

令和4年度 TR 事業研究奨励助成金

研究成果報告書

2023 年 4 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： 矢野 公義

研究課題： ライフステージやがんの特性に着目した重点研究
(3) 難治性がんに関する研究
(テーマ) 難治性肺腺がんの ATR 依存的 DNA 複製ストレス耐性を標的とした
個別化治療法開発

研究期間： 自 2022 年 4 月 1 日
至 2023 年 3 月 31 日

研究指導者：氏名 塩谷 文章

公益財団法人 がん研究振興財団

(1) 期間中の研究について

【要旨】

がん細胞は、異常な増殖シグナルや DNA 損傷応答機構の異常などを起因として、高度な DNA 複製ストレスを抱えていることが知られている。がん細胞において、DNA 複製ストレス応答因子である ATR キナーゼは DNA 複製ストレス耐性機構を制御し、がん細胞の生存戦略に必須な役割を果たすことから、新たながん分子標的として注目されている。当研究グループは、肺がんで頻発する KRAS 変異や SMARCA4 変異に着目して、これらが DNA 複製ストレスを誘発すると同時に、ATR 高依存性であることを明らかにしている。そこで本研究は、KRAS 及び SMARCA4 変異を有する肺がんを標的とした ATR 阻害剤治療法の開発を目的とした。

本研究より、KRAS 変異や SMARCA4 変異、これらの併存変異がん細胞では ATR 阻害剤に対し強い感受性を示した。また、SMARCA4 欠損細胞では、内在性一本鎖 DNA 量の増加を伴う高度な DNA 複製ストレスを抱えながらも、ATR 依存的に複製フォークを進行させていることが観察された。これは、SMARCA4 欠損細胞では ATR 依存的な DNA 複製ストレス耐性機構が獲得されることを示唆している。現在、KRAS 及び SMARCA4 変異併存がんモデル細胞株の樹立を試みている。今後、このモデル細胞株を用いて、KRAS 及び SMARCA4 変異併存における DNA 複製ストレス耐性機構を詳細に解析し、DNA 複製ストレス耐性を制御する因子が ATR 阻害剤の奏功性予測バイオマーカーとして有用であるかどうかを検証していく計画である。

【序】

がん遺伝子の活性化に起因した異常な増殖シグナルや DNA 損傷応答機構の異常は、DNA 複製ストレスを増大させ、DNA 複製エラーに伴うゲノム不安定性の獲得および発がんを促進する (Marcheret & Halazonetis, Annu. Rev. Pathol., 2015)。同時に、がん細胞は高度な DNA 複製ストレスを抱えながらも生存・増殖を可能にする DNA 複製ストレス耐性機構を獲得していると考えられている。ATR キナーゼは、DNA 複製ストレスの結果として生じる一本鎖 DNA に応答して活性化し、様々なタンパク質をリン酸化することによって、DNA 複製フォークの安定化、DNA 損傷修復、細胞周期チェックポイントの活性化などを制御する。古くから、ATR はゲノムの恒常性維持に必須ながん抑制因子として知られてきたが、がん細胞における ATR 機能不全は極めて稀であり、ATR を低発現させた腫瘍では増殖が抑制されることも報告されてきた (Schoppy et al., J Clin. Invest., 2012)。このことから近年、高度な DNA 複製ストレスを抱えているがん細胞を標的とした ATR 阻害剤による治療法が注目されている。

