

令和元年6月20日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04716

研究課題名(和文) 合成致死を利用した薬剤著効ゲノムプロファイルの描出

研究課題名(英文) Synthetic lethality-based identification of drug-sensitive genome profiles

研究代表者

清宮 啓之 (Seimiya, Hiroyuki)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子生物治療研究部・部長

研究者番号：50280623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：DECIPHERバーコードshRNAライブラリーを用いた機能ゲノミクス探索により、ポリ(ADP-リボシル)化酵素タンキラーゼの阻害剤に対して合成致死性を示す遺伝子Xを同定した。タンキラーゼ阻害剤はβ-カテニンシグナルを遮断することでAPC変異大腸がんの増殖を阻害するが、遺伝子Xの枯渇はβ-カテニンシグナルとは異なる作用点を介して、タンキラーゼ阻害剤のがん細胞増殖抑制効果を増強することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では年間37万人以上の方ががんで死亡している。治癒切除不能な再発・転移がんの根治薬物療法は未確立であり、新たな創薬シーズとしてタンキラーゼ阻害剤の開発・提供が切望されている。合成致死の概念は選択的で効果的な薬物療法に有用である。本研究ではじめて同定されたタンキラーゼ阻害剤の合成致死因子は、阻害剤の適用がふさわしいがん患者の予測法や、より効果的な併用薬物療法の開発に役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Employing a functional genomic screening with DECIPHER barcode short hairpin RNA libraries, we identified a gene X, which exhibited synthetic lethality with inhibitors for the poly(ADP-ribose) polymerase called tankyrase. While tankyrase inhibitors downregulate beta-catenin signaling and block proliferation of APC-mutated colorectal cancer cells, we found that depletion of gene X enhances the anticancer effects of tankyrase inhibitors in a beta-catenin-independent manner.

研究分野：腫瘍生物学、分子標的治療

キーワード：合成致死 分子標的治療 shRNAライブラリー スクリーニング ポリ(ADP-リボシル)化 タンキラーゼ がん

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

がんゲノムプロジェクト TCGA (The Cancer Genome Atlas) は、25 種類以上のがん種から 1 万件以上のがんゲノム情報を解読し、本研究課題の開始年度 (2016 年度) 当時は、一部の臓器がんを除いて段階的に終了しつつある状況であった。これらのビッグデータから、特定分子パスウェイ内で生じる遺伝子変異の相互排他性 (mutual exclusivity) を読み解くことにより、ドライバーが不明瞭であったがん種からも標的候補となる遺伝子変異を発見することが出来るようになってきた (Leiserson et al. Nat Genet, 2015)。但し、同定されたドライバー変異ががん抑制遺伝子の機能喪失型変異である場合、がん遺伝子の機能獲得型変異 (上皮成長因子受容体 EGFR の L858R 変異など) とは異なり、その“不在性”を直接の薬剤標的とすることは不可能である。その場合、合成致死 (synthetic lethality) と呼ばれる概念 (遺伝子 A もしくは遺伝子 B のいずれかが単独で機能欠損を起こしたときは致死性を与えないが、両者が同時に機能欠損を起こすと致死性が生じること) を利用した創薬戦略が有望である。例として、がん抑制遺伝子 BRCA1 もしくは BRCA2 の欠損に対してポリ (ADP-リボシル) 化酵素 (PARP-1/2) 阻害剤が合成致死を誘導するため、PARP-1/2 阻害剤オラパリブが BRCA 変異陽性卵巣がんの治療薬として 2014 年に欧米で認可された (日本でも 2018 年に「白金系抗悪性腫瘍剤感受性の再発卵巣癌における維持療法」を効能・効果として同剤が認可された)。同様に、がん抑制遺伝子 ARID1A の欠損とヒストンメチル化酵素 EZH2 の阻害が合成致死の関係にあることが報告されている (Bitler et al. Nat Med, 2015)。これらのことは、合成致死の原理を利用することにより、すでに失活して不在となったがん抑制遺伝子に対しても標的治療を行うことが可能であるのに加え、PARP 阻害剤や EZH2 阻害剤など、それまで適応がん腫が必ずしも明確でなかった抗がん候補薬剤の効果予測因子をゲノムレベルで明確に規定しうることを示している。

