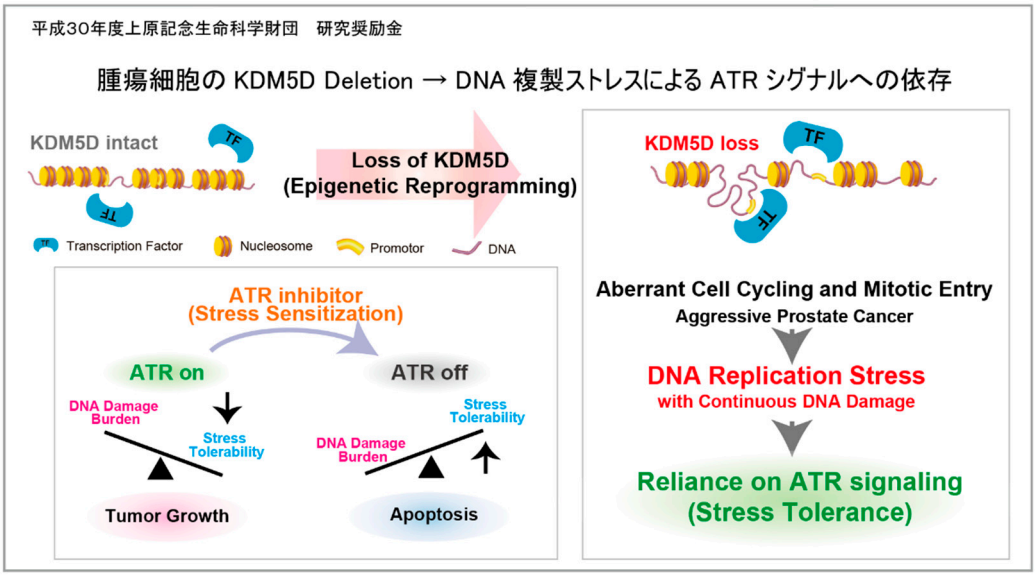
172　DNA複製ｽﾄﾚｽを利用したがん合成致死誘導治療法確立	小村　和正

【目的】がんは、正常細胞が様々な細胞ストレスにより起こる遺伝子変異を蓄積することにより発生する。それらの一部は Driver Mutation として働き、腫瘍細胞へと変化していくが、核内で起こっているこの変異を修復できずに核酸が正常からかけ離れた状態となっていく状態をゲノム不安定性 Genomic Instability と呼んでいる。我々は現在までにエピジェネティックファクターである KDM5D の機能異常により、細胞のトランスクリプトーム変遷がおこり、DNA の複製に負荷がかかることから（複製ストレス）、この修復機構が完全に働かず、がん細胞のゲノム不安定性を引き起こし、より悪性度の高い腫瘍へと変化していくことを報告している（Komura et al. PNAS 2016）。本研究では、この分子生物学的な特徴の解明と、臨床への応用の可能性を明らかにすることを目的とした。

【方法】男性特異的臓器である前立腺がんでの、Y 染色体上にコードされるヒストン脱メチル化酵素である KDM5D は、病期進行に伴い mRNA レベルでの発現が低下、また KDM5D 低発現レベル群では明らかに予後が不良であることから、実臨床の前立腺がん FFPE 検体を用いて、Fluorescent in Situ Hybridization（FISH）による KDM5D locus の deletion を検出できる実験系を樹立した。また KDM5D deletion による DNA 複製ストレス発生に寄与する因子の解析のための *in vitro*、*in vivo* 実験系を構築した。

