

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06181・19K21286

研究課題名(和文) PARP阻害剤の耐性機構の解析と耐性克服に有効な治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of resistance mechanisms of PARP inhibitor and development of effective therapeutic method for overcoming drug resistance

研究代表者

佐々木 由香 (SASAKI, Yuka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・特任研究員

研究者番号：50823332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：PARP阻害剤は、DNA修復に関わるBRCA1及びBRCA2に変異を有する卵巣がん、乳がん及び膵がんに特異的に致死を誘導する合成致死性抗がん剤として開発された。研究代表者らは、以前shRNAライブラリーを導入したT-REx HeLa細胞株をPARP阻害剤で処理し、遺伝子発現解析を行った結果を基に、耐性候補因子の検証を行った。また、新規PARP阻害剤耐性因子を同定するために、新たにPARP阻害剤耐性株をスクリーニングした。今後、これらの細胞株を用いて耐性規定遺伝子の解析を行うことで、新規耐性因子を同定し、PARP阻害剤耐性を克服するために新規治療法を提案できると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

合成致死性抗がん剤は、正常細胞ではなくがん細胞に対して特異的に致死を誘導することから、副作用の少ない抗がん剤として期待される。合成致死性抗がん剤であるPARP阻害剤も既に臨床応用されているが、がんの治療において、抗がん剤耐性の獲得が治療上の問題となっている。本研究課題では、PARP阻害剤に対する耐性株を新たに構築すると共に、PARP1欠損マウスを用いた解析より、PARPの発現低下がPARP阻害剤耐性に繋がる可能性を示唆した。今後、PARP阻害剤に対する新規耐性因子を同定し、耐性獲得時の治療法を開発することにより、がん治療に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：PARP inhibitors were developed as synthetic lethal anti-cancer agents for BRCA1 and BRCA2 mutated ovarian, breast and pancreatic cancer patients. Previously, we performed the comprehensive screening using shRNA library for identification of genes involved in PARP inhibitor resistance. In this study, we validated the candidate genes related to PARP inhibitor resistance. PARP inhibitor resistant clones were screened using breast cancer cell lines. In future, we will perform the screening for novel PARP inhibitor resistance factors using these PARP inhibitor resistant cancer cells. These outcomes will contribute to propose the novel therapy for overcoming PARP inhibitor resistance.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：PARP阻害剤 olaparib 抗がん剤耐性 PARP1 合成致死性抗がん剤 ポリ(ADP-リボース) 耐性克服治療法

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。

1. 研究開始当初の背景

近年開発されたポリ(ADP-リボース)合成酵素(PARP)阻害剤は、相同性組換え修復に関わる *BRCA1* 及び *BRCA2* に変異を有する卵巣がん、乳がん及び膵がんに特異的に致死を誘導する合成致死性抗がん剤として開発されており、既に日本、アメリカ、ヨーロッパにおいて承認されている抗がん剤である。合成致死性抗がん剤は、正常細胞ではなく、*BRCA1/2* に変異を持つがんに対して特異的に致死を誘導し、副作用が少ない抗がん剤として期待される。現在、がんの化学療法において、抗がん剤耐性の獲得が臨床上的問題として挙げられており、PARP 阻害剤についても、化学療法時の抗がん剤耐性の獲得が懸念される。本抗がん剤は、現在の臨床試験の状況からも、今後さらに多くのがん種に対して適応拡大が期待される。しかしながら、PARP 阻害剤耐性の獲得機構については未解明な点が多く、更なる解析が必要とされる。さらに、PARP 阻害剤が誘導された際の治療法についても確立されておらず、早期に抗がん剤耐性獲得時の治療法を開発する必要があると考えた。

2. 研究の目的

これまでに、主な PARP 阻害剤耐性機構として、*BRCA1* のフレームシフト変異による機能回復や、53BP1 の機能欠損の誘導による相同性組換え修復能の回復などが報告されてきた。これまでに、PARP は DNA 修復過程に寄与するだけでなく、細胞内の多様な生命現象に関わることが報告されており、研究代表者は PARP 阻害剤耐性の誘導に、DNA 修復経路以外の因子が関与する可能性があると考えた。しかしながら、DNA 修復因子以外の耐性誘導に関わる因子はほとんど同定されておらず、PARP 阻害剤耐性機構の解析も進んでいないことから、未解明な点が多い。さらに、PARP 阻害剤耐性を克服するための治療法も未だ開発されていない。そこで本研究課題では、PARP 阻害剤耐性に寄与する新規因子を同定し、その耐性機構を解明すると共に、PARP 阻害剤耐性を克服するための治療法を構築することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

