

令和元年6月19日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08325

研究課題名(和文) BAP1変異がんにおけるDNA損傷・修復因子を中心としたがん増殖機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the Growth Mechanism of BAP1-Mutated Cancer Focused on DNA Damage Repair Factors

研究代表者

村上 優子(渡並優子)(Murakami-Tonami, Yuko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70405174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制遺伝子BAP1は悪性中皮腫はじめ多くのがんで変異があることが知られている。がんの原因遺伝子のがん抑制遺伝子の場合、一般的にそれらを活性化させる薬剤は開発が困難である。そこで、合成致死表現型を用いて悪性中皮腫原因遺伝子の1つBAP1変異に対してDNA損傷応答因子を中心に新規分子標的の探索を行った。候補遺伝子として脱ユビキチン化酵素をコードする遺伝子AおよびDNA損傷修復に関わるキナーゼをコードする遺伝子Bが得られた。このことから、これらの遺伝子がBAP1変異がんに対する新規分子標的となる可能性が高いことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果から、BAP1変異がんをはじめとするがん抑制遺伝子変異が原因遺伝子となるがんにおいて、合成致死表現型を用いることで有力な新規分子標的が得られることが明らかとなった。また、BAP1と今回得られた候補遺伝子の関わりについてはこれまで報告がないため、BAP1とこれらの候補遺伝子が合成致死を示す分子機構を明らかとすることで、新たな制御機構を明らかにすることができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The tumor suppressor gene BAP1 is known to be mutated in many cancers, including malignant mesothelioma. When the oncogenic gene is a tumor-suppressor gene, it is generally difficult to develop drugs that activate them. Therefore, we searched for a new molecular target for BAP1 mutation, one of the causative genes of malignant mesothelioma, by focusing on DNA damage response factor using synthetic lethal phenotype. As candidate genes, gene A encoding deubiquitination enzyme and gene B encoding kinase involved in DNA damage repair were obtained. This suggests that these genes are likely to be novel molecular targets for BAP1-mutant cancers.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：合成致死 悪性中皮腫 がん抑制遺伝子 DNA修復

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は主にアスベスト曝露によって引き起こされる難治性の腫瘍である。現在はアスベストの使用が国内で全面禁止されているが、アスベスト曝露から中皮腫発症まで30-40年かかるため、死亡者数は2020-2025年ごろにピークを迎えると考えられている。また、多層カーボンナノチューブなどの新素材による中皮腫の発症が実験動物モデルにおいて報告されるなど、今後も他の新規物質による中皮腫患者の発生が予想される。

悪性中皮腫の原因遺伝子は、現在知られている主なものは全てがん抑制遺伝子である。DNA損傷修復やヒストンのユビキチン化を介して転写制御をおこなっている脱ユビキチン化酵素であるBAP1 (BRCA1 associated protein 1)、細胞骨格の制御に関わるNF2 (Neurofibromatosis type 2)、有糸分裂において中心体を制御するキナーゼであるLATS2 (Large tumor suppressor 2)、ヒストンをメチル化するエピゲノム修飾酵素でエピゲノムH3K9me3にかかわるSETDB1 (SET domain bifurcated 1)、ヒストンをメチル化するエピゲノム修飾酵素でエピゲノムH3K36me3にかかわるSETD2 (SET domain containing 2) が知られている。

悪性中皮腫は早期発見が難しく、診断時に外科的な根治切除は困難であることが多い。また、化学療法、放射線療法も十分な効果はなく、有効な治療法の早期の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

現在使用されている分子標的薬の多くは、がん遺伝子の変異(機能獲得変異)に対する阻害薬である。一方、がんの原因遺伝子のがん抑制遺伝子(機能喪失変異)の場合、一般的にそれらを活性化させる薬剤の開発が困難である。そのため、それらのがんに対する新規分子標的を探索するにあたり、がん抑制遺伝子を直接標的にするのではなく、「合成致死表現型」を利用することで、がん抑制遺伝子変異を持つがんにおいてもがん細胞特異的に死滅させる(副作用が少ない)分子標的薬が開発できると期待できる。

