

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：83901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20854

研究課題名（和文）合成致死性を利用した新規悪性中皮腫治療標的の探索

研究課題名（英文）Exploring novel therapeutic targets for malignant mesothelioma using synthetic lethality.

研究代表者

向井 智美（Mukai, Satomi）

愛知県がんセンター（研究所）・分子腫瘍学分野・研究員

研究者番号：10706146

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：悪性中皮腫は予後不良の難治性希少がんで5年生存率は10%未満である。悪性中皮腫において明らかとなった高頻度の遺伝子変異の多くががん抑制遺伝子であるため、分子標的薬の開発が遅れている。近年様々ながんを対象に、合成致死遺伝子スクリーニングによる抗がん剤開発が進められているが、悪性中皮腫は利用できるサンプルが少なく研究が遅れている。所属研究室では、日本人悪性中皮腫患者より独自に樹立した細胞株を30株以上有しており、本研究ではこれらの細胞株を利用して、悪性中皮腫で高頻度に変異がみられるNF2の合成致死遺伝子をCRISPR libraryスクリーニングによって同定することを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、NF2が欠損した悪性中皮腫における腫瘍進展機構として、腫瘍抑制シグナル伝達経路であるHippo経路の破綻が原因であると報告されてきたが、本研究においては、Hippo経路の寄与は小さいものが多く、その他のシグナル伝達経路が原因である可能性が高いことが明らかとなった。本研究によって明らかとなる合成致死遺伝子を標的とする薬剤が、NF2欠損悪性中皮腫患者に対する新規の分子標的薬として期待される。

研究成果の概要（英文）：Malignant mesothelioma is a rare, refractory cancer with a poor prognosis and a five-year survival rate of less than 10%. Many of the high frequency of genetic mutations identified in malignant mesothelioma are cancer-suppressor genes, which has delayed the development of molecular targeted drugs. Recently, anti-cancer drug development by synthetic lethal gene screening has been conducted for various cancers, but malignant mesothelioma has lagged behind in research due to the paucity of available samples. In this study, we attempted to identify the NF2 synthetic lethal gene, which is frequently mutated in malignant mesothelioma, by CRISPR library screening using more than 30 cell lines originally established from Japanese malignant mesothelioma patients.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：悪性中皮腫 NF2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は、アスベスト曝露から 30~40 年の潜伏期間を経て発症する難治性の希少がんである。早期診断が困難で、診断時には既に根治的な手術が難しい。薬物療法としては、シスプラチン、ペメトレキセドの併用療法、さらに近年では抗 PD1 抗体ニボルマブが使用されているが患者の予後は未だ不良で、効果的な分子標的治療法も確立されていない。

これまでに所属研究室では、日本人の悪性中皮腫患者におけるゲノム解析を行い、少数のがん抑制遺伝子 (CDKN2A, NF2, BAP1) が高頻度に変異すること、がん遺伝子のドライバー変異は極めて稀であり、体細胞突然変異数も少ないことを明らかにしている (Hmeljak

et al, *Cancer Discovery*, 2018)。特に、腫瘍抑制性のシグナル伝達経路である Hippo 経路 (図 1) の構成因子である NF2 や LATS2 キナーゼの高頻度な不活化変異 (図 1 黒塗。数字は変異頻度) は世界に先駆けて見出し、Hippo 経路の不活化が転写共役因子 YAP/TAZ の核移行を伴う活性化を引き起こし、悪性中皮腫の増殖・進展を促進すること明らかにしてきた (Murakami et al., *Cancer Res.*, 2011; Tanaka et al., *Oncogene*, 2015)。近年では YAP/TAZ - TEAD を標的とした治療の可能性を報告している。世界中で YAP/TAZ - TEAD 阻害剤の開発が行われており、臨床応用が期待されているが、細胞種によっては増殖抑制効果が十分でない場合がある。これは細胞増殖に關与する別のシグナル経路の存在を強く示唆するもので、実際申請者は、LATS2 キナーゼに関する Hippo 経路非依存的な腫瘍抑制シグナル経路を多数報告している。しかし、NF2 について、腫瘍増殖に致命的なシグナル経路は何か、という「問い」が依然として存在する。