PARP 阻害剤耐性因子の検証

以前に PARP 阻害剤耐性因子のスクリーニングにより同定された PARP 阻害剤耐性に寄与する耐性候補遺伝子の siRNA を複数種類合成し、Lipofectamine RNAiMAX を用いて、siRNA をがん細胞株にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞は、PARP 阻害剤に対する感受性を評価するために、コロニー形成法による細胞生存率の測定に用いた。具体的には、トランスフェクションした翌日に 6-well plate に細胞を播種し、トランスフェクションして 2 日後に、PARP 阻害剤を添加した。PARP 阻害剤を添加して約 1 週間後に、細胞を 4% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、細胞をクリスタルバイレットで染色した。染色されたコロニーの数を計測し、細胞の生存率を算出した。標的遺伝子のノックダウンレベルは、qRT-PCR を用いて測定した。

PARP 阻害剤耐性株の構築

PARP 阻害剤耐性株を構築するために、*BRCA1* に変異を有する乳がん細胞株を、変異原性の化学物質であるメチルメタンスルホン酸の存在下または非存在下において培養した。細胞が増殖した後に、複数回 PARP 阻害剤処理を行い、PARP 阻害剤耐性株の構築を試みた。耐性株が構築されているかどうかを検証するために、PARP 阻害剤に対する感受性を、親株との比較により MTT アッセイにより評価した。

PARP1 欠損マウスモデルを用いた検証

所属する研究室で作製された PARP1 欠損マウス、PAR の分解酵素である PARG と PARP1 の両者を欠損したマウスモデルを用いて、性状解析を行った。

4. 研究成果

PARP 阻害剤耐性因子の検証

研究代表者は、以前、shRNA ライブラリーを導入した T-REx HeLa 細胞株を PARP 阻害剤で処理することにより、多数の耐性候補遺伝子が検出されることを見出した。本研究では、TCGA データベースより乳がん患者において遺伝子欠失およびミスセンス変異が認められる 2 遺伝子に着目した。これら耐性候補遺伝子の siRNA を複数種類合成し、

T-REx HeLa 細胞においてトランスフェクションし、PARP 阻害剤感受性を調べた。その結果、候補の2つの遺伝子について詳細に解析したところ、PARP 阻害剤耐性を誘導しないことが分かった。今後、本スクリーニング結果について、がん患者に対して遺伝子発現異常が報告されている他の臨床的に意義のある遺伝子にさらに着目し、検証を行うことにより、耐性規定因子を同定したいと考えている。

PARP 阻害剤耐性株の構築

以前行われた PARP 阻害剤耐性因子の網羅的解析による検証から、有用な PARP 阻害剤耐性因子が同定できなかったことから、別法で、耐性既定因子を同定するために、PARP 阻害剤耐性株の単離を試みた。PARP 阻害剤耐性株を単離するために、変異原性を有する化学物質であるメチルメタンサルホン酸を用いて、乳がん細胞株を処理し、PARP 阻害剤耐性細胞のスクリーニングを行った。今後、耐性細胞を用いて、遺伝子発現解析を行うことにより、PARP 阻害剤耐性が誘導された原因を解明できると考えている。

PARP1 欠損マウスモデルを用いた検証

PARP1 欠損マウスモデルを用いて、その機能から阻害剤の作用に関係する因子を解析する検討を行った。その結果、ポリ(ADP-リボース) の分解酵素である PARG の欠損が、PARP1 機能阻害との組み合わせでマウスの生存性を増加させることを見出し、PARG の発現状態と PARP 阻害剤感受性が関連する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Chen L, Gunji A, Uemura A, Fujihara H, Nakamoto K, Onodera T, Sasaki Y, Imamichi S, Isumi M, Nozaki T, Kamada N, Jishage KI, Masutani M	4. 巻 167
2. 論文標題 Development of renal failure in PargParp-1 null and Timm23 hypomorphic mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical pharmacology	6. 最初と最後の頁 116-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2019.07.003	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 荒木智徳, 佐々木由香, 小野寺貴恵, 園田悠紀, 鳥谷直紀, 石飛俊介, 今道祥二, 高木正 稔 , 益谷美都子 , 益谷美都子	4. 巻 34
2. 論文標題 PARPとPARGを標的とする抗がん剤のバイオマーカー	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 951-958
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 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木由香、藤森浩彰、穂積美幸、小野寺貴恵、村上康文、小泉史明、井上謙吾、益谷美都子
2. 発表標題 PARP機能阻害条件下における合成致死遺伝子の同定と細胞死誘導機序の解析
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 Yuka Sasaki, Hiroaki Fujimori, Takae Onodera, Tadashige Nozaki, Fumiaki Koizumi, Mitsuko Masutani
2. 発表標題 Dysfunction of DUSP22 induces synthetic lethal effects under the knockdown condition of poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) in lung cancer cell lines.
3. 学会等名 PARP2019 (国際学会)
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
研究協力者	益谷 美都子 (MASUTANI Mitsuko)		
研究協力者	藤森 浩彰 (FUJIMORI Hiroaki)		
研究協力者	今道 祥二 (IMAMICHI Shoji)		
研究協力者	小野寺 貴恵 (ONODERA Takae)		