

23-B-25 合成致死仮説に基づく新規がん分子標的の探索研究

独立行政法人国立がん研究センター 研究所 遺伝医学研究分野 小泉 史明

研究の分類・属性

基礎系

研究の概要

合成致死仮説に基づき、創薬、効果予測バイオマーカーのための新規がん分子標的を探索している。本仮説に基づく抗がん剤開発の成功例として PARP 阻害剤が挙げられる。PARP 阻害剤は、BRCA1/2 遺伝子の機能不全によりがん化した細胞に対して作用すると、DNA 損傷の修復が障害され、合成致死と呼ばれる細胞死を誘導することが知られている。今回我々は、分子標的薬の開発が遅れている、トリプルネガティブ乳がん (TN 乳がん) を対象に、everolimus 存在下でその感受性を飛躍的に高める、あるいは単独で細胞増殖抑制を示す遺伝子を探索する。遺伝子の探索には 700 程度のキナーゼ遺伝子からなる siRNA ライブラリーと、レンチウイルス shRNA システムを用いた網羅的遺伝子ライブラリーの両者を用いる。得られた研究成果は、臨床検体を用いてレトロスペクティブに検証し、その後前向き臨床試験の準備を開始する。

研究経費

5,000 千円

研究班の組織

小泉史明	研究所遺伝医学研究分野ユニット長	研究の統括
田村研治	乳腺科・腫瘍内科 通院治療室医長	臨床試験の推進・臨床検体および臨床情報の提供 (臨床試験の統括)
温泉川真由	乳腺腫瘍内科医師	臨床試験の推進・臨床検体および臨床情報の提供、 臨床研究の解析
藤森浩彰	研究所ゲノム生物学研究分野研究員	合成致死法によるがん治療分子標的の解析、標的 分子アッセイ系の構築

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標) :

合成致死仮説に基づき、難治性がんである TN 乳がんにおける everolimus の感受性を飛躍的に高める、あるいは単独で抗腫瘍活性を示す新規がん分子標的を探索し、創薬、あるいは everolimus の効果予測バイオマーカー開発のための基盤となる究成果を得る。

第1年次

(到達目標)

1 使用する細胞腫の選択 (乳がん)

TN 乳がん細胞株から、実験に用いる細胞株を選択する。everolimus の感受性、siRNA の導入効率などから判断する。実験に用いる siRNA のライブラリーを決定する。

2 標的分子の同定 (乳がん)

siRNA ライブラリーを用いて、抗がん剤の感受性を増強する、または単独で細胞増殖抑制作用を示す候補遺伝子群を選択する。

3 標的分子の評価 (乳がん)

上記で同定された遺伝子の siRNA を合成し、検証とメカニズム解析を開始する。

(年次評価時点の実績要点)

1 使用する細胞腫の選択 (乳がん)

TN 乳がん細胞株から、上記指針より everolimus の感受性が低く、siRNA 導入効率の良い MDA-MB-157 と -231 の 2 株を用いて解析を行った。siRNA ライブラリーは、機能性、お呼び網羅性の観点から、約 700 個のプロテインキナーゼを標的としたプリメイド siRNA ライブラリー (Silencer® Select Human Kinase SiRNA Library V4, life technologies) と、網羅的な遺伝子ノックダウンが可能なレンチウイルス shRNA ライブラリー (Decode RNAi-GIPZ: a Annotated Genes Screening Library-Negative Selection Kit, Open Biosystems) の両者を用いることとした。以上より目標は達成された。

2 標的分子の同定 (乳がん)

上記 2 種類のプリメイド、および網羅的 siRNA ライブラリーを用いて遺伝子をノックダウンし、それぞれについて everolimus の感受性を増強させる候補遺伝子群を選択した。以上より目標は達成された。

3 標的分子の評価 (乳がん)

複数の候補遺伝子からの絞り込みがなされず、機能解析開始には至らなかったため、本目標は (メカニズムの解析の開始) 達成されていない。

研究成果と考察

第1年次評価時点

我々は、以前の研究において、分子標的薬である everolimus が TN 乳がんに対して強い抗腫瘍活性を有すること、標的である mTOR の抑制が同程度でありながら、その感受性に数百倍の差が生じることを見出している。本研究は、synthetic lethal 仮説をもとに、感受性を決定する標的の同定を試みる目的で開始された。