肺がんにおいて、KRAS は最も頻繁に変異するがん遺伝子の一つであり、一般的に KRAS タンパク質の G12 が他のアミノ酸に置換され、下流の RAS シグナル伝達カスケードの恒常的活性化を引き起こし、発がんを促進する (Huang et al., Signal Transduct Target Ther, 2021)。当研究グループは、肺腺がんモデル細胞において、KRAS^{G12V} 発現誘導がヘテロクロマチン領域の増加に伴う DNA 複製ストレス（複製フォーク進行速度の低下）を誘導すること、ATR 高発現によって DNA 複製ストレス耐性（複製フォーク進行速度の回復）を獲得することを明らかにしている (Igarashi et al., Nat. Commun., under revision)。さらに、SMARCA4 などの SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体のサブユニットもまた、肺がんで頻繁に変異するがん抑制遺伝子として知られている (Kadoch et al. Nature Genet 2013)。その一つのメカニズムとして、SWI/SNF 欠損による遺伝子転写の調節不全が発がんの要因となることが報告されている (Wilson and Roberts, Nat. Rev., Cancer, 2011)。当研究グループは、SMARCA4 の欠損がヘテロクロマチン領域の増加に伴う DNA 複製ストレスを増加させ、ATR 阻害剤に対して高い感受性を示すことを報告した (Kurashima K. et al., NAR Cancer, 2020)。これらの結果から、KRAS 変異や SMARCA4 変異を有する肺腺がんは ATR への依存度が高く、ATR 阻害剤治療法が有効であることが強く示唆される。

これまでの臨床的知見から、KRAS 及び SMARCA4 変異を併存する肺腺がんは、それぞれ単独変異がんよりも予後不良であり、免疫療法にほとんど効果が認められない超難治性であることが報告されている (Liu L. et al., Mol. Oncol., 2021)。そこで本研究では、KRAS 及び SMARCA4 変異併存肺腺がんを標的とした ATR 阻害剤による個別化治療法の開発を目的とした。また本研究期間内では、SMARCA4 変異における ATR 依存的な DNA 複製ストレス耐性機構に着目して、ATR 阻害剤の作用点を調べた。

【実験方法】

細胞株

ウイルス産生用細胞株 HEK293T と肺腺がん細胞株 A549 は、DMEM, 10% FBS, 100U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin で、H1299, H1975, H322 は、RPMI-1640, 10% FBS, 100U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin で培養した。小気道上皮細胞株 (Human Small Airway Epithelial Cells; SAECS) は、BronchiaLife Epithelial Basal Medium (Lifeline Cell Technology) 及び Lifefactors kit (Lifeline Cell Technology, Human Serum Albumin, Lecithin, Linoleic Acid, L-glutamine, Bovine Pituitary Extract, TM-1 factor) で培養した。すべての細胞株は、37° C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。SMARCA4 発現回復細胞株の樹立のため、polyethlenimine を用いて HEK293T 細胞に CSII-CMV-MCS/SMARCA4-IRES2-Bsd, pCAG-HIVgp, pCMV-VSV-G-RSV-Rev をトランスフェクションして、レンチウイルスを産生させた。レンチウイルス培養上清は、Lenti-X concentrator (clonetechnology) で濃縮回収した。レンチウイルス濃縮液と 8 µg/mL polybrene を含む培地中で標的細胞へ感染後、10 µg/ml blasticidin で薬剤選択し細胞株を樹立した。KRAS^{G12V} 発現細胞株の樹立のため、polyethlenimine を用いて HEK293T 細胞に pQCX1Hyg-mERT2-KRAS^{G12V}, pCL-GagPol, pEF6/env (10A1) をトランスフェクションして、レトロウイルスを産生させた。レトロウイルス培養上清は、Retro-X concentrator (clonetechnology) で濃縮回収した。レトロウイルス濃縮液と 8 µg/mL polybrene を含む培地中で標的細胞へ感染後、50 µg/ml hygromycin で薬剤選択し細胞株を樹立した。SMARCA4 ノックアウト細胞株の樹立のため、Lipofectamine 3000 reagent を用いて標的細胞に pSpCas9 (BB/SMARCA4)-2A-Puro (PX459) V2.0 をトランスフェクションした。1 µg/ml puromycin で薬剤選択した後で、ノックアウト細胞株をクローニングした。