【結果】前立腺がん全摘標本で施行した FISH 検体のうち、11%（8／75）において *KDM5D* 欠失が確認され、さらにそのうちのほとんど全例（7／8）で優位グリソンスコアが 5 の悪性度の高い腫瘍であった。このことから、*KDM5D* 欠失は、前立腺がんの極めて悪性度が高いサブタイプのジェネティックな特徴の一つである可能性が考えられた。*KDM5D* 欠失細胞では、細胞内で発生している複製ストレスによる DNA ダメージ修復時間の猶予を担保するために ATR シグナルへの依存がおこっており、genomic instability を伴いながら生存増殖していることを明らかにした。このことから、ATR 阻害薬により、DNA 複製ストレスへの耐性を打ち消すことで腫瘍合成致死を誘導できる可能性を考え、*in vivo* にてその効果を検討したところ、*KDM5D* の欠失している細胞に特異的な腫瘍増殖の抑制効果が認められていた。本研究成果は、*KDM5D* 欠失の検出が、ATR 阻害薬の治療効果予測のバイオマーカーである可能性を示したものであり、これをもとに Precision Medicine への応用を目指し、ゲノム医療で加療選択され得る治療オプションの一つとなる可能性をもつ研究成果であると考えている。

腫瘍細胞の KDM5D Deletion → DNA 複製ストレスによる ATR シグナルへの依存



172. DNA 複製ストレスを利用したがん合成致死誘導治療法確立

小村　和正

大阪医科大学 泌尿生殖・発達医学講座 泌尿器科学教室

Key words：複製ストレス，腫瘍合成致死，ATR 阻害薬，KDM5D

緒　言

がんは、正常細胞が様々な細胞ストレスにより起こる遺伝子変異を蓄積することにより発生する。これらの遺伝子変異のうち、一部は Driver Mutation として働き、細胞を無秩序に増殖させる出発点となる。このような変異の蓄積により、細胞は腫瘍細胞へと変化していくが、核内で起こっているこの変異を修復できずに核酸が正常からどんどんかけ離れた状態となっていく状態をゲノム不安定性 Genomic Instability と呼んでいる。

一つの例として、我々は現在までにエピジェネティックファクターである KDM5D の機能異常により、細胞のトランスクリプトーム変遷がおこり、DNA の複製に負荷がかかることから（複製ストレス）、この修復機構が完全に働かず、がん細胞のゲノム不安定性を引き起こし、より悪性度の高い腫瘍へと変化していくことを報告している（図 1）[1]。本研究では、この分子生物学的な特徴の解明と、他がん種を含めた臨床への応用の可能性を明らかにすることを目的とした。

