

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20136

研究課題名(和文) 前立腺癌の薬剤感受性に関与する新規遺伝子のスクリーニング

研究課題名(英文) Screening for new genes for resistance to drug in prostate cancer

研究代表者

川村 憲彦 (Kawamura, Norihiko)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：40722658

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)：本研究は、前立腺癌のドセタキセル感受性に関わる新規遺伝子を抽出することと、そのメカニズムを解明し、新規治療ターゲットの発見につなげることを目的とした。前立腺癌細胞株の1細胞あたり1遺伝子がノックアウトされた細胞集団にドセタキセルを投与し、ドセタキセル投与下に生存することができた細胞からいずれの遺伝子がノックアウトされていたかを解析した。結果、抑制時に前立腺癌の進展を促す可能性があることが近年報告された遺伝子が抽出された。新規遺伝子を発見するために、抽出されたその他の新しい候補遺伝子の機能抑制を行った場合に前立腺癌細胞がドセタキセル抵抗性を示すのかを検討したが、有意な差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to identify new genes associated with resistance to docetaxel in prostate cancer, to clarify the mechanisms. Using CRISPR/Cas9 knockout screening system, we extracted several candidate genes. We examined whether these candidate genes knockout increase docetaxel-sensitivity in prostate cancer cell line, but knockout of these genes showed no difference of sensitivity to docetaxel, comparing to control cells.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：癌 薬剤耐性メカニズム スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌に対しては、エンザルタミドなどに代表される新規内分泌療法やドセタキセルを中心とした抗癌化学療法が行われている。しかし、一時的な奏功期間の後、薬剤抵抗性が獲得され、前立腺癌の進行・癌死とつながるため、薬剤抵抗性獲得のメカニズムの解明、ならびに新規治療法の開発は社会的にも重要と考えられている。

ドセタキセルへの抵抗性獲得に関しては、抗癌剤の投与で Clusterin の発現上昇¹⁾²⁾³⁾ や Bcl2 の発現上昇⁴⁾⁵⁾ などが起こり、アポトーシス回避に働くことが明らかになり、これらの遺伝子産物に対する阻害剤を用いた臨床試験が行われてきたが、著明な効果を認めたものはなかった⁶⁾⁷⁾。一方、最近では去勢抵抗性前立腺癌患者に対するエンザルタミドなどの新規内分泌療法において、血中循環腫瘍細胞におけるアンドロゲン受容体変異体の検出が治療抵抗性と関連していることが報告されており⁸⁾、前立腺癌の薬剤抵抗性獲得のメカニズムを新たな視点から解明すること、ならびに薬剤の感受性に関する遺伝子を探索することは、現在も重要な課題であると考えられる。

2013年、CRISPR/Cas9 system という遺伝子編集技術が報告された⁹⁾。この方法は、目的の遺伝子の配列に結合する相補的な配列を有する guide RNA と、Cas9 という endonuclease を発現するベクターを細胞に導入することで、guide RNA が目的の遺伝子に結合、これを Cas9 が認識し DNA 切断を起こし、目的遺伝子のノックアウトを可能としている。我々はこの技術を確認しており、これまで配列の高度な相同性のため区別不可能であった NANOG 遺伝子とその偽遺伝子 NANOGP8 を個別にノックアウトした細胞株を作成し、両遺伝子共に前立腺癌のドセタキセル感受性に関与していることを我々はすでに報告している¹⁰⁾。

さらに2014年、この技術を利用した新しい遺伝子スクリーニングの方法が報告された¹¹⁾。ゲノムワイドに1細胞1遺伝子をノックアウトした細胞集団を作成し、この細胞集団を薬剤に対する感受性によって選別し、残存した集団に含まれる guide RNA 発現領域を次世代シーケンサーで解析することで、薬剤感受性に関する遺伝子をスクリーニングすることができる。これは、「表現型の変化に関わる遺伝子を直接的に網羅的に」探索できる画期的なスクリーニング手法である。我々は、この手法を前立腺癌のエンザルタミド感受性に関する遺伝子の探索に利用しようと考えた。

<参考文献>

1. Miyake H, et al.(2000) *Cancer Research* **60** 2547-2554.
2. Mizutani K, et al.(2006) *Experimental Oncology* **28** 209-215.
3. Patterson SG, et al.(2006) *Oncogene* **25** 6113-6122.
4. Rocchi P, et al.(2004) *Cancer Research* **64** 6595-6602.
5. Gleaves M, et al.(2005) *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **56** (Supplement 1) 47-57.
6. Saad F, et al.(2008) *Journal of Clinical Oncology* **26** 5002.
7. Oh WK, et al.(2009) In *ASCO Genitourinary cancers Symposium*. Abstract 219.
8. Antonarakis ES, et al. (2014) *N Engl J Med*. **371** 1028-38
9. Mali P, et al.(2013) *Science* **339** 823-826.
10. Kawamura N, et al. (2015) *Oncotarget* **6** 22361-22374.
11. Shalem O, et al.(2014) *Science* **343** 84-87.

