

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290053

研究課題名(和文) 悪性中皮腫細胞において合成致死を示す遺伝子の同定とその臨床応用

研究課題名(英文) Identification of genes which shows synthetic lethality in malignant mesothelioma cells and application of them in clinics

研究代表者

関戸 好孝 (SEKIDO, YOSHITAKA)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・副所長兼部長

研究者番号：00311712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は極めて難治性の腫瘍である。悪性中皮腫における原因遺伝子の異常は、がん抑制遺伝子の異常が多いため、それらの遺伝子異常に対する直接的な分子標的薬の開発は極めて難しい。悪性中皮腫においてしばしば変異が見られるBAP1がん抑制遺伝子に着目し、遺伝子の網羅的なスクリーニング実験を行い、BAP1遺伝子変異と合成致死を示す遺伝子(その遺伝子に異常が生じるとBAP1遺伝子異常を有するがん細胞は死滅するが正常細胞は生存する。)を探索した。BAP1遺伝子変異を有する悪性中皮腫において、いくつかの興味深い遺伝子が新たに治療の分子標的となりうるということが明らかとなった

研究成果の概要(英文)：Malignant mesothelioma is a highly refractory disease against conventional therapies. Since major genes responsible for malignant mesothelioma development are primarily tumor suppressor genes, it is very difficult to develop molecular target drugs based on these specific gene mutations. We focused on the BAP1 tumor suppressor gene, which is one the most frequently mutated in malignant mesothelioma, and performed genetic screening to identify genes which show synthetic lethality with this genes (synthetic lethality means that simultaneous alterations of two genes induce cell death of cancer cells but not normal cells). We found that several interesting genes show synthetic lethality with BAP1 mutation and can be applied for promising targets for new molecular target therapy against malignant mesothelioma.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん 腫瘍抑制遺伝子 ゲノム 悪性中皮腫 合成致死

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 年の潜伏期を経て発症する極めて難治性の腫瘍である。本邦においてはアスベストの規制が遅れたため、今後、中皮腫の患者数の増加が見込まれ、2020-2025 年ごろをピークに現在の 4-5 倍の死亡者数が予想されている。

悪性中皮腫の原因の解析研究は他の発症頻度の高い腫瘍に比べて極めて遅れている。悪性中皮腫におけるがん抑制遺伝子異常に関しては古典的ながん抑制遺伝子である p16^{INK4a}/p14^{ARF} 遺伝子が高頻度に変異している。さらに、家族性腫瘍の原因遺伝子である神経線維腫症 2 型遺伝子 (NF2) の異常が悪性中皮腫において高頻度 (悪性中皮腫の 40-50% で不活化変異) に認められることを研究代表者が世界に先駆けて明らかにした (Sekido et al, Cancer Res 1995)。さらに研究代表者らは NF2-Hippo シグナル伝達系に係わる LATS2 遺伝子が悪性中皮腫の新規がん抑制遺伝子であることを明らかにした (Murakami et al., Cancer Res 2011)。最近では、NF2-Hippo シグナル伝達系の不活化と TGF-beta 系の活性化が協調して結合組織成長因子 (CTGF) の転写亢進に働き、中皮腫組織の間質造成・悪性を誘導することを報告した (Fujii et al., J Exp Med 2012)。

近年、米国の 2 つのグループから染色体 3 p に局在する BAP1 遺伝子が悪性中皮腫の約 25% において不活化し、悪性中皮腫におけるがん抑制遺伝子であることが報告された (Bott et al., Nat Genet 2011, Testa et al., Nat Genet 2011)。ユビキチン化酵素である BAP1 はヒストン修飾に係わり多くの遺伝子発現に調節に関与することが示唆されている。しかし、現在まで悪性中皮腫において明らかとなった頻度の高い遺伝子変異はすべてがん抑制遺伝子であり、活性型のがん遺伝子変異の頻度は極めて低い。このため、既存のチロシンキナーゼ阻害剤などの多くはほとんど有効性をしめさず、悪性中皮腫に対する効果的な分子標的治療法は未だ確立されていない。