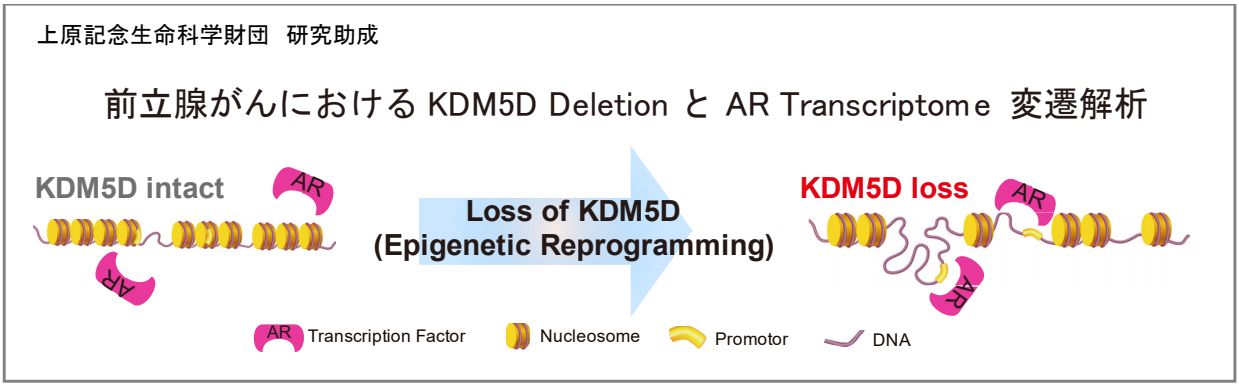


図 1. 前立腺がんにおける KDM5D Deletion と Transcriptome 変遷解析

方法および結果

1.　FISH による KDM5D locus の deletion

男性特異的臓器である前立腺がんでの、Y 染色体上にコードされるヒストン脱メチル化酵素である KDM5D は、病期進行に伴い mRNA レベルでの発現が低下、また KDM5D 低発現レベル群では明らかに予後が不良であることから [1]、実臨床の前立腺がん FFPE 検体を用いて、Fluorescent in Situ Hybridization（FISH）による KDM5D locus の deletion を検出できる実験系を樹立した。Y 染色体の欠失では KDM5D を code する長腕部と、たん腕部（Yp）にそれぞれプローブを設計し、positive control として X 染色体セントロメアにプローブを設計した（図 2）。前立腺がん全摘標本で施行した FISH 検体のうち、11%（8／75）において *KDM5D* 欠失が確認され、さらにそのうちのほとんど全例（7／8）で優位グリソンスコアが 5 の悪性度の高い腫瘍であった。このことから、*KDM5D* 欠失は、前立腺がんの極めて悪性度が高いサブタイプのジェネティックな特徴の一つである可能性が考えられた。

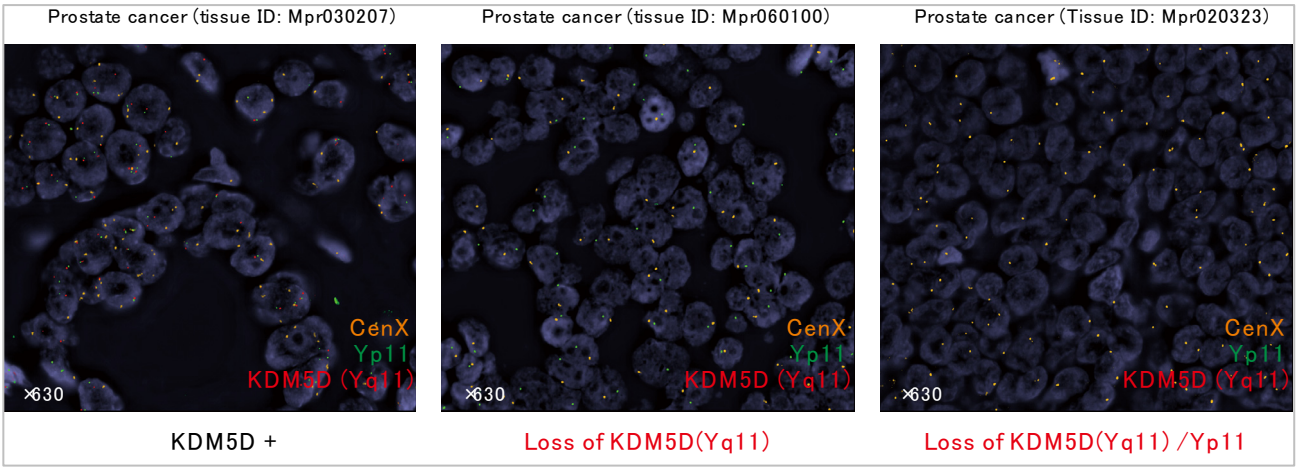


図 2.　3 色プローブによる Y 染色体上長腕 *KDM5D* の欠失を検出する FISH 実験系の樹立
3 種の BAC クローンは KDM5D (Yq11) gene (RP11-188C1 ; labled with Red dUTP)、Y 染色体短腕 (RP11-182H20 ; labled with Green dUTP)、コントロールとして X 染色体セントロメア（CenX）(pSV2x5 ; labled with Orange dUTP）で標識した。

