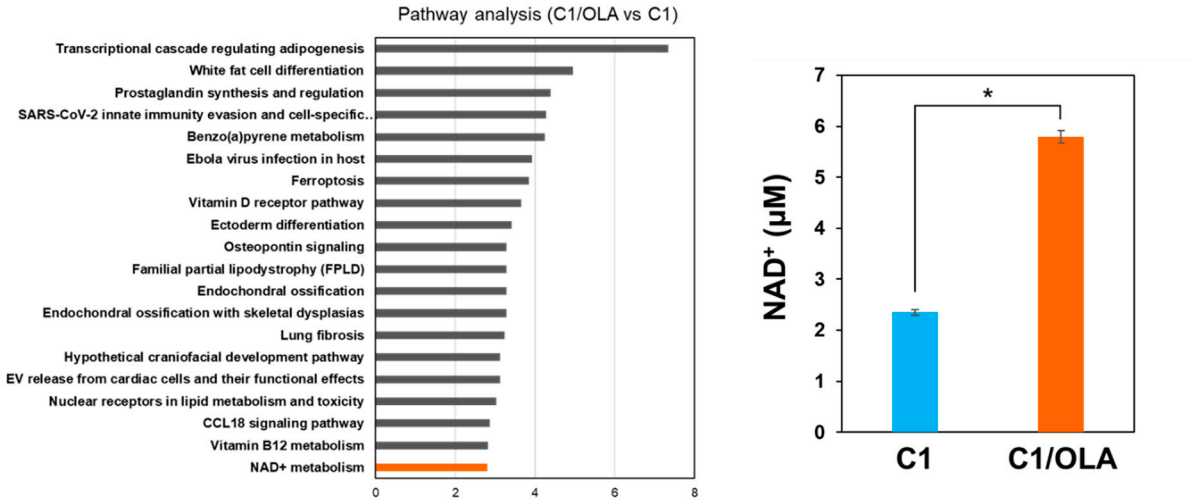
120　Olaparibの新規耐性因子の同定と耐性克服治療法の開発	佐々木　由香

【目的】臨床承認薬 olaparib は、ポリ（ADP-リボース）合成酵素（PARP）を標的とした合成致死性抗がん薬として開発され、DNA 修復経路の一つである相同性組換え修復に関わる *BRCA1* または *BRCA2* に変異を有する乳がん、卵巣がん、膵がん等に対して特異的に細胞死を誘導することから、副作用の少ない抗がん薬として期待されている。しかしながら、olaparib の投与による olaparib 耐性の獲得は、現在治療上の大きな問題となっており、早期に olaparib 耐性獲得機構を明らかにし、耐性解消法を確立する必要がある。そこで本研究では、PARP 阻害薬耐性に寄与する新規因子を同定し、その耐性機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】これまでに、膵がん細胞株 MIA PaCa-2 において、CRISPR/Cas9 システムを用いて BRCA1 ノックアウト（KO）細胞株（C1 細胞）を樹立し、C1 細胞株における olaparib の継続的な処理により、olaparib 耐性クローンとして C1/OLA 細胞株を単離した。本研究では、olaparib 処理した C1/OLA 細胞と親株である C1 細胞との比較により、RNA-seq 解析により網羅的な遺伝子発現を解析し、2 倍以上発現上昇が認められた遺伝子について pathway 解析を実施し、olaparib 耐性に寄与する細胞内経路を探索した。さらに、qRT-PCR による mRNA 発現レベルの解析、細胞内 NAD^+量の測定などにより olaparib 耐性機序の解析を行った。

【結果】Olaparib 処理した C1/OLA 細胞と C1 細胞において RNA-seq 解析および pathway 解析を行った結果、C1/OLA 細胞において NAD^+代謝に関わる経路が活性化していることが明らかとなった。C1/OLA 細胞において、NAD^+の生合成に関わる nicotinamide phosphoribosyltransferase（NAMPT）および nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2（NMNAT2）の mRNA 発現は有意に上昇しており、さらに細胞内 NAD^+レベルの上昇が認められた。C1 細胞においてニコチンアミド添加により細胞内 NAD^+レベルの上昇を誘導した結果、ニコチンアミド存在下において、C1 細胞は PARP 阻害薬である olaparib と talazoparib に対する感受性を有意に低下させた。以上のことから、NAD^+生合成経路の活性化に伴う細胞内 NAD^+レベルの上昇が、PARP 阻害薬耐性を獲得する要因の一つになり得ることが示唆された。

