

氏 名	辻野 拓也
(ふりがな)	(つじの たくや)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第18号
学位審査年月日	令和 5 年 1 月 11 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	<i>RB1</i> loss overrides PARP inhibitor sensitivity driven by <i>RNASEH2B</i> loss in prostate cancer (前立腺がんにおいて、 <i>RB1</i> 欠失は <i>RNASEH2B</i> 欠失による PARP 阻害剤感受性を無効化する)
論文審査委員	(主) 教授 藤阪 保仁 教授 高井 真司 教授 大道 正英

学位論文内容の要旨

《目的》

PARP 阻害剤は、治療抵抗性の様々な固形がんにおいて有効性を示しており、転移性去勢抵抗性前立腺がんに対する新たな治療薬である。現時点で前立腺がんに対する PARP 阻害剤の有効性は、相同組み換え修復 (HRR) 遺伝子である *BRCA1/2* の変異陽性の患者のみに示されており、*BRCA* 遺伝子以外の変異を有する患者に対する有効性はいまだ明らかになっていない。近年、CRISPR/Cas9 ノックアウトスクリーニング (以下 CRISPR スクリーニング) を行うことにより様々な新規ターゲット遺伝子が同定され、それらの遺伝子バイオマーカーとしての可能性が報告されてきた。*RNASEH2B* は、PARP 阻害剤治療併用の CRISPR スクリーニングにより同定され、前立腺がんにおいて高頻度に欠失していることから遺伝子バイオマーカーとして期待されている。しかしながら、現在のがん標的治

療は、単一の遺伝子変異に基づくものが多く、複数の遺伝子変異が及ぼす治療に対する影響は明らかにされていない。本研究では、前立腺がん患者において高頻度に共欠失している *RNASEH2B*、*RB1*、*BRCA2* に着目し、それら複数の遺伝子変異が及ぼす PARP 阻害剤感受性変化を検証した。

《方法》

以下の方法により上述の検証を行った。

1. PARP 阻害剤治療における遺伝子バイオマーカーを同定するため、hTERT-RPE1、HELA、SUM 細胞株を用いた CRISPR スクリーニング解析を行った。同定された遺伝子に対して Gene Ontology (GO) 解析、前立腺がん患者データセットを用いた発現および変異についての解析を行った。
2. CRISPR/Cas9 を用いて *RNASEH2B* 欠失細胞株 (Single knockout ; SKO)、*RNASEH2B* /*RB1* 共欠失細胞株 (Double knockout ; DKO) を樹立した。*RNASEH2B* /*RB1* /*BRCA2* 欠失細胞モデルの検証には DKO に対して siRNA を用いて *BRCA2* をノックダウンした。それぞれの細胞株に対して PARP 阻害剤感受性の検証、および機能解析を行った。
3. DKO の薬剤耐性克服法検討のため PARP 阻害剤 (Olaparib) と ATR 阻害剤 (VE-822) を用いて、その単剤およびコンビネーション治療を行い、治療効果を検証した。*In vivo* の検証には DKO 皮下移植モデルマウス (5 週齢 ICR-SCID マウス) を作製し経口投与による治療を行った。

《結果》

1. 5 つの CRISPR スクリーニング解析の結果、複数のスクリーニングで共通する感受性に関与する遺伝子を同定した。GO 解析の結果、DNA 修復、特に HRR が感受性に関与する機能であった。また、それらの遺伝子の中で *RNASEH2B* が限局性および転移性前立腺がん両方において最も高頻度に欠失していた。