2. *KDM5D* 欠失と細胞形質変化

次に、*KDM5D* 欠失により前立腺がんがよりアグレッシブな形質を獲得することを証明するために、KDM5D 陽性 LNCaP 細胞株に Teton-inducible shKDM5D をレンチウィルスにて導入し、男性ホルモン除去環境下での増殖、足場非依存性の増殖能を獲得することを証明した。配列相同性の高い他の KDM5 パラログの影響ではないことを証明するために、KDM5D-3’ UTR 領域への shRNA をさらに設計し、さらに KDM5D coding region を再導入する実験系を樹立、ルシフェレースで標識したうえで、同所性ゼノグラフトマウス移植モデルで、去勢抵抗性増殖能を検討した。*KDM5D* ノックダウンでの去勢抵抗性増殖フェノタイプが、coding region 再導入により消失することを証明した（図 3)。これにより、*KDM5D* が欠失することにより、腫瘍細胞の悪性度が上がるように形質変化を起こすことが示された。

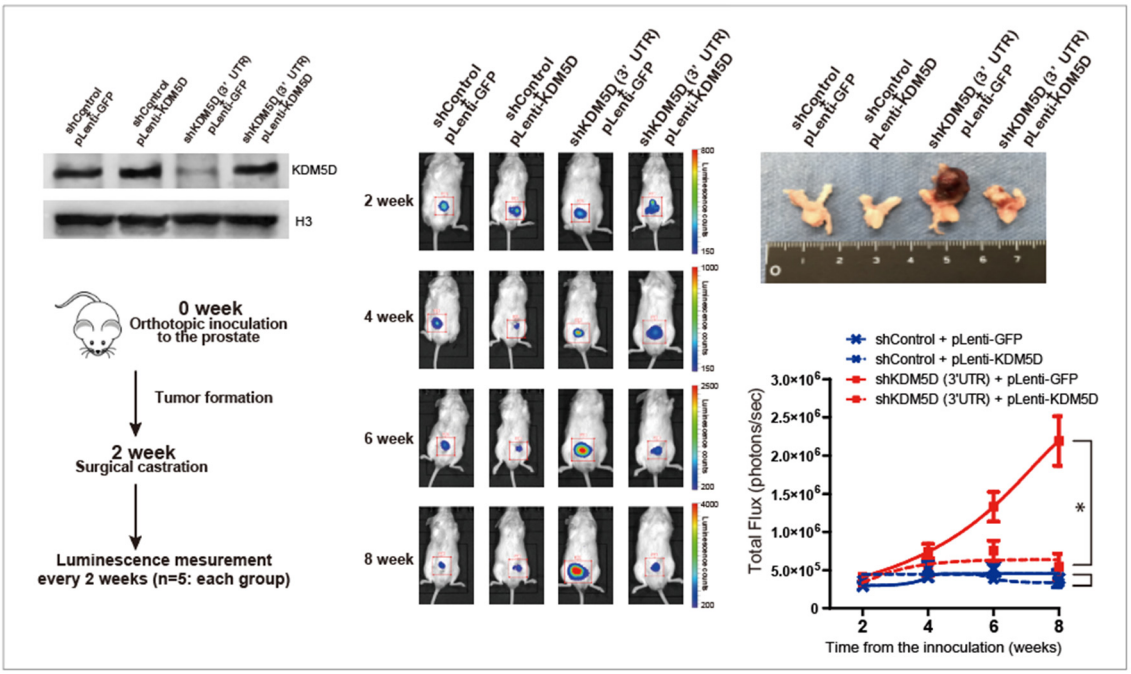


図 3.　Orthotopic Xenograft をもちいた *KDM5D* 欠失による腫瘍細胞悪性化の証明

3. ChIP-seq、RNAseq 解析による *KDM5D* 欠失の細胞形質変化の解明

KDM5D 欠失がいかにしてアグレッシブな形質を獲得するかを、クロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-Seq）、RNA シーケンスを用いて包括的に解析をおこなった。LNCaP 細胞を用いた KDM5D ChIP-seq では、KDM5D が主にプロモーター領域のヒストンに結合すること、また KDM5D がターゲットとするその領域の H3K4me3、2 を脱メチル化することを明らかにした。LNCaP sh-KDM5D 細胞でもヒストンメチル基の ChIPseq をおこない、KDM5D 欠失により、その領域の H3K4me3 シグナル上昇がみられプロモーター領域のユーロクロマチン化により転写因子群が接近できるようになること、またモチーフ解析ではその転写因子群は細胞周期調節因子が主であることを明らかにした（図 4）。

