

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16388

研究課題名(和文) PARP阻害剤の新規耐性因子の同定と耐性克服治療法の開発

研究課題名(英文) The exploration of PARP inhibitor resistance factors and development of treatment which overcomes resistance to PARP inhibitor

研究代表者

佐々木 由香 (Sasaki, Yuka)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：50823332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：PARP阻害薬olaparibは、相同組換え修復に関わるBRCA1またはBRCA2に変異を持つ乳がん、卵巣がん、膵がんなどに対する合成致死性抗がん剤として臨床承認されている。本研究では、膵がん細胞株において、CRISPR/Cas9システムを用いてBRCA1ノックアウト株を構築した。さらに、この細胞株を用いて、olaparibに耐性株を複数単離したところ、これらはolaparib耐性因子を同定するために有用な細胞株であることが示唆された。単離したolaparib耐性株を用いた耐性因子の同定とその耐性機構の解析は、PARP阻害薬耐性を克服するための新規治療法の開発に繋がると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PARP阻害薬olaparibは合成致死性抗がん剤であり、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薬として期待される。既に臨床承認されているolaparibを用いた治療上の問題として、抗がん薬耐性の獲得が挙げられる。本研究課題では、olaparibに対して高感受性を示すBRCA1ノックアウト細胞を構築し、その細胞株を用いて、複数のolaparib耐性細胞株を単離した。これらの耐性機序を明らかにし、olaparib耐性獲得時の新規治療法を提案することで、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 inhibitor olaparib has developed as an anti-cancer agent based on synthetic lethality for BRCA1 and BRCA2 mutated breast, ovarian and pancreatic cancer patients. In this study, we constructed BRCA1 knockout pancreatic cancer cells using CRISPR/Cas9 system. Additionally, we isolated some olaparib resistance cells in BRCA1 knockout cells, and these cells showed high IC50 values of olaparib compared with BRCA1 knockout cells without down-regulation of PARP1 and up-regulation of BRCA1, suggesting that these cells are valuable for identification of the resistance factors. In future, we will explore the olaparib resistance factors and determine the mechanism of olaparib resistance. These outcomes will contribute to propose the novel therapy for overcoming olaparib resistance.

研究分野：生化学、分子生物学、腫瘍学

キーワード：Olaparib 抗がん剤耐性 PARP1 poly (ADP-ribose) 膵がん

## 1. 研究開始当初の背景

ポリ (ADP-リボース) 合成酵素 (PARP) 阻害薬 olaparib は、DNA 修復経路の一つである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臨床承認されている。本抗がん薬は正常細胞ではなく、*BRCA1/2* を含む相同性組換え修復因子に遺伝子変異を持つがんに対して特異的に細胞死を誘導することから、副作用の少ない抗がん薬として期待される。現在、がんの化学療法において、抗がん薬耐性の獲得が臨床上の問題として挙げられており、PARP 阻害薬 olaparib についても、治療継続による抗がん薬耐性の獲得が懸念される。本抗がん薬は、肺がん、大腸がん、前立腺がんなど複数のがん種を対象とした臨床試験が実施されており (Boussios, S. *et al.*, *Diagnostics*, 9, E87 (2019))、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、olaparib 投与による耐性の獲得機構については未解明な点も多く、耐性獲得時の治療法は未だ確立されていない。

## 2. 研究の目的

これまでに、PARP 阻害薬 olaparib の耐性機構として、二次的な *BRCA1* および *BRCA2* 変異による復帰変異の誘導や、DNA 修復因子 53BP1 の機能欠損の誘導等による相同性組換え修復能の回復が耐性獲得の主な原因として報告されてきた (E.K. Lee and U.A. Matulonis, *Cancers* (2020) 12, 2054.)。しかしながら、olaparib の標的分子であるポリ (ADP-リボース) 合成酵素 1 (PARP1) は DNA 修復過程に関わるだけでなく、細胞死やクロマチン制御、炎症応答などの様々な生命現象に関わることが報告されていることから、PARP 阻害薬耐性の誘導に DNA 修復経路に関わる因子以外の標的分子が関与する可能性があると考えた。そこで、本研究では、olaparib 耐性に関わる新規因子を同定し、その耐性機構を解明することを目指して研究を行った。