昨年 9 月に研究のコンセプトの確認、詳細な役割分担と研究の具体的な進め方、問題点の確認のため班会議を開催した。当初使用予定であった、Thermo 社の Druggable siRNA は、薬剤標的となる可能性のある遺伝子の約 8000 個を網羅した siRNA ライブラリーであったが、非常に高価であり (約 1000 万円)、今回の使用は断念した。同じ Thermo 社のプロテインキナーゼ siRNA と life technologies 社の製品を比較した結果、コストパフォーマンスの点から、life technologies 社の製品を用いることとした。

一方、探索する遺伝子数が減少したことを補うため、レンチウイルス shRNA ライブラリーシステムを用いて解析を行うこととした。本システムでは、対象遺伝子をキナーゼ等に特化していないが、前者に比較してより網羅的な解析を行うことができる (約 1-3 万個)。本システムは、遺伝子工学技術を得意とする藤森先生が担当することとなった。

1) 使用する細胞腫の選択 (乳がん)

対象とする TN 乳がん細胞 5 株の everolimus による細胞増殖抑制効果を、感受性株である MDA-MB468 とともに確認した。以前の検討結果と同様に、MDA-MB468 は、1nM 程度の IC50 値であるのに対し、HCC1937、MDA-MB-436、MDA-MB-231、MDA-MB-157 は 100nM 程度、またはそれ以上の IC50 値であり、BT20 は中間の 50nM 程度の値だ

った。標的である mTOR の抑制を pS6K 分子のリン酸化抑制で確認したところ、感受性株、耐性株ともに 1nM 程度で十分な抑制が見られ、感受性、標的の抑制ともに再現性が得られた。耐性株である MDA-MB-231、-157 ともに遺伝子導入など問題なく施行でき、実験に用いる細胞株とした。

2) 標的分子の同定 (乳がん)

プロテインキナーゼプライメド siRNA ライブラリー (Silencer® Select Human Kinase siRNA Library V4, life technologies) とレンチウイルス shRNA ライブラリー (Decode RNAi-GIPZ: a Annotated Genes Screening Library-Negative Selection Kit, Open Biosystems) を購入した。前者は、すでに合成されている限られた siRNA を用いるため、96 穴ではなく、384 穴のシステムを用いた。MDA-MB157 を用いて、評価をおこない、感受性を 1.5 倍以上更新させる遺伝子として (IC50 値)、27 個の遺伝子同定した。

一方、レンチウイルス shRNA ライブラリー (Decode RNAi-GIPZ: a Annotated Genes Screening Library-Negative Selection Kit, Open Biosystems) に関しては、MDA-MB-231 を用いて、上記方法により、遺伝子 knock down 後に everolimus 感受性を亢進させる候補遺伝子 155 個を同定した。今後は、両者において、同じ耐性株を用いて再現性を確認し、もう一方の耐性株にて同様の結果が得られるかを確認し、候補遺伝子を最終的に 10 個程度に絞る予定である。

3) 標的分子の評価 (乳がん)

それぞれの手法により、遺伝子を選択したが、結果の検証と機能解析の開始には至らなかった。

倫理面への配慮

遺伝子発現プラスミド及び変異遺伝子作成等の組換え DNA 実験をおこなう必要がある場合は、遺伝子組換え実験安全委員会に実験計画書を提出し承認を得る。実施にあたっては関連法規を遵守する。

動物実験をおこなう必要がある場合は (国立がん研究センターのみ)、動物実験計画書を動物実験倫理委員会に提出し承認を得る。実施にあたっては関連法規を遵守する。本研究は臨床研究には該当しない。

ヒトを対象とした遺伝子診断を含む臨床研究が必要となる場合は、ヘルシンキ宣言を尊重して計画された臨床試験計画に基づいて実施される。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「臨床研究倫理指針」に基づいた研究計画書を作成する。研究計画書、患者への説明文書について倫理委員会の承認を得るとともに、臨床試験対象者の書面によるインフォームド・コンセントを得て施行する。本研究において臨床検体を取り扱う可能性のある研究者 (国立がん研究センター研究所 小泉、田村) は臨床検体を用いた薬力学的解析、Pharmacodynamics などの研究について数多くの経験を有し、具体的な検体の匿名化、管理方法などに熟知している。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

前回提出の報告書において、本研究に至る背景に関する記載が乏しく、誤解が生じたと推測している。また記載方式に関しても指示通りでない点があり改訂した。エフォート率も変更した。研究に関しては、一部に遅れが生じているが、ほぼ予定通りに進行し、感受性を付加する遺伝子を選択している。ライブラリーに関しても市販のものに頼っているという指摘があったが、あくまでも、siRNA であり、2通りのアプローチを行っている点は、コストパフォーマンスに優れていると考える。