ウェスタンブロット解析

細胞を 2x SDS sample buffer (125 mM Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 0.01% BPB, 20% glycerol, 200 mM DTT) で溶解後、95° C で 10 分間熱変性した。XL-Bradford (APRO science) を用いてタンパク定量を行い、サンプルを調整した。SDS-PAGE (定電圧 100 V) によってタンパク質を分離後、ゲルから PVDF メンブレンにタンパク質を転写した (定電流 90 mA, overnight)。5% skim milk 中でメンブレンをブロッキングした後、一次抗体反応 (anti-SMARCA4, CST, 1:1000; anti-pan Ras, Santa Cruz, 1:1000; α-Tubulin, MBL, 1:5000) を行なった。一次抗体反応後、メンブレンを洗浄し、二次抗体反応 (HRP-conjugated IgG secondary anti-Mouse, Jackson ImmunoResearch, 1:5000; HRP-conjugated IgG secondary anti-Rabbit, Jackson ImmunoResearch, 1:5000) を行なった。二次抗体反応後、メンブレンを洗浄し、化学発光試薬 Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) に浸した。化学発光シグナルの検出には、LAS3000 (GE Healthcare) を使用した。

細胞生存率解析

96 well plateに細胞を播種し、ATR阻害剤を3日間処理した後、CellTiter-Glo 2.0 reagent (Promega) を用いて細胞生存率を解析した。発光量の測定には、マイクロプレートリーダーSYNERGY H1 (BioTek) を使用した。

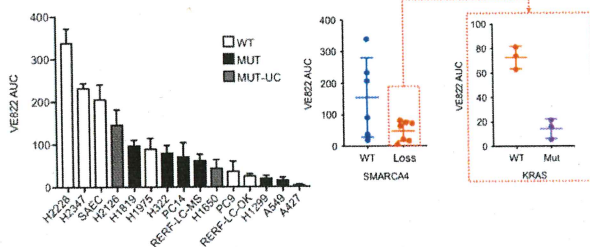
一本鎖DNA量解析

8 well chamber スライドガラスに細胞を播種し、10 μ M BrdU を含む培地中で48時間培養した。その後、BrdUを除いた培地中で2時間培養し、細胞を固定した。ATR阻害剤は細胞を固定する24時間前から処理した。細胞を氷冷固定した後、0.5% Triton X-100 で5分間 pre-extraction を行なった。その後、4% PFA で10分間固定し、0.5% Triton X-100 で10分間透過処理した。3% BSA-0.05% Tween 20 中でサンプルをブロッキングした後、一次抗体反応 (anti-BrdU (BU-1), GE Healthcare, 1:500) を行なった。一次抗体反応後、サンプルを洗浄し、二次抗体反応 (AlexaFluor488-conjugated anti-Mouse IgG, Jackson ImmunoResearch, 1:500) を行なった。二次抗体反応後、0.1 μ g/mL DAPI で核を染色した。その後、サンプルを洗浄して、VECTASHIELD mounting medium (Vector) を用いてサンプルを封入した。蛍光顕微鏡は、Celldiscovery 7 (Zeiss) を使用した。

DNA fiber 解析

6 well plateに細胞を播種し、50 μ M IdU を含む培地中で20分間培養後、250 μ M CldU を含む培地中で40分間培養して、合成中のDNAをラベリングした。ATR阻害剤は細胞を回収する3時間前から処理した。回収した細胞はMeOH:AcOH (3:1) で固定し、スライドガラス上に滴下した。固定液が乾燥した後、スライドガラスを37 $^{\circ}$ C lysis buffer (200 mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM EDTA, 0.5% SDS) 中に15分間置いた。スライドガラスをlysis buffer から取り出した後、スライドガラスを傾けてDNAサンプルを展開させ、再度固定した。固定後、スライドガラスを4 $^{\circ}$ Cで一晩乾燥させ、サンプルを固相化した。サンプルを洗浄後、2.5 M HCl で1時間DNAを変性させた。サンプルを洗浄して、5% BSA-0.1% Tween 20 中でブロッキングした後、一次抗体反応 (anti-BrdU (B44), BD, 1:25; anti-BrdU (BU1/75), Abcam, 1:100) を行なった。一次抗体反応後、サンプルを洗浄し、二次抗体反応 (AlexaFluor555-conjugated anti-Mouse IgG, Life technologies, 1:500; AlexaFluor488-conjugated anti-Rat IgG, Life technologies, 1:100) を行なった。二次抗体反応後、サンプルを洗浄して、ProLong Glass antifade mountant (Invitrogen) を用いてサンプルを封入した。蛍光顕微鏡は、Celldiscovery 7 (Zeiss) を使用した。

