

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06678

研究課題名(和文) 遺伝学的スクリーニングによるがん細胞の脆弱性の同定

研究課題名(英文) Identification of cancer vulnerabilities by genetic screening

研究代表者

松本 健 (Matsumoto, Ken)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：60222311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の脆弱性の同定を目指し、がん抑制遺伝子ノックアウト株と野生株でのCRISPR/Cas9 sgRNAライブラリースクリーニングを行った。遺伝子破壊によって、野生株と比較してノックアウト株において顕著に細胞増殖が抑制される候補遺伝子群が得られた。このうち遺伝子産物に阻害剤が利用できるものについて調べたところ、ノックアウト株で感受性が亢進した阻害剤が見出された。こうした遺伝子が、このがん抑制遺伝子の発現抑制が見られるがん細胞での薬剤標的となりうると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん遺伝子やがん抑制遺伝子のなかには、複数のがんで高頻度に変異や発現量に異常が見られるものがある。こうしたがん細胞でがん遺伝子、がん抑制遺伝子以外に薬剤標的を見いだすことができれば、既存薬に対する耐性の問題が回避でき、新たな治療法の開発につながる。今回得られた、がん抑制遺伝子ノックアウト株で遺伝子破壊によって増殖が抑制される遺伝子はがんの新規な薬剤標的候補となり、その遺伝子産物を標的とし、感受性がノックアウト株で亢進する化合物は、新規な抗がん剤のシードとなりうる。

研究成果の概要(英文)：To identify vulnerabilities in cancer cells, we performed CRISPR/Cas9 screening in tumor suppressor gene knockout cells and wild-type cells. Gene disruption screening yielded a set of candidate genes that markedly suppressed cell proliferation in the knockout cells compared to the wild-type cells. The knockout cells showed a higher sensitivity than the wild-type cells to several compounds that target the products of these candidate genes. These genes may be potential drug targets in cancer cells where the expression of the tumor suppressor gene is suppressed.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん抑制遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

複数の癌で高頻度に変異や発現量に異常が見られる癌遺伝子や癌抑制遺伝子が存在する。こうした癌細胞で癌遺伝子、癌抑制遺伝子以外に薬剤標的を見いだせれば、既存薬に対する耐性の問題が回避でき、新たな治療法の開発につながる可能性がある。このような癌細胞の脆弱性（ウイークポイント）として最もよく知られている例は、2005年に報告された、BRCA1やBRCA2遺伝子に変異を持つ遺伝性乳癌や卵巣癌におけるPARP1蛋白質である。実際、PARP1阻害剤がBRCA1/2変異をもつ癌の治療薬となっている。こうした脆弱性を見いだすためには、網羅的、系統的なスクリーニングを行うのがふさわしい。2004年ごろよりsiRNAスクリーニングが、また2013年ごろからCRISPR/Cas9スクリーニングが動物培養細胞で行えるようになり、研究開始当時に変異を持つ細胞での遺伝学的スクリーニングが行えるようになっていた。研究代表者も、化合物標的の同定を目的としたshRNAスクリーニングを実施しており、この方法を癌細胞の脆弱性の同定に用いたいと考えて本研究を提案した。

2. 研究の目的

ある癌細胞の脆弱性は、原因となっている癌遺伝子や癌抑制遺伝子が働くパスウェイの近傍に見つかる場合もあるかもしれないが、全く予想外のパスウェイ上の遺伝子の場合もあり得る。そこで、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の発現異常によって引き起こされる癌細胞において、ゲノムワイドにshRNA (short hairpin RNA) ライブラリーによるノックダウンスクリーニングおよびCRISPR/Cas9 sgRNA (short guide RNA) ライブラリーによる遺伝子破壊細胞スクリーニングを実施する。これによって合成致死遺伝子を同定、解析し、癌細胞の脆弱性を利用した新たな薬剤標的を見いだすことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞株： CRISPR/Cas9 スクリーニングを行うために、ヒト一倍体細胞株 HAP1 (野生株) と、HAP1 由来の癌抑制遺伝子破壊株 (以下、遺伝子破壊株と表記) を得た。それぞれに、Cas9 タンパク質を安定に発現する細胞株を樹立した。