2. 研究の目的

悪性中皮腫において、NF2-Hippo シグナル伝達系の高頻度の不活化により恒常的に活性化しているがん遺伝子 YAP を標的とする治療戦略も国内外のグループにおいて追求されているが、YAP 自身キナーゼ活性を持たないため、YAP 阻害剤の開発は極めて困難な状

況にある。このような状況のもと、悪性中皮腫において高頻度の変異を呈する NF2 や BAP1 ががん抑制遺伝子異常と合成致死を示す遺伝子が明らかになれば、同定された遺伝子を基軸とした新たな分子診断・分子標的治療法の開発研究に応用できることが極めて高く期待される。

3. 研究の方法

(1) 合成致死スクリーニング

愛知県がんセンターで樹立した日本人患者由来の悪性中皮腫細胞株あるいは ATCC より購入した中皮腫細胞株の中で、NF2 あるいは BAP1 ががん抑制遺伝子 (欠失) 変異を有する細胞株 (親株) にそれぞれの野生型遺伝子を導入し、安定発現細胞株を樹立する。現在までの検討で、これらの野生型遺伝子の導入による増殖・浸潤抑制能あるいはアポトーシス誘導能が細胞株毎に異なることが明らかになっており、遺伝子導入による細胞増殖抑制効果が比較的軽度～中等度である細胞株を用いる。

レンチウイルス shRNA ライブラリーをそれぞれの遺伝子欠失をきたしている悪性中皮腫細胞株 (親株) および野生型遺伝子導入株に感染させ培養を行う。Sigma-Aldrich 社の shRNA ライブラリー (MISSION shRNA ライブラリー) を使用する。このライブラリーの 1 pool は 10K の lentiviral shRNAmir クローンから構成されており、各遺伝子に対して平均 5 個の shRNA クローンが対応し、標的遺伝子としてはヒト約 1 万 8 千標的遺伝子を網羅している。細胞に感染後、ゲノム DNA の中にランダムに組み込まれる。

具体的には、対象とする腫瘍抑制遺伝子 (BAP1 あるいは NF2) (欠失) 変異細胞株 (親株) および野生型 (BAP1 あるいは NF2) の腫瘍抑制遺伝子を導入した細胞株にそれぞれ 10K クローンの shRNA ライブラリーを 1~7 pool 感染させて、培養後、ゲノム DNA を抽出して次世代シーケンサーにより解析する (1 次スクリーニング)。1 次スクリーニングは Triplicate で施行し、3 度の実験で共通して増殖抑制を引き起こす遺伝子群を抽出する。1 次スクリーニングにおいて候補遺伝子は数百~千単位でピックアップされることが予想されるので、遺伝子群に対してパスウェイ解析等と同じパスウェイに属する遺伝子を選別する等、分類・順位付けを行う。

順位付けを行った合成致死の候補遺伝子に対して 2 次スクリーニングを行う。候補遺

伝子が多数にわたる場合には、上記による分類、およびそれぞれの遺伝子についての現在までの研究報告、阻害剤の availability など参考に上位 20-50 遺伝子に関して解析を行う。

2 次スクリーニングで増殖抑制効果が認められた候補遺伝子に対してはさらに複数の shRNA によるノックダウン実験を行い、合成致死が誘導されるかどうかを確認する。合成致死候補遺伝子に対する直接的な阻害剤、あるいは関係するパスウェイに対する阻害剤が available な場合には、それらを用いて検討を行う。

(2) 特異的阻害剤による中皮腫細胞増殖抑制の検討

現在までの BAP1 や NF2 の機能的な解析報告から、これらの遺伝子の不活性化と合成致死の表現型を示す可能性があり、特異的阻害剤が利用可能な分子を選択し、in vitro での検討を行う。対象とする候補分子（および対応する特異的阻害剤）として、チューブリン (Nocodazole)、ピルビン酸リン酸化酵素 (Shikonin)、カゼインキナーゼ 1 δ (IC261)、およびポリ ADP ポリメラーゼ (MC2050 およびアミノベンズアミド) を対象とする。BAP1 および NF2 の変異および野生型中皮腫細胞株において阻害剤による細胞増殖抑制効果の差があるか否か検討する。

