

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19415

研究課題名(和文) DNA障害型抗がん剤感受性増強因子SLFN11を標的とした創薬

研究課題名(英文) Drug discovery targeting SLFN11 the enhancer of sensitivity to DNA-damaging anti-cancer agents

研究代表者

村井 純子 (Junko, Murai)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：60532603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：Schlafen 11 (SLFN11)は、DNA障害型の抗がん剤の感受性を高める遺伝子として注目されている。SLFN11の発現を高める薬剤を開発し、それにより抗がん剤感受性を増強し、non-responderを無くすることが本研究の目的である。SLFN11の発現上昇を経時的に観測可能な遺伝子組み換え細胞を樹立し、約4000種類の薬理活性をもつドラッグライブラリーを用いて、SLFN11のタンパク質レベルが高まる新規の薬剤を同定した。別のカテゴリーの薬剤XとYも同定できた。化合物XとYがタンパク質発現全体に及ぼす影響をプロテオーム解析で分析した。現在、成果を論文にまとめている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLFN11はDNA障害型抗がん剤の感受性を高めるので、SLFN11の発現を高める薬剤には臨床的に意義がある。またSLFN11の発現制御には不明な点が多いので、その機序解明のためにも意義がある。今回、既知のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤ほどの効果はなかったが、新規のカテゴリーとなるSLFN11の発現を高める薬剤Xを同定した。この発見によって、SLFN11の発現上昇のあらたなアプローチが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Schlafen 11 (SLFN11) is a gene that increases sensitivity to DNA-damaging anticancer drugs. We established genetically engineered cells in which the upregulation can be measured in a time course. The cells are tested with ~4000 pharmacologically active drugs to identify novel agents that increase the protein level of SLFN11. Consequently, a novel category of drugs (X and Y) was identified. The effects of compounds X and Y on overall protein expression were analyzed by proteomic analysis. The results are currently being compiled into a manuscript.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA修復剤 ヒストン 抗がん剤 薬剤感受性 エピジェネティクス DNA損傷 複製ストレス HDAC阻害剤

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

DNA 障害型の抗がん剤や DNA 複製阻害剤 (以下単に、抗がん剤) には、古くは 1960 年代から使用されているプラチナ製剤、トポイソメラーゼ阻害剤、シタラピンなどがあり、これらはがん種によっては第一選択薬として使われているほどメジャーであるが、いまだに responder/non-responder を投与前に予測することは困難である。Schlafen 11 (SLFN11) は 2012 年に、二つの大規模がんデータベース (NCI-60 と CCLE: the cancer cell line encyclopedia) の解析から、抗がん剤の感受性と mRNA 発現量が最も相関する遺伝子として報告された。それ以降、様々ながん種において、SLFN11 の発現量が抗がん剤効果予測バイオマーカーとして有用であることが報告されている (図 1)。本研究者は、SLFN11 が抗がん剤感受性を増強するメカニズムを世界に先駆けて報告するなど、SLFN11 の研究をリードしていた。SLFN11 の発現制御についても研究を進めており、SLFN11 には機能破壊の変異はほとんど起きず、発現制御はプロモーターのメチル化レベルに大きく依存することを報告していた。



2. 研究の目的

これらの背景から、SLFN11 の発現は外的刺激により高めることが可能であり、実際一部の epigenetic modulators (HDAC 阻害剤など) にその作用あることも報告していた。しかし、epigenetic modulator は SLFN11 以外の遺伝子発現にも、多大な影響を与えるため、実臨床での応用は困難と考え、SLFN11 特異的に発現上昇を誘導する化合物の発見を目的として本研究を開始した。

