

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09345

研究課題名(和文) DNA損傷応答に着目した機能喪失スクリーニングによる前立腺癌の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy for prostate cancer focusing on DNA damage response

研究代表者

石津谷 祐 (Ishizuya, Yu)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00783854

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)：前立腺癌細胞においてPARP阻害剤の感受性に関与する遺伝子の候補を同定した。PARPと合成致死を示すことが既知である相同組み換え修復に関連する遺伝子群のみならず、塩基除去修復やDNA複製に関連する遺伝子の機能抑制によってPARP阻害剤の感受性が増強することが示された。同定した遺伝子の機能抑制により、前立腺癌細胞のPARP阻害剤によるDNA損傷が有意に増強し、アポトーシスに至ることが示された。また、前立腺癌組織で一定の頻度で変異を認めるTP53の機能不全により、前立腺癌細胞はPARP阻害剤耐性を獲得した。TP53機能不全とPARP阻害剤の効果との関連性を臨床検体を用いて検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規アンドロゲン受容体シグナル阻害薬などが使用可能となった現在でも去勢抵抗性前立腺癌の予後は不良である。相同組み換え修復欠損(Homologous recombination deficiency: HRD)症例に対してPARP阻害剤が有効であるが、その対象となるのは一部の症例のみであり、対象症例もいずれ治療抵抗性となることが課題である。本研究により新たに同定されたPARP阻害剤の感受性に関連する遺伝子は、新規治療標的あるいはPARP阻害剤耐性の予測因子として有望である。

研究成果の概要(英文)：We identified candidate genes involved in PARP inhibitor sensitivity in prostate cancer cells, and showed that functional repression of genes involved in base excision repair and DNA replication, as well as those involved in homologous recombination repair, which is known to be synthetically lethal to PARP, enhanced sensitivity to PARP inhibitors. DNA replication. Functional suppression of the identified genes significantly enhanced PARP inhibitor-induced DNA damage in prostate cancer cells, leading to apoptosis. In addition, dysfunction of TP53, which is mutated at a certain frequency in prostate cancer tissues, rendered prostate cancer cells resistant to PARP inhibitors, and the relationship between TP53 dysfunction and the effects of PARP inhibitors is being investigated using clinical samples.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 DNA損傷応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (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)においてDNA損傷応答遺伝子の機能不全が高頻度に見られることが明らかとなり、治療への応用が期待されている。特に、DNA2本鎖切断に対する相同組み換え修復欠損(Homologous recombination deficiency : HRD)症例に対してPARP阻害剤が新規治療薬として有望である。しかし、臨床試験においてその恩恵が示されているのは相同組み換え修復遺伝子の中でもBRCA1/2など一部の遺伝子の欠損症例のみであり、多くの前立腺癌患者のうち少数が適応となっているのが現状である。相同組み換え修復に関連することが既知の遺伝子以外にPARPと合成致死を示す遺伝子、あるいはその機能不全がPARP阻害剤耐性の原因となる遺伝子を同定できれば、PARPと同時に阻害することで相乗効果を得ること、PARP阻害剤耐性を事前に予測することが可能になると考えられる。

### 2. 研究の目的

前立腺癌においてPARPと合成致死を示す遺伝子および機能不全によりPARP阻害剤耐性となる遺伝子を同定すること。

### 3. 研究の方法

前立腺癌細胞株(DU145, 22Rv1, LNCaP)を使用し、CRISPR/Cas9システムによる機能喪失型スクリーニングを行った。Cas9タンパクとsgRNAライブラリーを導入した前述の前立腺癌細胞株をPARP阻害剤であるolaparib(野生型細胞では増殖に影響しない濃度である2.5ug/ml)の存在下で14日間培養し、DNAを抽出した。コントロールとしてolaparib非存在下で同様に14日間培養した細胞群と比較して、存在数が増減しているsgRNAを同定した。Olaparib存在下で生存細胞中のsgRNAが減少している遺伝子をPARPと合成致死を示す遺伝子、すなわちPARPと同時に阻害することで相乗効果を期待できる治療標的の候補とした。逆にOlaparib存在下で生存細胞中のsgRNAが増加している遺伝子を機能不全がPARP阻害剤耐性の原因となる遺伝子の候補とした。

CRISPR機能喪失型スクリーニングによって得られた、PARPと合成致死を示す遺伝子および機能喪失がPARP阻害剤耐性の原因となる遺伝子の候補を、スクリーニングに用いた3遺伝子およびPC3細胞を用いて個別にノックアウトし、PARP阻害剤に対する感受性が親株と比較して変化するか、細胞増殖assayにより検証した。

