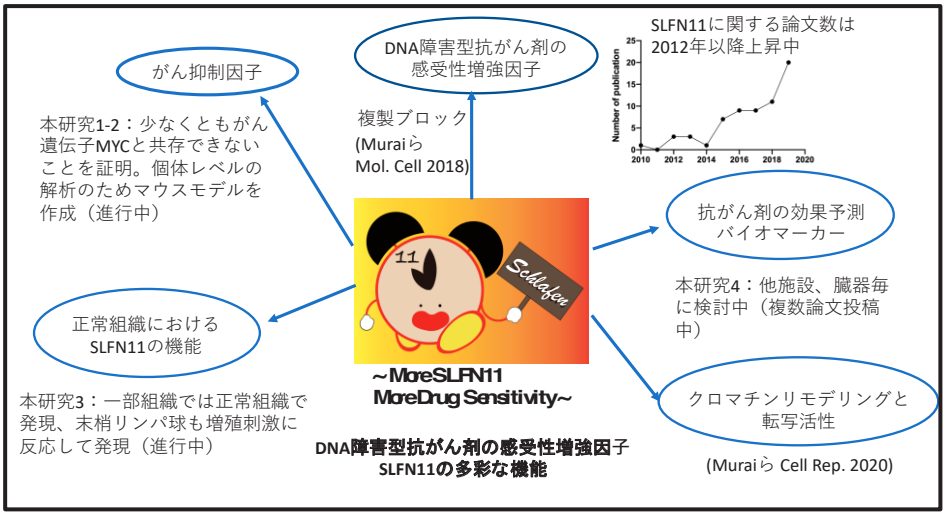
54　複製ストレス制御によるがん抑制機構の解明	村井　純子

【目的】SLFN11（Schlafen 11）は、DNA 障害型抗がん剤の効果を高め、DNA 複製の異常（複製ストレス）にさらされる細胞を選択的に排除する機能があることが最近解ってきた。複製ストレスは、がん遺伝子の活性化や DNA 障害型抗がん剤など様々な原因によって引き起こされ、遺伝子変異やがん化の促進、がんの薬剤耐性獲得の要因となる。よって、複製ストレスにさらされる細胞を排除できれば、がんの発症、進展、再発の抑制が期待できる。本研究の目的は、1. SLFN11 にがん抑制遺伝子としての機能があるかを検討すること、2. 個体レベルの SLFN11 機能解析のためにマウスモデルを構築すること、3. 正常ヒト組織における SLFN11 の機能を検討すること、4. さらには実臨床において、SLFN11 の抗がん剤効果予測バイオマーカーとしての有用性を検討することである。これらを明らかにすることで、SLFN11 を軸としたがん治療戦略を打ち立てることが可能となる。

【方法】1. 複製ストレスを惹起することが知られているがん遺伝子 MYC の過剰発現がドライバーとなって発症するバーキットリンパ腫（BL）由来の細胞株について、SLFN11 と MYC の共発現が細胞生存に及ぼす影響を検討した。2. マウス細胞においてヒト SLFN11 が機能するかを細胞レベルで検討した。3. 広島大学医学部病理学と共同研究で、ヒト非腫瘍部における SLFN11 発現頻度を 17 臓器について、免疫組織染色法にて検討した。また正常ヒト末梢血単核細胞をもちいて、正常 T リンパ球における SLFN11 の発現レベルと発現制御について検討した。4. 複数施設との共同研究で、SLFN11 の発現レベルと DNA 障害型抗がん剤を含む抗がん治療成績との相関関係を検討した。

