

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20800

研究課題名（和文）TEL02を標的とした悪性ラブドイド腫瘍に対する合成致死療法の基盤形成

研究課題名（英文）TEL02-targeting therapy for SMARCB1-deficient malignant rhabdoid tumor

研究代表者

米澤 穂波（Yonezawa, Honami）

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：90963364

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000 円

研究成果の概要（和文）：悪性ラブドイド腫瘍（Malignant rhabdoid tumor：MRT）は、SMARCB1遺伝子の欠損を特徴とする非常に予後不良な小児がんである。本研究開始時、イベルメクチンがTEL02タンパク質を減少させることを明らかにしていた。申請者は、データベース解析からMRT細胞の生存がTEL02に依存する可能性を見出した。本研究では、「イベルメクチンはTEL02タンパク質レベルを低下させ、SMARCB1を欠損するMRT細胞の合成致死を引き起こす」という仮説の検証を行い、MRTに対するイベルメクチンの有効性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRTには、外科手術や放射線治療、化学療法の併用が行われるが、標準治療は確立されておらず、依然として予後は不良である。これまでに、TEL02を標的としたMRT治療に関する報告はない。本研究では、TEL02がMRTの治療標的分子となる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：SMARCB1-deficient malignant rhabdoid tumor (MRT) is a high-mortality childhood tumor. We found that an anti-parasitic drug, ivermectin, reduced TEL02 protein levels in mammalian cells. Database analysis showed tendency that survival of MRT cells depends on TEL02. In this study, we revealed that ivermectin reduced TEL02 protein levels in SMARCB1-deficient MRT cells and induced synthetic lethality with SMARCB1-deficiency.

研究分野：腫瘍学

キーワード：悪性ラブドイド腫瘍 阻害剤 TEL02 イベルメクチン

1. 研究開始当初の背景

【有効な治療法のない希少がん：悪性ラブドイド腫瘍】

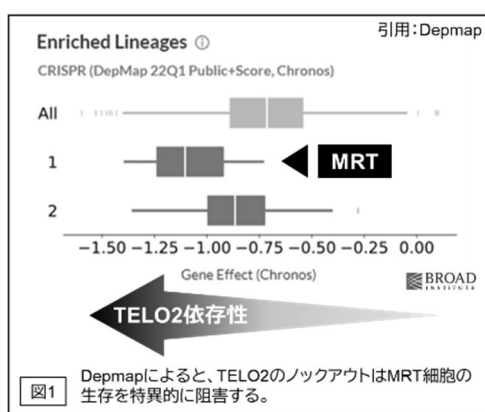
悪性ラブドイド腫瘍 (Malignant rhabdoid tumor : MRT) は、主に新生児や乳児に発生する希少がんである。本疾患は、進行が早く極めて予後不良であるが、標準治療は確立されていない。がん抑制遺伝子 SMARCB1 の欠損を特徴とするため、SMARCB1 を直接標的とする医薬品開発は困難である。外科手術や放射線治療、化学療法との併用など様々な臨床試験が実施されているが、効果的な治療法の確立には至っていない。

【イベルメクチンによる TELO2 減少作用】

我々は、抗寄生虫薬イベルメクチンが、Telomere length regulation protein 2 (TELO2) に結合し、そのタンパク質レベルを減少させることを明らかにした。TELO2 は、mTOR や ataxia-telangiectasia mutated (ATM)、ATM and Rad3-related (ATR) などの Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases (PIKKs) の安定化に必須の因子である。我々は、イベルメクチンが TELO2 に結合し、TELO2 や PIKKs のタンパク質レベルを低下させることを明らかにした (Yonezawa *et al.* iScience, 2022)。

【MRT 細胞株の TELO2 依存性】

米澤は、BROAD INSTITUTE の The Cancer Dependency Map (DepMap) を利用したデータベース解析により、TELO2 のノックアウトが複数の MRT 細胞株の増殖を特異的に阻害することを見出した。TELO2 は、MRT 細胞の増殖に必須の因子であり、薬剤による TELO2 の制御が MRT 細胞に増殖阻害作用を示す可能性がある (図 1)。



