

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：34401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20806

研究課題名（和文）前立腺がんにおけるCRISPR/Cas9スクリーニングによる新規ターゲット遺伝子の同定

研究課題名（英文）CRISPR screen reveals novel target genes in prostate cancer

研究代表者

辻野 拓也（Tsujino, Takuya）

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：60937407

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：転移性去勢抵抗性前立腺がんの予後は依然として不良であり、新たな治療法開発が喫緊の課題である。本研究においては、CRISPRスクリーニング解析により、前立腺がんPARP阻害剤治療に関する67個の感受性関連遺伝子、103個の抵抗性関連遺伝子を同定した。感受性関連遺伝子のうちMMS22L遺伝子を代表とする10遺伝子以上を遺伝子バイオマーカーとして解明した。さらに抵抗性遺伝子としてRB1遺伝子、CHEK2遺伝子を代表とする7遺伝子をPARP阻害剤耐性における遺伝子バイオマーカーとして解明した。本成果は前立腺がんにおけるPARP阻害剤の包括的な遺伝子バイオマーカーに関する初報告である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでPARP阻害剤の有効性はBRCA1/2遺伝子変異のみに限定されており、現在その拡充、および耐性克服が課題となっている。本研究における成果により、PARP阻害剤の有用性拡大の可能性が示されたと同時に、耐性克服を可能とする新規治療法開発に繋がると考えられる。本成果は、前立腺がんPARP阻害剤治療包括的遺伝子バイオマーカーを同定した初報告であり、その研究発展性は非常に高く、転移性去勢抵抗性前立腺がんの予後改善に繋がる成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In our CRISPR screening analysis combined with PARP inhibitor therapy in prostate cancer cell lines, we identified 67 sensitivity-related genes and 103 resistance-related genes. The identified sensitivity-related genes are mainly associated with DNA repair pathways, and more than 10 genes, including the MMS22L gene, have been elucidated as genetic biomarkers that confer high sensitivity to PARP inhibitors. Additionally, as resistance genes, 7 genes including the RB1 gene and CHEK2 gene have been elucidated as genetic biomarkers associated with PARP inhibitor resistance. These results represent the first comprehensive report on genetic biomarkers for PARP inhibitors in prostate cancer.

研究分野：腫瘍

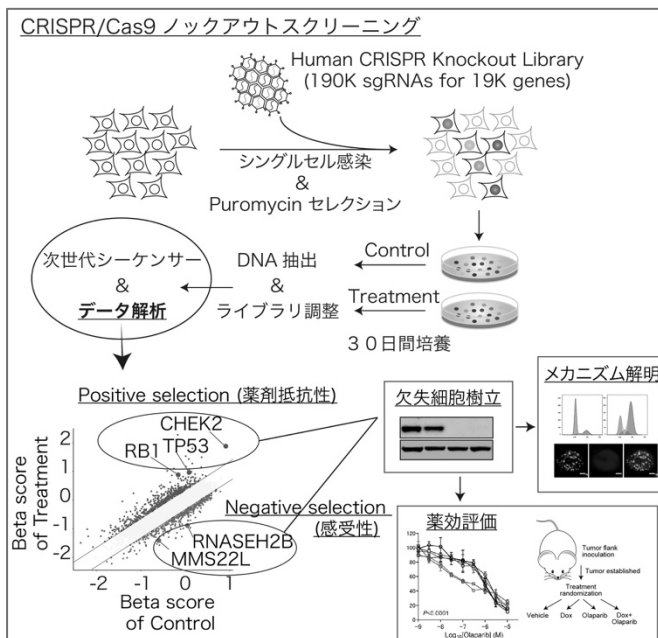
キーワード：前立腺がん PARP阻害 CRISPRスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

