

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03512

研究課題名（和文）膠芽腫における合成致死性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Deciphering the mechanism of synthetic lethality in glioma

研究代表者

日野原 邦彦（Hinohara, Kunihiro）

名古屋大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号：50549467

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：悪性脳腫瘍であるグリオーマに対する治療薬は現在のところアルキル化剤テモゾロミド（TMZ）のみであり、そのTMZに対しても最終的に耐性が出現することから、新規治療法の開発が喫緊の課題である。本研究では神経膠腫に最も高頻度に認められるATRX変異に着目し、TMZに対する合成致死性メカニズムをゲノムワイドCRISPR loss-of-functionスクリーニングにより解析した。その結果、ATRX野生型と変異型のグリオーマ細胞はTMZに対して異なる脆弱性を有することを発見した。今後分子機構を詳細に解析することで、TMZの感受性を高めるコンビネーション療法や患者層別化マーカーの開発を推進していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤であるTMZはグリオーマに対して一定の効果があるものの、いずれ効き目がなくなってしまう。また、抗がん剤が効きやすい患者だけでなく、そもそも効かない患者も存在する。今回の研究成果から、特定の遺伝子を抑制する薬をTMZと同時に併用することでその効果が増強される可能性や、TMZが効きやすい患者の選別に応用可能な遺伝子の情報を得ることができた。今後これらのメカニズムをさらに研究し、効果的な治療法の開発へと結びつけたい。

研究成果の概要（英文）：Currently, the only treatment for gliomas, which are malignant brain tumors, is the alkylating agent temozolomide (TMZ), and since resistance to TMZ will eventually emerge, the development of new treatments is an urgent issue. In this study, we focused on ATRX mutations, which are most frequently observed in gliomas, and analyzed the mechanism of synthetic lethality to TMZ by genome-wide CRISPR loss-of-function screening. We found that ATRX wild-type and mutant glioma cells are differentially vulnerable to TMZ. Detailed analysis of the molecular mechanism will promote the development of combination therapies and patient stratification markers to enhance TMZ sensitivity.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：グリオーマ ATRX テモゾロミド 合成致死 CRISPRスクリーニング

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞は異なる遺伝子変異を持つ細胞集団としての多様性を組織内に創出し、環境の変動に適応しながら生き抜く力を持っている。悪性脳腫瘍である膠芽腫に対する治療薬は現在のところアルキル化剤テモゾロミド (TMZ) のみであり、その TMZ に対しても最終的に耐性が出現することから、その克服や新規治療法の開発が喫緊の課題である。

がんの進展過程において獲得されるドライバー変異はエピジェネティック因子にも同定されており、代表的な例としては SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の変異がある。SWI/SNF は多くのがん種で高頻度に不活化変異を認めることから、がん抑制遺伝子として働いていると考えられる。不活化変異によって SWI/SNF 複合体の DNA へのリクルートが正常に行われず、その結果クロマチン構造が変化することでヒストン修飾パターンが乱れることが報告されている。また、最近我々は化学療法耐性乳がんの特異的な SWI/SNF 変異を同定しており (unpublished data)、SWI/SNF の機能欠失は腫瘍化のドライバーとしてだけでなく薬剤耐性のドライバーとしても重要な役割を担っている可能性が示唆されている。