## 3. 研究の方法

### BRCA1 ノックアウト細胞株の樹立

Olaparib は、BRCA1/2 変異を持つがん細胞に対して細胞死を誘導することから、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集によりがん細胞株において *BRCA1* 遺伝子のノックアウトを行った。CCLE データベースより、*BRCA1* を高発現し、かつ、*BRCA1* 変異を持たない細胞株を選択し、本研究では、膵がん細胞株およびトリプルネガティブ乳がん細胞株をそれぞれ 1 細胞株ずつ使用することにした。*BRCA1* の guide RNA を 2 種類合成し、Cas9 遺伝子とともにトランスフェクションし、BRCA1 ノックアウト候補細胞のシングルクローンを単離した。*BRCA1* 遺伝子のノックアウトは、guide RNA 領域のシーケンス解析、qRT-PCR、および、ウェスタンブロッティングにより解析した。

### BRCA1 ノックアウト細胞株の olaparib 感受性

BRCA1 ノックアウト細胞株の olaparib に対する感受性を CCK アッセイにより解析した。CCK Assay Kit (Cell Counting Kit-8, Dojindo) を用いて添付のプロトコールに従って行った。96-ウェルプレートで olaparib 存在下にて培養した細胞に、CCK-8 溶液を添加し 37°C でインキュベーション後、450 nm の吸光度 (reference 600 nm) を測定することにより細胞の生存率を算出した。

### PARP 阻害薬耐性株の単離

上記で樹立した BRCA1 ノックアウト細胞株を用いて、PARP 阻害薬耐性細胞株を単離した。具体的には、BRCA1 ノックアウト膵がん細胞株を変異原性の化学物質であるメチルメタンサルホン酸の存在下と非存在下において培養後、一定期間 olaparib で処理するサイクルを複数回行った。Olaparib の濃度や処理日数等は複数の条件で検討を行った。PARP 阻害薬耐性細胞株の構築は、親株である BRCA1 ノックアウト細胞株との比較により、細胞生存率アッセイにより解析して調べた。

#### qRT-PCR

Total RNA は各細胞より High Pure RNA isolation Kit (Roche) を用いて抽出した。cDNA の合成は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用い、添付のマニュアルに従って行った。qRT-PCR は SYBR Green を用いて、StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) で解析した。標的遺伝子の mRNA レベルは *GUSB* (Glucuronidase Beta) の mRNA レベルで normalize した。使用したプライマーは以下のとおりである。*GUSB* 遺伝子： Forward primer 5' - GCCTGCGTCCACCTAGAAT -3', Reverse primer 5' - ACATACGGAGCCCCCTTGTC -3', *PARP1* 遺伝子： Forward primer 5' - GCTTCAGCCTCCTTGCTACA -3', Reverse primer 5' - TTCGCCACTTCATCCACTCC -3', *BRCA1* 遺伝子： Forward primer 5' - ATTGCGGGAGGAAAATGGT -3', Reverse primer 5' - AGAAGGGCCCATAGCAACAG -3'

## 4. 研究成果

### BRCA1 ノックアウト細胞株の樹立

2020 年度に、*BRCA1* のノックアウト細胞株の構築を目指し、*BRCA1* 遺伝子に対する guide RNA を 2 種類合成し、off target 効果を最小限にするために Cas9 タンパク質と共に guide RNA をトランスフェクションした結果、合計 49 株のシングルクローンを単離した。しかしながら、*BRCA1* 遺伝子の発現を調べたところ、*BRCA1* をノックアウトできていないことが分かった。そのため、2021 年度に Cas9 遺伝子と guide RNA を含むプラスミドを、がん細胞株にトランスフェクションする方法に切り替えて *BRCA1* 遺伝子のノックアウトを行い、複数の *BRCA1* ノックアウト腫がん細胞株の樹立を目指した。結果的に、得られた 4 種類の *BRCA1* ノックアウト候補株は、qRT-PCR による解析により、*BRCA1* の mRNA レベルを 9.6~29% まで低下させた。さらに、これら 4 細胞株において、*BRCA1* 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った結果、単離してきた候補株 2 つにおいて、*BRCA1* の発現量が完全に低下していたことから (図 1)、*BRCA1* ノックアウト腫がん細胞株を構築できたと判断した。

