

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07312

研究課題名(和文)腎がんにおける遺伝子変異に基づいた合成致死治療法の開発

研究課題名(英文)Development of synthetic lethal therapy based on gene mutations in renal cancer

研究代表者

荻原 秀明(Ogiwara, Hideaki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：40568953

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)：本研究では、腎臓がんのPBRM1、SETD2、BAP1欠損がんに対する合成致死治療標的を同定し、腎臓がん患者を対象とした個別化がん治療法を開発することを目的とする。本研究では、PBRM1欠損がんにおける合成致死標的を探索した結果、複数の標的を同定した。今後はこれらの標的について、PBRM1欠損がんにおける機能的意義のメカニズムを解明することで、これらの標的の阻害薬の創薬開発へと発展させていくことで、PBRM1欠損型腎臓がんにおける治療法の臨床応用を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓がんにおける遺伝子異常に基づいた個別化がん治療法は行われていない。PBRM1の遺伝子異常は約40%の腎臓がん患者で見られる。本研究で同定した標的の阻害薬を開発することで、PBRM1遺伝子異常を持つ腎臓がん患者の40%に対する個別化がん治療法の臨床応用が期待できる。さらにPBRM1は腎臓がん以外の胆道がん等の難治性がんでも高頻度異常が認められるため、他のがん種でも個別化治療法の臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to develop the precision medicine for renal clear cell carcinomas by identification of synthetic lethal targets for cancers deficient for chromatin regulator genes PBRM1, SETD2 and BAP1. We identified several synthetic lethal targets for PBRM1-deficient cancers. We would like to elucidate the mechanism of functional relationship between PBRM1 and each of target. And then, we aim for clinical application of synthetic lethal therapy for PBRM1-deficient cancers through the drug and discovery of inhibitors.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：腎臓がん PBRM1 合成致死性 最適化がん治療 ゲノム医療

## 1. 研究開始当初の背景

合成致死治療法は、遺伝子変異に基づいた分子標的治療法の中でも、がん特異性の高く、副作用の少ない分子標的治療法が期待できる新しい個別化がん治療法である。従来の分子標的治療法は、がんで異常のある（活性化）遺伝子産物を標的とする方法であった。一方で、合成致死治療法は、がんで異常のある遺伝子ではなく、その異常な遺伝子との合成致死遺伝子を標的する方法である。合成致死性とは、二つの遺伝子が両方機能喪失することで細胞致死となる現象であり、どちらか片方の遺伝子の機能喪失では細胞死は起こらない。そのため、合成致死治療法は特に失活型遺伝子異常のあるがんで有望な治療法となる。即ち、遺伝子 A と遺伝子 B が合成致死性の関係にあるとき、がんで遺伝子異常により失活した遺伝子 A は直接阻害することができない。しかし、遺伝子 A との合成致死遺伝子 B を阻害することで、がん細胞は選択的に（合成）致死となる。一方で、正常細胞では遺伝子 A は正常なため遺伝子 B だけを阻害しても合成致死とならない。そのため、合成致死性を利用したがん治療法（合成致死治療法）は、副作用が少なくがん特異性の高い治療法が期待できる。

近年の網羅的がんゲノム解析によって、クロマチン制御遺伝子が様々ながんで高頻度に遺伝子変異があることが分かってきた。また、それらの変異遺伝子の多くは失活型の変異が多い。また、活性化型変異の多くはキナーゼ遺伝子であり、それらの阻害薬の開発は世界中の製薬企業により創薬開発は飽和状態にある。一方で、活性化型変異がないものの失活型変異があるがん（がん抑制遺伝子の失活に起因するがん）においては、失活型変異遺伝子との合成致死遺伝子産物を標的とした創薬開発が期待できる。

腎臓がんは、網羅的変異検索により遺伝子異常が明らかにされているがんである。しかし、その遺伝子異常の多くは失活型の遺伝子異常であり、遺伝子変異に基づいた分子標的治療法は確立されていない。腎臓がんでは、PBRM1 (SWI/SNF クロマチンリモデリング遺伝子)、SETD2 (メチル化酵素)、BAP1 (脱ユビキチン化酵素) 等のクロマチン制御関連遺伝子が高頻度（それぞれ全体の 39.2%/21.0%/19.8%の変異率:TCGA より引用）で失活変異している。いずれかの遺伝子変異の合計は約 52%（同一患者の重複変異を含める）となる。そのため各遺伝子の失活がんに対する合成致死治療法を確立できれば、腎臓がんの半数の患者の治療法を提言できる。

## 2. 研究の目的

本研究は、腎臓がんの約半数の患者が対象となる PBRM1、SETD2、BAP1 欠損がんに対する合成致死治療標的を同定し、腎臓がん患者を対象とした個別化がん治療法を開発することを目的とする。その目的を達成するために、PBRM1、SETD2、BAP1 欠損がんに対する合成致死治療標的との合成致死のメカニズムを解明することで創薬開発の POC (Proof of Concept) を取得し、創薬開発も視野に入れた基盤情報の獲得を目指す。