【SMARCB1 と TELO2 の合成致死を標的とした治療法開発】

オラパリブをはじめとする Poly-ADP-ribose polymerase (PARP) 阻害薬は、BRCA 機能欠損を有する腫瘍に特異的に著効する。MRT において高頻度で欠損が認められる SMARCB1 は、DNA の複製や修復を制御する SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の構成因子である (Roberts *et al.* Cancer Biol. Ther. 2009)。一方、TELO2 は、DNA 損傷応答や修復を担う PIKKs の安定化に必須である (Kaizuka *et al.* J. Biol. Chem. 2010; Takai *et al.* Cell 2007, Genes Dev. 2010)。すなわち、SMARCB1 と TELO2 は、BRCA と PARP のように互いの機能を補填するパートナー遺伝子の可能性があり、TELO2 は MRT に対する合成致死療法の標的となり得る。

2. 研究の目的

本研究では、「イベルメクチンは TELO2 タンパク質レベルを低下させ、SMARCB1 を欠損する MRT 細胞の合成致死を引き起こす」という作業仮説の検証を行い、MRT に対するイベルメクチンの有効性を明らかにする。本研究は、有効な治療法のない MRT に対する合成致死療法を開拓する糸口となる。

3. 研究の方法

下記の方法で、「イベルメクチンは TELO2 タンパク質レベルを低下させ、SMARCB1 を欠損する MRT 細胞の合成致死を引き起こす」という作業仮説の検証を行った。

【TELO2 ノックアウトおよびイベルメクチンに対する MRT 細胞の感受性評価】

CRISPR-Cas9 を利用した TELO2 のノックアウトおよび siRNA を利用した TELO2 ノックダウンによって、データベースが示す感受性情報を実際に再現できるかを MTT assay によって評価した。また、複数の MRT 細胞株を用いて、イベルメクチンに高感受性の細胞株が存在するかを MTT assay によって評価した。

【イベルメクチンによる TELO2 および PIKKs 減少作用の評価】

イベルメクチンに高感受性であった MRT 細胞株 G401 を用いて、イベルメクチンが TELO2 を減少させるかをウェスタンブロットによって評価した。TELO2 は PIKKs の安定化に必須であるため、イベルメクチンが PIKKs やその下流因子に及ぼす影響もウェスタンブロットによ

て評価した。

【イベルメクチンによる増殖阻害作用の TELO2 依存性の検証】

イベルメクチンによる G401 細胞の増殖阻害活性が、TELO2 に依存するか検討した。イベルメクチン非結合型 TELO2 K749T 変異体 (Yonezawa *et al.* iScience, 2022) を発現させた G401 細胞を利用し、イベルメクチンの増殖阻害作用を評価した。

【SMARCB1 欠損と TELO2 機能阻害の合成致死性の検証】

イベルメクチンによる G401 細胞の増殖阻害活性が、TELO2 の機能阻害および SMARCB1 欠損に依存するか検討した。野生型 SMARCB1 強制発現 G401 細胞を作製し、イベルメクチンによる増殖阻害作用が低下するかを評価した。

4. 研究成果

DepMap を利用したデータベース解析から、MRT 細胞株の生存が TELO2 に依存する傾向を見出した。MTT assay の結果、イベルメクチンは、MRT 細胞株 G401 および JMU-RTK-2 の増殖を抑制した (図 2)。以下の実験には、イベルメクチンへの感受性が高かった G401 細胞を用いることとした。

