

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02796

研究課題名（和文）複数因子の同時阻害による新規治療標的探索法の開発

研究課題名（英文）Development of new therapeutic target search methods by simultaneous inhibition of multiple factors

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） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がんでの1つの遺伝子異常に対して、さらに2つの遺伝子を同時に抑制させることで、がん細胞を特異的に抑制させる方法を考案した。この発想に基づいて、2つの遺伝子を同時に抑制する方法を用いて、SMARCB1遺伝子の欠損型遺伝子異常のあるがん細胞に対して、2つのタンパク質の同時阻害剤を投与することで、抗腫瘍効果を示すことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MARCB1欠損型のがんには、小児がんや若年性がんであるラブドイド腫瘍や類上皮肉腫が知られている。これらのがんは難治性希少がんであり、治療法が十分に確立されていない。本研究では、SMARCB1欠損がんに対する治療標的を同定した。本研究の成果は、その標的に対する阻害剤を用いた分子標的治療法が、小児がんや若年性がんであるラブドイド腫瘍や類上皮肉腫の治療法の確立につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we devised a method to specifically suppress cancer cells by simultaneously suppressing two genes for one genetic abnormality in cancer. Based on this idea, we used a method of simultaneously suppressing two genes and found that simultaneous administration of two proteins to SMARCB1-deficient cancer cells showed an antitumor effect.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：合成致死 パラログ SMARCB1 小児がん 若年性がん

1. 研究開始当初の背景

がん遺伝子パネル検査が日本で保険適用になり、がん患者ごとの遺伝子異常に基づいた“がんゲノム医療”が始まりつつある。現在、臨床応用が実現化した“がんゲノム医療”は、がん遺伝子の活性化型異常タンパク質を阻害する治療であるが、一部のがんに限られる。一方で、その他のがんではがん抑制遺伝子等の欠損型異常があるが、機能欠損異常は阻害できない。しかし、欠損型遺伝子異常に対する合成致死性因子を阻害すれば治療が可能となる。“合成致死性”とは、1つの遺伝子だけが抑制されても細胞の生存に影響はないが、2つの遺伝子の機能が両方同時に抑制されたときに細胞が致死となる現象である。例えば、遺伝子 A の欠損型異常のがん患者がいた場合、この患者に A との合成致死因子 B の阻害薬の投薬治療をしたとする。正常細胞では A は正常なため、B だけが阻害されても正常細胞は死なない。一方で、がん細胞では A が欠損している上に、さらに B も阻害することで合成致死となる。このように合成致死性を利用したがん治療法(合成致死治療法)は、がん特異性が高く副作用の少ない治療が期待でき、特に欠損型遺伝子異常を持つがんに有望である。

2. 研究の目的

これまでの合成致死標的の探索方法は、ある欠損型遺伝子異常に対して、1つの遺伝子を抑制することで細胞が死ぬ因子(合成致死因子)を見つけ出す方法である。この方法は、shRNA や CRISPR/Cas9 システムによる網羅的な合成致死標的探索手法が確立されており、既存細胞株に対する合成致死因子のデータベース化まで始まっている。このように1つの遺伝子異常に対して、単独因子を標的とする合成致死因子の探索法はすでに一般化している状況にある。一方で、ある一つの欠損型遺伝子異常に対して、1つの因子の抑制では不十分だけれども、2つ以上の複数の因子を同時に抑制したときに致死性を示す現象も考えられる。しかし、これまでの単独因子の抑制に基づく探索方法では、複数因子の同時抑制による新しい標的の発見の可能性は想定されていなかった。このように複数因子の同時抑制による治療標的探索法を確立できれば、欠損型遺伝子異常がんに対する新規治療標的の発見、そして新しい治療法の開発への発展が期待される。

そこで本研究では、複数因子同時抑制による新しいがん治療標的探索法を確立し新規治療標的を同定する。

3. 研究の方法

クロマチン制御因子は様々な難治性がんを高頻度に欠損型遺伝子異常が認められる。一方で、クロマチン制御因子の多くはパラログが存在する。そこで本研究では、クロマチン制御因子のパラログ因子群の同時抑制による治療標的探索法を確立し、クロマチン制御因子欠損がんを選択的に致死性を示す治療標的を同定する。さらには、その選択的な致死性のメカニズムを解明することによって、クロマチン制御因子欠損がんの新規治療法の開発を目指す。

パラログ因子群の抑制のためのコンストラクティブライブラリーの構築

本研究では、これまでのクロマチン制御因子の研究経験から、まずクロマチン制御因子のパラログを対象とする。文献や Gene Card 等のデータベースを用いてクロマチン制御因子の中でパラログが存在する因子を選定し、情報を整理する。本研究で対象とするクロマチン制御因子の中で、パラログ因子群は 100 種以下になると推定される。それらのパラログ因子群のそれぞれの siRNA を、パラログ因子群ごとに一つにまとめた siRNA プールライブラリーを作製する。

クロマチン制御因子欠損がんモデルの構築

アイソジェニック細胞株モデルとして相補細胞株あるいはノックアウト細胞株を樹立する。相補細胞株は、対象遺伝子の欠損型細胞株にその遺伝子のレンチウイルス由来発現ベクターを導入することで樹立する。ノックアウト細胞株モデルは、対象遺伝子の野生型細胞株に CRISPR/Cas9 システムを用いて、対象遺伝子のノックアウト細胞株を樹立する。