染色体末端のキャップ構造であるテロメアは、ゲノムの維持と継承に必須の DNA タンパク質複合体である。ヒトがん細胞においてテロメア反復配列の伸長を促進するタンキラーゼ (tankyrases) は、PARP 酵素活性を有し、テロメア再生酵素であるテロメララーゼ (telomerase) の阻害剤耐性因子となる一方 (Seimiya et al. Cancer Cell, 2005)、Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナルの増強因子でもある (Huang et al. Nature, 2009)。後者の場合、タンキラーゼは  $\beta$ -カテニンの負の制御因子アキシンをポリ (ADP-リボシル) 化して分解に導くことで、 $\beta$ -カテニンを細胞内に蓄積させる。我々がこれまでに開発を進めてきたタンキラーゼ特異的 PARP 阻害剤 (以下、タンキラーゼ阻害剤) は、がん抑制遺伝子 APC 変異陽性の Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル依存性大腸がんの増殖を細胞およびマウスゼノグラフトモデルの両レベルで抑制することが確認されている。一方、我々は、タンキラーゼが分子内アンキリン領域の ARCs (ANK repeat clusters) と名付けた保存領域を介して様々な結合タンパク質と相互作用し、テロメア伸長のみならず、細胞分裂や細胞運動といった多様ながん悪性形質の発現に関与していることを見出してきた (Seimiya et al. JBC, 2002; MCB, 2004; Cancer Cell, 2005; Ohishi et al. Cancer Res, 2010)。すなわち、タンキラーゼは結合因子の多様性から様々な機構を介してがん形質に関与していると予想される。これらの背景を踏まえ、我々は、タンキラーゼ阻害剤は Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル以外の作用点からも制がん効果を発揮しうるのではないかと推論した。

### 2. 研究の目的

本研究は、新たな制がん剤として期待されるタンキラーゼ阻害剤について、APC 変異陽性大腸がん以外のがん種にも著効を示す、合成致死性のがんゲノム変異を「薬効予測因子」として同定することにより、それらの変異を有するがんに対する革新的な治療法を開発すること、あるいは同因子の働きを阻害することでタンキラーゼ阻害剤の制がん効果を増強させる併用療法を開発することを目的とする。具体的には、タンキラーゼの PARP 酵素活性を阻害することにより合成致死を示す遺伝子変異 (実際には shRNA クローン) を同定し、その分子作用メカニズムを解明することを達成目標とする。

### 3. 研究の方法

(1) バーコード shRNA ライブラリーを用いた合成致死因子の探索: shRNA ライブラリーを用いた機能ゲノミクス探索は、バイアスの全くかからない (=分子機能から類推される仮説に頼らない) 有用な機能分子探索アプローチである。我々は同法により既に、前立腺がん幹細胞の機能分子として、TRIB1 と呼ばれるシグナルアダプター因子を同定することに成功している (Mashima et al. Cancer Res, 2014)。そこでまず、DECIPHER shRNA ライブラリー (=のべ約 15,000 の標的 mRNA に対する shRNA クローンを収載したプール型ライブラリー) のレンチウイルスベクターを作製し、子宮頸がん HeLa 細胞に感染させた。ピューロマイシンでウイルス感染細胞を選択後、タンキラーゼ阻害剤 G007-LK を処理し、8 日間培養した。この細胞からゲノム DNA を抽出し、shRNA ベクターに含まれるバーコード配列について次世代シーケンシングにより頻度分布解析を行い、タンキラーゼ阻害剤によって選択的に頻度が低下する shRNA クローン (合成致死候補クローン) を同定した。

(2) ヒット shRNA クローンの初期確認および高次評価に向けての選抜方針: 上述のヒットクローン標的遺伝子が構成する分子シグナル経路を *in silico* 探索するとともに、標的となる個々

