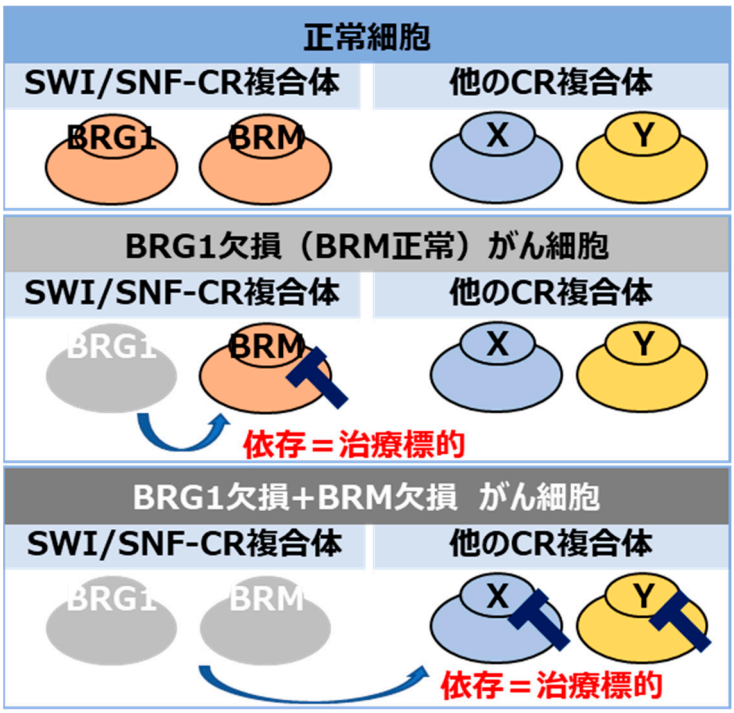
25　SWI/SNF複合体欠損がんにおける合成致死治療法の開発	荻原　秀明

【目的】SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体は、BRG1 を含む複合体と BRM 含む複合体から成るクロマチンリモデリング複合体ファミリーの一つである。BRG1 と BRM の両方が欠損したがん（SWI/SNF 欠損がん）が、非小細胞肺がん（10%）、肺大細胞がん（31%）、肺多形がん（23%）、小細胞卵巣がん・胸部肉腫（100%）で存在する。SWI/SNF 欠損がんはいずれのがん種においても未分化がんであり悪性度が高く予後の悪いがんである。とくに難治がんである肺腺がんは毎年 50 万人以上の死因となる。そして肺腺がんの 10%（5 万人以上）で BRG1 と BRM が両方欠損している。そこで本研究では、SWI/SNF 欠損がんにおける有望な治療標的を同定することで、SWI/SNF 欠損がんを対象とした合成致死治療法の開発を目指す。

【方法および結果】SWI/SNF 欠損がんが依存するクロマチンリモデリング複合体を探索するために、ヒト細胞で 20 種類ほど存在するクロマチンリモデリング複合体の ATP 加水分解酵素因子（複合体の機能に必須因子）を siRNA でノックダウンしたときに、SWI/SNF 欠損型細胞株で選択的に致死性を示す複合体因子を探索した。その結果、X 複合体と Y 複合体を同定した。X あるいは Y を抑制したとき、正常型細胞株（WT: $BRG1^{+}/BRM^{+}$）にはほとんど影響が認められなかったが、SWI/SNF 欠損型（$BRG1^{-}/BRM^{-}$）細胞株群で特異的に生存率が顕著に低下した。しかし、BRG1 単独欠損細胞株（$BRG1^{-}/BRM^{+}$）では、X あるいは Y を抑制しても、生存率の低下は部分的にしか認められなかった。さらに、SWI/SNF 欠損型（$BRG1^{-}/BRM^{-}$）細胞において、X あるいは Y を抑制することで細胞が死ぬ現象が、BRG1 と BRM の両方が欠損していることに特異的な現象であるかを検討するために、SWI/SNF 複合体欠損型細胞株（$BRG1^{-}/BRM^{-}$）SBC-5 における *BRG1* の cDNA を導入した細胞株（+BRG1）を樹立した。SWI/SNF 複合体欠損型細胞株（$BRG1^{-}/BRM^{-}$）SBC-5 において、X あるいは Y を抑制すると致死性を示したが、BRG1 を強制発現させると、その致死性は救済された。これらの結果から、BRG1 と BRM の両方が欠損した細胞は、細胞生存のために X あるいは Y に依存していることが考えられた。このように本研究では SWI/SNF 欠損がんに有望な治療標的としてクロマチンリモデリング複合体因子 X および Y を同定した。