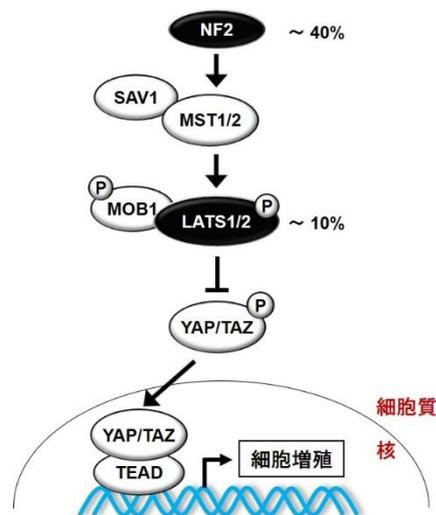


図1 Hippo経路

黒塗りの分子は悪性中皮腫で不活化変異が見られる分子。数字は悪性中皮腫における変異頻度。

### 2. 研究の目的

「合成致死性」とは、単独の遺伝子変異では細胞や個体に対する致死性を示さないが (図 2 ①, ②)、別の遺伝子の変異が共存すると致死性を発揮する現象である (図 2 ④)。合成致死遺伝子を同定することで、細胞増殖にクリティカルなシグナル経路を見出すことが可能である。本研究ではこの合成致死性を利用して、悪性中皮腫において高頻度に変異が見られる NF2 の合成致死遺伝子の同定及び治療標的としての有用性を前臨床レベルで検証することを目的とした。

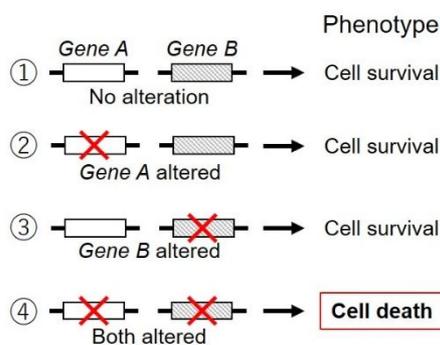


図2 合成致死性

### 3. 研究の方法

合成致死遺伝子スクリーニングは、CRISPR sgRNA virus library を利用する。スクリーニングを開始するにあたり、NF2 をロックアウトした中皮細胞株および、種々の NF2 欠損悪性中皮腫細胞株のうち、スクリーニングに適した細胞を選択する (研究成果 (1))。選択した細胞に Cas9 を発現させた後、sgRNA library を感染させ、抗生物質 (Puromycin) によるセレクションを行

い、一定期間培養する。抗生物質のセレクションを早期に終了させた、イニシャルセレクションサンプルをコントロールとし、ネガティブスクリーニングにより NF2 の合成致死候補遺伝子を見出す (図 3) (研究成果 (2))。

#### 4. 研究成果

(1) NF2 をロックアウト (KO) した中皮細胞株および、種々の NF2 欠損悪性中皮腫細胞株それぞれに、NF2 を発現させた細胞を作製し、各細胞の増殖における NF2 の寄与を検討したところ、NF2 欠損悪性中皮腫細胞ではすべての細胞株で NF2 の発現による増殖抑制が確認できた。一方

で、NF2 KO 中皮細胞では有意な差が見られなかった。さらに、NF2 欠損による細胞増殖が、Hippo 経路非依存的か否かを検討するため、NF2 欠損悪性中皮腫細胞における YAP の活性化状態 (図 4) や、YAP/TAZ-TEAD 阻害剤に対する増殖応答、YAP/TAZ-TEAD の標的遺伝子の発現を検討した。その結果、程度の差はあるものの、多くの NF2 欠損悪性中皮腫細胞は Hippo 経路非依存的であることが明らかとなった。これらのうち、ヌードマウスへの造腫瘍能や、他の遺伝子変異等を考慮し、スクリーニングに使用する細胞株を決定した。

(2) スクリーニングを開始するにあたり、Cas9 およびロックアウトウイルスの作製、抗生物質の最適濃度の検討等、種々の予備実験を行い、スクリーニングを開始した。スクリーニングは、培養 dish を用いた 2D 環境で行ったが、これに加え、ヌードマウスの皮下移植を行い、3D 環境で培養するサンプルも用意した。ヌードマウスへの生着が悪く、増殖に時間を有

しているが、全てのサンプルがそろった後、NGS 解析を行う。今後、得られた合成致死候補遺伝子について、正常細胞および NF2 欠損悪性中皮腫細胞においてノックダウンやノックアウトを行い、NF2 の合成致死遺伝子であるか検証する。また、NF2 および同定遺伝子が関与する腫瘍進展メカニズムについても明らかにし、悪性中皮腫における治療標的の創出を目指す。