前立腺がんは男性における罹患数が第一位 (2017 年時点) の疾患であり、世界で年間約 130 万人が新たに罹患している。進行前立腺がんの約 10-20%は 5 年以内に去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) へと進行する。CRPC の 5 年生存率は依然として低く新たな治療法の開発が喫緊の課題となっている。PARP 阻害剤 Olaparib (AZD-2281) は、乳がん、卵巣がんなど治療抵抗性の様々な固形がんにおいて有効性を示しており、転移性 CRPC 患者に対して Phase3 試験中の治療薬である。現時点で前立腺がんに対する PARP 阻害剤の有効性は、相同組み換え修復 (HRR) 遺伝子である BRCA1/2 変異陽性の症例のみに示されており、その他の有効性を示す遺伝子変異の解明と薬剤抵抗性を示す遺伝子変異の解明、およびその症例への代替治療薬の選択が今後の課題となっている。

2. 研究の目的

前立腺がん細胞株に対して Olaparib 治療を併用した約 19,000 遺伝子対象の CRISPR スクリーニング (右図上参照) を行うことにより、BRCA1/2 のような、その機能損失により PARP 阻害剤と合成致死を誘導する遺伝子 (Negative selection)、および薬剤抵抗性を示す遺伝子 (Positive selection) の判別が可能となる (右図左下参照)。具体的な応用として、Negative selection の結果から前述の遺伝子変異陽性以外の治療対象となり得る症例の判別と、PARP 阻害剤との Combination therapy としてターゲットとなり得る遺伝子を同定することができる。また、今後臨床的に PARP 阻害剤治療が進むに連れて薬剤抵抗性を示す症例が増えてくることが予想されるが、Positive selection の結果からは薬剤抵抗性を示す遺伝子変異およびそのメカニズムを解明することが可能となる。さらに申請者らは前立腺がん細胞株の中から HRR 遺伝子変異陽性の細胞株 (22Rv1; BRCA2 変異陽性) とその他 HRR 遺伝子野生型の細胞株 (LNCaP, C4-2B, DU145) 計 4 つの細胞株に対して CRISPR スクリーニングを施行することにより、異なる腫瘍サブタイプを有する様々な症例における PARP 阻害剤に対する有効性および薬剤抵抗性を示す遺伝子表現型の判別、さらにそのメカニズム解明を目指す。



また、今後臨床的に PARP 阻害剤治療が進むに連れて薬剤抵抗性を示す症例が増えてくることが予想されるが、Positive selection の結果からは薬剤抵抗性を示す遺伝子変異およびそのメカニズムを解明することが可能となる。さらに申請者らは前立腺がん細胞株の中から HRR 遺伝子変異陽性の細胞株 (22Rv1; BRCA2 変異陽性) とその他 HRR 遺伝子野生型の細胞株 (LNCaP, C4-2B, DU145) 計 4 つの細胞株に対して CRISPR スクリーニングを施行することにより、異なる腫瘍サブタイプを有する様々な症例における PARP 阻害剤に対する有効性および薬剤抵抗性を示す遺伝子表現型の判別、さらにそのメカニズム解明を目指す。

本研究の最終的な目的は、転移性 CRPC 患者における PARP 阻害剤の BRCA1/2 変異以外の遺伝子変異を有する症例への治療拡大と Combination therapy として可能性のある治療薬の提案、および薬剤抵抗性を示す症例への代替治療薬の提案、さらには個別化医療 Precision Medicine への応用へと発展させ、転移性 CRPC 患者の予後改善に寄与することである。

3. 研究の方法

1) CRISPR スクリーニング

4つの前立腺がん細胞株 (LNCaP, C4-2B, 22Rv1, DU145) を用いた。これらに対して Olaparib 治療を併用した CRISPR スクリーニング (右図上参照) を施行した。CRISPR library は Liu Human CRISPR knockout library (H1/H2) を用いた。治療期間は、8 doubling time とした。治療期間終了後にコントロール群、治療群より DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてそれぞれの遺伝子に対応する sgRNA のリード数を解析した。次に、MAGeCK アルゴリズムを用いて、各 sgRNA におけるベータスコアを算出した。Negative selection、Positive selection により PARP 阻害剤と合成致死を誘導する遺伝子、および薬剤抵抗性を示す遺伝子を同定した。