本研究の概念



25. SWI/SNF 複合体欠損がんにおける合成致死治療法の開発

荻原　秀明

国立がん研究センター 研究所 がん治療学研究分野

Key words：がんゲノム医療，肺がん，若年性がん，クロマチン制御異常，合成致死性

緒　言

がんの遺伝子変異に基づいた分子標的治療法は、がん遺伝子の活性化を起因とするがんに対して、その活性化した遺伝子産物（タンパク質）を標的とする。一方で、がん抑制遺伝子などの機能喪失異常を起因とするがんでは機能喪失ゆえにそれを単純には阻害できない。このようながんを治療するには機能喪失した遺伝子との合成致死性因子を発見し、それを創薬標的とする必要がある。

“合成致死性”とは 1 つの遺伝子だけが機能阻害されても細胞の生存に影響はないが 2 つの遺伝子の機能が両方阻害されたときに細胞が致死となる現象である。ある遺伝子 A が機能喪失変異したがん患者がいた場合、この患者に遺伝子 A との合成致死因子 B の阻害薬を用いて治療したとする。がん細胞では遺伝子 A の機能喪失に加えて B も阻害することで合成致死となる。一方で、がん細胞以外の全身の正常細胞では、A は正常なため B だけを阻害しても正常細胞の生存への影響は少ないと考えられる。このように合成致死性を利用したがん治療法（合成致死治療法）は、がん特異性が高く、副作用の少ない治療が期待できる。

これまでに研究代表者らはクロマチン制御遺伝子が様々ながんで高頻度に機能喪失性の遺伝子変異があることに着目してきた。それらの中で、クロマチン制御遺伝子 *BRG1*、*CBP*、*ARID1A* は、がんの中でも難治がんである肺腺がん、小細胞肺がん、卵巣明細胞がんで高頻度に機能喪失性変異がある。そのような状況の中で研究代表者らは、これらの遺伝子との合成致死標的を探索し、*BRM*、*p300*、*GCLC* をそれぞれ同定し、合成致死性のメカニズムを解明し、クロマチン制御遺伝子欠損がんにおける合成致死治療法を提唱してきた［1〜3］。

SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体は、BRG1 を含む複合体と BRM 含む複合体が相互排他的に別々に存在する。今までに研究代表者らは BRG1 欠損がんで BRM を抑制するとがん細胞が合成致死となることを明らかにしてきた［3］。この結果は、BRG1 欠損がん細胞は BRM（を含む複合体）がないと生きられないということを意味する。ところが BRG1 と BRM の両方が欠損したがんも存在することが分かった。我々のデータでは非小細胞肺がん症例 103 例において BRG1 単独欠損患者は 10%だったが BRG1・BRM 両方欠損患者が 6%も存在した。さらには他のグループからも同様の報告が追随して報告された。BRG1 および BRM が両方欠損した症例は非小細胞肺がん（10%）、肺大細胞がん（31%）、肺多形がん（23%）、小細胞卵巣がん・胸部肉腫（100%）でも存在した［4〜7］。このように BRG1 と BRM の両方が欠損したがん（SWI/SNF 欠損がん）が存在しうる。