本研究課題では、悪性中皮腫、腎臓明細胞がん、悪性黒色腫などがんの原因遺伝子であるBAP1変異に着目し、

(1) DNA損傷修復因子を中心とした、BAP1変異に対して合成致死表現型を示す遺伝子の確定

(2) BAP1変異と得られた候補遺伝子のノックダウンが細胞死を誘導する分子機構の解析

(3) 候補遺伝子の発現の腫瘍マーカーおよび分子標的薬としての有用性

について検討することを目的とする。

BAP1変異を持つがんのモデルとして、悪性中皮腫を用いて実験を進めた。

### 3. 研究の方法

Web上に公開された、悪性中皮腫患者検体の発現アレイのデータと、患者予後のデータを再解析し、BAP1変異と合成致死表現型を示す可能性がある遺伝子を抽出した。具体的には、患者群をBAP1変異あり群となし群に分け、さらにそれらの中を各遺伝子の高発現群と低発現群に分ける。もし、BAP1変異と遺伝子Aの低発現で合成致死表現型を示すなら、BAP1変異あり群では遺伝子Aの低発現群の予後が高発現群の予後よりも有意によくならずと予想されるのに対し、BAP1変異なし群では遺伝子Aの発現による予後の差は生じないと考えられる。この解析により、我々はBAP1変異と合成致死表現型を示す可能性がある遺伝子候補を700あまり得た。その中にDNA損傷応答因子・関連するクロマチン修飾因子の一群があった(22個)。22遺伝子の大部分はBAP1との関連の報告はなかった。

別の研究課題(基盤研究(B)16H04706)において、我々はゲノムワイドなshRNAライブラリーを用いた合成致死スクリーニングを行なった。具体的には、BAP1変異悪性中皮腫細胞株であるNCI-H28株およびコントロールとしてNCI-H28株にBAP1を過剰発現させた細胞を用い、shRNAライブラリーは、SIGMA社のMISSION LentiPlex Human Pooled shRNA libraryを用いた。このライブラリーは約16,000遺伝子に対して80,000あまりのshRNAクローンを含んでおり、ほぼゲノムワイドのスクリーニングが可能であった。ライブラリーをそれぞれの細胞株に感染させ、培養後ゲノムDNAを回収し、各細胞に含まれているshRNA配列を次世代シーケンサー(MiSeq)を用いて定量した。目的の合成致死表現型を示す遺伝子はコントロール株で数が多く変異細胞では優位に少ないshRNA配列であることを指標とした。

合成致死スクリーニングから抽出された候補遺伝子と再解析したデータから抽出した遺伝子を比較することで、候補遺伝子をさらに絞り込み、候補遺伝子を培養細胞を用いて個別にノックダウンして表現型を確認することで、最終的に着目して解析を進めて行く遺伝子を決定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞レベルにおける BAP1 と合成致死表現型を示す候補遺伝子の確定

データの再解析によって得られた 22 遺伝子と、別の研究課題（基盤研究 (B) 16H04706）で行った shRNA ライブラリースクリーニングの結果を参照することで、候補遺伝子を決定した。

その結果、1) 脱ユビキチン化酵素 A、および 2) DNA 損傷修復に関わるキナーゼ B が有力な候補遺伝子として抽出された。A 遺伝子も B 遺伝子も BAP1 との関連は現在までのところ報告されていない。

実際に、細胞株を用い、shRNA を使ったノックダウンをして表現型を確認したところ、A 遺伝子について合成致死表現型が確認された (図 1)。さらに、市販の A の阻害剤についても同様の結果が得られた。

また、B キナーゼについては阻害剤が入手可能であったため、阻害剤を用いた検討を行ったところ、BAP1 変異細胞株の方が BAP1 過剰発現細胞よりも阻害剤に対する感受性が高いことが示された (図 2)。キナーゼ B を制御する上流のキナーゼ C の阻害剤についても同様の結果が得られた。