【結果】1. MYC 高発現 SLFN11 低発現の BL 細胞株 Sultan、Ramos において、薬剤による SLFN11 発現誘導により細胞死が起こった。逆に MYC 低発現 SLFN11 高発現の BL 細胞株 Tree92 に MYC の発現を誘導すると細胞死が起こった。どちらの場合も SLFN11 をノックアウトした株では細胞死が起こらなかったことから、BL 細胞株では SLFN11 と MYC が共発現できない、つまりがん遺伝子 MYC の過剰発現細胞を SLFN11 は選択的に排除できると考えられた。2. マウス由来リンパ球細胞 A20 を用いて、tetracycline 誘導性にヒト SLFN11 を高発現する細胞株を作製したが、これらの株は DNA 障害型抗がん剤に高感受性とならなかった。少なくともこの細胞株では、ヒト SLFN11 が機能しないと結論づけた。3. ヒト非腫瘍部における SLFN11 の発現は、乳腺、大腸、膵臓ではほぼゼロであった一方、肺、子宮頸部、食道では発現していた。またヒト扁消 T リンパ球は非増殖刺激下では、SLFN11 の発現を認めなかったが、IL2 刺激により発現が上昇した。マクロファージは非増殖刺激下でも SLFN11 を高発現していた。このことより、正常細胞においても SLFN11 が機能している可能性が示唆された。4. 複数のがん種において、SLFN11 の発現レベルと DNA 障害型抗がん剤を含む治療を受けた時の生命予後に有意な相関を認めた。SLFN11 が抗がん剤治療の効果予測バイオマーカーまたは、治療薬決定のバイオマーカーとして有用であるエビデンスが得られた。

SLFN11 研究の現在とこれから



54. 複製ストレス制御によるがん抑制機構の解明

村井　純子

慶應義塾大学 先端生命科学研究所／大学院政策・メディア研究科

Key words：SLFN11，バイオマーカー，がん抑制遺伝子，複製ストレス，DNA ダメージ

緒　言

DNA 複製の異常（複製ストレス）は、がん遺伝子の活性化や DNA 障害型抗がん剤など様々な原因によって引き起こされ、遺伝子変異やがん化の促進、がんの薬剤耐性獲得の要因となる。よって、複製ストレスにさらされる細胞を排除できれば、がんの発症、進展、再発の抑制が期待できる。これまで研究が進んできた ATR 依存性の S 期チェックポイントは、複製ストレスを感知するが細胞生存に有利に働くため、変異蓄積の原因になることがわかってきた。 我々は全く新しい複製ストレスの抑制因子として、DNA ヘリケースに属する Schlafen 11（SLFN11、シュラーフェン 11）に着目している［1］。SLFN11 は、2012 年に独立した二つの大規模がんデータベースの解析から、DNA 障害型抗がん剤（プラチナ製剤、トポイソメラーゼ阻害剤、DNA 複製阻害剤など）の感受性と mRNA 発現量が最も高く相関する遺伝子として報告された［2〜3］。その後、SLFN11 の発現量が卵巣がんの新規治療薬 PARP 阻害剤の感受性にも強く関わることも報告された［4］。SLFN11 が DNA 障害型抗がん剤の感受性を増強させるメカニズムについて、我々は、DNA 障害型抗がん剤によって複製ストレスがかかったときに、SLFN11 が複製フォークに結合し、複製を永続的にブロックすることで、細胞死を誘導することを発見した［5］。このような複製ストレス抑制機能を持つタンパク質は他に例がない。このことから、我々は SLFN11 が PARP 阻害剤を含む広範な DNA 障害型抗がん剤の効果予測の強力なバイオマーカーとなるのみならず、複製ストレスにさらされた細胞を排除する、「がん抑制遺伝子」としての機能を持つと推測した。さらに、SLFN11 の機能解析は始まったばかりであり、とくに正常組織や個体レベルでの機能はほとんど理解できていない。これらの解明のためにはマウスモデルの樹立が必須であるが、マウスに SLFN11 のホモログはなく、マウスの Slfn5、8、9、10、14 にヒト SLFN11 と同様の機能を持つものがないかを、他大学との共同研究で進めてきたが、マウスにはヒト SLFN11 に相応する Slfn はないようである。以上の背景を基に、本研究の目的を、1．SLFN11 にがん抑制遺伝子としての機能があるかを検討すること、2．個体レベルの SLFN11 機能解析のためにマウスモデルを構築すること、3．正常ヒト組織における SLFN11 の機能を検討すること、4．さらには実臨床において、SLFN11 の抗がん剤効果予測バイオマーカーとしての有用性を検討することとした。これらを明らかにすることで、SLFN11 を軸としたがん治療戦略を打ち立てることが可能となる。