(2) shRNA スクリーニング： 研究代表者らはこれまでに、ヒト 15,000 遺伝子を標的とする、レンチウイルス shRNA ライブラリー (バーコード付き) での化合物標的経路のスクリーニングを行っている (Kobayashi et al., *BBRC* 2015; Takase et al., *Sci. Rep.* 2017)。同じライブラリーを HAP1 野生株と遺伝子破壊株に感染させて、感染細胞の培養を続けた。

(3) CRISPR/Cas9 スクリーニング： トロント大学のブーン教授とモファット教授の協力を得て、ヒト 18,000 遺伝子余りを標的とする、レンチウイルス sgRNA ライブラリーでのスクリーニング法を習得した。Cas9 を発現する HAP1 野生株と遺伝子破壊株にライブ

ライリーを感染させて、感染細胞の培養を続けた。HAP1 野生株と遺伝子破壊株それぞれで、感染初期と2週間培養後、3週間培養後の細胞を回収した。

(4) 候補遺伝子の同定: shRNA または sgRNA ライブラリースクリーニングで生き残った細胞のゲノム DNA からバーコード領域または sgRNA コード領域を PCR で増幅し、次世代シーケンスによって各バーコード、sgRNA の頻度を調べて、野生株と遺伝子破壊株で比較した。野生株より遺伝子破壊株で頻度が低い shRNA や sgRNA が標的とする遺伝子群 (Depleted genes) と頻度が高い shRNA や sgRNA が標的とする遺伝子群 (Enriched genes) を得た。それぞれについてパスウェイ解析を行った。

(5) 候補遺伝子の検証: 野生株よりも遺伝子破壊株で頻度が低い shRNA、sgRNA が標的とする遺伝子群のなかから、遺伝子産物自体やそれが作用するパスウェイに対する特異的阻害化合物が利用可能な遺伝子を検索し、これら阻害化合物に対する HAP1 野生株と遺伝子破壊株の感受性を調べた。具体的には、様々な濃度の阻害化合物を細胞に添加して数日間培養し、WST-8 アッセイを用いて細胞増殖への効果を測定した。

(6) メタボローム解析: 野生株と遺伝子破壊株でメタボローム解析を行った。

4. 研究成果

(1) shRNA スクリーニング: 当初は肺癌由来 A549 細胞を利用する計画であったが、一倍体細胞のほうがゲノム編集による遺伝子破壊が容易であることを考慮し、ヒト一倍体 HAP1 細胞株を shRNA スクリーニング、CRISPR/Cas9 スクリーニングの両方で用いることとした。HAP1 野生株と遺伝子破壊株において、細胞増殖抑制を指標に shRNA スクリーニングを行い、遺伝子破壊株特異的に増殖を抑制する shRNA を同定した。

(2) CRISPR/Cas9 スクリーニング: Cas9 タンパク質を安定発現する HAP1 野生株と遺伝子破壊株を作成し、これらに sgRNA ライブラリーを感染させて、CRISPR/Cas9 スクリーニングを実施した。sgRNA 領域のシーケンスデータを得て、HAP1 野生株と遺伝子破壊株それぞれの2週間培養後、3週間培養後の各 sgRNA の頻度 (相対的リード数) を感染初期の各 sgRNA の頻度で割り、遺伝子ごとに平均値 (値が小さければ、その sgRNA を発現すると細胞増殖が抑制されることを示唆する) を算出した。その値を野生株と遺伝子破壊株で比較した。この方法で、遺伝子破壊株特異的に sgRNA の頻度が低下する遺伝子群 (Depleted genes) 頻度が上昇する遺伝子群 (Enriched genes) を得た。Depleted genes が、この癌抑制遺伝子の合成致死遺伝子候補と考えられる。

Depleted genes と Enriched genes についてそれぞれパスウェイ解析を行って、各遺伝子群に濃縮されたシグナリングパスウェイを同定した。その結果、Depleted genes は、