SWI/SNF 欠損がんはいずれのがん種においても未分化がんであり悪性度が高く予後の悪いがんである。とくに難治がんである肺腺がんは毎年 50 万人以上の死因となる。そして肺腺がんの 10%（5 万人以上）で BRG1 と BRM が両方欠損している。そこで本研究では、SWI/SNF 欠損がんにおける有望な治療標的を同定することで、SWI/SNF 欠損がんを対象とした合成致死治療法の開発を目指す。まず SWI/SNF 欠損がんにおける合成致死標的を同定する。そして合成致死性のメカニズムを解明することで創薬開発および臨床応用の基盤となる科学的根拠を明らかにする。最終的には、その成果を製薬会社へ橋渡しすることで、共同研究として SWI/SNF 欠損がんに有望な標的に対する阻害薬の創薬開発を目指す。本研究の成果は、一般がんである肺がんにおける治療法を確立させた上で、希少がんである卵巣小細胞がんや胸部肉腫等の治療法の確立へと発展させることが期待できる。

方法および結果

1. SWI/SNF 欠損がんの依存性クロマチンリモデリング複合体の探索

SWI/SNF 欠損がんが依存するクロマチンリモデリング複合体を探索するために、ヒト細胞で 20 種類ほど存在するクロマチンリモデリング複合体の ATP 加水分解酵素因子（複合体の機能に必須因子）を siRNA でノックダウンしたときに、SWI/SNF 欠損型細胞株で選択的に致死性を示す複合体因子の siRNA スクリーニングを行った。その結果、各複合体を抑制した時に SWI/SNF 複合体正常型細胞株（WT）の生存率には影響がなく、SWI/SNF 複合体欠損型細胞株（SWI/SNF^{-}）において生存率が顕著に低下する因子として、X（複合体）と Y（複合体）を同定した（図 1）。

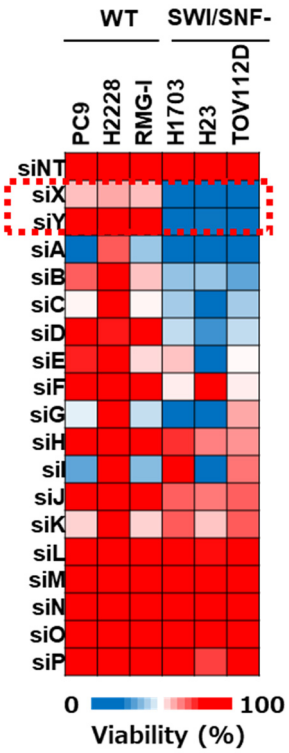


図1. SWI/SNF欠損がんの依存性クロマチンリモデリング複合体の探索
SWI/SNF 複合体正常型細胞株（WT）および SWI/SNF 複合体欠損型細胞株（SWI/SNF^{-}）において、クロマチンリモデリング複合体の ATPase サブユニット遺伝子をノックダウンした後、6 日後の生存率をヒートマップで示した。

2. 細胞株パネルにおける X と Y の抑制による合成致死性の検証

次に、上記のスクリーニングの結果を検証するために細胞株パネルにおいて、X あるいは Y を siRNA でノックダウンしたときの生存率への影響を調べた。X あるいは Y をノックダウンしたとき、正常型細胞株（WT : BRG1^{+}/BRM^{+}）にはほとんど影響が認められなかったが、SWI/SNF 欠損型（BRG1^{-}/BRM^{-}）細胞株群で特異的に細胞増殖が顕著に抑制された（図 2a）。また、X あるいは Y を siRNA でノックダウンすると、SWI/SNF 欠損型（BRG1^{-}/BRM^{-}）細胞で選択的にコロニー形成が抑制された（図 2b）。しかし、BRG1 単独欠損細胞株（BRG1^{-}/BRM^{+}）では、X あるいは Y を siRNA でノックダウンしても、細胞増殖の抑制は部分的であった（図 2a）。これらの結果から、BRG1 と BRM が両方を欠損した細胞株において、X あるいは Y を抑制すると選択的に致死性を示すことが考えられた。