方法および結果

1.　バーキットリンパ腫細胞株において、SLFN11 とがん遺伝子 MYC は互いに排他的であった

バーキットリンパ腫（BL）は、がん遺伝子 MYC 過剰発現による、極めて速い増殖と複製ストレスを特徴とするリンパ腫である。がん細胞データベース（GDSC）をマイニングしたところ、MYC と SLFN11 の発現量はほぼ完全に逆相関（r＝ −0.96、N＝10）していた。これは複製ストレスにさらされた細胞が SLFN11 をオフにすることで生存に有利になっている可能性、すなわち、SLFN11 は MYC をドライバーとするがん化に拮抗する可能性を示唆した。この可能性を検証するために、複数の BL 細胞を購入し、また京都大学医学部産婦人科学より BL 細胞株 Tree92 を供与いただいた。さて、SLFN11 の不活化はほとんどがプロモーターのメチル化亢進が原因であり、発現誘導にはヒストン脱アセチル化阻害剤（entinostat）が有効である［6］。我々は、まず SLFN11 が不活化されている BL 細胞 Sultan 株を用いて、entinostat（1 μM）で SLFN11 が再発現するかを検討したところ、16 時間で SLFN11 の高発現

を認めた（図 1A）。さらに 72 時間連続暴露の viability assay を行ったところ Sulatn 株は entinostat に高感受性であった（図 1B）。SLFN11 の再発現が、entinostat 高感受性の原因となる可能性を考え、SLFN11 ノックアウト Sultan 細胞株（Sultan *SLFN11*-KO）を複数作製したところ、これらの *SLFN11*-KO 株は親株に比べ entinostat に対して耐性となった（図 1A&B）。これらのことから、BL 由来の Sultan 細胞では SLFN11 が発現することが原因で細胞死が引き起こされることがわかった。

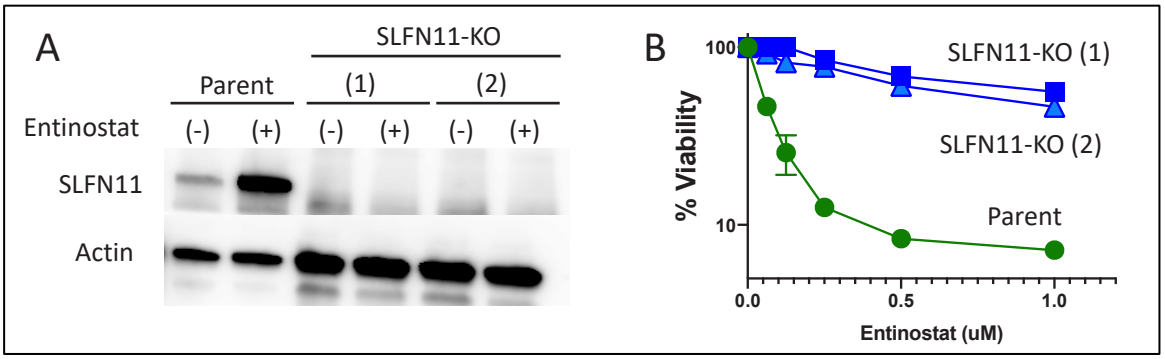


図 1. Sultan 細胞の HDAC 阻害剤に対する高感受性は SLFN11 の再活性化に起因していた

A) バーキットリンパ腫由来細胞株 Sultan の親株（parent）と *SLFN11*-KO 細胞株に対し、HDAC 阻害剤である entinostat を 16 時間暴露したところ、親株では SLFN11 の発現が上昇したが、KO では SLFN11 は検出されなかった。ウェスタンブロット。