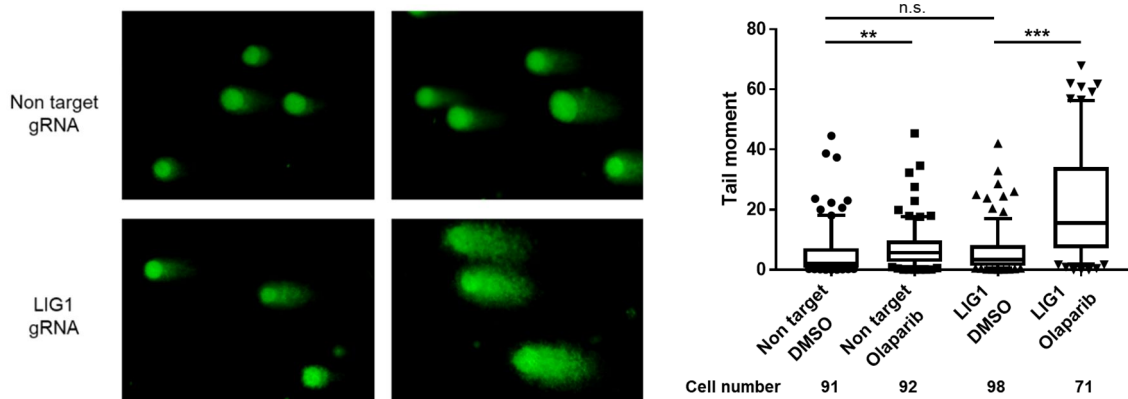
候補遺伝子の機能抑制が前立腺癌細胞のPARP阻害剤によるDNA損傷に与える影響をComet assayで、アポトーシスに与える影響をAnnexin V・propidium iodide染色により評価した。

### 4. 研究成果

機能喪失型スクリーニングにより、SUPT20H, LIG1, EDC4, ZSWIM7, FANCL, RNASEH2C等がPARPと合成致死を示す遺伝子の候補として抽出された。また、TP53機能不全がPARP阻害剤耐性の原因となると考えられた。これらの遺伝子のうち、相同組換え修復に関連することやPARPとの合成致死性が既知であるもの除いた遺伝子を個別にノックアウトしてPARP阻害剤感受性に变化があるか細胞増殖assayで評価したところ、複数の前立腺癌細胞株で共通してPARP阻害剤感受性に有意な変化が確認されたのは、LIG1(ノックアウトによりPARP阻害剤感受性が増強)とTP53(ノックアウトによりPARP阻害剤感受性が低下)であった。

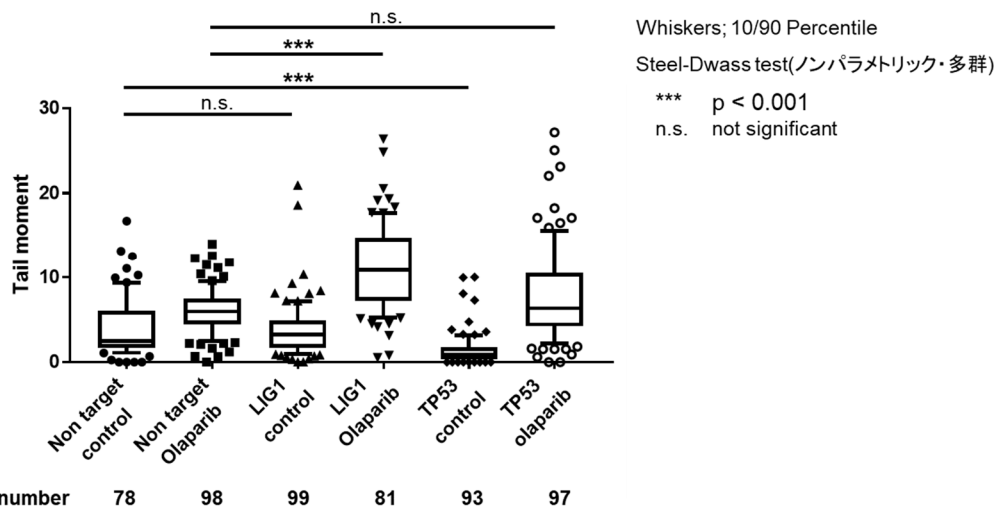
これらの2遺伝子のノックアウトが前立腺癌細胞株に対してPARP阻害剤を投与した際のDNA損傷に与える影響をComet assayで評価した。DU145細胞(TP53機能不全)において、野生株へのolaparib投与やLIG1ノックアウト株へのolaparib非投与ではDNA損傷は誘導されず、LIG1ノックアウト株にolaparibを投与したときのみDNA損傷が有意に増強することが確認された(図1)。

図1. DU145細胞のPARP阻害剤によるDNA損傷にLIG1機能抑制が与える影響



同様の結果は 22Rv1 細胞 (TP53 野生型) でも確認されたが、TP53 ノックアウトにより olaparib 投与による DNA 損傷が有意に減弱するという結果は得られなかった (図 2)。