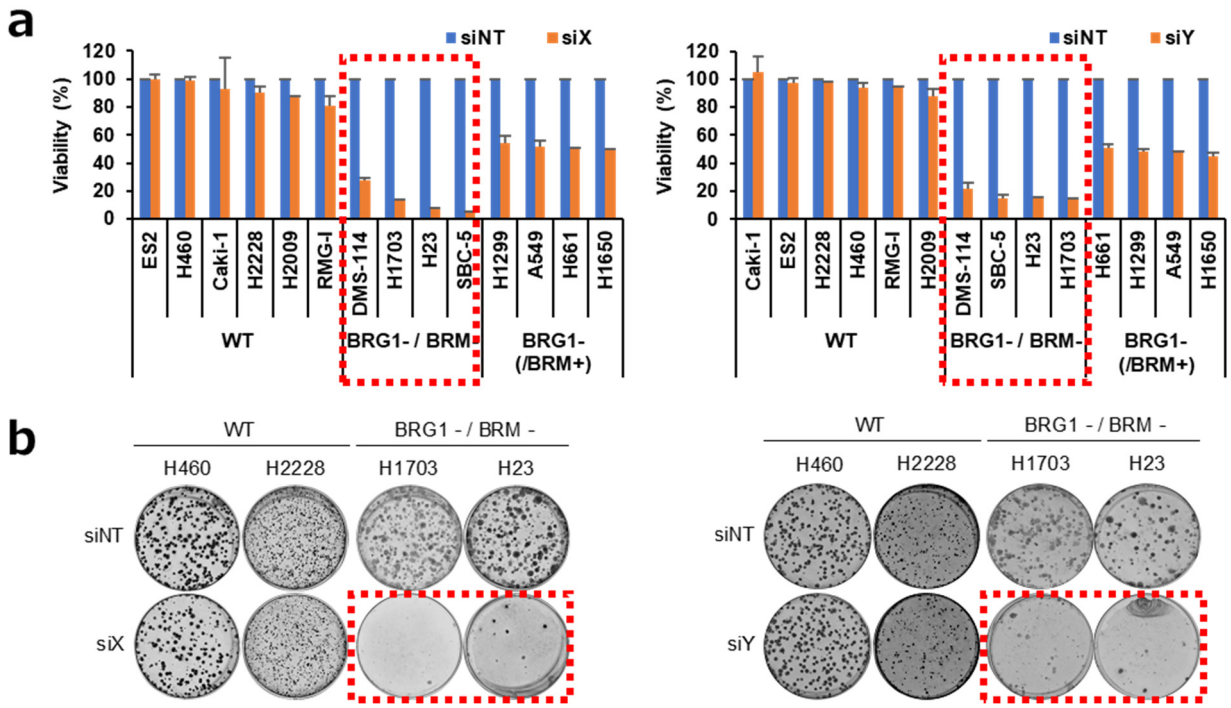


図2. 細胞株パネルにおけるXとYの抑制による合成致死性の検証

a) SWI/SNF 複合体正常型細胞株（WT）および SWI/SNF 複合体欠損型細胞株（BRG1^{-}/BRM^{-}）、BRG1 欠損細胞株（BRG1^{-}/BRM^{+}）において、クロマチンリモデリング複合体因子 X あるいは Y をノックダウンした後、6 日後の生存率を示した。

b) SWI/SNF 複合体正常型細胞株（WT）および SWI/SNF 複合体欠損型細胞株（BRG1^{-}/BRM^{-}）、BRG1 欠損細胞株（BRG1^{-}・BRM^{+}）において、クロマチンリモデリング複合体因子 X あるいは Y をノックダウンした後、14 日後のコロニー形成を示した。