B) A の細胞株を entinostat に 72 時間暴露したのちに、細胞の生存率（viability）を、ATP 量を基に計測しコントロール（薬剤なし）を 100%として、各濃度における viability をグラフ化した。HDAC：ヒストン脱アセチル化酵素

次に、BL 細胞でありながら、SLFN11 を高発現し、MYC の発現レベルが低い Tree92 細胞について、ドキシサイクリン添加依存的に MYC を高発現する細胞株 Tree92 tetON-MYC を作製した（図 2A）。メチルセルロース培地を用いて、ドキシサイクリン濃度依存的なコロニー形成率を計測したところ、親株に比べ Tree92 tetON-MYC 細胞は明らかに生存率が下がった（図 2B）。なお Tree92 SLFN11-KO 株にドキシサイクリン添加依存的に MYC を高発現させても、生存率は低下しなかった。これらのことより、BL 由来の Tree92 細胞では MYC が高発現することが原因で細胞死が引き起こされ、さらにその細胞死は SLFN11 依存的であった。

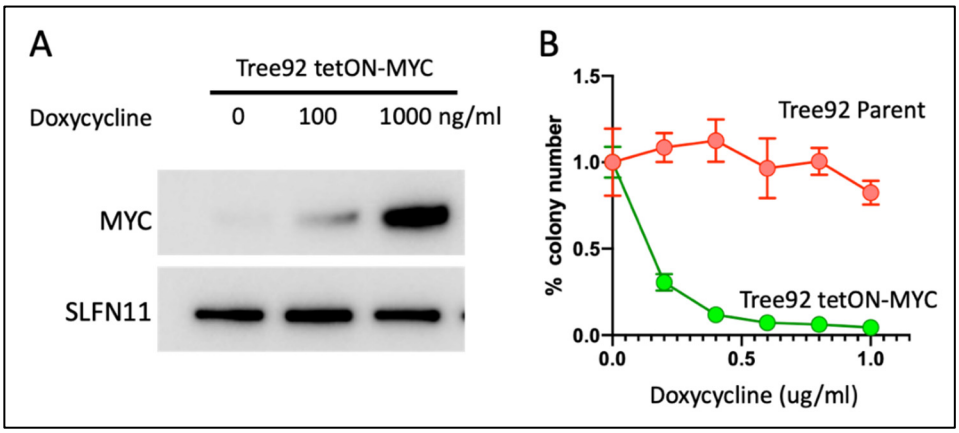


図 2. BL 由来の Tree92 細胞は MYC の高発現により細胞死が誘導された

A) Doxycycline 濃度依存的に MYC を発現する BL 由来の Tree92 tetON-MYC に doxycycline を図中の濃度で添加し、16 時間後の細胞溶解液を用いてウェスタンブロットを行った。

B) Tree92 の親株と Tree92 tetON-MYC 株を HDAC 阻害剤 entinostat に 72 時間暴露したのちに、細胞のコロニー形成率を、コントロール（薬剤なし）を 100%として算出し、グラフ化した。HDAC：ヒストン脱アセチル化酵素

2. マウスリンパ球株 A20 において、ヒト SLFN11 は機能しない

SLFN11 のトランスジェニックマウス作製に向けた前段階として、マウスリンパ腫由来の細胞株 A20 を用いて実験を行った。マウス A20 細胞を用いてドキシサイクリン添加依存的に SLNF11 を高発現する細胞株 A20 tetON-SLFN11 を作製した（図 3A）。SLFN11 はほぼ全ての細胞で発現したにも関わらず、カンプトテシン（CPT）への感受性には影響がなかった（図 3B）。