図 2. 22Rv1 細胞の PARP 阻害剤による DNA 損傷に LIG1・TP53 機能抑制が与える影響



上記の結果より、TP53 ノックアウトは PARP 阻害剤による DNA 損傷を減弱させないにもかかわらず、PARP 阻害剤耐性を誘導すると考えられた。TP53 はアポトーシス誘導に参与していることが知られているため、TP53 をノックアウトすると本来はアポトーシスが誘導される DNA 損傷が起こってもアポトーシスに至らず細胞が生存しているという仮説を立てた。22Rv1 細胞の LIG1 と TP53 をノックアウトし、olaparib を投与して Annexin V・propidium iodide アッセイによりアポトーシスに至る細胞の割合を評価した。LIG1 ノックアウトによりアポトーシスに至る細胞が有意に増えることは確認されたが、Olaparib を 20uM という高濃度で投与しても野生株ではアポトーシスは誘導されておらず、TP53 ノックアウトによる変化は観察されなかった (図 3)。

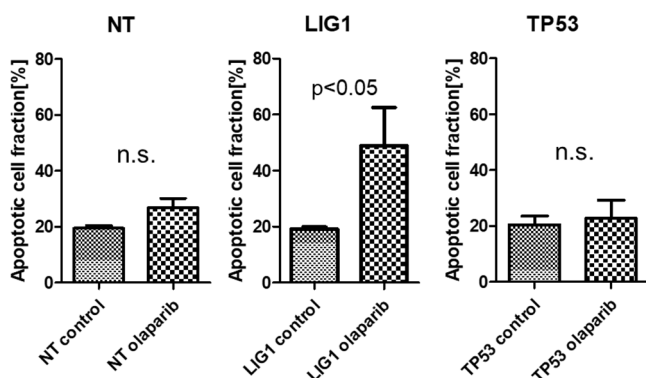
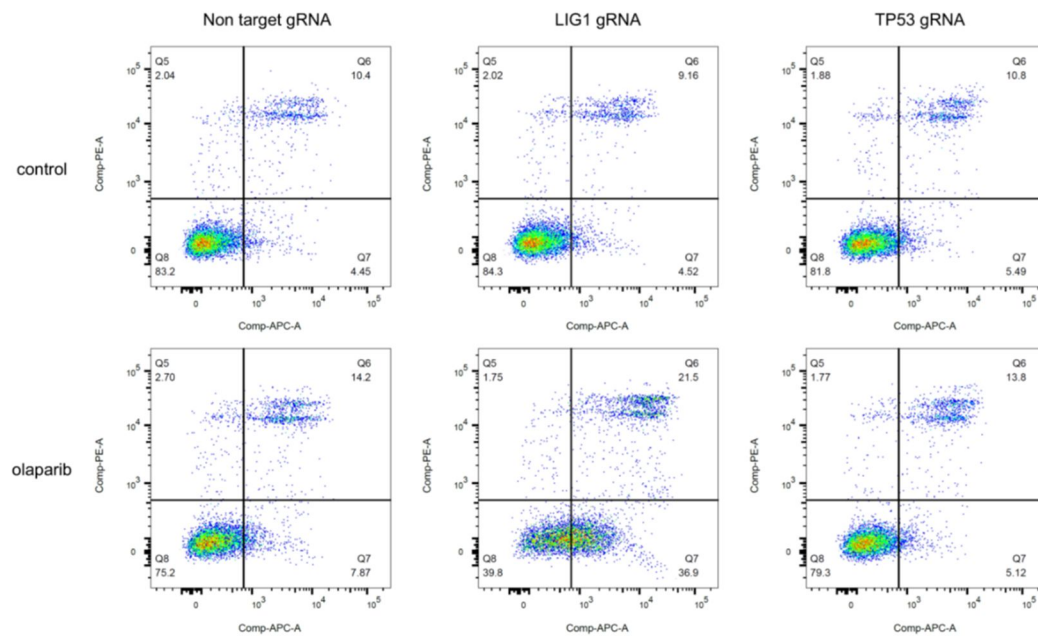


図 3. LIG1, TP53 機能抑制が 22Rv1 細胞の olaparib によるアポトーシス誘導に与える影響。

前立腺癌において LIG1 の機能不全は稀であるが、その特異的な阻害剤が開発されれば、PARP と同時に阻害することで既知の相同組換え修復欠損がない患者にも奏効する可能性がある。また、前立腺癌でも一定の頻度で見られる TP53 変異が PARP 阻害剤の耐性に関連するか、解明が必要である。

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
研究分担者	植村 元秀  (Uemura Motohide)  (40631015)	福島県立医科大学・医学部・特任教授    (21601)	

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