の遺伝子が実際のがんでどの程度変異・欠失もしくは発現低下を起こしているか、がん抑制遺伝子としての記述はないか、公的データベースおよび文献検索で確認した。標的遺伝子とタンキラーゼの間でどのようなメカニズムを介して合成致死が成立するのか考察し、がん治療応用の観点でフィージビリティが明らかに欠けるものは以降の解析から除外した。

(3) 標的遺伝子ノックダウン細胞を用いた合成致死の検証：上述の初期確認を経て絞られた shRNA クローンのレンチウイルスベクターを作製し、HeLa 細胞もしくは大腸がん COLO-320DM 細胞に感染導入して標的遺伝子の枯渇細胞を樹立した。同細胞に対してタンキラーゼ阻害剤を処理し、これらの薬剤に対する高感受性が認められるか検証した。本実験に先立つ予備検討では、shRNA の代わりに小分子干渉 RNA (siRNA) を用いてタンキラーゼ阻害剤感受性の変化を調べた。遺伝子操作によるオフターゲット効果の影響を排除するため、標的遺伝子の外来発現ベクターを導入し、合成致死性が解消するか確認した。

#### 4. 研究成果

DECIPHER バーコード shRNA ライブラリーを用いた合成致死因子の探索を行うため、タンキラーゼ阻害剤 G007-LK を HeLa 細胞に処理し、薬力学的バイオマーカー（ここではタンキラーゼタンパク質の安定化に伴う細胞内蓄積）が明瞭に変動し、かつ細胞増殖には大きな影響を与えない薬剤濃度を決定した。shRNA ライブラリーのレンチウイルスベクターを作製し、クローン化した HeLa 細胞にこれを感染させ、上記検討で決定した濃度の G007-LK を処理し、8 日間培養後の細胞からゲノム DNA を抽出した。shRNA ベクターに含まれるバーコード配列について、次世代シーケンシング解析データを取得した。

このデータを解析した結果、G007-LK の存在下で選択的に頻度低下を示す shRNA クローンは 11 種類同定された。これらの shRNA の標的遺伝子は、もとのがん細胞株で実際に発現していることが確認された。そこで、各ヒットクローンの標的遺伝子に対する siRNA を新たにデザインしてがん細胞株 (HeLa 細胞および COLO-320DM 細胞) に処理し、逆転写定量 PCR 法でノックダウン効果を確認した。そのうえで、タンキラーゼ阻害剤 G007-LK および IWR-1 に対する感受性への影響を調べた。その結果、遺伝子 X のノックダウンがこれらの細胞株のタンキラーゼ阻害剤感受性を顕著に増強することが確認された。そこでさらに、複数の異なる shRNA 発現ウイルスベクターを用いて遺伝子 X が恒常的にノックダウンされたがん細胞株を樹立した。これらのがん細胞株について精査したところ、同細胞株は G007-LK および IWR-1 に高感受性を示すことが確認された。shRNA 耐性の外来性遺伝子 X を安定復帰導入したがん細胞株では、当該 shRNA を導入してもこれらのタンキラーゼ阻害剤の効果増強は観察されなかった。このことから、遺伝子 X のノックダウンによるタンキラーゼ阻害剤の効果増強は、当該 shRNA のオンターゲット効果によるものであると判断された。一方、この阻害剤感受性の増強効果は、タンキラーゼとは異なる PARP メンバーである、PARP-1 および PARP-2 に対する阻害剤 (オラパリブおよびベリパリブ) に対しては全く認められなかった。以上の結果から、遺伝子 X の機能欠損ないし発現低下は、タンキラーゼ阻害剤のがん細胞増殖抑制効果を選択的に増強すると判断された。