3. 研究の方法

1) 細胞ベースのドラッグスクリーニング系の構築と SLFN11 発現誘導化合物の同定

HDAC 阻害剤 (Entinostat) 投与により SLFN11 発現レベルが上昇するパーキットリンパ腫由来の Sultan 細胞を用いて、ゲノム上の SLFN11 遺伝子の ATG 配列直下に、HiBiT シークエンスを CRISPR/Cas9 法を用いて導入した。HiBiT シークエンスは翻訳されると、それに結合する約 18kDa の NanoLuc® ルシフェラーゼ断片 (LgBiT) と基質を培養液中に加えることで、発光法によって検出可能となる。薬剤耐性遺伝子は挿入されていないため、数回のセミクロニングを繰り返し、組み換えが起こった細胞が濃縮している細胞集団を獲得した。この細胞集団を用いて、ルシフェラーゼシグナル (SLFN11 発現量) を上昇させる化合物を探索した。ドラッグスクリーニングには、国立がん研究センター先端医療開発センターから提供された、薬理的活性を確認済みのドラッグライブラリー (約 4,000 種類) を利用した。

2) SLFN11 発現誘導化合物の評価 (タンパク質量など)

ヒット化合物について、SLFN11 の発現変化をウェスタンブロット方で、確認した。HDAC 阻害剤と、新規に同定した化合物 (decitabine、pomalidomide) について、薬剤投与前後のサンプルを用いて定量的プロテオーム解析を行い、薬剤が細胞全体に及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

1) 細胞ベースのドラッグスクリーニング系の構築

いくつかの細胞株で HDAC 阻害剤(entinostat)による SLFN11 の発現変化を検討したところ、パーキットリンパ腫由来の HS-Sultan 細胞 (以下 Sultan 細胞) において、顕著な発現上昇を認められた (Figure 1A)。Sultan 細胞のゲノム上の SLFN11 遺伝子 ATG 直下に 33 bp の HiBiT シグナルを挿入し (Figure 1B)、entinostat による SLFN11 発現上昇を、HiBiT を認識する抗体を用いて確認した (Figure 1C)。また同実験による、HiBiT に tag された SLFN11 の発現上昇は 5 倍程度であることを、Luciferase signal の検出で明らかとなった (Figure 1D)。

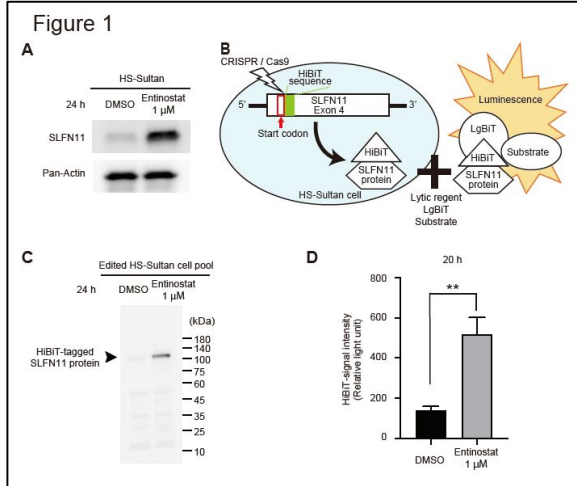
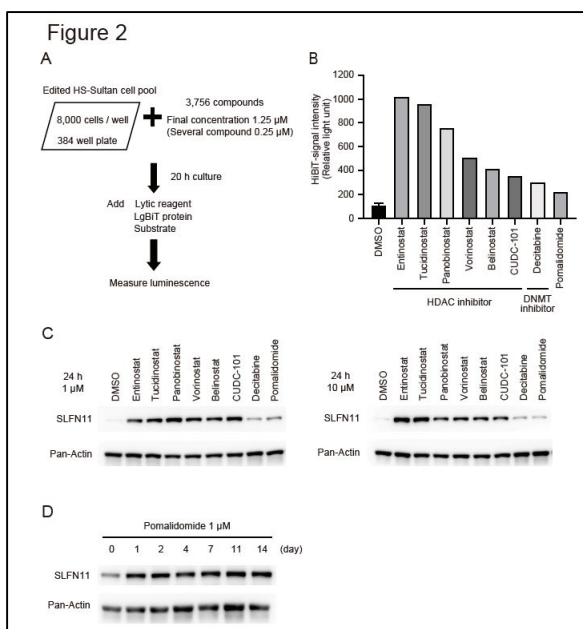