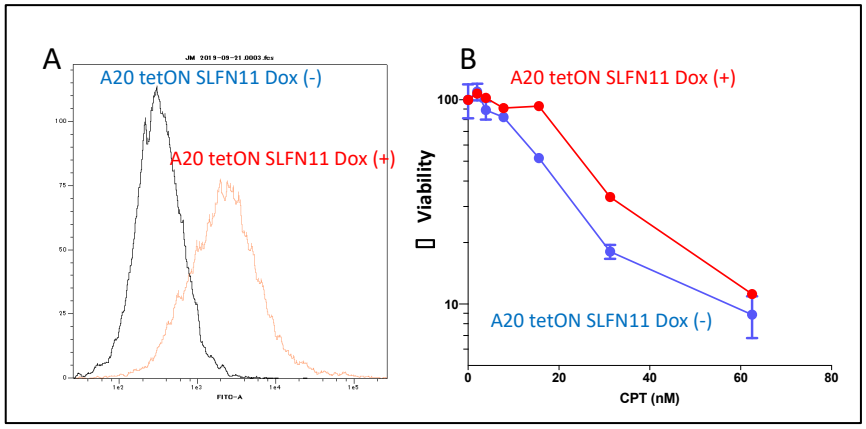


図 3. マウス A20 細胞において、SLFN11 は薬剤感受性を増強しなかった

A) Doxycycline 濃度依存的に SLFN11 を発現するマウス A20 tetON-SLFN11 に doxycycline（1 μg/ml）を 2 日間投与したのち、SLFN11 の発現量を FACS で検出した。Doxycycline 非添加 Dox（−）に比べ、Dox（+）ではシグナルが増強（右にシフト）している。

B) A) の条件で、DNA 障害型抗がん剤カンプトテシン (CPT) を 3 日間連続投与した後、細胞の生存率 (viability) を、ATP 量を基に計測しコントロール (薬剤なし) を 100%として、各濃度における viability をグラフ化した。

3. 一部のヒト正常組織は SLFN11 を発現していた

広島大学医学部病理部との共同研究で、ヒト非腫瘍部及び腫瘍部における SLFN11 の発現頻度を 17 臓器で、組織横断的に解析を行った。ヒト非腫瘍部における SLFN11 の発現は、乳腺、大腸、膵臓ではほぼゼロであった一方、肺、子宮頸部、食道では発現していた。腫瘍部においては、非腫瘍部と同様の発現パターンを示す臓器、腫瘍部において SLFN11 の発現が高くなる傾向が強い臓器、逆に腫瘍部において SLFN11 の発現が下がる傾向にある臓器があった。

4. ヒト末梢リンパ球は増殖刺激により SLFN11 の発現が上昇した

購入可能なヒト末梢血単核球細胞を用いて、末梢血における SLFN11 の発現を検討し、機能解析を行った。IL2/CD3 刺激により、T リンパ球を刺激したところ、SLFN11 の発現が上昇し（図 4A）、SLFN11 の発現が高まった細胞は EdU 染色が（DNA 複製をモニターしている）が陽性となった（図 4B）。

5. 一部のがん種において、臨床サンプルにおける SLFN11 の発現は生命予後と有意な相関があった

大阪国際がんセンターとの共同研究で、骨肉腫の摘出手術を受けた患者様 84 例の腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋切片を受け取った。SLFN11 の免疫組織化学染色（IHC）を行い、共同研究先の広島大学病理部の医師 2 名が組織サンプルの SLFN11 陽性率を独立に評価した。評価するにあたって不適切なサンプル（化学療法施行後、内部陽性コントロールが染まっていないスライド）を排除した。評価可能と判断したスライドに関して、SLFN11 陽性率（%）によって、SLFN11 陽性サンプルと SLFN11 陰性サンプルの二つグループに分け、カプランマイヤー生存分析を行った。陽性率 10%以上とそれ未満で二分したところ、SLFN11 陽性サンプルが 25 例で、SLFN11 陰性サンプルが 19 例であった。SLFN11 陽性サンプルの生存率は SLFN11 陰性サンプルを上回る結果が得られた。しかし有意な差はなかった。これ以外にも、北海道大学医学部耳鼻科、新潟大学医学部脳神経外科ほか 10 施設以上の研究に、SLFN11 の抗体や IHC プロトコールの提供、適宜アドバイスを行い、臨床サンプルにおける SLFN11 の発現解析と生命予後との相関を検討中である。一部のがん種においては、プラチナ製剤治療群において、SLFN11 の高発現とより良い生命予後とに有意な相関を認めた。