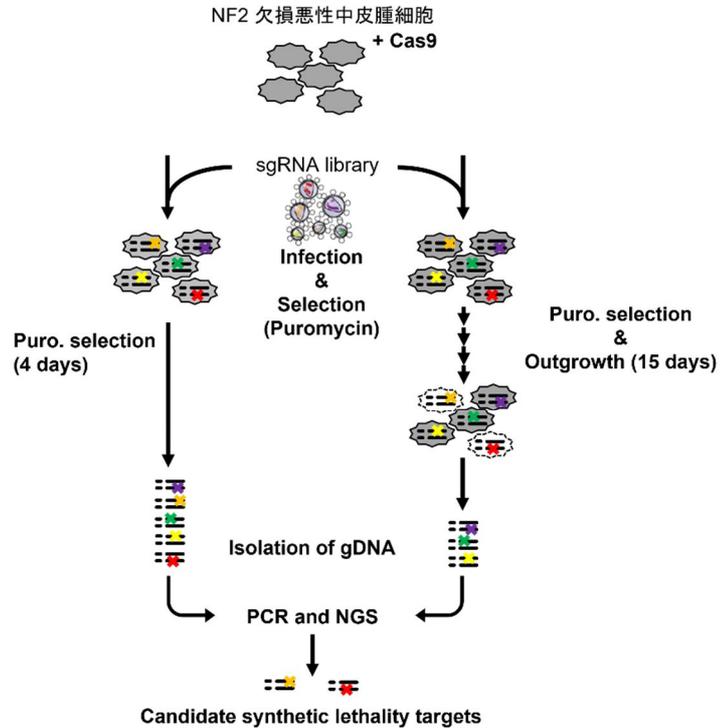


図3 CRISPR library を利用した合成致死遺伝子スクリーニングの概要

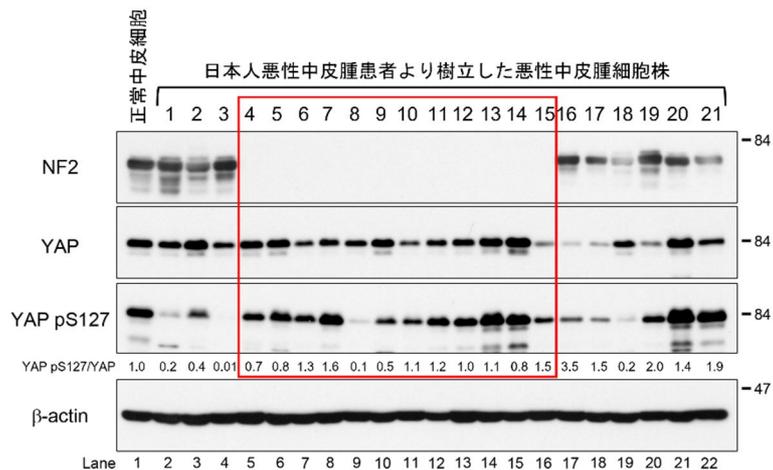


図4 種々の細胞株におけるNF2 の発現とYAPの活性

YAP のリン酸化 (pS127) は YAP の活性化の指標である。低リン酸化状態では活性が高く、高リン酸化状態では活性が低い (図1 参照)。赤枠内は NF2 欠損中皮腫細胞株の結果。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Suzuki Koya, Tange Masaki, Yamagishi Ryota, Hanada Hiroyuki, Mukai Satomi, Sato Tatsuhiko, Tanaka Takeshi, Akashi Tomohiro, Kadomatsu Kenji, Maeda Tohru, Miida Takashi, Takeuchi Ichiro, Murakami Hiroshi, Sekido Yoshitaka, Murakami-Tonami Yuko | 4. 巻<br>8         |
| 2. 論文標題<br>SMG6 regulates DNA damage and cell survival in Hippo pathway kinase LATS2-inactivated malignant mesothelioma  | 5. 発行年<br>2022年   |
| 3. 雑誌名<br>Cell Death Discovery   | 6. 最初と最後の頁<br>446 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41420-022-01232-w  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>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<br>-         |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>赤尾謙、佐藤龍洋、向井智美、平野雅規、関戸好孝        |
| 2. 発表標題<br>新規TEAD阻害剤の悪性中皮腫細胞株に対する抗腫瘍効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>日本癌学会総会                        |
| 4. 発表年<br>2022年                           |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---------|---------|
|---------|---------|