

平成29年度シニア・リサーチフェロー  
研究成果報告書

平成30年5月24日提出

公益財団法人 がん研究振興財団  
理事長 堀田 知光 殿

報告者氏名： 佐々木 由香



研究課題：難治性固形がん及び血液腫瘍に有効なポリ(ADP-リボース)集積を誘導する  
新規抗がん剤のバイオマーカー研究

研究期間： 自 平成29年 4月 1日

至 平成30年 3月 31日

研究指導者：氏名 芦澤 和人 印



公益財団法人 がん研究振興財団



## (1) シニア・リサーチフェロー期間中の研究について

### 1) 要旨

Poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)は poly(ADP-ribose) (PAR)を分解する主要な酵素である。特定のがん細胞における *PARG* ノックダウン (K.D.) は、放射線やアルキル化剤に対して高感受性を示すことが報告されている。最近、益谷教授ら (長崎大学) の研究グループは *PARG* を標的とする抗がん剤の開発研究を行い、がん細胞において細胞内 PAR 集積を誘導し、細胞毒性を示す抗がん剤候補化合物 M02455 を報告した。

本研究では、抗がん剤候補化合物 M02455 の効果予測バイオマーカー遺伝子の探索を行い、次世代シーケンス解析により、B 細胞リンパ腫 RA1 細胞において、M02455 処理条件下で発現を上昇または低下させる M02455 の効果を規定する候補遺伝子を探索した。また、以前に *PARG* 機能阻害条件下における合成致死遺伝子として、*Gene H* を同定していたことから、*PARG* と *Gene H* の double K.D. が合成致死を誘導する機序について解析を行ったので、その結果について報告する。

## 2) 序

難治性固形がんにおいては、抗がん剤および放射線に低感受性を示すことが、治療抵抗性や再発に関わると考えられている。また、がん細胞の化学療法や放射線治療法に対する治療抵抗性の一因として、相同組み換え修復系などの特定のDNA修復応答能が高いこと等が指摘されている。翻訳後修飾の一つであるポリADP-リボシル化反応の主要な分解酵素であるポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ (PARG) (図1) の機能阻害が、DNA修復応答を阻害し、ポリ (ADP-リボース) (PAR) の集積を介して特定のがん細胞株に対して効率的に致死や増殖抑制をもたらすことが見い出されている。そこで厚生労働科研費及びAMED研究事業のサポートのもと、益谷教授ら (長崎大学) の研究グループはPARGを標的とする抗がん剤の開発研究を行い、細胞内PAR集積を誘導する化合物のスクリーニングと構造最適化研究により、新規抗がん剤候補化合物M02455とその関連化合物を取得した。M02455は、PARG阻害活性を有し、細胞内にポリ (ADP-リボース) を集積しアポトーシスを誘導する新規の化合物であり、毒性プロファイルやその性質から臨床開発候補化合物として検討を行ってきた。抗がん剤開発を進めるにあたって、薬効予測バイオマーカーの探索は、治療効果の予測、臨床試験を効率的に進めるために重要である。また、合成致死法を利用した抗がん剤開発は、正常細胞への影響が少なく、ある種のがん細胞に対してのみ致死作用を誘導できることから、がん治療において、副作用軽減の観点からも優れた治療法になりうるということが知られている。そこで本研究では、抗がん剤候補化合物M02455の感受性が飛躍的に高まる特定の遺伝子の異常を探索することを目的に研究を行った。

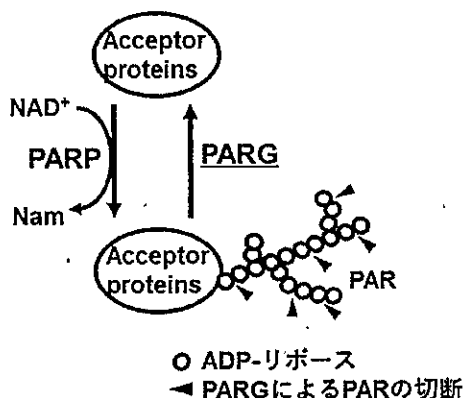


図1 PARGはPARPにより合成されたPARをADP-リボースへと分解する。PARGはexo-, endo-活性を有し、PAR鎖の(リボース)-(リボース)結合を切断する反応を触媒する。

### 3) 実験方法

#### Transfection

24-well plate に A549 は  $6 \times 10^4$  cells/well となるよう播種し、siRNA の濃度が終濃度 10 nM になるように Lipofectamine RNAi MAX (Life Technologies) を用いて推奨プロトコールに従って transfection を行った。

#### MTT assay

細胞生存アッセイは 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。

#### RNA 抽出および cDNA 合成

遺伝子導入した細胞の培養上清を 1.5 mL tube に回収し、細胞を PBS(-) で洗浄後、その洗浄液も同じ 1.5 mL tube に回収して 4 °C、200 xg で 5 分間遠心して上清を除いた。Plate 上の細胞は、PBS(-) 200 uL と High Pure RNA Isolation Kit (Roche) の Lysis Buffer 400 uL で懸濁し、この細胞懸濁液を細胞の培養上清と洗浄液の遠心後に得られた沈殿に加えて再懸濁した。細胞懸濁液からの RNA の回収は High Pure RNA Isolation Kit (Roche) のマニュアルに従って行った。