NAD^+生合成経路の活性化は olaparib 耐性を誘導する



120. Olaparib の新規耐性因子の同定と耐性克服治療法の開発

佐々木　由香

大阪歯科大学 歯学部 薬理学講座

Key words：PARP 阻害薬，olaparib，抗がん剤耐性，ポリ ADP リボシル化，NAD^+

緒　言

Olaparib は、ポリ（ADP-リボース）合成酵素（PARP）を標的とした合成致死性抗がん剤として開発され、DNA 修復経路の一つである相同性組換え（HR）修復能を欠損したがん細胞に対して、特異的に細胞死を誘導する［1］。本抗がん薬は、HR 修復因子 *BRCA1* または *BRCA2* 変異陽性の卵巣がん、乳がん、膵がん、前立腺がん等の治療薬として臨床承認されており、近年、肺がんなど複数のがん種を対象とした臨床試験も実施されていることから、今後適応拡大が見込まれる。しかしながら、PARP 阻害薬投与後に耐性が誘導されることが治療上の問題として生じており、早期に耐性要因を同定するとともに、耐性を克服するための治療法の確立が必要とされている。これまでに、PARP 阻害薬耐性機構として、BRCA1/2 復帰変異の誘導や DNA 修復因子への変異による HR 修復能の回復、薬剤排出ポンプ MDR1 の過剰発現、PARP1 及びポリ（ADP-リボース）分解酵素（PARG）の発現低下、停止した複製フォークの安定化による DNA 修復の亢進などが olaparib 耐性の原因として報告されている［2〜5］。Olaparib の標的分子である PARP は、翻訳後修飾の一つであるポリ ADP-リボシル化反応を介して、DNA 修復の他に DNA 複製や転写制御、炎症応答など生体内の様々な生命現象を制御することが知られており［6〜8］、PARP 阻害薬による PAR 化反応の抑制は、DNA 修復のみならず様々な細胞内経路の制御を介して、耐性を獲得する可能性を示している。そこで本研究では、新規の olaparib 耐性因子を同定し、その耐性機序を明らかにすることを目的として研究を行った。

方　法

1. 次世代シーケンス解析による olaparib 耐性因子の網羅的解析

BRCA1 ノックアウト細胞株と olaparib 耐性細胞株を 10 μM olaparib 存在下にて 24 時間処理し、total RNA を抽出した。RNA-seq ライブラリーを作製後、NovaSeq600（Illumina）を使用して RNA-seq 解析を行った（DNA チップ研究所）。

2. CCK アッセイによる細胞生存率の測定

細胞生存アッセイは CCK Assay Kit（Cell Counting Kit-8, Dojindo）を用いて添付のプロトコールに従って行った。96-ウェルプレートで培養した細胞に、CCK-8 溶液を添加し 37℃でインキュベーション後、450 nm の吸光度（reference 600 nm）を測定することにより細胞の生存率を算出した。

3. qRT-PCR

Total RNA は各細胞より High Pure RNA isolation Kit（Roche）を用いて抽出した。RNA からの cDNA の合成は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Thermo Fisher Scientific）を用い、添付のマニュアルに従って行った。qRT-PCR は SYBR Green を用いて、StepOne Plus Real Time PCR System で解析した。標的遺伝子の mRNA レベルは、*GUSB* の mRNA レベルで normalize した。

4. 細胞内 NAD^+ レベルの測定

細胞内 NAD^+ レベルの測定は、NAD/NADH Assay Kit-WST（Dojindo）を用いて、添付のマニュアルに従って行った。NAD/NADH Extraction Buffer により cell lysate を調製後、総 NAD^+/NADH 量および NADH 量をそれぞれ測定し、総 NAD^+/NADH 量から NADH 量を差し引くことで、細胞内 NAD^+ 量を算出した。

結果および考察

1. PARP 阻害薬 olaparib の耐性因子の探索

これまでに、膵がん細胞株 MIA PaCa-2 において、CRISPR/Cas9 システムを用いて BRCA1 ノックアウト（KO）細胞株（C1 細胞）を樹立し、C1 細胞株における olaparib の継続的な処理により、olaparib 耐性クローンとして C1/OLA 細胞株を単離した。C1/OLA 細胞は、C1 細胞と比べて olaparib に対する IC_{50} 値が 17 倍以上上昇した細胞株である。本研究では、C1/OLA 細胞における olaparib 耐性因子を探索するために、C1 細胞との比較により RNA-seq 解析による網羅的な mRNA 発現変動を解析した。その結果、2 倍以上発現上昇が検出された遺伝子が 1,042 遺伝子、発現低下した遺伝子が 1,259 遺伝子同定された。C1/OLA 細胞において 2 倍以上発現上昇した遺伝子について、pathway 解析を行った結果、NAD^+ 代謝経路を含む複数の経路の活性化と関連することが示唆された（図 1）。RNA-seq 解析により上昇した上位 40 遺伝子に、NAD^+ 代謝経路に関わる *NMNAT2* および *NT5E* 遺伝子が含まれていたことから、本研究では NAD^+ 代謝経路と olaparib 耐性の関連性を解析することにした。