予備的なデータではあるが、遺伝子 A のノックダウンは悪性中皮腫以外の BAP1 変異をもつがんについても同様の表現型を示すことが確認された。また、キナーゼ B の阻害剤は BAP1 変異を持つ悪性中皮腫担がんモデルマウスにおいても腫瘍増殖抑制効果を示すという予備的な結果も得られた。

##### (2) BAP1 変異と得られた候補遺伝子のノックダウンが細胞死を誘導する分子機構の解析

(2-a) 脱ユビキチン化酵素 A について A が制御しているという報告がある、DNA 損傷修復に関与するタンパク質 D の発現を BAP1 が制御している可能性が示唆された。しかしながら、現在までのところタンパク質 D の発現変動が直接合成致死による細胞死に関与しているかどうかははっきりした結論を出すことができていない。

そこで、直接合成致死表現型に関わっているかについて検討を進めると同時に、BAP1 も A もどちらも脱ユビキチン化活性を持っていることから、質量分析を用いた共通の脱ユビキチン化標的の探索を進めている。

##### (2-b) キナーゼ B について

キナーゼ B を制御しているという報告があるキナーゼ C の阻害剤を用いた場合も同様に BAP1 変異株の方が感受性が高いという結果が得られた。また、キナーゼ B もキナーゼ C も DNA 複製に関与しているため、HU (ヒドロキシ尿素) の感受性を検討したところ、BAP1 変異株の方が感受性が高いということが明らかとなった。

以上のことから、BAP1 とキナーゼ B、キナーゼ C が DNA 複製に関してどのような相互作用を持つのかについて、現在検討を進めている。

##### (3) 候補遺伝子の腫瘍マーカーおよび分子標的薬としての有用性

(1)でも記載したように、キナーゼ B の阻害剤は BAP1 変異を持つ悪性中皮腫担がんモデルマウスにおいても腫瘍増殖抑制効果を示すという予備的な結果が得られ、分子標的薬として有用である可能性が示唆された。