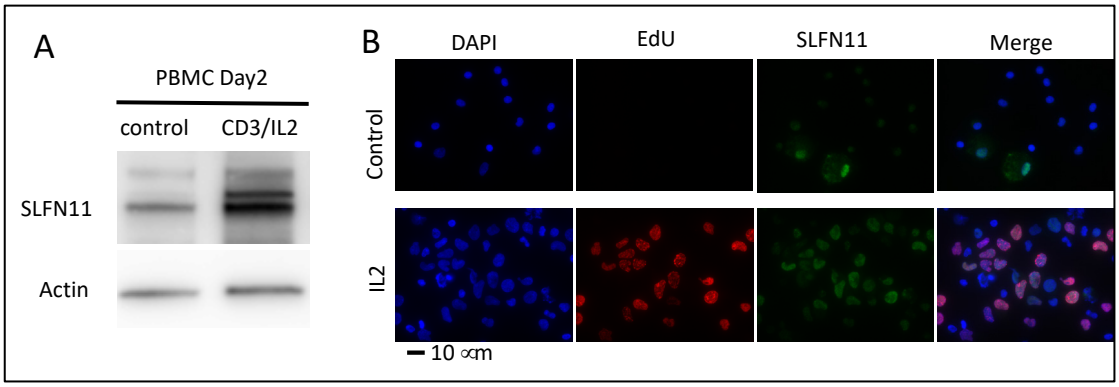


図 4. ヒト末梢血単核球細胞（PBMC）は IL2 刺激により増殖し SLFN11 の発現が高まった

A）ヒト末梢血単核球細胞を、CD3/IL2 で刺激または刺激しない（コントロール）時の SLFN11 の発現量をウェスタンブロットで検討した。刺激開始 2 日後の細胞溶解液を用いた。

B）ヒト末梢血単核球細胞を IL2 で刺激し、6 日後に SLFN11 の発現と、細胞増殖（EdU の取り込み）を免疫染色法で検討した。Control で SLFN11 ポジティブの細胞はマクロファージ。

考　察

方法と結果1より、SLFN11が、がん遺伝子MYCの過剰発現によって引き起こされる複製ストレスを抑制できることが示唆された。一方で細胞データベースレベルでは、MYCとSLFN11の発現に有意な負の相関は認めない（データ表示せず）。今後はどの程度の複製ストレスをSLFN11が抑制できるのか、がん化を抑制するほどに機能するかを動物モデルで実証することが必要である。一方で複製ストレスが溜まりながらも、SLFN11をオフすることで生存できているがん細胞が存在することが示唆された。この場合は、HDAC阻害剤などSLFN11を再発現させることで細胞死が誘導できるので、新規の抗がん治療戦略となる。方法と結果2、より、単なる遺伝子導入では、マウスでヒトSLFN11が機能しないことがわかった。SLFN11の結合タンパク質RPA1も同時に発現させることで解決するかもしれないので、現在実験中である。方法と結果3より、SLFN11の発現制御が臓器ごとに、また腫瘍化においてダイナミックに変化することを明らかにできた。臓器ごとのSLFN11発現制御因子の解明につながる結果である。方法と結果4より、ヒトTリンパ球でのSLFN11発現制御の1つが明らかとなった。Tリンパ球は腫瘍免疫に大きく関与するため、抗がん剤治療において腫瘍に浸潤するTリンパ球のダメージを回避する戦略につながる。方法と結果5より、SLFN11が一部のがん種において、DNA障害型抗がん剤の効果予測バイオマーカーとして利用できる可能性が示された。今後はより協力施設を増やし、症例数を増やし、エビデンスの蓄積やがん種ごとの閾値の設定などを詰めていく必要がある。