Figure 1. A: Sultan 細胞を用いた Immunoblot 実験結果 B: 本研究で用いた HiBiT signal の挿入と検出方法の模式図 C: HiBiT-tagged SLFN11 の検出 D: Entinostat による HiBiT-tagged SLFN11 の発現上昇の定量結果

2) SLFN11 発現誘導化合物の同定

国際がんセンターから供与いただいた、3,756 種類の化合物を、HiBiT シグナルを挿入した Sultan 細胞 (以下、HiBiT-Sultan 細胞) に加えて 20 時間後の Luciferase signal を測定した (Figure 2A)。その結果、ネガティブコントロールである DMSO サンプルに比べて、明らかなシグナル上昇を認められた化合物が同定できた (Figure 2B)。多くは、SLFN11 の発現を高めることが報告済みの HDAC 阻害剤であったが、DNA methyltransferase inhibitor である Decitabine と immunomodulator として多彩な機能が報告されている Pomalidomide が新規化合物としてヒットしてきた (Figure 2B)。これらの化合物が、SLFN11 の発現を上昇させることを、immunoblot 法にて検

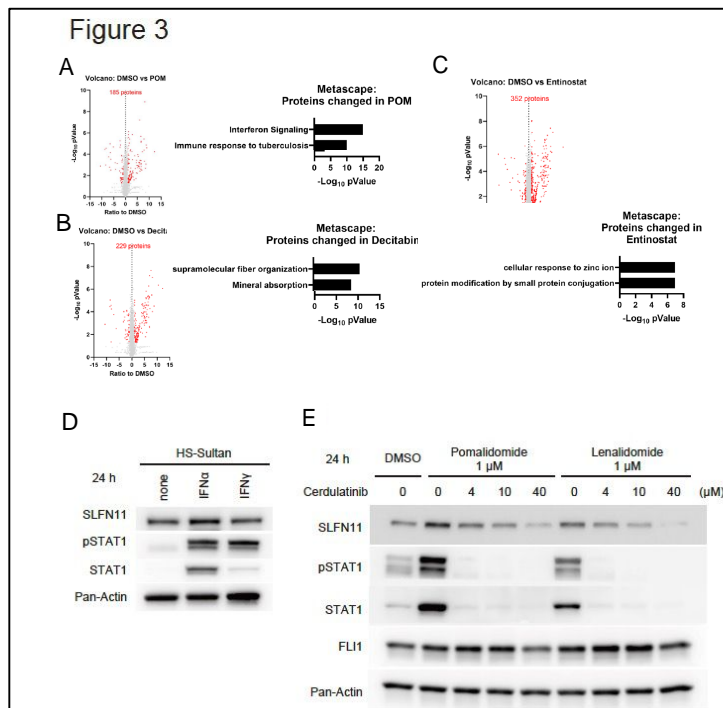


討したところ、Decitabine と Pomalidomide は HDAC 阻害剤に比べて、効果は弱いものの発現上昇を認められた (Figure 2C)。Pomalidomide を長期間投与したところ、SLFN11 の発現上昇はより顕著になった (Figure 2D)。

Figure 2. A: HiBiT-Sultan 細胞を用いた薬剤スクリーニングの概略図 B: 薬剤スクリーニングの結果、上位 8 種類についてグラフ化した C: Sultan 細胞にヒット化合物を 1 μM (左) 10 μM (右) 24 時間投与し、SLFN11 の発現を immunoblot で確認した D: Pomalidomide (1 μM) を長期間 (0~14 日間) 投与し続けたサンプルについて SLFN11 の発現を immunoblot で確認した。