RNA からの cDNA 合成は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) のマニュアルに従って行った。また、この時に RNase 阻害剤としては RNase Inhibitor (Applied Biosystems) を用いた。

#### Antibody array

A549 細胞は、*PARG* と *Genie H* の siRNA を transfection して、3 日間培養した。この細胞から調製した cell lysates は、PathScan Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array (Cell Signaling, #12856) を用いて解析した。解析方法は、antibody array のマニュアルに従って行った。

#### Western blotting

Cell extract は以前行った方法 (Sasaki et al. (2016) 17, 641-653, CPPS) と同様に調製し、Leamli' s sample buffer (10% glycerol、2% SDS、50 mM Tris-Cl (pH 6.8)、10%  $\beta$ -mercaptoethanol、Phosphostop (Roche)、Complete Mini (Roche)) に溶解した。Cell extracts は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、PVDF 膜に転写した。Western blotting に用いた一時抗体は、

以下の抗体である：anti- $\beta$ -Actin (Sigma-Aldrich), anti-AKT (pan) (C67E7) (Cell Signaling), anti-p-AKT (Ser473) (Cell Signaling), anti-p-mTOR (Ser2448) (Cell Signaling), anti-p-mTOR (Ser2481) (Cell Signaling), anti-mTOR (7C10) (Cell Signaling), anti-PTEN (138G6) (Cell Signaling), anti-p-PTEN (Ser380) (Cell Signaling).。二次抗体として、HRP-conjugated antibodies を使用して、化学発光を LAS3000 で検出した。

#### 次世代シーケンス解析によるMO2455感受性候補遺伝子の探索

B細胞リンパ腫 RA1 細胞は、 $IC_{80}$  濃度の MO2455 で 8 時間処理し、死細胞も含めて細胞を回収後、total RNA を抽出し、次世代シーケンス解析に用いた。解析は、北海道システムサイエンスで受託試験として行った。

#### 4) 結果

##### B細胞リンパ腫におけるMO2455の効果規定因子の探索

以前、抗がん剤候補化合物であるMO2455が、がん細胞のどのシグナル経路に作用するのかを調べるために pathway 解析を行ったところ、B細胞リンパ腫 RA1細胞において、B細胞受容体依存性の増殖経路において、下流のNFATの活性が特異的に阻害されることが分かった。この解析より、MO2455は難治性のB細胞リンパ腫に有効な抗がん剤となる可能性が考えられた。

そこで本研究では、B細胞リンパ腫 RA1細胞におけるMO2455の効果規定因子を同定することを目的とした。MO2455で処理/未処理条件化で培養したRA1細胞のRNAを用いて、次世代シーケンス解析を行った。その結果、B細胞に発現が認められるCD40およびCD79Aが発現し、B細胞に発現が認められないEPCAMの発現が認められなかったことから、本試験の次世代シーケンス解析の結果として妥当であると判断した。そこで、発現上昇および低下した遺伝子をピックアップしたところ、遺伝子発現を2倍以上上昇した遺伝子が42遺伝子、1/2倍以下に低下したものが32遺伝子検出された。今後、これらの遺伝子がMO2455の効果規定する因子になりうるのかを検証する予定である。

##### PARG機能阻害と合成致死を起こすGene Hの合成致死誘導機構の解析

以前、肺がん細胞A549においてGene HおよびPARGをノックダウン (K.D.) したところ、単独K.D.細胞に比べて細胞の生存率を相乗的に低下させ、マウス xenograft モデルにおいても抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。そこで、Gene Hが臨床的意義のある因子であるのかどうかを調べるために、TCGA データベースにおいて、がん患者におけるGene Hの非同義変異率を調べたところ、肺がん患者検体において本遺伝子の変異レベルが高いことが分かった (図2)。本実験では、PARGとGene Hの機能阻害により誘導される合成致死の機序をさらに解析することを目的とした。PARG機能阻害は、細胞内にポリ (ADP-リボース) (PAR)を集積し、アポトーシスを誘導することから、本実験ではPAR集積を誘導するMO2455の代わりに、PARG K.D.条件下で実験を行った。PARGとGene Hの機能阻害による細胞の生存率低下が、細胞増殖経路の抑制によるものなのかを調べるために、PathScan Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array (Cell Signaling, #12856)を用いて解析を行った。その結果、PARGとGene Hのdouble K.D. A549細胞株において、PTEN、phosphor-PTEN、phosphor-mTORレベルの低下が認められた。また、phospho-AKT (Thr308 and Ser473)とphospho-mTOR (Ser2481)は、double K.D. およびsingle K.D. 細胞株において、発現を低下させることが分かった。これらの結果は、Gene HとPARGのdouble K.D.