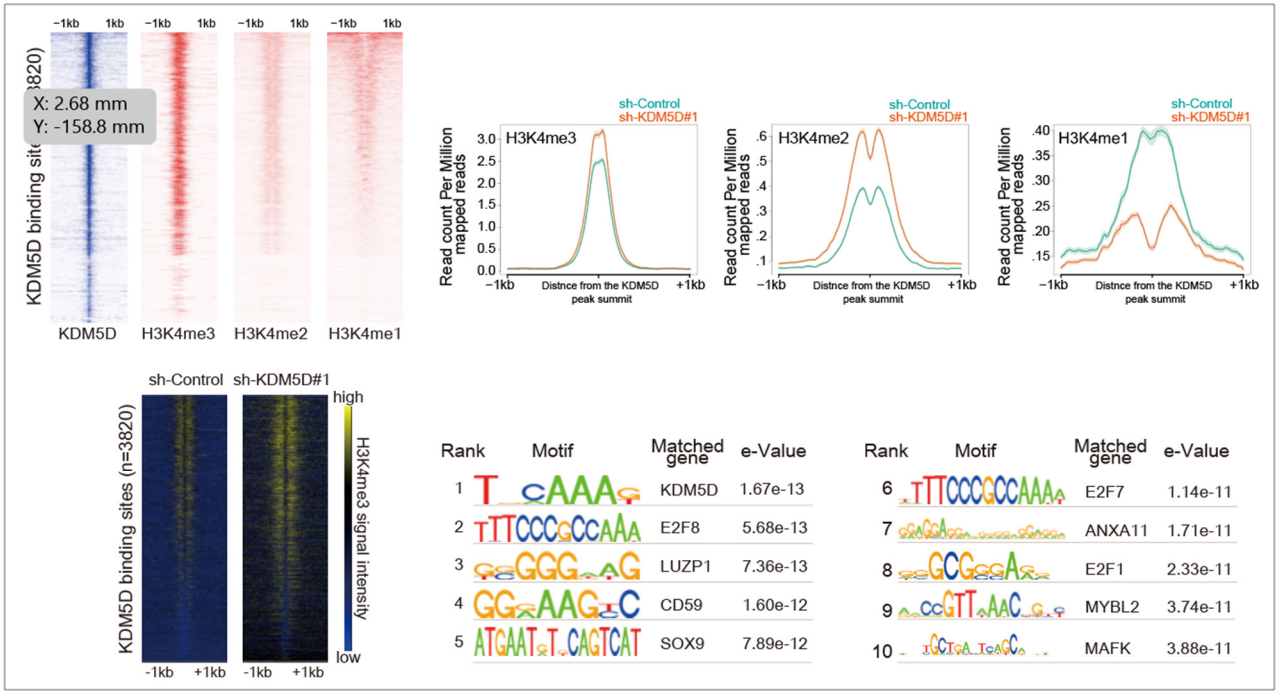


図 4. KDM5D、ヒストンメチル基の ChIP-seq 解析による細胞周期調節因子への影響

KDM5D と正に相関、負に相関する遺伝子群を解析した RNA-seq では、KDM5D 発現レベルと負に相関する遺伝子群のパスウェイとして、やはり細胞周期系遺伝子群がもっとも強力に上昇し、特に全トランスクリプトームレベルでは DNA 複製と分裂シグナルの亢進が確認され、ChIP-seq データを裏付ける結果であった（図 5）。