2. 研究の目的

去勢抵抗性前立腺癌が、エンザルタミドやドセタキセルといった薬剤に対して耐性を獲得する際に関与する新規の遺伝子を同定し、そのメカニズムを解明することで、去勢抵抗性前立腺癌に対する新たな治療戦略の礎を確立する。

3. 研究の方法

Cas9 を発現させた前立腺癌細胞株に、レンチウイルスを用いて GeCKO library を導入し、これらの細胞を全滅させうる濃度のエンザルタミド投与下に細胞を選択し、残存した細胞から DNA を抽出し guide RNA 発現領域を deep sequence することで、エンザルタミド感受性に関与する遺伝子をスクリーニングする。スクリーニングが計画通り進まない場合は、投与薬剤をドセタキセルへ変更し、スクリーニングを行う予定である。解析は遺伝子治療学教室の二村圭介准教授に依頼する。

スクリーニングで得られた候補遺伝子群から、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)などのバイオインフォマティクスリソースを用いて、エンザルタミドまたはドセタキセル感受性に関わる既知の遺伝子・パスウェイを省き、新規候補パスウェイを選定し新規候補遺伝子を抽出する。初年度にここまでの工程を終えることを目標とする。

新規候補遺伝子を1遺伝子ずつノックアウトした細胞株を作成する。その細胞株を用いて、*in vitro* と *in vivo* で実際に薬剤感受性が低下しているかを確認する。確認できた遺伝子については、パスウェイ解析などを行う。また、確認できた新規遺伝子については、感受性低下に関与するメカニズムについて検討を行う。

4. 研究成果

本研究は、前立腺癌のエンザルタミドまたはドセタキセル感受性に関わる新規遺伝子を

抽出することと、そのメカニズムを解明し、新規治療ターゲットの発見につなげることを目的とした。我々はまず、エンザルタミド感受性に関わる新規遺伝子の探索を試みたが、実験の根本となる細胞株に対するエンザルタミドの最小致死濃度の設定がうまくいかなかったため、ドセタキセル感受性に関わる新規遺伝子の探索へと目標を転換した。ドセタキセルにおいては最小致死濃度の設定が完了したため、前立腺癌細胞株(22Rv1)の各細胞に対し各々1遺伝子をノックアウトすることができ実験系(上述)を用いて、遺伝子の機能抑制(ノックアウト)スクリーニングを行った。具体的には、1細胞1遺伝子がノックアウトされた細胞集団にドセタキセルを投与し、ドセタキセル投与下に生存することができた細胞からいずれの遺伝子がノックアウトされていたかを次世代シーケンサーを用いて解析を行った結果、遺伝子のノックアウトによって前立腺癌細胞株のドセタキセル耐性が上昇した可能性がある遺伝子名が抽出された。抑制時に前立腺癌の進展を促す可能性があることが近年報告されたBACE2遺伝子や、膀胱癌で抗癌剤感受性に関わることが報告された mir1182 (miRNA)、急性骨髄性白血病の発生に寄与する可能性が報告されているMLLT10遺伝子などが上位に挙げられたため、これらの遺伝子のノックアウト細胞を前立腺癌細胞株(22Rv1)から作成し、コントロールの22Rv1細胞株と、ドセタキセルに対する耐性を比較することとした。Mir-1182とBACE2、MLLT10遺伝子を標的とするgRNAを作成しこれを細胞株に導入した後、薬剤選択し、これら各遺伝子をノックアウトした細胞株とコントロールの細胞株にドセタキセルを投与し、細胞の生存率をMTS assayにて評価した。しかし、ドセタキセルの投与濃度を0nMから20nMの間で変化させたものの、各候補遺伝子がノックアウトされた細胞とコントロール細胞との間で、ドセタキセル投与後の細胞生存率に、有意差

を認めなかった。スクリーニングで抽出された遺伝子の中から過去の文献から有望と考えた3つの遺伝子を抽出したが、実際のin vitroの実験では各遺伝子の欠損がドセタキセルに対する感受性に関与するという結果が得られなかった。全ての上位候補遺伝子の欠損株を作成したわけではないため断定はできないが、スクリーニングの実験系としてうまく機能しているのか、不明であり、結果として、新規遺伝子の発見には至らなかった。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

川村 憲彦 (Norihiko Kawamura)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教

員

研究者番号：40722658