3. X/Y の抑制による合成致死性は BRG1 と BRM の両方の欠損に特異的である

SWI/SNF 欠損型（BRG1^{-}/BRM^{-}）細胞において、X あるいは Y を抑制することで細胞が死ぬ現象が、BRG1 と BRM の両方が欠損していることに特異的な現象であるかを検討した。まず、SWI/SNF 欠損型細胞株（BRG1^{-}/BRM^{-}）SBC-5 に BRG1 の cDNA をレンチウイルスで導入し、薬剤選択された細胞株をクローン化した細胞株を樹立した。BRG1 の導入によるタンパク質の発現を確認するためにウエスタンブロッティング法によって、SWI/SNF 複合体欠損型細胞株（BRG1^{-}/BRM^{-}）SBC-5 における *BRG1* の cDNA を導入した細胞株（＋BRG1）と未導入細胞株（－BRG1）の BRG1 の発現を確認した。その結果、SWI/SNF 複合体欠損型細胞株（BRG1^{-}/BRM^{-}）SBC-5 における BRG1 導入細胞株を樹立に成功した（図 3a）。そこで、SWI/SNF 複合体欠損型細胞株（BRG1^{-}/BRM^{-}）SBC-5 における BRG1 の cDNA を導入した細胞株（＋BRG1）と未導入細胞株（－BRG1）において、X あるいは Y を抑制した時の生存率への影響を検討した。SWI/SNF 欠損型（BRG1^{-}/BRM^{-}）細胞は、X あるいは Y の siRNA によるノックダウンによって、致死性を示したが、その致死性は BRG1 を導入した細胞株で救済された（図 3）。これらの結果から、BRG1 と BRM の両方が欠損した細胞で、X あるいは Y を抑制すると致死となることが考えられた。

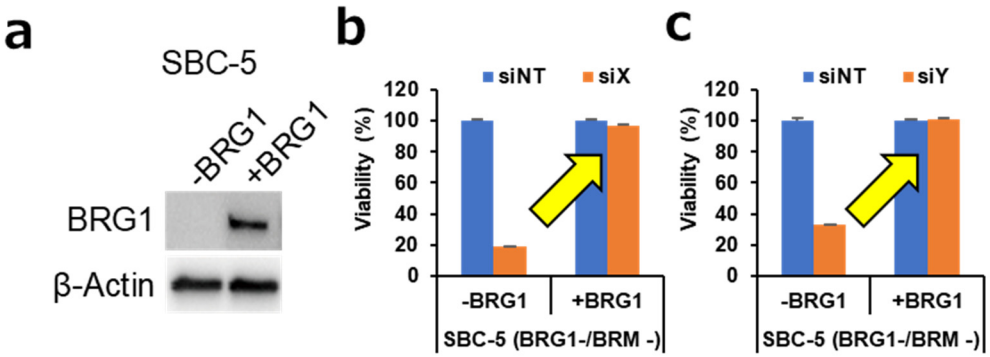


図3. X/Yの抑制による合成致死性はBRG1とBRMの両方の欠損に特異的である

a) SWI/SNF 複合体欠損型細胞株（BRG1⁻/BRM⁻）SBC-5 における BRG1 の cDNA を導入した細胞株（＋BRG1）と未導入細胞株（－BRG1）のウエスタンブロッティング法による BRG1 の発現を確認した。ローディングコントロールとしてβ-Actin を検出した。

b、c) SWI/SNF 複合体欠損型細胞株（BRG1⁻/BRM⁻）SBC-5 の BRG1 の cDNA を導入した細胞株（＋BRG1）と未導入細胞株（－BRG1）において、クロマチンリモデリング複合体因子 X（a）あるいは Y（b）をノックダウンした後、6 日後の生存率を示した。

考　察

肺がんは 5 年生存率が 40%ほどの難治がんである。肺がん患者の中で分子標的治療法が適用されるのは *EGFR* や *ALK* 遺伝子変異患者に限定される。これらの遺伝子変異のない患者と相互排他的に SWI/SNF 欠損がん患者が存在する。つまり、SWI/SNF 欠損がん患者は治療法が確立されていない。本研究では、SWI/SNF 欠損がんに有望な治療標的としてクロマチンリモデリング複合体因子である X および Y を同定した。今後の研究を発展させて、X 阻害薬や Y 阻害薬を創薬開発することで、これまでに治療法がなかった SWI/SNF 欠損型の難治性がん患者に対する治療の可能性が期待できる。