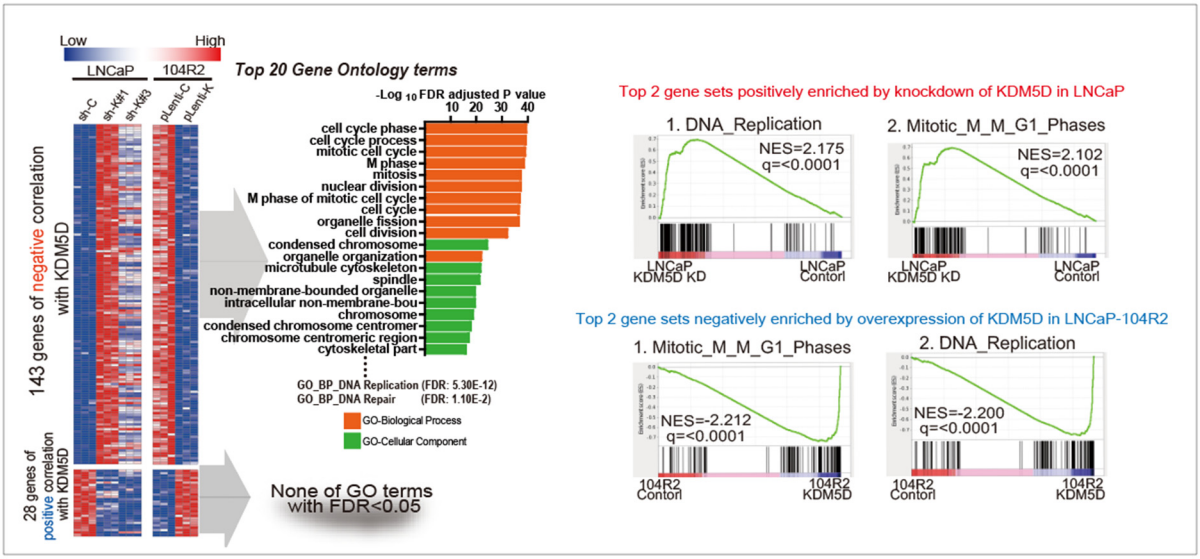


図 5. RNA トランスクリプトーム解析による、*KDM5D* 欠失の DNA 複製シグナル増強

4. ChIP-seq、RNAseq 解析による *KDM5D* 欠失の細胞形質変化の解明

悪性度の高い前立腺がんの一つのサブタイプの特徴であると考えられる *KDM5D* 欠失細胞において、DNA 複製ストレスが発生していると考えられることより、その修復時間の猶予を担保するために ATR シグナルへの依存がおこり、genomic instability を伴いながら生存増殖していることを明らかにした。さらに ATR 活性化により G2／M arrest に誘導されるべきところに、*KDM5D* が欠失することにより Epigenetic に制御されていた CDK1 をはじめとする G2／M 細胞周期調節因子が upregulate されることにより、arrest を回避されることを示した（図 6）。