A についても担がんマウスの実験を現在進行中である。

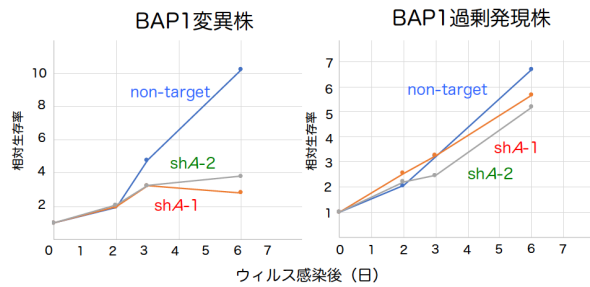


図 1 : 遺伝子 A のノックダウンは BAP1 と合成致死表現型を示す

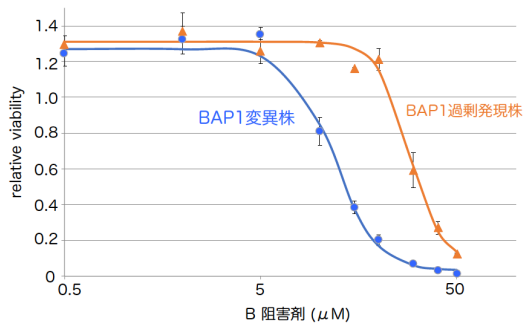


図 2 : B 阻害剤は BAP1 変異株で感受性が高い

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

1. Shishido Y, Tomoike F, Kimura Y, Kuwata K, Yano T, Fukui K, Fujikawa H, Sekido Y, Murakami-Tonami Y, Kameda T, Shuto S, Abe H. “A Covalent G-site Inhibitor for Glutathione S-Transferase Pi (GSTP1-1)”, *Chem. Comm.***53** (81), 11138-11141, 2017
  2. Tanaka K, Osada H, Murakami-Tonami Y, Horio Y, Hida T, Sekido Y. “Statin suppresses Hippo pathway-inactivated malignant mesothelioma cells and blocks the YAP/CD44 growth stimulatory axis”, *Cancer Letters*, **385**; 215-224, 2017
  3. Murakami-Tonami Y\*, Ikeda H, Yamagishi R, Inayoshi M, Inagaki S, Kishida S, Komata Y, Koster J, Takeuchi I, Kondo Y, Maeda T, Sekido Y, Murakami H, Kadomatsu K\*. “SGO1 is involved in the DNA damage response in MYCN-amplified neuroblastoma cells”, *Sci Rep*, **31615**, 2016
- \*: corresponding authors

〔学会発表〕 (計 29 件)

1. 鈴木浩也、向井智美、田部陽子、三井田孝、村上(渡並)優子、LATS2 変異を有した悪性腫瘍における合成致死を基盤とした細胞死誘導機構の検討、第 23 回日本がん分子標的治療学会学術総会 (2019.6, 大阪)
2. Yuko Murakami-Tonami, Shinichi Kiyonari, Yoko Tabe, Kenji Kadomatsu, Takashi Miida, Yoshitaka Sekido, Identification of the genes which show synthetic lethal phenotype with BAP1 mutations in malignant mesothelioma cells, 第 77 回日本癌学会学術総会 (2018.9.,大阪)
3. 村上(渡並)優子、天野美希、小木曾杏奈、清成信一、紅朋浩、田部陽子、金田典雄、門松健治、三井田孝、村上浩士、関戸好孝、悪性中皮腫における BAP1 遺伝子変異に対する合成致死遺伝子の網羅的探索、第 41 回日本分子生物学会年会 (2018.11., 横浜)
4. Yuko Murakami-Tonami, ‘The relationship between DNA damage response and MYCN amplification in neuroblastoma cells’, NAGOYA グローバルリトリート (2017.2,大府) 招待講演
5. 村上(渡並)優子、天野美希、小木曾杏奈、清成信一、紅朋浩、金田典雄、門松健治、村上浩士、関戸好孝、悪性中皮腫における BAP1 遺伝子変異に対する合成致死遺伝子の網羅的探索. ConBio 2017 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会) (2017.12,神戸)
6. 村上(渡並)優子、関戸好孝、門松健治、MYCN 増幅型神経芽腫細胞において SGO1 は DNA 損傷応答に関与する、第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会 (2017.6,別府)
7. Yuko Murakami-Tonami, Haruna Ikeda, Ryota Yamagishi, Mao Inayoshi, Shiho Inagaki, Satoshi Kishida, Yosuke Komata, Jan Koster, Ichiro Takeuchi, Yutaka Kondo, Toru Maeda, Yoshitaka Sekido, Hiroshi Murakami, Kenji Kadomatsu, SGO1 is involved in the DNA damage response in MYCN-amplified neuroblastoma cells, Gordon Research Conference, Genomic Instability (2016.7. Hong Kong)
8. 村上(渡並)優子、池田 遥奈、山岸 良多、稲吉 真央、稲垣 志保、岸田 聡、小俣 洋介、Koster Jan、竹内 一郎、近藤 豊、前田 徹、関戸 好孝、村上 浩士、門松 健治、MYCN 増幅型の神経芽腫細胞において SGO1 は DNA 損傷応答に関わる、第 39 回日本分子生物学会年会 (2016.11, 横浜)
9. 村上(渡並)優子、岸田聡、関戸好孝、門松健治、SGO1 は MYCN がん遺伝子増幅細胞において DNA 損傷応答を制御する、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会) (2015.12, 神戸)
10. 村上(渡並)優子、関戸好孝、門松健治、SGO1 regulates DNA damage response in MYCN-amplified neuroblastoma cells、第 74 回日本癌学会学術総会 (2015.10, 名古屋)

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。