4. 研究成果

(1) BAP1 合成致死スクリーニング

脱ユビキチン化酵素をコードする BAP1 蛋白の機能はヒストン修飾による標的遺伝子の転写制御や DNA 損傷 (2 重鎖切断) 時の修復における役割が想定されているが、悪性中皮腫における BAP1 機能の実態は未だ明らかではない。悪性中皮腫細胞株を用い、BAP1 と合成致死 (一方の遺伝子の不活化では細胞は生存するが、両方の遺伝子が不活化した場合、細胞死が誘導されること) の表現型を見いだすための実験を行った。細胞株は BAP1 変異中皮腫細胞株 NCI-H28 株に野生型 BAP1 を過剰発現した細胞株及びコントロール株として H28 に Venus を過剰発現した細胞株を用いた。

ゲノムワイドに遺伝子発現を阻害可能なレンチウイルス shRNA ライブラリーを BAP1 過剰発現細胞株およびコントロール細胞株に感染させ、スクリーニングを行った。培養後、両細胞株よりゲノム DNA を抽出し、ゲノ

ム DNA にインテグレートされた shRNA の配列を次世代シーケンサー MiSeq により同定した。実験は triplicate で行った。

コントロール細胞株では shRNA が存在するものの、BAP1 過剰発現細胞株ではインテグレートされた shRNA コピー数の少ない遺伝子 1074 個を抽出した。同時に、BAP1 変異と悪性中皮腫患者予後に関係のある遺伝子群を既存のデータベースより 616 個抽出し、両者を比較することによりさらに候補遺伝子を約 200 個に絞り込みを行った。

これらの 200 個の遺伝子産物の発現レベルの検討やパスウェイ解析から、BAP1 変異と合成致死を示す可能性のある有力な候補遺伝子を順次検討した。DNA 複製や DNA 損傷修復、さらにはオートファジーに関わる遺伝子群が有力候補と考えられた。特にオートファジーに関わる遺伝子 X が関与する経路については特異的な阻害剤が available であったため、それを投与したところ、予想どおり BAP1 欠損細胞株では著しい腫瘍抑制効果が認められた (図 1)。

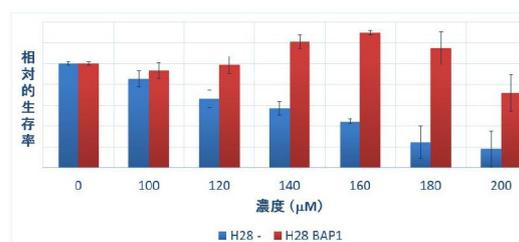


図1. BAP1遺伝子を導入したH28 株に比べ、H28親株はオートファジー阻害剤による著しい細胞増殖抑制効果が検出された

さらに、NF2 や LATS2 変異についてもそれぞれの遺伝子の変異を持つ細胞株 (NCI-H290 株および MST0-211H 株) についても同様の実験を行い、有力な候補遺伝子を抽出した。

以上の結果は、悪性中皮腫において高頻度に変異を示す BAP1、NF2 において合成致死を示す遺伝子の同定が可能であり、遺伝子ノックダウンあるいは特異的阻害剤による悪性中皮腫細胞の選択的な治療が行えることを強く示唆した。

(2) 特異的阻害剤による中皮腫細胞増殖抑制

BAP1 や NF2 と合成致死を生じる可能性のある分子およびパスウェイについて in silico の検討によって抽出された分子に対して特異的阻害剤による検討を行った。4 種類の標的分子に対し、複数の中皮腫細胞株を用い、細胞増殖抑制実験を行った。その中でピルビン酸リン酸化酵素 M2 (PKM2) に対する阻害剤

シコニンが、NF2 遺伝子変異を有する 2 株 (H290 株、H2373 株) に対して増殖抑制効果を有する一方、NF2 が野生型である H28 株、H2452 株では増殖抑制効果がみられないことから、NF2 変異と PKM2 の発現低下が合成致死表現型を示す可能性が示唆された。