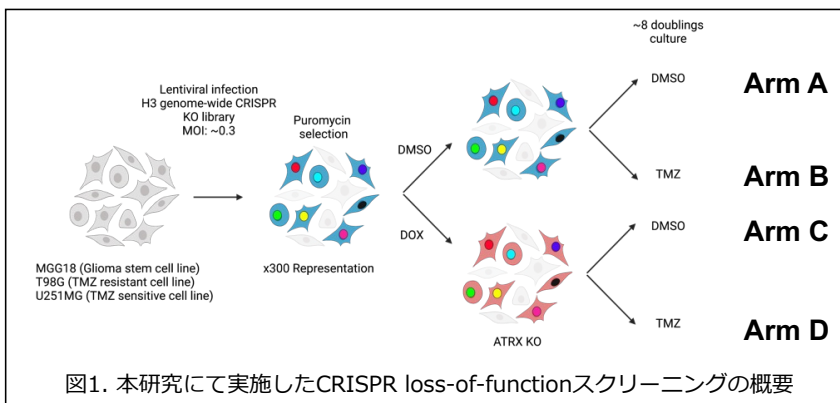
IDH1/2 変異陽性神経膠腫は低悪性度からグレード 4 の膠芽腫へと悪性化していくことが知られているが、IDH1/2 変異を持つ神経膠腫において最も高頻度に認められるエピジェネティック変異は SWI/SNF ファミリーに属する ATRX の不活化変異である。ATRX 変異は IDH1/2 変異陽性神経膠腫のうち p53 変異を持つ星細胞腫の約 80% に認められるが、ATRX の不活性化が膠芽腫のエピジェネティックランドスケープにどのように影響しているのか、そしてその変化がどのように膠芽腫への進展に寄与するかについては全くわかっておらず、膠芽腫に標準的に使用される唯一の治療薬 TMZ に対する耐性獲得機構への関与も不明である。膠芽腫患者に対する効果的な治療薬は TMZ 以外にないことから、新たなアイデアに基づいた新規治療法の開発や治療抵抗性に対抗する方法論の開発が必要とされている。不活化変異を標的とした治療法として、二つの遺伝子が両方機能喪失することで細胞死となる合成致死性が近年再度注目されつつあり、例えばがん抑制遺伝子 BRCA の機能欠失変異を持つがん患者に対する PARP1 阻害剤の合成致死性療法は、国内外の臨床試験から複数のがん種に対して非常に効果的であることが実証されつつある。ATRX と合成致死の関係にある未知の遺伝子を発見し膠芽腫における合成致死性メカニズムを解明することによって、これまでにない新規治療法の開発が期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究は、ATRX が不活化状態にある膠芽腫細胞の新規合成致死性メカニズムの解明を目的とする。膠芽腫の標準治療薬 TMZ の投与下における合成致死性メカニズムについても検証し、高いアンメットメディカルニーズが存在する膠芽腫の治療選択肢を広げることにつながる基礎的研究成果を得る。

### 3. 研究の方法

Massachusetts General Hospital にて樹立された患者由来の ATRX 野生型膠芽腫細胞株と市販の ATRX 野生型膠芽腫細胞株を用いて、ドキシサイクリン誘導性に ATRX を抑制する株を作成した。Dana-Farber Cancer Institute の X. Shirley Liu ラボにて開発された H3 Human CRISPR Knockout Library を ATRX のドキシサイクリン誘導系膠芽腫細胞株に感染させてゲノムワイド CRISPR loss-of-function スクリーニングを実施した。CRISPR スクリーニングはコントロール、ATRX ノックアウト、アルキル化剤テモゾロミド (TMZ) 投与、ATRX ノックアウト+アルキル化剤テモゾロミド (TMZ) 投与の 4 条件にて行なった (図 1)。コントロール細胞が 8 回以上細胞分裂するまで培養を継続 (約 3 週間) し、その後回収した DNA から PCR によりシーケンシングライブラリを作成して次世代シーケンサーによる sgRNA 解析を行なった。CRISPR 解析用パイプラインである MAGeCKFlute を用いてスクリーニングデータ解析を実施した。



#### 4. 研究成果

3種類の ATRX 野生型膠芽腫細胞株（市販の T98G と U251MG、および患者由来 MGG18）を対象としてドキシサイクリン誘導性 ATRX ノックアウト細胞株を樹立した。これらの細胞株の TMZ 感受性を調べたところ、T98G はほぼ TMZ に抵抗性である一方で、U251MG と MGG18 は顕著な感受性を示すことがわかった（図2）。