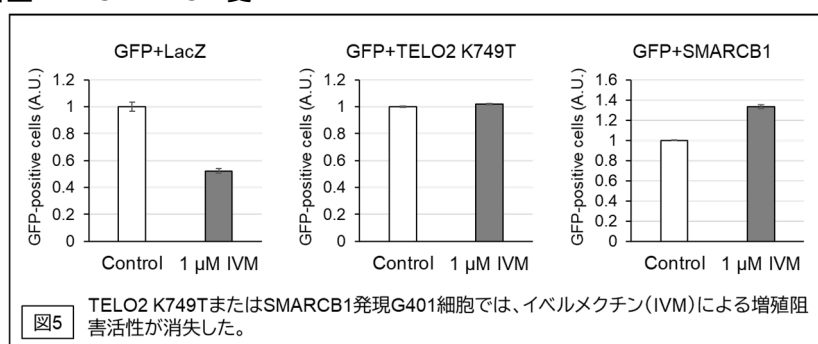
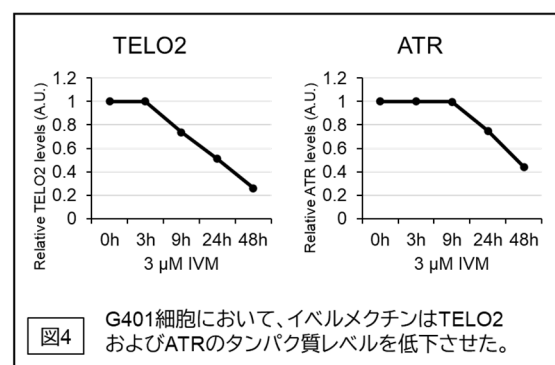
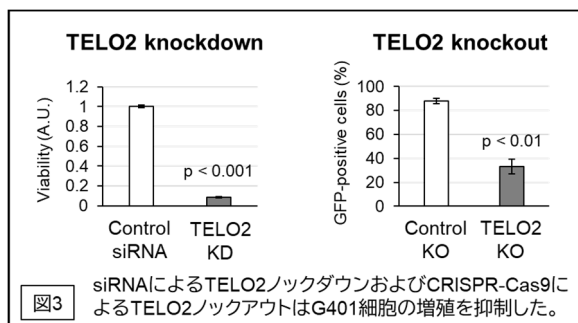
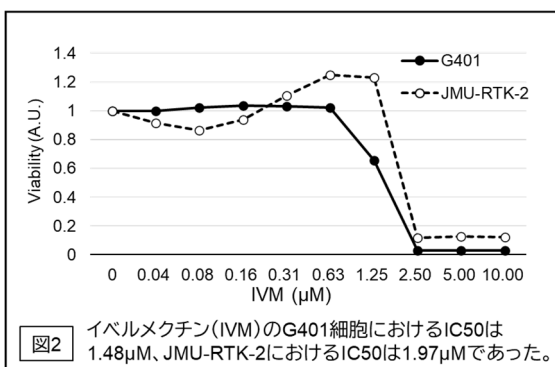
siRNA を利用した TELO2 ノックダウンは、G401 細胞の増殖を抑制した。CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集は、リポフェクション法による RNP トランスフェクションによって行った。しかし、G401 細胞に対するトランスフェクション効率が低く、TELO2 ノックアウトの増殖阻害活性を MTT assay によって評価することは困難であった。そこで、EGFP 発現プラスミドと RNP のコトランスフェクションを行い、GFP 陽性細胞について、TELO2 ノックアウト前後の細胞数をカウントし、増殖阻害活性を評価することとした。CRISPR-Cas9 を利用した TELO2 のノックアウトは、EGFP 発現 G401 細胞の増殖を抑制した (図 3)。

G401 細胞をイベルメクチンで処理し、ウェスタンブロットによって評価したところ、TELO2 および ATR のタンパク質レベルが MRT 細胞でも低下することが明らかになった (図 4)。

これまでの結果から、イベルメクチンによる G401 細胞の増殖阻害活性は、TELO2 機能の阻害によって引き起こされると推測した。そこで、イベルメクチン非結合型 TELO2 K749T 変異体を発現させた G401

細胞を作製し、イベルメクチンによる増殖阻害活性が低下するか検討した。EGFP 発現プラスミドと TELO2 K749T 発現プラスミドをコトランスフェクトした後、イベルメクチン未処理および処理後の GFP 陽性細胞数をカウントし、

生存率を比較した。ネガティブコントロールとしての LacZ 発現 GFP 陽性細胞の生存率は、イベルメクチン処理によって約 50%まで低下した (図 5)。一方、TELO2 K749T 発現 GFP 陽性細胞の生存率は、イベルメクチン処理後もほぼ 100%であり、イベルメクチンによる増殖阻害活性が消失した (図 5)。したがって、G401 細胞に対するイベルメクチンの増殖阻害活性は、TELO2



への結合に依存する作用であると考えられる。

MRT 細胞は、DNA の複製や修復を制御する SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の構成因子である SMARCB1 遺伝子の欠損を特徴とする。そこで、イベルメクチンによる増殖阻害活性は、SMARCB1 欠損と TELO2 の機能阻害による合成致死による作用であると推測した。野生型 SMARCB1 を G401 細胞に強制発現させ、イベルメクチンによる増殖阻害活性が低下するか検討した。その結果、野生型 SMARCB1 発現細胞においても、イベルメクチンによる増殖阻害活性は消失した (図 5)。したがって、G401 細胞に対するイベルメクチンの増殖阻害活性は、SMARCB1 遺伝子の欠損に依存する作用であると考えられる。