3) Pomalidomide はインターフェロンシグナル応答を高めることで SLFN11 の発現を高めている

Pomalidomide が SLFN11 の発現を高めるメカニズムを探索するために、Sultan 細胞に対して、Pomalidomide (Figure 3A)、 Decitabine (Figure 3B)、 Entinostat (Figure 3C)を投与し、24 時間後に発現変動した遺伝子について、Metascape を用いて pathway 解析を行った (Figure 3A-C)。まず、有意に変動した遺伝子の数は、Entinostat が一番多く 352 個、ついで Decitabine が 229 個、Pomalidomide は 185 個であった。Pathway 解析の結果では、Pomalidomide では interferon signaling が最上位となったが、このパスウェイはそれ以外の薬剤ではヒットしてこなかった。インターフェロン応答で、SLFN11 の発現が変動するか検討するために、Sultan 細胞に IFN-alpha または、IFN-gamma を投与したところ、IFN-alpha 投与で SLFN11 の発現上昇が確認できた (Figure 3D)。またこの時、下流のシグナルである STAT1 の安定化とリン酸化が起こっていた (Figure 3D)。そこで、Pomalidomide またはその類似化合物である Lenalidomide を用いて、Sultan 細胞において、STAT1 の安定化、リン酸化を検討したところ、両薬剤とも STAT1 の安定化、リン酸化を起こしていた (Figure 3E)。この時、SLFN11 の発現上昇を改めて確認できたが、STAT シグナルの阻害剤である Cerdulatinib をドーズを変えて投与したところ、4 μM の比較的低濃度においても、STAT シグナルの抑制とともに、SLFN11 の発現上昇の抑制を認めた (Figure 3E)。これらのこと



から、Pomalidomide による SLFN11 発現上昇は、Pomalidomide が STAT シグナルを活性化することで起こっていると考えられた。

Figure 3. A-C: 定量的プロテオームの解析結果。Sultan 細胞に対して、pomalidomide/DMSO 24h (A)、Decitabine/DMSO 24h (B)、Entinostat/DMSO (C)の結果と、有意に変動したタンパク質について、Metascape 解析を行った結果の上位 2 パスウェイのみを表示した D: Sultan 細胞に IFN を投与し、SLFN11 の発現変動を immunoblot で確認した。E: Pomalidomide (1 μM 24h)により発現上昇した SLFN11 が STAT 阻害剤である Cerdulatinib により発現抑制された。

考察：SLFN11 の発現上昇を起こさせる新規化合物として、Pomalidomide を同定した。また、その類似薬である Lenalidomide にも同様の活性があることを確認できた。Pomalidomide や Lenalidomide は immuno modulator として臨床でも使用されている薬剤であるので、本研究の臨床応用を考えた時にはハードルが低くて良いことである。ただし、Pomalidomide や Lenalidomide による SLFN11 の発現上昇は、HDAC 阻害剤による効果に比べて 4 分の 1 程度であった。SLFN11 の発現が高いと、プラチナ製剤やトポイソメラーゼ阻害剤への感受性が高まると想定されるが、Pomalidomide とこれらの薬剤を組み合わせても、感受性増強効果は確認できなかった (データ表示なし)。我々は、HDAC 阻害剤による感受性増強効果を報告しているので、今回 Pomalidomide で効果が確認できなかったのは、SLFN11 の発現上昇が不十分であったためと考えている。

SLFN11 の発現が、インターフェロン応答や JAK シグナル、STAT シグナルの下流で上昇してくることは、我々または別のラボから報告があるので、今回 Pomalidomide がこれらの経路を活性化させたことが、SLFN11 の発現上昇に繋がったと考えるのは、プロテオームなどの結果から考

えても妥当である。Pomalidomide に限らず、これらの経路を活性化させることができれば、SLFN11 発現も上昇させることができるはずなので、今後はそういった視点からも SLFN11 の発現誘導剤を探索していきたい。

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 村井純子
2. 発表標題 SLFN11 induces apoptosis in response to replication stress through impairment of ribosome biogenesis
3. 学会等名 先端モデル動物支援発表会
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
---------	---------