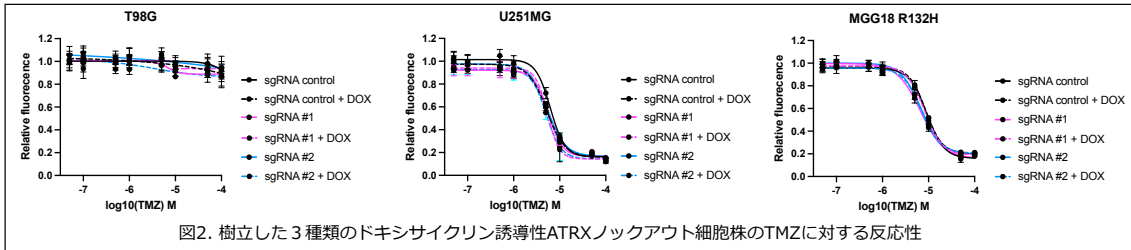


図2. 樹立した3種類のドキシサイクリン誘導性ATRXノックアウト細胞株のTMZに対する反応性

そこでこれらの細胞株を対象とし H3 Human CRISPR Knockout Library をレンチウイルスにより感染させ、抗生物質によるセレクション後にコントロール、ATR X ノックアウト、アルキル化剤テモゾロミド (TMZ) 投与、ATR X ノックアウト+アルキル化剤テモゾロミド (TMZ) 投与の4条件にてゲノムワイド CRISPR loss-of-function スクリーニングを実施した。その結果、コントロール (ATR X 野生型) と比較して ATR X ノックアウト細胞に特徴的な合成致死性遺伝子はほぼ存在しないことがわかった（図3, Arm A vs C 参照）一方で、TMZ 投与下における細胞の脆弱性は ATR X に規定される場合があることが明らかとなった。具体的には、TMZ に感受性を示す ATR X 野生型グリオーマ細胞株 U251MG 及び MGG18 は DNA 修復関連遺伝子の欠損によって TMZ 感受性が增大するが（図3, Arm A vs B 参照）、ATR X 欠損型グリオーマ細胞株は DNA 修復関連遺伝子だけでなくクロマチン立体構造制御因子やミトコンドリア関連遺伝子等の異なる遺伝子群の欠損によって TMZ 感受性が增大することがわかった（図3, Arm C vs D, B vs D 参照）。このことは、ATR X 野生型と変異型のグリオーマ患者は TMZ に対して異なる脆弱性を有している可能性を示唆しており、TMZ の感受性を高めるコンビネーション療法を開発する上で重要な知見である。特に、ATR X 欠損により新たに出現する脆弱性は ATR X 変異患者の合成致死性療法を開発するためのシーズとなる可能性があるため、今後これらの TMZ 合成致死性候補因子群の個別ノックアウト株を樹立して各々の機能解析を進め、新規合成致死性療法の開発に向けた研究を推進していく予定である。さらに、これらの候補遺伝子を欠損するがん細胞は TMZ 感受性が高いことが予想されるため、新規患者層別化マーカーとしての有用性についても検証を進める。また、これらの表現型を規定する分子メカニズムの解明に向け、現在 ATR X ノックアウト下における ChIP-seq 解析及び RNA-seq 解析を進めている。上記の脆弱性は ATR X 欠損によるクロマチンリモデリングの変化に起因する可能性が考えられるため、今後さらに詳細な分子的解析を進めることで ATR X によるグリオーマの分子制御機構を解明していきたい。