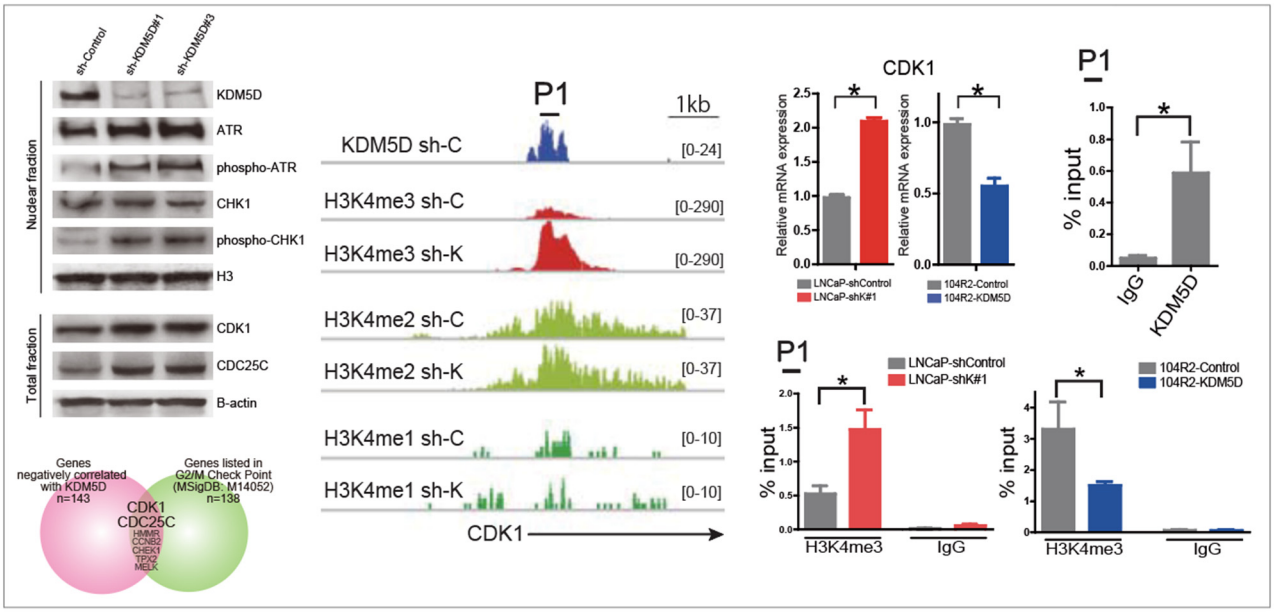


図 6. *KDM5D* 欠失による DNA 複製ストレス応答での ATR 活性化と、CDK1 の upregulation

このことから、ATR 阻害薬により、DNA 複製ストレスへの耐性を打ち消すことで腫瘍合成致死を誘導できる可能性を考え、*in vitro* にてその効果を検討したところ、sh-KDM5D 細胞にてより ATR 阻害薬の効果が高いことがわかった。このため、*in vivo* にて、*KDM5D* 欠失のある細胞、ない細胞をそれぞれ xenograft マウスモデルにて確認したところ、KDM5D-intact の細胞では単剤での効果は限定的であったが、*KDM5D* の欠失している細胞に特異的な腫瘍増殖の抑制効果が認められていた（図 7）。これらの結果は、*KDM5D* 欠失が ATR 阻害薬の治療効果予測のバイオマーカーとして有用である可能性を示唆していると考えらえた。