クロマチン制御因子欠損がんの治療標的候補の探索

クロマチン制御因子欠損がんモデルとパラログ因子群の siRNA プールライブラリーを用いて、各パラログ因子群の同時抑制によって、対象のクロマチン制御因子の正常細胞では致死とならず、欠損がん細胞でのみ選択的に致死性を示す因子群を探索する。

クロマチン制御因子欠損がんの治療標的の絞り込み

上記で同定した標的因子群について、ノックアウト細胞株モデル系や、がん細胞株モデル系を用いて、標的候補の抑制による合成致死性を検証することで、候補の中から有望な治療標的を絞り込む。

クロマチン制御因子欠損がんにおける治療標的との機能的関係性のメカニズムの解明

RNA-Seq 解析による網羅的遺伝子発現解析、ATAC-Seq 解析によるクロマチン構造解析、ChIP-Seq 解析によるクロマチン結合因子局在解析等を統合的に解析することによって、対象とするクロマチン制御因子とそのパラログ因子群との機能的関係性のメカニズムを解明する。

4. 研究成果

まず、文献やデータベースを調査し、クロマチン制御因子の中で、パラログが存在する因子を特定し、パラログペアとなる因子群を絞り込んだ。次に、パラログペアを同時に抑制するためのアッセイ系を構築するために、パラログペアに対するそれぞれの遺伝子を標的とする siRNA を作成し、各パラログペアの siRNA を混合した siRNA プールライブラリーを構築した。さらに、パラログペアを同時に抑制することで正常型細胞への細胞増殖への影響を検討するために、正常型細胞 HEK293T 細胞に対して、各パラログペアの siRNA を導入することで各パラログペアの機能を抑制した後の細胞増殖を観察した。その結果、いずれのパラログペアを抑制しても細胞増殖への影響が少なかった。このことから、パラログペアを同時に抑制しても正常細胞への影響が少ないことが考えられるため、パラログペアを同時に抑制する阻害薬を開発した場合に人体への副作用が少ないことが考えられた。

クロマチン制御因子の欠損型がん細胞株モデルの構築を検討した。特にがんで高頻度に欠損型異常が認められる SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の構成遺伝子やヒストン修飾遺伝子に着目し、それらの遺伝子の正常型細胞株に対してノックアウト細胞株、あるいは欠損型細胞株に対してレスキュー

一細胞株を樹立することで、クロマチン制御因子欠損型がん細胞株モデルを構築した。さらに、これらのモデル系を用いて、パラログペアを抑制したときに正常型細胞では増殖に影響が少なく、欠損型細胞では致死性を示す標的候補を探索した。その結果、複数のパラログペアを標的候補として同定した。

クロマチン制御因子欠損型がん細胞株モデルの中で SMARCB1 欠損型細胞株モデルでの検討を行った。SMARCB1 欠損型細胞株 (−SMARCB1 細胞株) において、SMARCB1 の cDNA を導入したレスキュー細胞株 (+SMARCB1 細胞株) を構築した。この SMARCB1 のアイソジェニック細胞株モデルを用いて、パラログペア siRNA ライブラリーによって、パラログペアを同時抑制したときに、合成致死性を示すパラログペアを探索した。その結果、7 ペアのパラログペアを抽出した。その中で 1 ペアは既存の標的候補であったため、スクリーニング自体の信頼性も担保されていると考えられた。そこで、残りの 6 ペアについて、別のバックグラウンドの SMARCB1 正常型細胞株と SMARCB1 欠損型細胞株で再検証を行った結果、1 ペアのパラログペア X/X' を絞り込んだ。さらに X/X' の合成致死標的パラログペアの有望性を検証するために、SMARCB1 正常型 6 細胞株と SMARCB1 欠損型細胞株 6 細胞株の細胞株モデルで再検証した結果、合成致死性を示すことを明らかにした。

SMARCB1 欠損がんにおけるヒストンアセチル化酵素のパラログペア (HAT-X/X') を阻害すると合成致死性を示す機能的メカニズムを検討した。まず、合成致死性を規定する決定因子を探索するために、網羅的発現解析を行い、SMARCB1 欠損型細胞で特異的に発現が増加し、HAT-X/X' の阻害で発現が減少する遺伝子として膜タンパク質遺伝子 KREMEN2 を同定した。CUT&RUN アッセイによって、SMARCB1 は、KREMEN2 遺伝子座のプロモーター領域に局在することで転写を抑制することを明らかにした。一方で、SMARCB1 が欠損した細胞では、HAT-X/X' が KREMEN2 遺伝子座にリクルートされることで、KREMEN2 の転写が促進されることを明らかにした。このとき、HAT-X/X' を同時に阻害すると、KREMEN2 の転写が抑制されることで、アポトーシスが誘導されることを明らかにした。また、これらの現象は、細胞株モデルだけでなくマウス移植腫瘍モデルでも同様の現象が認められた。さらに、SMARCB1 欠損型細胞株由来のマウス移植腫瘍は、HAT-X/X' 同時阻害剤の投与によって、抗腫瘍効果を示した。以上のことから、HAT-X/X' 同時阻害剤は SMARCB1 欠損がんの治療薬として有望であると考えられた。

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 Mariko Sasaki, Daiki Kato, Karin Murakami, Hiroshi Yoshida, Shohei Takase, Tsuguteru Otsubo, Hideaki Ogiwara	4. 巻 未定
2. 論文標題 Targeting Dependency on a Paralog Pair of CBP/p300 against De-repression of KREMEN2 in SMARCB1-Deficient Cancers	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-49063-w	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、荻原秀明
2. 発表標題 SMARCB1欠損がんにおける複数因子同時阻害法を用いた合成致死標的の同定
3. 学会等名 第28回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2024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
---------	---------