A



Western blot analysis of SMARCA4 expression in A549, H1299, and H1975 cells. The blots show SMARCA4 and α -Tubulin protein levels. In A549 cells, SMARCA4 is present in EV and SMARCA4-expressing lanes. In H1299 cells, SMARCA4 is present in EV and SMARCA4-expressing lanes. In H1975 cells, SMARCA4 is present in EV and SMARCA4KO lanes, but absent in the SMARCA4KO lane. α -Tubulin is used as a loading control and is present in all lanes.

A549 cells

ATR inhibitor (μM)	EV (%)	SMARCA4 (%)
0	100	100
0.01	100	100
0.03	100	100
0.1	80	100
0.3	50	80
1	25	45

H1299 cells

ATR inhibitor (μM)	EV (%)	SMARCA4 (%)	SMARCA4 ^{ΔKO} (%)
0	100	100	100
0.01	100	100	100
0.03	100	100	100
0.1	50	80	100
0.3	15	30	80
1	10	15	15

H1975 cells

ATR inhibitor (μM)	EV (%)	SMARCA4 (%)	SMARCA4 ^{ΔKO} (%)
0	100	100	100
0.01	100	100	100
0.03	100	100	100
0.1	100	100	100
0.3	100	100	50
1	80	100	20

Western blot analysis of ER-KRAS G12V and α -Tubulin in H322 cells. The top panel shows ER-KRAS G12V protein levels, which are significantly reduced in the 4-OHT treated sample compared to the control. The bottom panel shows α -Tubulin protein levels, which serve as a loading control and remain consistent across both samples. The lanes are labeled 'Control' and '4-OHT' at the top.

H322-ER-KRAS^{G12V} cells

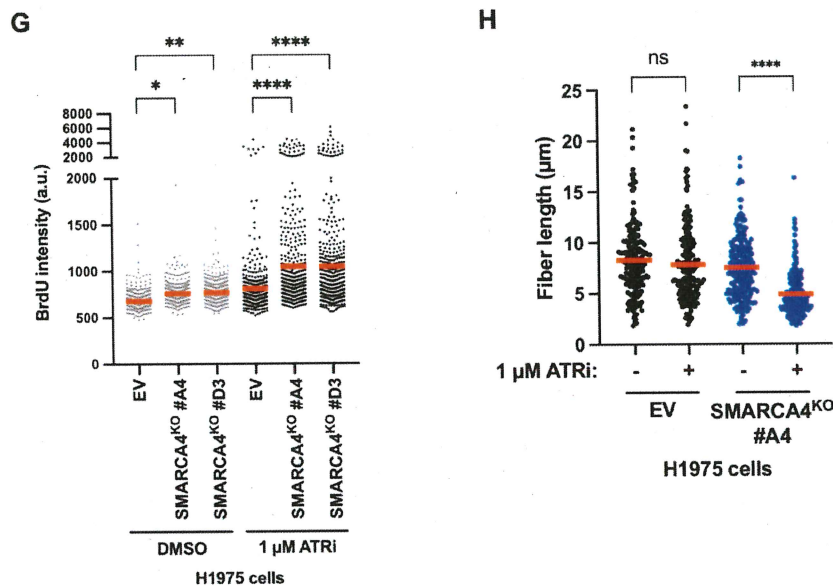
ATR 阻害剤 (μM)	UT Cell viability (% of Control)	100 nM 4-OHT Cell viability (% of Control)
0	100	100
0.005	100	100
0.01	100	95
0.02	95	85
0.05	75	55
0.1	55	35
0.2	35	25
0.5	25	20
1	20	15