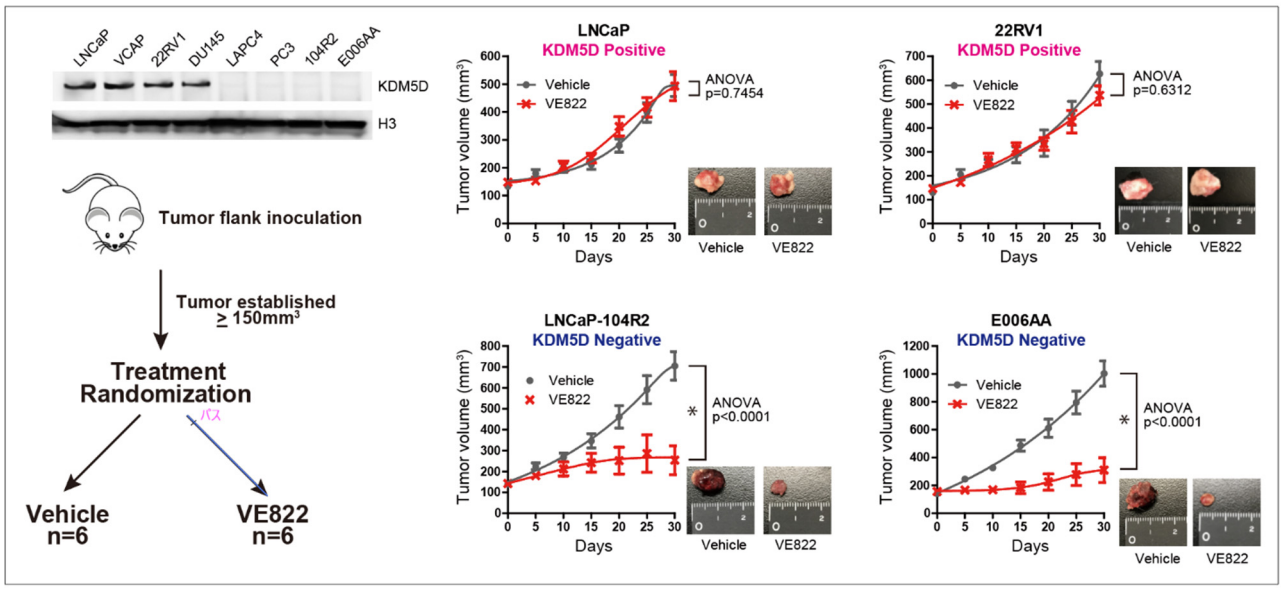


図 7. *KDM5D* 欠失細胞に特異的な ATR 阻害薬の腫瘍抑制効果

考　察

本研究の最大のハイライトは、このDNA複製ストレスを利用したATR阻害薬による腫瘍合成致死が、KDM5Dの発現依存性に見られることを明らかにした点である。つまり、*KDM5D*欠失がATR阻害薬の治療効果予測因子のバイオマーカーとして有用である可能性が高いと考えられる。現在、本研究助成の成果をさらに発展させるために、本論文中に公表しているFISHでの欠失検出のほかに、Digital Droplet PCRでの検出にも取り掛かっている段階である。

*KDM5D*はY染色体上にコードされる遺伝子である。実は、世界的に主要なデータセット解析でも、Y染色体上の遺伝子のコピーナンバー解析は暗に省かれていることは知られていない。本研究は、世界で初めて、Y染色体上の遺伝子の欠失が、がんの増殖能獲得に有利に働くことを証明した研究成果であり、その学術的なインパクトは大きいと信じている。また近年、前立腺がんのみでなく、がん罹患性差の大きい膀胱がん、すい臓がん、肺がん、腎がん等においても注目を集めており、Y染色体のがん研究における位置づけを再考させる可能性を秘めている。本分野での研究をさらに発展させるため、帰国後さらにトランスジェニックマウスを用いた研究に注力しており、現在まで世界で報告のないYchr-KDM5Dflox / ¯ マウスの作製にも取り組んでいる。これにより、今後コンディショナルノックアウトマウスでのATR阻害薬の治療効果の検討、また全身性CAG-Cre発現モデルでの形質の確認などの、斬新な*in vivo*実験を計画している。

最後に、現在国内で行われているゲノム医療の普及促進の一つの課題として、解析後のアウトプットとなる臨床治験を含む治療選択肢の拡充が挙げられる。がん治療、研究において特定のKey Moleculeによる多彩な形質変化を明らかにすることは、患者様の発現差異による層別化を可能にする。本研究成果は、*KDM5D*欠失の検出が、ATR阻害薬の治療効果予測のバイオマーカーである可能性を示したものであり、これをもとにPrecision Medicineへの応用を目指し、ゲノム医療で加療選択され得る治療オプションの一つとなる可能性をもつ、大変意義深い研究成果であると信じている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院医学系研究科附属神経疾患・腫瘍分子医学研究センターの島村徹平教授と筑波大学プレシジョンメディスンセンターの佐藤孝明センター長である。

文　献

1）　Komura K, Jeong SH, Hinohara K, Qu F, Wang X, Hiraki M, Azuma H, Lee GS, Kantoff PW, Sweeney CJ. Resistance to docetaxel in prostate cancer is associated with androgen receptor activation and loss of KDM5D expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 May 31;113(22):6259-64. PMID: 27185910