シコニンの標的分子 PKM2 に対する shRNA を用いても同様に NF2 変異細胞株に特異的な細胞増殖抑制効果が確認された。さらに、悪性中皮腫において重要な役割を担う Hippo Pathway の因子が NF2 変異株特異的に PKM2 のノックダウンで発現が低下することが示された。以上の結果は、PKM2 の障害が、NF2 変異を有する悪性中皮腫細胞に対して、新規の治療戦略になりうることを強く示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Tanaka I, Osada H, Fujii M, Fukatsu A, Hida T, Horio Y, Kondo Y, Sato A, Hasegawa Y, Tsujimura T, Sekido Y: LIM-domain protein AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. **Oncogene**, 34:73-83, 2015. 査読有 doi: 10.1038/onc.2013.528
2. Hakiri S, Osada H, Ishiguro F, Murakami H, Murakami-Tonami Y, Yokoi K, Sekido Y: Functional differences between wild-type and mutant-type BRCA1-associated protein 1 tumor suppressor against malignant mesothelioma cells. **Cancer Sci**, 106:990-9, 2015. 査読有 doi: 10.1111/cas.12698
3. Li Q, Wang W, Machino Y, Yamada T, Kita K, Oshima M, Sekido Y, Tsuchiya M, Suzuki Y, Nan-Ya KI, Iida S, Nakamura K, Iwakiri S, Itoi K, Yano S : Therapeutic activity of glycoengineered anti-GM2 antibodies against malignant pleural mesothelioma. **Cancer Sci**, 106:102-7, 2015. 査読有 doi: 10.1111/cas.12575
4. 関戸好孝: 「Hippo シグナルとがん」 “発生・器官形成、がん悪性化に関わる Hippo シグナル” 実験医学 2015 年 11 月号 vol. 33 2934-9. 羊土社 査読無
5. Chew S-H, Okazaki Y, Nagai H, Misawa N, Akatsuka S, Yamashita K, Jiang L, Yamashita Y, Noguchi M, Hosoda K, Sekido Y, Takahashi T, Toyokuni S: Cancer-promoting role of adipocytes in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through dysregulated adipocytokine production. **Carcinogenesis**, 35:164-72, 2014. 査読有 doi: 10.1093/carcin/bgt267
6. 関戸好孝: 「悪性中皮腫と Hippo pathway」 “広がる Hippo pathway 研究” 医学のあゆみ 2014 年 11 月号 423-7 査読無
7. Sekido Y: Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. **Carcinogenesis**, 34:1413-9, 2013. 査読無 doi: 10.1093/carcin/bgt166
8. Satoh M, Takemura Y, Hamada H, Sekido Y, Kubota S: EGCG induces human mesothelioma cell death by inducing reactive oxygen species and autophagy. **Cancer Cell Int**, 13:19, 2013. 査読有 doi: 10.1186/1475-2867-13-19
9. Abe S, Morita Y, Kato-Kaneko M, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S, Akiyama S, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y: A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody. **J Immunol**, 190: 6239-40, 2013. 査読有 doi: 10.4049/jimmunol.1300448
10. 関戸好孝: 「悪性胸膜中皮腫にみられる遺伝子異常」 “胸膜全書” 医薬ジャーナル 2013 年 277-85 査読無

[学会発表] (計 21 件)

1. Hakiri S, Osada H, Ishiguro F, Murakami Y, Yokoi K, Sekido Y 「Inactivating mutations of BAP1 gene in Japanese malignant mesothelioma patients: BAP1 have an effect on DNA repair partly through stabilizing BRCA1 proteins」 第 7 回 NAGOYA グローバルリトリート, 2016 年 2 月 12 日, 愛知健康プラザ (愛知県・大府市)
2. 関戸好孝: 「悪性中皮腫における Hippo シグナル伝達系異常」 BMB2015, 2015 年 12 月 3 日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