	EV		SMARCA4 ^{KO} #13	
	-	+	-	+
ER-KRAS ^{G12V}	Strong band	Strong band	Strong band	Strong band
SMARCA4	Strong band	Strong band	Weak band	Very weak band
α-Tubulin	Strong band	Strong band	Strong band	Strong band

SAECs

次に、SMARCA4 欠損、また KRAS 変異によって ATR 阻害剤感受性が高まるかどうかを検証した。その結果、SMARCA4 欠損型細胞株 A549 や H1299 では、SMARCA4 発現回復によって ATR 阻害剤感受性が低下した (図 B, C)。また、SMARCA4 野生型細胞株 H1975 では、SMARCA4 ノックアウトによって ATR 阻害剤感受性が上昇した (図 B, C)。先行研究と同様に、SMARCA4 欠損は ATR 阻害剤に高感受性であることが確認された。さらに、KRAS 及び SMARCA4 変異の併存がんでは、より強い ATR 阻害剤感受性が示されるかどうかを検証するために、SMARCA4 欠損細胞における KRAS 変異の導入によって ATR 阻害剤感受性が高まるかどうかを検証した。SMARCA4 欠損細胞株 H322 において、4-hydroxytamoxifen (4-OHT) 誘導性 KRAS^{G12V} を発現する

細胞株を樹立した (図 D)。この細胞株を用いて ATR 阻害剤の効果調べた結果、4-OHT による KRAS^{G12V} 発現誘導によって ATR 阻害剤感受性が上昇する傾向にあることが観察された (図 E)。以上の結果から、SMARCA4 欠損及び KRAS 変異発現細胞では、ATR 阻害剤によって強い増殖抑制効果が示されると考えられる。しかし、一過的な KRAS^{G12V} 発現誘導では、ほとんどの細胞が細胞老化様フェノタイプを介して細胞死が誘導されることから、KRAS^{G12V} 発現がんモデル細胞として十分に評価できない問題点が浮かび上がった。当研究グループは、SAEC 細胞において、長期的に 4-OHT を処理して KRAS^{G12V} を発現させて培養を続けた後に、低頻度に足場非依存的増殖能を獲得したクローン細胞を得ており、これらが DNA 複製ストレス耐性機構を獲得していることを明らかにしている。そこで、SAEC 細胞における SMARCA4 ノックアウト細胞を樹立した後、これに KRAS^{G12V} 発現システムを導入することによって、SMARCA4 欠損及び KRAS^{G12V} 発現がんモデル細胞の樹立を試みた。現在までに、SMARCA4 ノックアウトと KRAS^{G12V} 発現システムを導入した細胞株の樹立まで進んでいる (図 F)。今後、4-OHT 処理による長期的培養を行い、足場非依存的増殖能を獲得したクローン細胞株を樹立し、ATR 阻害剤の効果と比較する予定である。



SMARCA4 欠損細胞は ATR に強く依存していることが示唆されたことから、SMARCA4 欠損細胞の DNA 複製ストレスに対する ATR の寄与を調べた。まず、DNA 複製ストレスの指標の一つである一本鎖 DNA の露出量を解析した。その結果、SMARCA4 ノックアウト細胞では野生型と比較して、内在性一本鎖 DNA 量が増加していることが示された (図 G)。さらに、SMARCA4 ノックアウト細胞では、ATR 阻害剤によって露出される一本鎖 DNA 量についても増大することが示された (図 G)。このことから、SMARCA4 欠損細胞では内在性一本鎖 DNA 量の増加を伴う DNA 複製ストレスが高まっており、これが ATR 阻害剤に対する脆弱性の要因となっていると考えられる。次に、SMARCA4 欠損細胞の複製フォークの進行に及ぼす ATR 阻害剤の影響を