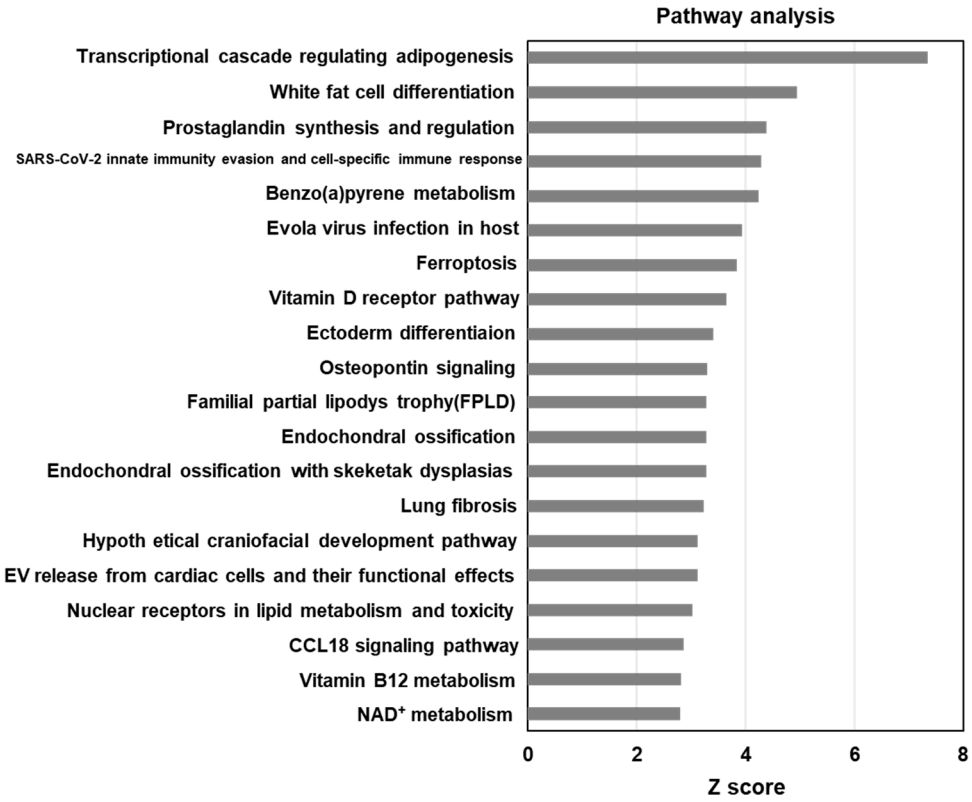


図 1. Olaparib 耐性機序同定のための遺伝子発現プロファイル
Olaparib 処理した C1/OLA 細胞は C1 細胞との比較により RNA-seq 解析を実施後、C1/OLA 細胞において 2 倍以上上昇した発現変動遺伝子について、pathway 解析を行った。Pathway 解析の結果、同定された上位 20 個の経路を示している。

2. C1/OLA 細胞における olaparib 耐性機序の解析

NAMPT および NMNAT2 は Salvage 経路を介した NAD^+ 合成に関わる主要な因子であり、NAMPT は salvage 経路の律速酵素として知られる。C1/OLA 細胞において、これらの遺伝子発現を qRT-PCR により解析した結果、C1 細胞と比べてどちらの遺伝子も有意に発現上昇が認められた（図 2a）。さらに、C1/OLA 細胞における細胞内 NAD^+ 量を測定した結果、C1 細胞と比較して 2.5 倍上昇することが明らかとなった（図 2b）。これらの結果は、C1/OLA 細胞において NAD^+ 生合成経路が活性化していることを示唆した。