## 3. 研究の方法

今までの研究成果により対象遺伝子のノックアウト (KO) 細胞を用いることで合成致死遺伝子を同定することに成功してきた(Ogiwara et al., *Cancer Discovery*, 2016)。以上の経験を踏まえ以下の手順で研究を進めていく。

- ①PBRM1、SETD2、BAP1 遺伝子 KO 細胞を樹立する
- ②KO 細胞を用いて合成致死標的を探索する
- ③KO 細胞への合成致死性を再検証する
- ④PBRM1、SETD2、BAP1 変異がん細胞株への合成致死性を検証する
- ⑤生体内レベルでの合成致死性を検討する
- ⑥合成致死性のメカニズムを解明する。

いままでの研究から得られた経験からクロマチン制御遺伝子間の抑制で合成致死性を示すことを明らかにしてきた。そこで、本研究ではスクリーニング対象遺伝子をクロマチン制御関連因子(遺伝子)の分子標的薬と siRNA に絞って、それらの中から、PBRM1、SETD2、BAP1 との合成致死標的を探索する。

## 4. 研究成果

これまでの研究で、本研究において重要な実験系である PBRM1、SETD2、BAP1 遺伝子 KO 細胞株モデルの構築に成功している。そして、これらのノックアウト (KO) 細胞株モデルを用いて、化合物および siRNA ライブラリースクリーニングによって、候補となる標的薬や標的遺伝子を得ている。そこで、これらのスクリーニングで得られた候補の中から有望な標的の絞り込みを行い、候補薬剤のなかで、PBRM1・SETD2・BAP1-KO に共通性して選択性の高かった X 阻害薬 A、Y 阻害薬 B に着目し、さらに詳細な解析を進めた。

X 阻害薬 A、Y 阻害薬 B による細胞増殖アッセイ、コロニー形成アッセイによる生存率測定法で検証した。その結果、X 阻害薬および Y 阻害薬が PBRM1・SETD2・BAP1-KO に共通性して選択性が高いことが考えられた。

次に、標的 X および標的 Y をノックダウンすることで、PBRM1・SETD2・BAP1-KO で合成致死性を示すかを検討した。その結果、PBRM1-KO 細胞に対して、標的 X をノックダウンしたときに合成致死性を示したが、標的 Y のノックダウンでは合成致死性を示さなかった。また、SETD2-KO 細胞および BAP-KO に対して標的 X あるいは標的 Y をノックダウンしても合成致死性を示さなかった。以上の結果より、PBRM1 の合成致死標的として標的 X が合成致死標的候補として絞り込んだ。そこで、腎臓がん細胞株における PBRM1 欠損がん細胞株に対する X 阻害薬の選択性を検討した。しかし、PBRM1 欠損型がん細胞株群は、PBRM1 正常型がん細胞株群に比べて X 阻害薬に対する有意な選択性を示さなかった。

これまでの研究で PBRM1、SETD2、BAP1 遺伝子の KO 細胞株モデルを構築し、化合物および siRNA ライブラリースクリーニングによって、候補となる標的薬や標的遺伝子を同定し、候補阻害剤を絞り込んだが、腎臓がん細胞株モデルにおいて検証した結果、候補薬剤はこれらの欠損型遺伝子異常に選択性を示さなかった。

そこで、腎臓がんの 40%以上の患者で欠損型遺伝子異常が認められる PBRM1 遺伝子異常に焦点をあて、PBRM1 欠損がんに有望な合成致死標的を同定することを検討した。まず、KO 細胞株モデルを用いて同定した標的薬の有望性が、がん細胞株モデルで反映されなかったことから、がん細胞株モデルにおける PBRM1 欠損型モデルの構築を検討した。つまり、腎臓がんの PBRM1 欠損型細胞株に PBRM1 の遺伝子を導入することで、PBRM1 遺伝子の欠損を相補した細胞株を樹立した。

次に、がん細胞株とその遺伝子異常に基づいた依存性因子に関するデータベースを利用して、PBRM1 欠損型腎臓がん細胞株に依存性を示す遺伝子を独自に探索し、依存性の高い上位トップ 10 の遺伝子を抽出した。さらに、PBRM1 欠損型細胞株（-PBRM1）および、その PBRM1 導入細胞株（+PBRM1）に対して、これらの候補遺伝子をノックダウンしたときの合成致死性を検討した。その結果、5 つの遺伝子が PBRM1 欠損型細胞株の合成致死遺伝子として選定された。今後は、さらにはがん細胞株パネルで有望な遺伝子を絞り込み、マウス移植腫瘍モデルで検証することで、PBRM1 欠損がんに有望な合成致死標的を同定するとともに、合成致死性のメカニズムを解明していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木麻里子1、河野隆志、荻原秀明
2. 発表標題 クロマチン制御遺伝子変異型腎臓がんにおける合成致死標的の探索
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019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
---------	---------