2. 前立腺がん細胞株 (LNCaP、C4-2B、22Rv1、PC-3、DU145) を用いて SKO を樹立し、それぞれの PARP 阻害剤感受性を検証した結果、LNCaP、C4-2B、22Rv1 において SKO はコントロール細胞株と比較し高感受性を示した。さらに、そのメカニズムは PARP trapping の増加によるものであることが示された。次に DKO の PARP 阻害剤感受性を検証した結果、DKO においては上述の高感受性は消失しており、*RB1* 欠失が薬剤耐性に関与していることが示された。メカニズム解明のため、DNA 損傷、HRR 機能を検証した。Olaparib 治療により SKO ではコントロール細胞株と比較して DNA 損傷マーカーである γ H2AX foci は有意に増加したが、DKO では有意差を認めなかった。さらに HRR 機能マーカーである RAD51 foci は DKO においてのみ有意に増加していた。これらの結果から *RB1* 欠失による HRR 機能亢進が薬剤耐性のメカニズムと考えられた。次に、*RB1* が DNA 修復遺伝子の転写因子 E2F1 の活性を制御しているという報告を基に、E2F1 活性が *RB1* 欠失における薬剤耐性に関わっている、という仮説を立て検証した。ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、DKO は SKO と比較して *RB1* 欠失に伴う E2F1 転写活性亢進が認められた。ChIP-PCR により、E2F1 は *BRCA1/2* と *RAD51* のプロモーター領域に強く結合していること、さらに E2F1 阻害により *BRCA1/2* と *RAD51* のタンパク発現低下を認めたことにより、E2F1 が *BRCA1/2* および *RAD51* の転写因子であることが確認された。次に、PARP 阻害剤治療下におけるこれらのタンパク発現を検証した。Olaparib 治療下の DKO における *BRCA1/2* 発現は SKO と比較し上昇していた。これらの結果から DKO の薬剤耐性のメカニズムは、E2F1 を介した *BRCA1/2* 発現上昇に伴う HRR 機能亢進であることが示された。次に、*RNASEH2B/RB1/BRCA2* 共欠失モデルにおける感受性検証を行った。*BRCA2* ノックダウンにより DKO は再度高感受性を示した。これらの結果により確かに *BRCA2* 発現上昇が PARP 阻害剤耐性のメカニズムの一つであることが示されると同時に、*BRCA2* 欠失腫瘍は *RB1* 機能に関わらず PARP 阻害剤に感受性であることが示唆された。
3. 最後に DKO における薬剤耐性克服法について検討した。PARP 阻害により ATR-

CHK1 経路が活性化する、この経路が E2F 依存性の転写を制御しているという報告を基に、PARP 阻害剤治療における DKO の生存は同経路に依存している、という仮説を立て検証した。DKO は SKO と比較し、Olaparib 治療による p-CHK1 発現上昇が認められ、同経路が活性化されていることが示された。次に同経路の ATR 阻害剤 (VE-822) の治療効果について検証した。DKO において VE-822 単剤では効果が乏しいが、Olaparib とのコンビネーション治療では相乗効果による増殖抑制効果を認めた。また、皮下移植モデルマウスにおいても同様の治療効果を認めた。さらに、そのメカニズムが VE-822 治療による HRR 機能低下であることが示された。

《結論》

本研究は、*RNASEH2B/RB1/BRCA2* を例として、複数の遺伝子変異が及ぼす PARP 阻害剤治療における感受性変化を検証すると共に、抵抗性メカニズムの解明、およびその克服法を提示した。本研究の結果は、現在の PARP 阻害剤の多様な臨床効果の一部を表しており、このことにより、PARP 阻害剤の治療効果を予測可能とするためには単一遺伝子ではなく包括的遺伝子検査の施行が推奨される。

論文審査結果の要旨

PARP 阻害剤は、*BRCA1/2* 変異陽性の転移性去勢抵抗性前立腺がん患者においては良好な治療効果が期待される。しかしながら、*BRCA* 遺伝子以外の変異を有する患者に対する PARP 阻害剤の有効性はいまだ明らかでなく、新たな遺伝子バイオマーカーの同定が課題となっている。近年、CRISPR スクリーニングにより PARP 阻害剤治療の遺伝子バイオマーカーの候補として *RNASEH2B* が同定された。申請者は本研究において、Chromosome13q14 に位置する同遺伝子が、近接する *RB1* および *BRCA2* と高頻度に共欠失していることに着目し、それらが及ぼす PARP 阻害剤感受性への影響を検証した。初めに、*RNASEH2B* が複数の CRISPR スクリーニングに共通して同定された遺伝子バイオマーカーであることを示し、臨床的重要性として、その欠失、および *RB1*、*BRCA2* との共欠失の頻度の高さを示した。次に、単欠失、共欠失モデルを作製し、PARP 阻害剤感受性の検証を行った。*RNASEH2B* 単欠失の高感受性が、*RB1* との共欠失では消失することから、*RB1* 欠失が PARP 阻害剤の薬剤耐性に関わること、およびそのメカニズムを解明した。さらに *RNASEH2B/RB1/BRCA2* 共欠失モデルにおいては感受性が回復し、*BRCA2* 欠失腫瘍が *RB1* 変異非依存性の高感受性を有することより、*BRCA2* 欠失の臨床的有用性を示した。最後に、薬剤耐性の克服法として ATR 阻害剤と PARP 阻害剤のコンビネーション治療の有効性を *in vitro*、*in vivo* 実験にて実証した。

本研究は、PARP 阻害剤薬剤耐性の新たなメカニズムを解明し、その克服法を提示すると同時に、単一の遺伝子変異のみを遺伝子バイオマーカーとして用いることへの警鐘と包括的遺伝子検査の必要性を提唱する、臨床的に重要な知見を示したものであると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 14 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Science Advances 8(7):eabl9794, 2022 Feb

Doi: 10.1126/sciadv.abl9794.