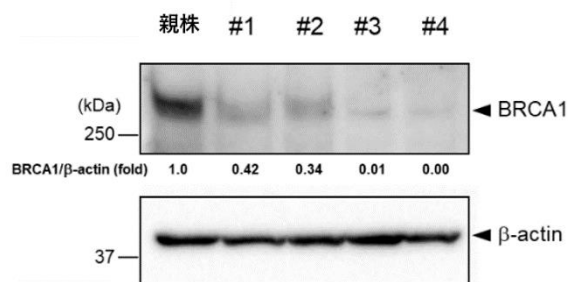


図1 BRCA1 KO株の樹立

### BRCA1 ノックアウト細胞株の olaparib 感受性

構築した 2 種類の *BRCA1* ノックアウト腫がん細胞株の olaparib 感受性を細胞生存率アッセイにより解析した。その結果、親株との比較により olaparib の  $IC_{50}$  値は、それぞれ 12% と 28% まで低下し、olaparib に対して高い感受性を示すことが分かった。Olaparib は、*BRCA1* 機能欠損により合成致死を誘導することから、構築した 2 種類の *BRCA1* ノックアウト株において、olaparib 処理時に DNA 修復経路に依存した細胞死が誘導されることを確認できた。したがって、これらの *BRCA1* ノックアウト細胞株を用いて、olaparib 耐性細胞株を構築することとした。

### Olaparib 耐性株の単離

複数の薬剤処理条件下 (olaparib 濃度、処理期間、および、メチルメタンスルホン酸の有無) において、合計 15 種類の olaparib 耐性株を単離した。CCK アッセイを行った結果、これらの耐性細胞株の olaparib に対する  $IC_{50}$  値は、47  $\mu$ M から >60  $\mu$ M であり、*BRCA1* ノックアウト腫がん細胞株と比べて 15 倍以上の  $IC_{50}$  値を示し、*BRCA1* ノックアウト前の親株と比較すると、約 2 倍程度 olaparib 耐性が誘導されていることが分かった。

### Olaparib 耐性株における PARP1 発現レベルの解析

Olaparib 耐性株における PARP1 発現レベルの低下は、olaparib 感受性の低下を誘導する可能性があることから、olaparib 耐性株における PARP1 レベルを解析した。Olaparib 耐性株のうち 13 クローンについて qRT-PCR を行った結果、*PARP1* mRNA レベルは、BRCA1 ノックアウト株と比べて、約 50~93%の PARP1 レベルを維持していた。さらに、ウェスタンブロット解析により PARP1 発現レベルを解析したところ、PARP1 レベルは 51~97%であり、親株である膵がん細胞株と比較して 71~191%であった。したがって、単離した olaparib 耐性株において、PARP1 の発現低下が olaparib 感受性を低下させたわけではないことが示唆された。さらに、olaparib 耐性は BRCA1 の復帰変異により耐性を獲得することが報告されていることから、BRCA1 の発現レベルを解析した。その結果、BRCA1 の発現は検出されず BRCA1 の発現量上昇が olaparib 耐性を誘導したわけではないことが明らかとなり、別の要因で olaparib 耐性を獲得した可能性があることが明らかとなった。

以上の結果より、本研究で構築した olaparib 耐性膵がん細胞株は、olaparib 耐性因子を同定するために有用な細胞株であると考えられる。今後、これらの耐性細胞株の遺伝子発現解析等を行い、細胞内シグナル経路を網羅的に解析することで、olaparib 耐性因子、および、その耐性機序を明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Sonoda Yuki, Sasaki Yuka, Gunji Akemi, Shirai Hidenori, Araki Tomonori, Imamichi Shoji, Onodera Takae, Ryden Anna-Margareta, Watanabe Masatoshi, Itami Jun, Honda Takuya, Ashizawa Kazuto, Nakao Kazuhiko, Masutani Mitsuko | 4. 巻<br>12                |
| 2. 論文標題<br>Reduced Tumorigenicity of Mouse ES Cells and the Augmented Anti-Tumor Therapeutic Effects under Parg Deficiency  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Cancers   | 6. 最初と最後の頁<br>1056 ~ 1056 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/cancers12041056  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---------|---------|
|---------|---------|