これまでにこの癌抑制遺伝子産物が作用することが知られていたパスウェイの関連遺伝子群

それ以外のパスウェイ上の遺伝子群

それらのいずれにも含まれない遺伝子群

に分けることができた。

(3)メタボローム解析： Depleted genes の上位に代謝酵素遺伝子が複数含まれていたため、HAP1 野生株と遺伝子破壊株でメタボローム解析を行った。その結果、遺伝子破壊株で顕著に代謝物が低下している代謝パスウェイが見出された。

(4) 阻害剤感受性の検討： Depleted genes、Enriched genes の上位の遺伝子について、個々の siRNA を用いて mRNA のノックダウンを行い、野生株と遺伝子破壊株での増殖抑制に差がみられるか検討したが、期待された方向への差がみられるものは少なかった。siRNA による短期のノックダウンでは、増殖への影響の差が見にくいのかもしいと考えられた。

つぎに、Depleted genes 中の遺伝子またはその遺伝子産物がかかわるシグナリングパスウェイや代謝パスウェイに働く阻害化合物があるかどうか検討したところ、複数の遺伝子産物について既知阻害化合物が利用できることが分かった。そこで、これらについて野生株と遺伝子破壊株の感受性を調べたところ、野生株に比べ遺伝子破壊株の感受性が高い阻害化合物が複数同定できた。