## 2) 候補遺伝子の評価、およびノックアウト細胞株の作製と感受性検証

1. において同定した遺伝子のうち、前立腺がんに関する遺伝子バイオマーカーとしての有用性を検討する上で、それぞれ遺伝子変異の頻度を解析した。最終的に同定した候補遺伝子の欠失モデルを前立腺がん細胞株にて CRISPR/Cas9 を用いて作製した。ウエスタンブロット、およびシーケンスにてそのノックアウトの Validation を行った。

## 3) 薬効評価

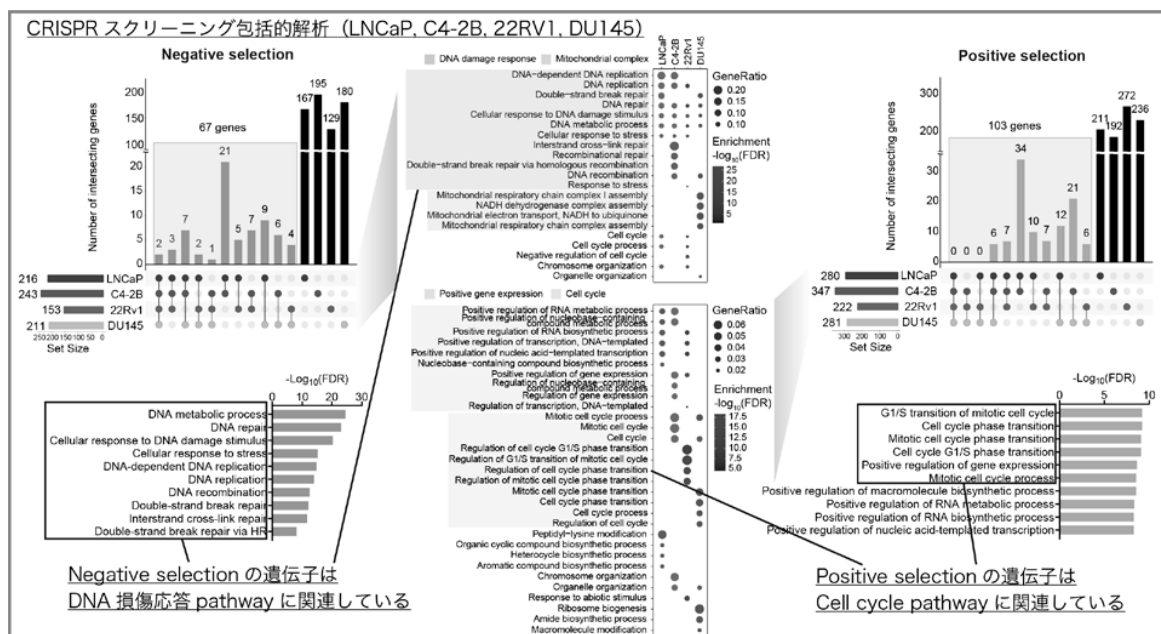
作成したノックアウト細胞における Olaparib を含めた PARP 阻害剤に対する感受性を評価した。細胞株における薬効評価には alamar blue assay を用いた。さらに皮下移植モデルマウスにおいても同様に薬効評価した。具体的には、作成したノックアウト細胞株、および野生型細胞株を NOD. SCID マウスに皮下移植し腫瘍の生着を確認した後、マウスをランダム化し Olaparib、および Vehicle の経口投与を施行し、腫瘍計の経時変化を観察、および記録した。