3. 関戸好孝「悪性中皮腫におけるトランスレーショナルリサーチ」第56回日本肺癌学会、2015年11月27日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
4. 関戸好孝「悪性中皮腫細胞におけるBAP1遺伝子の機能解析」第22回石綿・中皮腫研究会、2015年10月31日、ソリッドスクエアホール（神奈川県・川崎市）
5. 羽切周平、長田啓隆、関戸好孝「悪性胸膜中皮腫細胞株におけるBAP1遺伝子不活化変異についての検討」第74回日本癌学会学術総会、2015年10月10日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）
6. 関戸好孝「悪性胸膜中皮腫の分子生物学的解析と臨床への応用」第74回日本癌学会学術総会、2015年10月10日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）
7. 竹下純平、山本尚吾、辰野健二、大搦泰一郎、栗林康造、近藤展行、長谷川誠紀、辻村亨、長田啓隆、中野孝司、関戸好孝、油谷浩幸「悪性胸膜中皮腫の遺伝子プロファイル」第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）
8. 関戸好孝「Hippo pathway dysregulation in mesothelioma cells」第16回世界肺癌学会、2015年9月9日、(米国、コロラド、デンバー)
9. 関戸好孝「Hippo pathway inactivation in malignant mesothelioma cells」KEYSTONE SYMPOSIA、2015年5月19日、(米国、ニューメキシコ、タオス)
10. 関戸好孝「悪性中皮腫の遺伝子異常とシグナル伝達」第21回石綿・中皮腫研究会、2014年10月11日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）
11. 垣内辰雄、高原大志、吉田稚明、在田幸太郎、春日井由美子、片山幸、中西速夫、長田啓隆、関戸好孝、都築忍、瀬戸加大「Hippo経路の不活性化による中皮細胞の形質転換への寄与」第73回日本癌学会学術総会、2014年9月27日 パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
12. 関戸好孝「悪性中皮腫の分子病態」第73回日本癌学会学術総会、2014年9月26日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
13. 関戸好孝、田中一大、藤井万紀子、長田啓隆「悪性中皮腫におけるHippoシグナル伝達系異常」第18回日本がん分子標的治療学会、2014年6月26日、仙台市情報・産業プラザ（宮城県・仙台市）
14. 関戸好孝「悪性中皮腫の遺伝子異常：分子標的治療法のターゲットは何か？」第19回癌と遺伝子・大分外科フォーラム、2014年6月9日、レンブラントホテル大分(大分県・大分市)
15. 関戸好孝「悪性中皮腫の遺伝子異常」第8回中皮腫細胞診セミナー、2014年1月26日、福岡大学医学部（福岡県・福岡市）
16. 関戸好孝「悪性中皮腫に対する新規治療法開発へ向けた中皮腫細胞株の利用」平成25年度中部地区医療・バイオ系シーズ発表会、2013年12月12日、ウインクあいち（愛知県・名古屋市）
17. 田中一大、長田啓隆、藤井万紀子、深津明日樹、樋田豊明、佐藤鮎子、長谷川好規、辻村亨、関戸好孝「LIMドメインを持つAJUBA蛋白質は、Hippoシグナル経路を介して悪性中皮腫細胞の増殖を抑制する」第72回日本がん学会学術総会、2013年10月4日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
18. 関戸好孝「悪性中皮腫の遺伝子シグナル伝達系異常」4th Japan Mesothelioma Interest Group(JMIG)、2013年8月31日、京都私学会館（京都府・京都市）
19. 関戸好孝「中皮腫の複合シグナル伝達系異常とその制御」第11回日本臨床腫瘍学会 2013年8月29日 仙台国際センター（宮城県・仙台市）
20. Sekido Y「Dysregulation of Hippo tumor-suppressive pathway in malignant mesothelioma」15th International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)、2013年10月29日、(シドニー、オーストラリア)
21. Sekido Y, Tanaka I, Fujii M, Osada H:「Hippo signaling cascade alteration in malignant mesothelioma」Keystone Symposia、2013年5月20日、(モントレール、カルフォルニア、米国)

[その他]

ホームページ:

http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/03bunshi_shuyo/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関戸 好孝 (SEKIDO, Yoshitaka)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・副所長兼部長

研究者番号: 00311712

(2)研究分担者

村上 優子 (渡並 優子)

(MURAKAMI-TONAMI, Yuko)

愛知県がんセンター (研究所)・分子腫瘍

学部・主任研究員

研究者番号： 70405174