本研究で同定した治療標的 X および Y は、クロマチンリモデリング複合体の機能に必須な ATP 分解酵素活性を持つ。現在までにクロマチンリモデリング複合体の機能を阻害する薬剤は臨床応用されていない。しかし、BRG1 や BRM は、ATP 分解酵素であり、BRG1/BRM 阻害薬の既存薬も存在する。X および Y の阻害薬としての標的ドメインは ATPase ドメインであり、ATP との競合的な低分子阻害薬の開発が想定される。クロマチンリモデリング複合体は、複数の因子から構成されるため、*in vitro* アッセイ系の構築には複数のサブユニットタンパク質の中から X あるいは Y を中心としたコアとなる数個のタンパク質を精製し、*in vitro* で複合体を構成し、ATPase 阻害活性を評価するハイスループットスクリーニング系を構築する。また、X 複合体と Y 複合体の構造解析の報告があることから、*in silico* 解析により、X と Y の基質である ATP ポケットに適合するような候補化合物の構造展開解析が可能である。したがって、X 阻害薬や Y 阻害薬の創薬開発も実現可能であると考えられる。

実際の臨床応用を想定したとき、患者数の多い一般がんの肺腺がんの中で SWI/SNF 欠損がんに有望である治療標的 X の阻害薬を製薬企業との共同で創薬開発する道筋になる。第一目標はクロマチンリモデリング因子 X 阻害薬を肺腺がんの治療薬として臨床応用を目指し、肺腺がんでの承認を目指す。それを基盤に、希少がんでかつ若年性がんである胸部肉腫、卵巣小細胞がん等への適応拡大を目指すことで、治療法のない患者のアンメットメディカルニーズへの貢献が期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究は、国立がん研究センター研究所がん治療学研究分野で行われた研究である。研究に協力して頂いた研究員の佐々木麻里子博士、特任研究員の小松崎理絵氏に御礼申し上げます。

文　献

1) Ogiwara H, Takahashi K, Sasaki M, Kuroda T, Yoshida H, Watanabe R, et al. Targeting the Vulnerability of Glutathione Metabolism in ARID1A-Deficient Cancers. Cancer Cell. 2019;35(2):177-90 e8. Epub 2019/01/29. doi: 10.1016/j.ccell.2018.12.009. PubMed PMID: 30686770.

2) Ogiwara H, Sasaki M, Mitachi T, Oike T, Higuchi S, Tominaga Y, et al. Targeting p300 Addiction in CBP-Deficient Cancers Causes Synthetic Lethality by Apoptotic Cell Death due to Abrogation of MYC Expression. Cancer Discov. 2016;6(4):430-45. Epub 2015/11/26. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0754. PubMed PMID: 26603525.

3) Oike T, Ogiwara H, Tominaga Y, Ito K, Ando O, Tsuta K, et al. A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. Cancer Res. 2013;73(17):5508-18. Epub 2013/07/23. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4593. PubMed PMID: 23872584.

4) Marquez SB, Thompson KW, Lu L, Reisman D. Beyond Mutations: Additional Mechanisms and Implications of SWI/SNF Complex Inactivation. Front Oncol. 2014;4:372. Epub 2014/01/01. doi: 10.3389/fonc.2014.00372. PubMed PMID: 25774356; PubMed Central PMCID: PMCPMC4343012.

5) Yoshimoto T, Matsubara D, Nakano T, Tamura T, Endo S, Sugiyama Y, et al. Frequent loss of the expression of multiple subunits of the SWI/SNF complex in large cell carcinoma and pleomorphic carcinoma of the lung. Pathol Int. 2015;65(11):595-602. Epub 2015/09/09. doi: 10.1111/pin.12350. PubMed PMID: 26345631.

6) Karnezis AN, Hoang LN, Coatham M, Ravn S, Almadani N, Tessier-Cloutier B, et al. Loss of switch/sucrose non-fermenting complex protein expression is associated with dedifferentiation in endometrial carcinomas. Mod Pathol. 2016;29(3):302-14. Epub 2016/01/09. doi: 10.1038/modpathol.2015.155. PubMed PMID: 26743474; PubMed Central PMCID: PMCPMC4980656.

7) Yoshida A, Kobayashi E, Kubo T, Kodaira M, Motoi T, Motoi N, et al. Clinicopathological and molecular characterization of SMARCA4-deficient thoracic sarcomas with comparison to potentially related entities. Mod Pathol. 2017;30(6):797-809. Epub 2017/03/04. doi: 10.1038/modpathol.2017.11. PubMed PMID: 28256572.