大腸がん COLO-320DM 細胞では、APC の機能喪失型変異により  $\beta$ -カテニンの安定化および核内蓄積が認められ、タンキラーゼ阻害剤は  $\beta$ -カテニンの分解を促進することで同細胞の増殖を阻害する。重要なことに、遺伝子 X のノックダウンは COLO-320DM 細胞の定常状態における  $\beta$ -カテニンの発現量およびタンキラーゼ阻害剤による  $\beta$ -カテニンの分解の程度には顕著な影響を与えないことが判明した。さらに、遺伝子 X のノックダウンによるタンキラーゼ阻害剤の効果増強は、 $\beta$ -カテニン非依存的な HeLa 細胞 (=  $\beta$ -カテニンのノックダウンは COLO-320DM 細胞の増殖を阻害したが、HeLa 細胞の増殖は阻害しなかった) でも認められたため、本研究で同定された遺伝子 X の発現ないし機能の阻害は、Wnt/ $\beta$ -カテニン経路とは異なる作用点を介してタンキラーゼ阻害剤と合成致死の関係を示すものと推定された。これまでにタンキラーゼ阻害剤と合成致死の関係にある因子の報告は国内外ともなく、本研究成果はタンキラーゼ阻害剤の適用がふさわしいがん患者の予測法や、より効果的な併用薬物療法の開発に役立つものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Okamoto, K., Seimiya, H. Revisiting telomere shortening in cancer (Review Article). *Cells*, 8: 107 (2019). DOI: 10.3390/cells8020107.
- ② Okamoto, K., Ohishi, T., Kuroiwa, M., Iemura, S. I., Natsume, T., Seimiya, H. MERIT40-dependent recruitment of tankyrase to damaged DNA and its implication for cell sensitivity to DNA-damaging anticancer drugs. *Oncotarget*, 9: 35844-35855 (2018). DOI: 10.18632/oncotarget.26312.
- ③ Mizutani, A., Yashiroda, Y., Muramatsu, Y., Yoshida, H., Chikada, T., Tsumura, T., Okue, M., Shirai, F., Fukami, T., Yoshida, M., Seimiya, H. RK-287107, a potent and specific tankyrase inhibitor, blocks colorectal cancer cell growth in a preclinical model. *Cancer Sci*, 109: 4003-4014 (2018). DOI: 10.1111/cas.13805. Featured in Issue

Highlight.

- ④ Fujiwara, C., Muramatsu, Y., Nishii, M., Tokunaka, K., Tahara, H., Ueno, M., Yamori, T., Sugimoto, Y., Seimiya, H. Cell-based chemical fingerprinting identifies telomeres and lamin A as modifiers of DNA damage response in cancer cells. *Sci Rep*, 8: 14827 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-33139-x.
- ⑤ Tanaka, N., Mashima, T., Mizutani, A., Sato, A., Aoyama, A., Gong, B., Yoshida, H., Muramatsu, Y., Nakata, K., Matsuura, M., Katayama, R., Nagayama, S., Fujita, N., Sugimoto, Y., Seimiya, H. APC Mutations as a Potential Biomarker for Sensitivity to Tankyrase Inhibitors in Colorectal Cancer. *Mol Cancer Ther*, 16: 752-62 (2017). DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0578.
- ⑥ Ohishi, T., Yoshida, H., Katori, M., Migita, T., Muramatsu, Y., Miyake, M., Ishikawa, Y., Saiura, A., Iemura, S. I., Natsume, T., Seimiya, H. Tankyrase-Binding Protein TNKS1BP1 Regulates Actin Cytoskeleton Rearrangement and Cancer Cell Invasion. *Cancer Res*, 77: 2328-38 (2017). DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1846.
- ⑦ Mashima, T., Taneda, Y., Jang, M. K., Mizutani, A., Muramatsu, Y., Yoshida, H., Sato, A., Tanaka, N., Sugimoto, Y., Seimiya, H. mTOR signaling mediates resistance to tankyrase inhibitors in Wnt-driven colorectal cancer. *Oncotarget*, 8: 47902-15 (2017). DOI: 10.18632/oncotarget.18146.