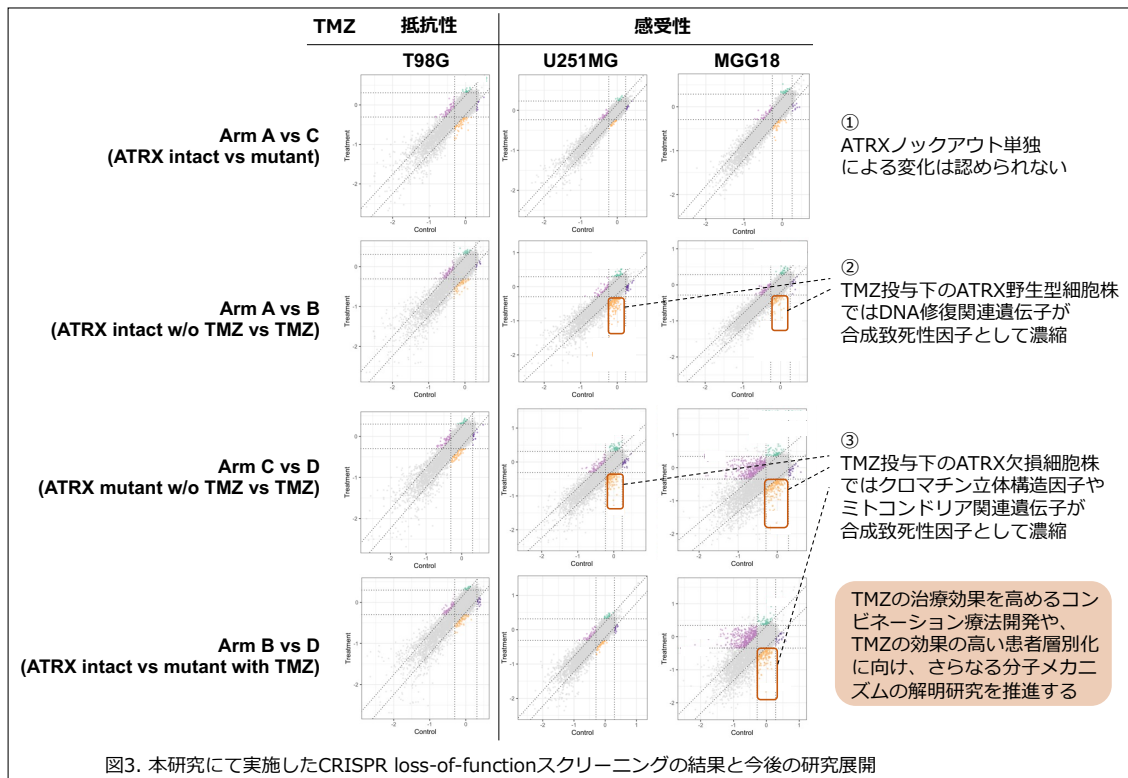


図3. 本研究にて実施したCRISPR loss-of-functionスクリーニングの結果と今後の研究展開

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 2件）

1. 著者名 Tsujino Takuya, Takai Tomoaki, Hinohara Kunihiko, Gui Fu, Tsutsumi Takeshi, Bai Xiao, Miao Chenkui, Feng Chao, Gui Bin, Sztupinski Zsofia, Simoneau Antoine, Xie Ning, Fazli Ladan, Dong Xuesen, Azuma Haruhito, Choudhury Atish D., Mouw Kent W., Szallasi Zoltan, Zou Lee, Kibel Adam S., Jia Li	4. 巻 14
2. 論文標題 CRISPR screens reveal genetic determinants of PARP inhibitor sensitivity and resistance in prostate cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-023-35880-y	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 Kato Shinichiro, Maeda Yuka, Sugiyama Daisuke, Watanabe Keisuke, Nishikawa Hiroyoshi, Hinohara Kunihiko	4. 巻 114
2. 論文標題 The cancer epigenome: Non cell autonomous player in tumor immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 730 ~ 740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15681	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口純矢、日野原邦彦、西川博嘉
2. 発表標題 星細胞腫におけるATRXによるクロマチン制御と合成致死ターゲットの同定
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日野原邦彦
2. 発表標題 がん細胞多様性のエピゲノム制御機構
3. 学会等名 第80回日本癌学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日野原邦彦
2. 発表標題 がんの進化と脆弱性
3. 学会等名 第81回日本癌学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日野原邦彦	4. 発行年 2023年
2. 出版社 癌と化学療法	5. 総ページ数 6
3. 書名 がんの表現型可塑性と治療抵抗性	

〔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
---------	---------