## 4) メカニズム解明

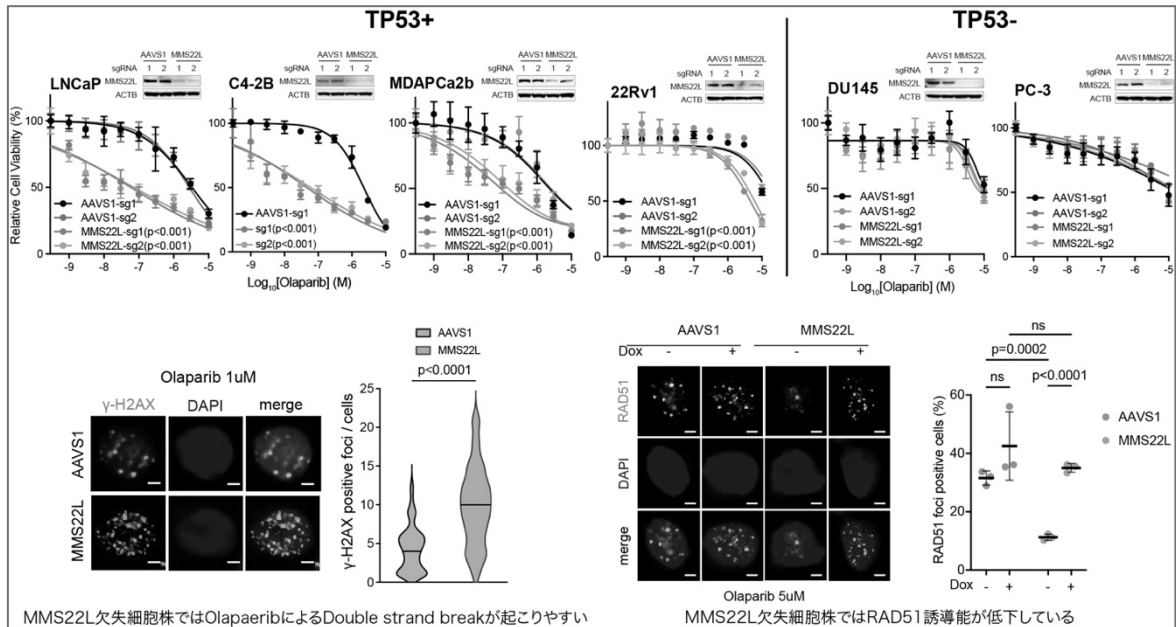
薬効評価により確認された感受性の変化を引き起こすメカニズムを免疫染色、免疫沈降、細胞周期解析より機能解析を施行した。DNA 損傷の評価として  $\gamma$ H2AX foci assay を、HRR 機能評価として RAD51 foci assay を行った

## 4. 研究成果

4つの細胞株のスクリーニング結果を包括的に解析することにより、Negative selection から 67 個の候補遺伝子、Positive selection から 103 個の候補遺伝子を判別した。Gene Ontology 解析からは Negative selection の遺伝子は DNA repair pathway に、また、Positive selection の遺伝子は Cell cycle pathway に関連していることが示された。



次に申請者らは、Negative selectionの中から前立腺がん患者の14%にそのホモ欠失が存在するMMS22Lを同定した。MMS22L欠失細胞株は、野生型細胞株と比較してOlaparibに対する非常に高い感受性を示し、それはTP53依存性であることが示された(下図参照)。さらに申請者らは、そのメカニズムが、MMS22L機能喪失によりDNA損傷部位へのRAD51誘導低下による、HRR機能の低下によるものであることを解明した。さらにIn vivoにおいてMMS22L欠失皮下移植モデルがPARP阻害剤に対して高感受性であることを実証した。



上述の代表される成果の他、その他の感受性遺伝子、抵抗性遺伝子における検証を行っており、PARP阻害剤治療の更なる遺伝子バイオマーカー開発に繋がると考えられ、本研究の発展性は極めて高いと考えられる。

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, Tokushige Satoshi, Komura Kazumasa, et al	4. 巻 12
2. 論文標題 Real-world survival outcome comparing abiraterone acetate plus prednisone and enzalutamide for nonmetastatic castration resistant prostate cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 19414 ~ 19422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.6536	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 Tsujino Takuya, Takai Tomoaki, Hinohara Kunihiro, Gui Fu, Tsutsumi Takeshi, Bai Xiao, Miao Chenkui, Feng Chao, Gui Bin, Sztupinski Zsafia, 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 252
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻野拓也.
2. 発表標題 前立腺がんPARP 阻害剤治療におけるCRISPR スクリーニングを用いた新規ターゲット遺伝子の同定
3. 学会等名 第32回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻野拓也, 南幸一郎, 小村和正, 上原博史, 平野 一, 能見勇人, 稲元輝生, 東 治人.
2. 発表標題 複数遺伝子変異が及ぼすPARP阻害剤感受性への影響
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023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			
米国	Brigham & Women's Hospital			