以上の結果から、今回同定した Depleted genes 中には、この癌抑制遺伝子と合成致死の関係にある遺伝子が少なくともいくつか含まれることが分かった。この癌抑制遺伝子は複数の癌で発現が低下している。つまり、こうした合成致死遺伝子の働きを抑えることで、こうした癌細胞の増殖を抑制できると考えられる。こうした癌細胞は、今回同定した化合物に対して感受性が高い可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kobayashi Hiroki, Takase Shohei, Nishimura Haruna, Matsumoto Ken, Harada Hironori, Yoshida Minoru	4. 巻 114
2. 論文標題 RNAi screening reveals a synthetic chemical-genetic interaction between ATP synthase and PFK1 in cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1663 ~ 1671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Scully Olivia J., Shyamasundar Sukanya, Matsumoto Ken, Dheen S. Thameem, Yip George W., Bay Boon Huat	4. 巻 24
2. 論文標題 C1QBP Mediates Breast Cancer Cell Proliferation and Growth via Multiple Potential Signalling Pathways	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1343 ~ 1343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24021343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsumoto Ken, Yoshida Minoru	4. 巻 23
2. 論文標題 Mammalian Chemical Genomics towards Identifying Targets and Elucidating Modes of Action of Bioactive Compounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 e202100561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202100561	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Matsumoto Ken, Bay Boon-Huat	4. 巻 28
2. 論文標題 Role of C1QBP/p32 and its therapeutic potential in breast carcinoma and other cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/0929867328666201231124038	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Takase, S., Kurokawa, R., Kondoh, Y., Honda, K., Suzuki, T., Kawahara, T., Ikeda, H., Dohmae, N., Osada, H., Shin-ya, K., Kushiro, T, Yoshida, M., and Matsumoto, K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Mechanism of action of prethioviridamide, an anticancer ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide with a polythioamide structure.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 1819-1828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.9b00410.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Lim, J. P., Nair, S., Shyamasundar, S., Chua, P. J., Muniasamy, U., Matsumoto, K., Gunaratne, J., and Bay B.-H.	4. 巻 452
2. 論文標題 Silencing Y-box binding protein-1 inhibits triple-negative breast cancer cell invasiveness via regulation of MMP1 and beta-catenin expression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Lett.	6. 最初と最後の頁 119-131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.03.014.	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Matsumoto Ken, Kose Shingo, Kuwahara Iku, Yoshimura Mami, Imamoto Naoko, Yoshida Minoru	4. 巻 8
2. 論文標題 Y-box protein-associated acidic protein (YBAP1/C1QB) affects the localization and cytoplasmic functions of YB-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24401-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoki Kazuma, Furuya Akemi, Matsumoto Ken, Tsujimoto Masafumi	4. 巻 503
2. 論文標題 The gene expression of two endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 isoforms is regulated by distinct posttranscriptional mechanisms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 3180 ~ 3185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.08.117	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 松本 健、高瀬翔平、吉田 稔	4. 巻 56
2. 論文標題 網羅的shRNAスクリーニングを用いた、化合物による細胞増殖抑制メカニズムの解明	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 649-650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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22件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 松本 健、堂前 直、吉田 稔
2. 発表標題 eIF5Aハイブシン化阻害剤GC7による細胞増殖抑制の標的経路の解析
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 松本 健、黒川留美、Tilman Schneider-Poetsch、高瀬 恵、鈴木健裕、堂前 直、吉田 稔
2. 発表標題 eIF5Aハイブシン化阻害剤GC7はミトコンドリアストレスを誘導する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 健、黒川留美、Tilman Schneider-Poetsch、高瀬 恵、鈴木健裕、堂前 直、吉田 稔
2. 発表標題 eIF5Aハイブシン化の阻害剤GC7はミトコンドリアストレスを誘導する
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第13回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本 健、黒川留美、Tilman Schneider-Poetsch、高瀬 恵、鈴木健裕、堂前 直、吉田 稔
2. 発表標題 eIF5Aハイブシン化阻害剤によるミトコンドリアタンパク質の減少
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 Matsumoto, K., and Yoshida, M.
2. 発表標題 Target pathway identification of bioactive compounds by shRNA library screening in human cultured cells.
3. 学会等名 IASCBC 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 健、黒川留美、吉田 稔
2. 発表標題 eIF5Aハイブシン化阻害剤GC7によるミトコンドリアタンパク質への影響
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本 健、黒川留美、吉田 稔
2. 発表標題 ハイブシン化阻害剤GC7による細胞増殖抑制の標的経路の解析
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsumoto, K., Takase, S., Kurokawa, R., and Yoshida, M.
2. 発表標題 Target pathway identification of bioactive compounds by multifaceted approaches
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Conference “Chemical Biology and Drug Discovery 2019” (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 健、黒川留美、Tariq, M., Schneider-Poetsch, T., 室井 誠、鈴木健裕、堂前 直、伊藤昭博、長田裕之、吉田 稔
2. 発表標題 翻訳因子eIF5Aのハイプシン化阻害剤GC7によるミトコンドリア制御
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 健、黒川留美、Tariq, M., Schneider-Poetsch, T., 凌 楓、室井 誠、鈴木健裕、堂前 直、伊藤昭博、長田裕之、吉田 稔
2. 発表標題 eIF5Aハイプシン化阻害剤GC7によるミトコンドリアタンパク質の減少
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 健、黒川留美、凌 楓、鈴木健裕、堂前 直、吉田 稔
2. 発表標題 eIF5Aハイプシン化阻害剤GC7によるミトコンドリア制御
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第11回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsumoto, K.
2. 発表標題 Translational control through the formation of messenger RNPs.
3. 学会等名 IASCBC 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 健
2. 発表標題 ゲノムワイドshRNAライブラリースクリーニングによるアポトーシス誘導物質JBIR-140の標的経路の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2018年度第2回支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsumoto, K.
2. 発表標題 Analysis of the mode of action of JBIR-140
3. 学会等名 The 9th Japan-Korea Chemical Biology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 健、高瀬翔平、近藤恭光、鈴木健裕、堂前 直、新家一男、長田裕之、久城哲夫、吉田 稔
2. 発表標題 JBIR-140の細胞増殖抑制機構の解析
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 健、黒川留美、Tariq, M.、鈴木健裕、堂前 直、伊藤昭博、吉田 稔
2. 発表標題 翻訳因子eIF5Aのハイプシン化を阻害するGC7によるミトコンドリア制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 健、黒川留美、Tariq, M.、Schneider-Poetsch, T.、凌 楓、室井 誠、鈴木健裕、堂前 直、伊藤昭博、長田裕之、吉田 稔
2. 発表標題 ハイプシン化阻害剤GC7のミトコンドリアへの影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 先端モデル動物支援プラットフォーム (AdAMS)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 320
3. 書名 マウス・ラットモデル作製・解析プロフェッショナル	

〔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

カナダ	トロント大学			
シンガポール	シンガポール国立大学			