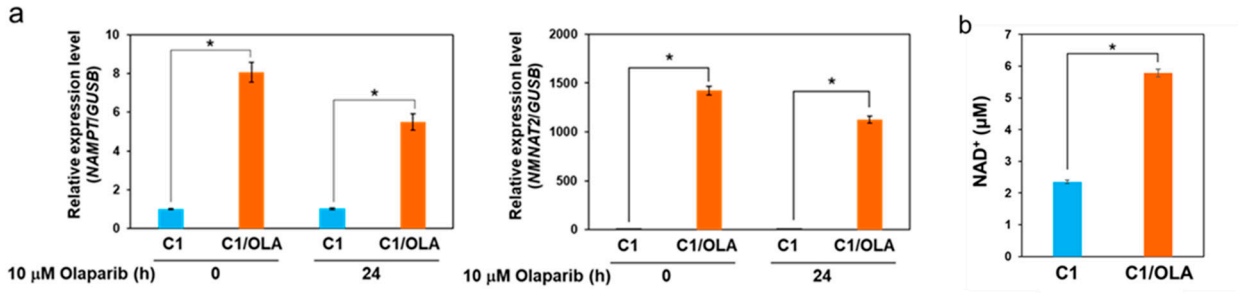


図 2. C1/OLA 細胞における NAD^+ 合成経路の活性化

a） 10 μM olaparib 処理（24 h）または未処理（0 h）条件下で、C1 および C1/OLA 細胞における *NAMPT* および *NMNAT2* の mRNA 発現量を qRT-PCR により解析した（n=5 independent experiments）。

b） C1 および C1/OLA 細胞における細胞内 NAD^+ 量の測定。NAD^+ 量は、C1 細胞と比較して、C1/OLA 細胞において 2.5 倍上昇した（n=3 independent experiments）。* $p < 0.01$（Student's *t*-test）。

次に、細胞内の NAD^+ レベルの上昇が C1/OLA 細胞における olaparib 耐性の要因であるのかどうかを明らかにするために、C1 細胞をニコチンアミドで処理することにより、細胞内 NAD^+ レベルの上昇を誘導した。C1 細胞において、20 または 30 mM のニコチンアミド添加は、細胞内 NAD^+ レベルをそれぞれ 2.3 および 2.9 倍上昇させた（図 3a）。C1 細胞におけるニコチンアミド処理が細胞内 NAD^+ レベルの上昇を誘導したことから、ニコチンアミド処理条件下にて、olaparib 感受性を測定した。その結果、ニコチンアミド濃度依存的に、C1 細胞の olaparib 感受性は低下し、olaparib に対する IC_{40} 値は、30 mM ニコチンアミド存在下で、未処理細胞と比べて、3.8 倍に上昇した（図 3b）。既に臨床承認されている別の PARP 阻害薬である talazoparib を用いて同様の解析を行った結果、30 mM ニコチンアミド存在下で、talazoparib に対する IC_{40} 値は 383 倍上昇することが明らかとなった。以上の結果より、C1/OLA 細胞において、NAD 代謝経路の活性化に伴う細胞内 NAD^+ レベルの上昇が PARP 阻害薬耐性を誘導する要因であることが示唆された。PARP 阻害薬は、PARP1 や PARP2 の触媒部位（NAD^+ 結合領域）に結合することで、ポリ ADP-リボシル化活性を阻害する。C1/OLA 細胞において、NAD^+ 合成経路の活性化により PARP の基質である NAD^+ レベルの上昇が誘導されたことにより、PARP の触媒部位において PARP 阻害薬の結合が競合的に阻害され、olaparib 耐性が引き起こされたと考えられる。

これまでに、NAMPT 発現の上昇は、大腸がんやメラノーマ等の腫瘍増殖に関わることが報告されている［9, 10］。TCGA データベースを解析した結果、膵がんを含む複数の腫瘍において *NAMPT* や *NMNAT2* の遺伝子増幅が認められ、*NAMPT* 高発現の膵がん患者における全生存期間の短縮を示した。これらの結果は、NAMPT 過剰発現により引き起こされる NAD^+ レベルの上昇が、膵がんの増悪に寄与することを示唆しており、PARP 阻害薬耐性が膵がん患者において引き起こされ得ると考えられた。今後、olaparib 耐性と膵がん患者における NAD^+ や NAMPT 発現レベルとの相関性の解析が必要であると考えている。

