 22RV1, LNCaP)を用いて、CRISPR/Cas9システムによる網羅的ノックアウト・スクリーニングを行い、放射線増感ターゲット遺伝子の探索を行った。3種類の前立腺癌細胞株において、共通して放射線増感効果を示すトプランクの候補遺伝子、および共通して放射線耐性効果を示す候補遺伝子の同定を行った。さらに、放射線増感効果を示す各候補遺伝子をCRISPRシステムによりノックアウトした前立腺癌細胞株の樹立を行った。放射線増感ターゲット遺伝子ノックアウト前立腺癌細胞株はWild typeの細胞株と比較して、放射線感受性が高まることを、Colonyアッセイ、H2AXアッセイ、コメットアッセイにより確認した。放射線増感ターゲット遺伝子ノックアウト前立腺癌細胞株に当該遺伝子をノックインすることで、放射線感受性は回復した。本研究成果は現在論文作成中であり、2023年度日本泌尿器科学会総会において発表する予定である。

申請者らは、同意を得られた12例の前立腺癌患者より腫瘍検体を採取して、マウスPDXモデルを作成した。このうち、1例の腫瘍検体において、マウスPDXモデルを確立し得た。今後は、本モデルを用いて、経静脈的にPSMAを標的とした前立腺癌選択的なsiRNAデリバリーを行い放射線治療との併用効果を検討する。前立腺癌に高発現するPSMAを標的としたsiRNAデリバリー技術との融合を行い、画期的新薬(ファースト・イン・クラス)の開発を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujita K, Kato T, Hatano K, Kawashima A, Ujike T, Uemura M, Imamura R, Okihara K, Ukimura O, Miki T, Nakajima T, Kaneda Y, Nonomura N.	4. 巻 111
2. 論文標題 Intratumoral and s.c. injection of inactivated hemagglutinating virus of Japan envelope (GEN0101) in metastatic castration-resistant prostate cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1692-1698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14366.	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 Hatano K, Fujita K, Nonomura N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Application of Anti-Inflammatory Agents in Prostate Cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 2680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm9082680.	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 Nakamura R, Hirata T, Suzuki O, Otani K, Kai N, Hatano K, Fujita K, Uemura M, Imamura R, Tanaka K, Yoshioka Y, Nonomura N, Ogawa K.	4. 巻 40
2. 論文標題 Stereotactic Body Radiotherapy Using CyberKnife for Localized Low- and Intermediate-risk Prostate Cancer: Initial Report on a Phase I/II Trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 2053-2057
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14162.	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 Hatano K, Fujita K	4. 巻 -
2. 論文標題 Extracellular vesicles in prostate cancer: a narrative review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transl Androl Urol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/tau-20-1210	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Hatano Koji, Nonomura Norio	4. 巻 39
2. 論文標題 Genomic Profiling of Prostate Cancer: An Updated Review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The World Journal of Men's Health	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5534/wjmh.210072	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Hatano Koji, Yoneyama Tohru, Hatakeyama Shingo, Tomiyama Eisuke, Tsuchiya Mutsumi, Nishimoto Mitsuhiro, Yoshimura Kazuhiro, Miyoshi Eiji, Uemura Hirotsugu, Ohyama Chikara, Nonomura Norio, Fujita Kazutoshi	4. 巻 126
2. 論文標題 Simultaneous analysis of serum 2,3-linked sialylation and core-type fucosylation of prostate-specific antigen for the detection of high-grade prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 764 ~ 770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-021-01637-x	査読の有無 有
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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 波多野浩士, 岡俊樹, 石津谷裕, 山本致之, 加藤大悟, 河嶋厚成, 藤田和利, 植村元秀, 野々村祝夫
2. 発表標題 CRISPRスクリーニングによる放射線増感ターゲットの探索と前立腺癌への治療応用
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023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
---------	---------