[学会発表] (計 29 件)

- ① Seimiya, H. Telomere as the starting point of anticancer drug discovery (招待講演), 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine, 2019 年
- ② Seimiya, H. Telomere as the starting point of anticancer drug discovery (招待講演), OIST Seminar, 2019 年
- ③ 水谷アテナ, 村松由起子, 吉田喜香, 清宮啓之、新規タンキラーゼ阻害剤 RK-287107 は非臨床モデルで大腸がんを抑制する、第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年
- ④ 藤原千明, 村松由起子, 矢守隆夫, 杉本芳一, 清宮啓之、テロメラーゼ阻害剤 MST-312 の新規作用機序とその制がん効果を規定する因子、第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年
- ⑤ 清宮啓之、ポリ(ADP-リボシル)化酵素タンキラーゼを標的としたがん創薬 (招待講演)、理研シンポジウム第 4 回 DMP 創薬ワークショップ、2018 年
- ⑥ Seimiya, H. Telomere as the starting point of anticancer drug discovery (招待講演), RIKEN IMS Cancer Immunology Seminar Series, 2018 年
- ⑦ Oishi, T., Mashima, T., Sato, A., Yoshida, H., Aoyama, A., Gong, B., Katayama, R., Nagayama, S., Fujita, N., Seimiya, H. Identification of potential biomarkers for sensitivity to tankyrase inhibitors in patient-derived colorectal cancer, The 14th Japan Korea Cancer and Aging Joint Symposium, 2018 年
- ⑧ Seimiya, H. Telomeres as the starting point of cancer biology and drug discovery, Nagoya University Cancer Science Course (招待講演), 2018 年
- ⑨ 清宮啓之、テロメアを起点としたがんの本態解明と分子標的治療薬の開発 (招待講演)、京都大学 学際融合教育推進センター生理化学研究ユニット第 7 回シンポジウム “Chemistry で紐解く Physiology”, 2017 年
- ⑩ 清宮啓之、テロメアを起点としたがんの本態解明と分子標的治療薬の開発 (鶴尾隆賞受賞講演 (招待講演))、第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2017 年
- ⑪ 田中伯享, 馬島哲夫, 且慎吾, 杉本芳一, 清宮啓之、大腸がん細胞株のタンキラーゼ阻害剤感受性を予測する APC 変異、第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2017 年
- ⑫ 張明奎, 馬島哲夫, 清宮啓之、タンキラーゼ阻害剤による大腸がん幹細胞の標的化と抗がん剤の効果増強、第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2017 年
- ⑬ 清宮啓之、PARP ファミリー酵素を標的とする抗がん剤の開発 (招待講演)、CBI 学会 2016 年大会、2016 年
- ⑭ 清宮啓之、Telomere maintenance system as an anticancer therapeutic target (JCA-Mauvernay Award 受賞講演 (招待講演))、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年
- ⑮ 清宮啓之、がん創薬に向けたテロメア研究の進歩 (招待講演)、第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2016 年

[その他]

ホームページ等

- ① [https://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular\\_biotherapy/index.html](https://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular_biotherapy/index.html)
- ② [https://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular\\_biotherapy/research/003.html](https://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular_biotherapy/research/003.html)

アウトリーチ活動

- ① 清宮啓之、がんとは何でしょう、中学生職場訪問 (がん研究会、東京)、2018/7/25

- ② 清宮啓之、がんとは何でしょう、中学生職場訪問 (がん研究会、東京)、2017/12/21
- ③ 清宮啓之、がんとは何でしょう、中学生職場訪問 (がん研究会、東京)、2017/7/24
- ④ 清宮啓之、がんとは何でしょう、中学生職場訪問 (がん研究会、東京)、2016/8/23

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：藤原 千明

ローマ字氏名：(FUJIWARA, chiaki)

研究協力者氏名：杉本 芳一

ローマ字氏名：(SUGIMOTO, yoshikazu)

研究協力者氏名：馬島 哲夫

ローマ字氏名：(MASHIMA, tetsuo)

研究協力者氏名：水谷 アンナ

ローマ字氏名：(MIZUTANI, anna)

研究協力者氏名：岡本 啓治

ローマ字氏名：(OKAMOTO, keiji)

研究協力者氏名：田中 伯享

ローマ字氏名：(TANAKA, noritaka)

研究協力者氏名：村松 由起子

ローマ字氏名：(MURAMATSU, yukiko)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。