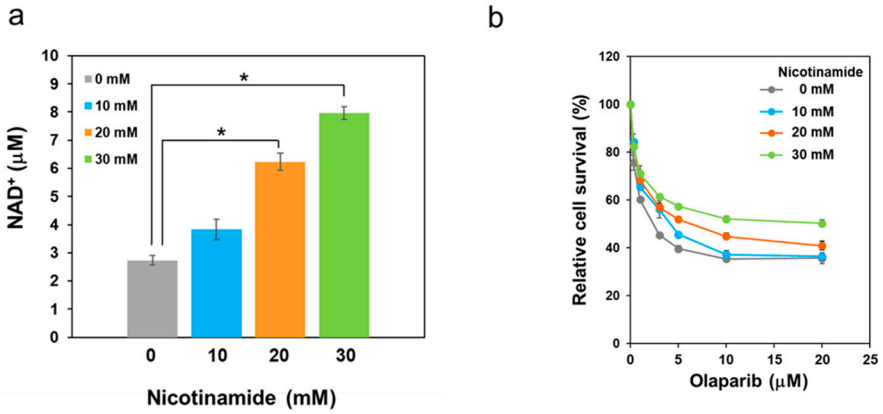


図 3. 細胞内 NAD^+ レベルの上昇に伴う C1 細胞の olaparib に対する感受性

a) C1 細胞におけるニコチンアミド処理後の細胞内 NAD^+ レベル。C1 細胞は 0～30 mM ニコチンアミド存在下で 24 h 培養後、細胞内 NAD^+ レベルを測定した（n＝3 independent experiments）。NAD^+ レベルはニコチンアミド濃度依存的に上昇した。*$p < 0.01$（ANOVA followed by Tukey's HSD post hoc analysis）。

b) ニコチンアミド存在下における olaparib 感受性。C1 細胞は 0～30 mM にニコチンアミド存在下で、0～20 μM olaparib と共に処理し、細胞の生存率を CCK アッセイにより解析した（n＝3 or 4 independent experiments）。

謝　辞

本研究の遂行においてご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文　献

1) Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. N Engl J Med. 2009;361(2):123-34. Epub 20090624. doi: 10.1056/NEJMoa0900212. PubMed PMID: 19553641.

2) Noordermeer SM, van Attikum H. PARP Inhibitor Resistance: A Tug-of-War in BRCA-Mutated Cells. Trends Cell Biol. 2019;29(10):820-34. Epub 20190814. doi: 10.1016/j.tcb.2019.07.008. PubMed PMID: 31421928.

3) Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, et al. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(44):17079-84. Epub 20081029. doi: 10.1073/pnas.0806092105. PubMed PMID: 18971340; PubMed Central PMCID: PMC2579381.

4) Li H, Liu ZY, Wu N, Chen YC, Cheng Q, Wang J. PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. Mol Cancer. 2020;19(1):107. Epub 20200620. doi: 10.1186/s12943-020-01227-0. PubMed PMID: 32563252; PubMed Central PMCID: PMC7305609.

5) Bunting SF, Callen E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, et al. 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. Cell. 2010;141(2):243-54. Epub 20100401. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.012. PubMed PMID: 20362325; PubMed Central PMCID: PMC2857570.

6) Bai P. Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. Mol Cell. 2015;58(6):947-58. doi: 10.1016/j.molcel.2015.01.034. PubMed PMID: 26091343.
7) Richard IA, Burgess JT, O'Byrne KJ, Bolderson E. Beyond PARP1: The Potential of Other Members of the Poly (ADP-Ribose) Polymerase Family in DNA Repair and Cancer Therapeutics. Front Cell Dev Biol. 2021;9:801200. Epub 20220114. doi: 10.3389/fcell.2021.801200. PubMed PMID: 35096828; PubMed Central PMCID: PMC8795897.
8) Ummarino S, Hausman C, Di Ruscio A. The PARP Way to Epigenetic Changes. Genes (Basel). 2021;12(3). Epub 20210320. doi: 10.3390/genes12030446. PubMed PMID: 33804735; PubMed Central PMCID: PMC8003872.
9) Lucena-Cacace A, Otero-Albiol D, Jimenez-Garcia MP, Munoz-Galvan S, Carnero A. NAMPT Is a Potent Oncogene in Colon Cancer Progression that Modulates Cancer Stem Cell Properties and Resistance to Therapy through Sirt1 and PARP. Clin Cancer Res. 2018;24(5):1202-15. Epub 20171204. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2575. PubMed PMID: 29203587.
10) Audrito V, Messana VG, Moiso E, Vitale N, Arruga F, Brandimarte L, et al. NAMPT Over-Expression Recapitulates the BRAF Inhibitor Resistant Phenotype Plasticity in Melanoma. Cancers (Basel). 2020;12(12). Epub 20201220. doi: 10.3390/cancers12123855. PubMed PMID: 33419372; PubMed Central PMCID: PMC7766175.