SLFN11の機能は、これまで知られていたどの遺伝子の機能とも似ておらず、とても興味深い。例えば、我々は最近SLFN11が抗がん剤の投与下において、遺伝子プロモーター領域のクロマチン構造を変化させる（緩ませる）ことを発見した［7］。クロマチンが緩むと同時に、最初期遺伝子（immediate early genes）と呼ばれる、ストレス応答や免疫反応に関わる遺伝子群の発現が数倍から数十倍に高まることも発見した［7］。最初期遺伝子は、外部刺激を加えてから1時間以内に発現上昇のピークを迎えることが知られていたが、今回発見したSLFN11が介在する経路では、数時間かけてクロマチンの緩みと並行して起こるため、従来の刺激応答とは異なると考えられる。この発見の生理学的意義についてはさらなる研究が必要であるが、SLFN11に点変異を入れると、クロマチンの緩みや最初期遺伝子群の活性化が起こらなくなり、抗がん剤の効果を増強する作用も打ち消されるため、これらの現象はすべてSLFN11の作用によって引き起こされていると言える。今後も、この摩訶不思議なSLFN11を研究することで、抗がん効果を高めるメカニズムを更に詳細に解析し、SLFN11を軸とした新規がん治療戦略を創世したいと考える。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、広島大学大学院医系科学研究科分子病理学研究室の坂本直也先生、谷山大樹先生、高島剛志先生、大阪国際がんセンターの中紀文先生、本学修士生の馬芸笑さんです。本研究への多大なご協力に感謝申し上げます。

文　献

1) Murai J, Thomas A, Miettinen M, Pommier Y. Schlafen 11 (SLFN11), a restriction factor for replicative stress induced by DNA-targeting anti-cancer therapies. Pharmacol Ther. 2019;201:94-102. Epub 2019/05/28. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.05.009. PubMed PMID: 31128155; PubMed Central PMCID: PMCPMC6708787.

2) Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. Nature. 2012;483(7391):603-7. Epub 2012/03/31. doi: 10.1038/nature11003. PubMed PMID: 22460905; PubMed Central PMCID: PMCPMC3320027.

3) Zoppoli G, Regairaz M, Leo E, Reinhold WC, Varma S, Ballestrero A, et al. Putative DNA/RNA helicase Schlafen-11 (SLFN11) sensitizes cancer cells to DNA-damaging agents. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(37):15030-5. Epub 2012/08/29. doi: 10.1073/pnas.1205943109. PubMed PMID: 22927417; PubMed Central PMCID: PMCPMC3443151.

4) Murai J, Feng Y, Yu GK, Ru Y, Tang SW, Shen Y, et al. Resistance to PARP inhibitors by SLFN11 inactivation can be overcome by ATR inhibition. Oncotarget. 2016;7(47):76534-50. Epub 2016/10/07. doi: 10.18632/oncotarget.12266. PubMed PMID: 27708213; PubMed Central PMCID: PMCPMC5340226.

5) Murai J, Tang SW, Leo E, Baechler SA, Redon CE, Zhang H, et al. SLFN11 Blocks Stressed Replication Forks Independently of ATR. Mol Cell. 2018;69(3):371-84 e6. Epub 2018/02/06. doi: 10.1016/j.molcel.2018.01.012. PubMed PMID: 29395061; PubMed Central PMCID: PMCPMC5802881.

6) Tang SW, Thomas A, Murai J, Trepel JB, Bates SE, Rajapakse VN, et al. Overcoming Resistance to DNA-Targeted Agents by Epigenetic Activation of Schlafen 11 (SLFN11) Expression with Class I Histone Deacetylase Inhibitors. Clin Cancer Res. 2018;24(8):1944-53. Epub 2018/02/03. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0443. PubMed PMID: 29391350; PubMed Central PMCID: PMCPMC5899656.

7) Murai J, Zhang H, Pongor L, Tang SW, Jo U, Moribe F, et al. Chromatin Remodeling and Immediate Early Gene Activation by SLFN11 in Response to Replication Stress. Cell Rep. 2020;30(12):4137-51 e6. Epub 2020/03/27. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.117. PubMed PMID: 32209474.