が、PI3K/AKT/mTOR 経路を部分的に阻害していることを示唆している。

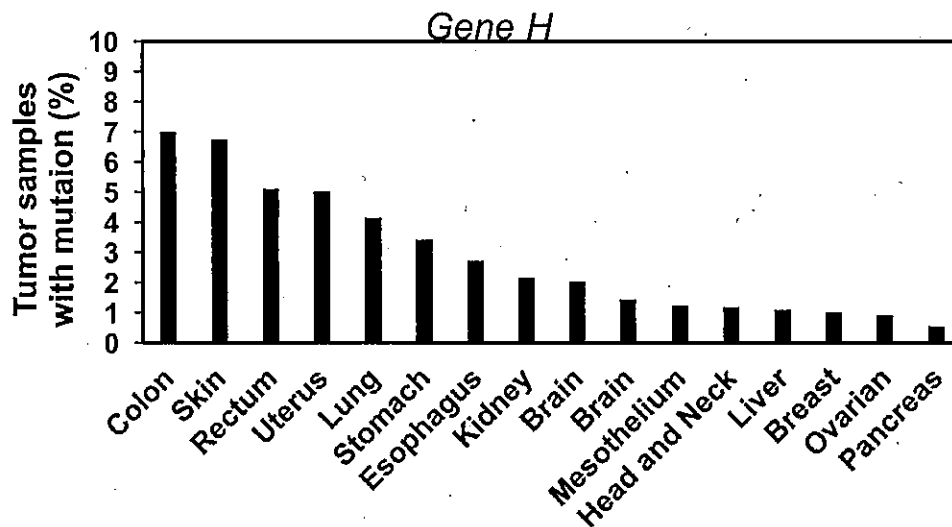


図2 がんにおける Gene H の非同義変異の割合

各がん患者におけるがん種ごとの変異率は、CanSAR database (<https://cansar.icr.ac.uk/>) (Tym, J. E. et al., Nucleic Acids Res. (2016) 44, D938-D943.) を用いて調べた (total 199 mutations of tumor samples/7146 patients)。



## 5) 考察

### B細胞リンパ腫における M02455 の効果規定因子の同定

これまでの研究成果より、抗がん剤候補化合物 M02455 が B 細胞リンパ腫に有効な抗がん剤になる可能性が示唆されたことから、本研究では、B 細胞リンパ腫 RA1 細胞を用いて、M02455 の効果規定因子を同定することを目的として実験を行った。その結果、M02455 処理細胞において、未処理細胞と比べて発現を 2 倍以上上昇または低下させた遺伝子が得られたことから、今後これらの遺伝子が、M02455 耐性または感受性を規定する因子になりうるのかを、候補遺伝子を用いた siRNA または cDNA 導入細胞を用いて検証する。

### PARG 機能阻害と合成致死を起こす Gene H の合成致死誘導機構の解析

以前、PARG と Gene H の機能阻害が、肺がん細胞において合成致死を誘導することを明らかにしたことから、合成致死誘導機序について、本研究でさらに解析することにした。細胞増殖経路に着目して抗体アレイを行った結果、PARG と Gene H の double K. D. は、PI3K/AKT/mTOR 経路を部分的に抑制することにより、細胞増殖を抑制することで、細胞の生存率を低下させている可能性が考えられた。Gene H は、肺がんだけでなく大腸がんや胃がんにおいても、非同義変異が高確率で検出されていることから (図 2)、今後、これらのがん細胞株でも同様に合成致死が誘導されるのかを調べる。また、本実験では、抗がん剤候補化合物 M02455 の代わりに、M02455 と同様の PAR 集積が認められる PARG ソックダウン条件下で実験を行っていることから、今後、Gene H K. D. 細胞株において、M02455 感受性が上昇するのかを検証する。

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

近年、がんの罹患率が上昇していること、また、難治性固形がんにおける治療抵抗性や再発の問題点から、新規抗がん剤開発が必要とされている。抗がん剤開発において、その効果を予測するバイオマーカーの開発は、効率的な臨床試験の進行、患者個人の適切な治療選択、副作用低減の観点からも重要である。また、近年、ポリ ADP-リボシル化反応に関わる PARP 阻害剤が、BRCA1/2 変異卵巣がんの治療薬としてアメリカ、ヨーロッパ、及び日本で承認された。合成致死性抗がん剤は、特定の遺伝子変異を持つがん細胞に対して特異的に作用することから、正常細胞に作用せず副作用の軽減に繋がることが期待され、難治性固形がんの有効な治療法になると考えられる。

私はシニア・リサーチフェローとして雇用されている期間中に、細胞内に poly(ADP-ribose) の集積を伴い細胞毒性を示す抗がん剤候補化合物 M02455 を用いて、その効果を規定する因子を探索することを目的として研究を行った。本化合物は、合成致死性の抗がん剤候補化合物として開発されたものである。本研究で、M02455 の効果を規定する候補遺伝子が得られたことから、今後これらの遺伝子が効果規定因子になりうるのかを検証し、臨床的に意義のあるバイオマーカーなのかを調べる予定である。シニア・リサーチフェロー期間中に身につけた研究成果や手法、考え方や得られた成果を活かして、今後も新規抗がん剤開発に必要な知識・手法などを積極的に学ぶとともに、新規抗がん剤開発に携われるような研究に取り組むことで、がん治療に貢献したいと考えている。