DNA fiber 法によって解析した。興味深いことに、SMARCA4 野生型細胞の複製フォークの進行速度は ATR 阻害剤にほとんど影響されない一方で、SMARCA4 ノックアウト細胞では ATR 阻害剤によって有意に複製フォークが失速することが示された (図 H)。すなわち、SMARCA4 欠損細胞では高度な DNA 複製ストレス抱えながらも、ATR 依存的に複製フォークを進行させる DNA 複製ストレス耐性機構を獲得しているという可能性が示唆された。さらに我々は、SMARCA4 欠損細胞では、ATR 依存的にリン酸化されるタンパク質 X のノックダウンによっても複製フォークが失速するという予備的実験データを得ている。現在は、SMARCA4 欠損細胞における DNA 複製ストレス耐性機構の解析を進めるとともに、この制御因子が ATR 阻害剤の奏功性予測バイオマーカーとなりうるかどうか検証している。

(2) 今回の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

本研究成果から、KRAS 及び SMARCA4 変異がん細胞は ATR 阻害剤に対して高感受性を示すことが示唆された。これは、本研究の目指す「KRAS 及び SMARCA4 変異併存肺腺がんを標的とした ATR 阻害剤による個別化治療法の開発」を強くサポートするものと考えられる。今後、KRAS 及び SMARCA4 変異併存肺腺がんモデル細胞株を樹立し、ATR 阻害剤の効果を評価する予定である。また、当研究グループでは製薬企業との共同研究を実施しており、臨床試験中の ATR 阻害剤を用いて *in vivo* レベルでの腫瘍抑制効果の評価を行っている。今後の研究によって、KRAS 及び SMARCA4 変異がんが ATR 阻害剤治療によって著効することが期待される場合には、製薬企業との共同研究へと展開して TR 研究として発展させることを考えている。

また本研究から、SMARCA4 欠損細胞では DNA 複製ストレスが増加し、これに伴って ATR 依存的な DNA 複製ストレス耐性機構を獲得するという可能性を示唆するデータを得られた。今後、SMARCA4 欠損細胞における DNA 複製ストレス耐性機構の詳細な解析を進め、さらに、KRAS 及び SMARCA4 変異併存がんモデル細胞ではこの DNA 複製ストレス耐性機構への依存度がより高まっているかどうかを検証する。近年の臨床試験の結果から、一部の患者では ATR 阻害剤治療によって著効例が認められることが報告されている。しかし、どのようながん種で ATR 阻害剤が有効であるかという情報が不足している現状から、CRISPR-Cas9 や shRNA を用いた網羅的スクリーニングなどによって ATR 阻害剤高感受性をもたらすバイオマーカーの探索が進められている。同定された因子のほとんどは、その機能異常によって複製フォークの失速を伴う DNA 複製ストレスを誘発するものである。しかし近年の研究より、複製フォークの失速は DNA 複製ストレス耐性機構によって回復すること、ATR が DNA 複製ストレス耐性機構に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。すなわち我々は、この ATR 依存的な DNA 複製ストレス耐性機構への依存度が、より有用なバイオマーカーとなりうると考えている。我々は既に、DNA 複製ストレス耐性を制御する ATR 依存的リン酸化タンパク質を同定し、このリン酸化タンパク質特異的なモノクローナル抗体の単離に取り掛かっている。今後、同定されたリン酸化タンパク質などの DNA 複製ストレス耐性を制御する因子が、ATR 阻害剤の奏功性予測バイオマーカーとして有用であるかどうかを検証していく計画である。