以上の結果から、イベルメクチンは TELO2 の機能阻害と SMARCB1 欠損に依存して MRT 細胞の増殖を阻害しており、TELO2 と SMARCB1 は合成致死の関係にあることが示唆された。TELO2 は druggable な MRT 治療標的分子候補であり、TELO2 機能を制御する化合物は画期的な MRT 治療薬となることが期待される。

引用文献

1. Yonezawa H, Ikeda A, Takahashi R, Endo H, Sugawara Y, Goto M, Kanno M, Ogawa S, Nakamura K, Ujiie H, Iwatsuki M, Hirose T, Sunazuka T, Uehara Y, Nishiya N. Ivermectin represses Wnt/ β -catenin signaling by binding to TELO2, a regulator of phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases. *iScience*. 2022, 25(3):103912.
2. Roberts CW, Biegel JA. The role of SMARCB1/INI1 in development of rhabdoid tumor. *Cancer Biology & Therapy*. 2009, 8(5):412-416.
3. Kaizuka T, Hara T, Oshiro N, Kikkawa U, Yonezawa K, Takehana K, Iemura S, Natsume T, Mizushima N. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285(26): 20109–20116.
4. Takai H, Wang RC, Takai KK, Yang H, de Lange T. Tel2 regulates the stability of PI3K-related protein kinases. *Cell*. 2007, 131(7):1248-59.
5. Takai H, Xie Y, de Lange T, Pavletich NP. Tel2 structure and function in the Hsp90-dependent maturation of mTOR and ATR complexes. *Genes & Development*. 2010, 24(18):2019-30.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 西谷 直之、米澤 穂波	4. 巻 59
2. 論文標題 中分子化合物の新たな標的分子：PI3K関連キナーゼのco-chaperone成分TEL02	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 1096-1100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14894/faruawpsj.59.12_1096	査読の有無 無
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10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 米澤穂波、氏家悠貴、上原至雅、西谷直之
2. 発表標題 新規創薬標的分子TEL02を介したイベルメクチンによるWnt/ β -catenin経路阻害作用の解析
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Honami Yonezawa, Haruki Ujiie, Yoshimasa Uehara, Naoyuki Nishiya
2. 発表標題 Ivermectin-binding to TEL02 mediates the Wnt/ β -catenin signaling suppression by ivermectin
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米澤穂波
2. 発表標題 イベルメクチンによるWnt/ β -catenin 経路阻害作用の解析と新規標的分子TEL02の同定
3. 学会等名 第20回生物化学若手研究者セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米澤穂波、池田朱里、高橋亮、廣瀬友靖、岩月正人、砂塚敏明、上原至雅、西谷直之
2. 発表標題 PIKKs安定化因子TEL02はイベルメクチンによる Wnt/ β -catenin経路阻害作用を仲介する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米澤 穂波、上原 至雅、西谷 直之
2. 発表標題 PIKKs安定化因子TEL02の機能制御による悪性ラプドイド腫瘍細胞の増殖抑制
3. 学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Honami Yonezawa, Haruki Ujiie, Yoshimasa Uehara, Naoyuki Nishiya
2. 発表標題 Suppression of TEL02 inhibits survival of malignant rhabdoid tumor cells
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Honami Yonezawa, Haruki Ujiie, Yoshimasa Uehara, Naoyuki Nishiya
2. 発表標題 TEL02, a regulator of phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases, is a druggable target for an inhibitor of the Wnt/ β -catenin and the mTOR signaling
3. 学会等名 EACR conference Cellular Bases for Patient Response to Cancer Therapies (国際学会)
4. 発表年 2023年

1 . 発表者名 Naoyuki Nishiya, Honami Yonezawa
2 . 発表標題 A chemical suppressor screening in zebrafish identifies Wnt/ β -catenin pathway inhibitors improving anticancer drug response.
3 . 学会等名 EACR conference Cellular Bases for Patient Response to Cancer Therapies (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 米澤穂波、大森紀和、池田朱里、廣瀬友靖、岩月正人、砂塚敏明、上原至雅、西谷直之
2 . 発表標題 イベルメクチン結合因子の同定とWnt/ β -catenin経路制御機能の解析
3 . 学会等名 日本薬学会第144年会
4 . 発表年 2024年

1 . 発表者名 米澤 穂波、氏家 悠貴、上原 至雅、西谷 直之
2 . 発表標題 PIKKs安定化因子TEL02の機能抑制は悪性ラブドイド腫瘍細胞の増殖を阻害する
3 . 学会等名 第28回日本がん分子標的治療学会学術集会
4 . 発表年 2024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
---------	---------