

# 研究報告書

## 「ヒト shRNA と微生物 cDNA を利用した機能的ゲノミクス・スクリーニングに基づく新しい代謝標的がん治療開発技術の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研究者: 加藤 洋人

### 1. 研究のねらい

この研究計画の狙いは、新しい機能ゲノミクス・スクリーニング法を開発し、それに基づいた新規代謝標的がん治療法の開発技術を樹立することである。

がん細胞が正常細胞とは異なる特徴的な代謝フェノタイプを呈することはよく知られており、これまでに、がん細胞やがん微小環境における特異的な代謝プロファイルが次々と明らかにされている。つまりがんとは代謝異常を包含する疾患であると理解されるようになった。「がん特異的な代謝活性の異常」が存在するという事は、がん細胞がその生存のために強く依存し、あるいは利用している特異的な代謝経路が存在することを示している。重要なことは、そのような「特定の代謝活性に対する依存」という状況に介入することで、新しいがん治療法の開発が可能だという点である。

そのような背景に基づいて、がん細胞でみられる特異的な代謝異常を標的としたがん治療薬の開発が多くの研究者によって試みられているが、そのために通常考えられるアプローチとしては、がん特異的な代謝変化を同定し、それに対する阻害剤を開発するという手法である。しかしながら、この研究計画ではそのような「がん特異的な代謝プロファイリング」といった解析からはいったん離れ、私がこれまでに蓄積していた保有技術（①shRNA ライブラリの構築技術＋②cDNA ライブラリの構築技術＋③次世代シーケンズ技術）を基盤として開発される「仮説なしの新しい網羅的ゲノミクス・スクリーニング法」によって、がん治療の標的となりうる代謝関連分子を一網打尽に同定することができる新しい方法論を確立する。

この研究計画で最もオリジナリティのある点は、微生物 cDNA ライブラリを用いたスクリーニングを行うことである。微生物 cDNA をヒトがん細胞に導入し強制発現させることによって、本来ヒト細胞には存在しない想定外の原始的側副代謝経路・迂回代謝経路を強制的に活性化させ、ヒトがん細胞の代謝ホメオスタシスに揺さ振りを仕掛ける。このような方法論をとることによって、「既知のヒト代謝経路」という枠組みを越えた予想外の新規がん治療標的あるいはがん治療に応用可能な代謝産物を発見することができる独創的な研究を遂行できると考えられる。この研究計画によって樹立される新規スクリーニング法を通して、複数の新規代謝標的がん治療の基盤的方法論が見出されていくことが期待される。

### 2. 研究成果

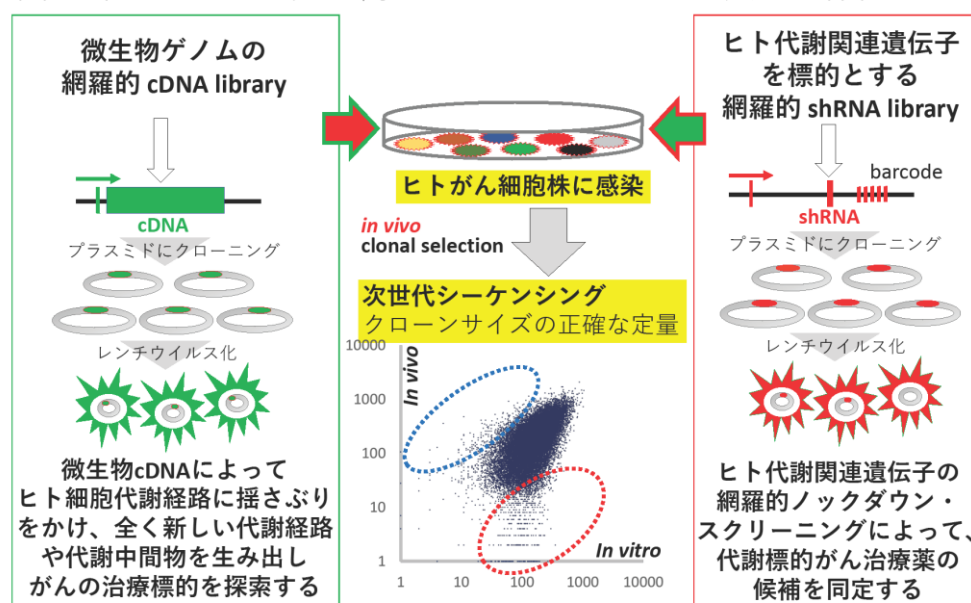
#### (1) 概要

これまでにない新しい機能ゲノミクス・スクリーニング法を樹立して、がん治療において介入可能な新規代謝関連治療標的を探索することを目的として、微生物 cDNA の網羅的レンチウイルス・ライブラリおよびヒト代謝関連遺伝子の網羅的 shRNA レンチウイルス・ライブラリを構築した。図 1 に示すように、大腸菌の全 cDNA をカバーした cDNA ライブラリをヒトがん細胞に導入して *in vivo* における細胞増殖や細胞死を次世代シーケンサで定量するという新しいスクリーニング法を樹立することに成功し、具体的に新しいがん治療標的としての応用可能性を有する複数の新規代謝関連分子および代謝経路を同定することができた。微生物 cDNA をヒトがん細胞に導入して強制発現させることによって、本来ヒト細胞には存在しない想定外の原始的側副代謝経路・迂回代謝経路を強制的に活性化させ、ヒトがん細胞の代謝ホメオスタシスに揺さ振りを仕掛けるといった方法論はこれまでにない新しいスクリーニング法であり、「既

知のヒト代謝経路」という枠組みを越えた予想外の新規がん治療標的あるいはがん治療に応用可能な代謝産物を発見することができる独創的なスクリーニング法といえる。この研究計画によって樹立された新規スクリーニング法を通して、今後複数の新規代謝標的がん治療の基盤的方法論が見出されていくことが期待される。

また、ヒト shRNA ライブラリを用いたスクリーニングでは、多くの新規治療標的ヒト遺伝子を同定することができただけでなく、大腸菌 cDNA ライブラリによるスクリーニングと表裏を成すようにヒトがん細胞株ごとに両方で類似の代謝経路がヒットしている例も見出された。両スクリーニングの妥当性を示すと同時に、ヒトがん細胞株ごとに特異的な代謝活性の側面をがん治療標的として狙える可能性があることを明らかにすることができた(図 1)。

図1: 本さがけ研究で樹立したスクリーニング法の全体像



cDNAあるいはshRNAが導入されたヒトがん細胞クローンのマウス *in vivo* におけるクローンサイズを次世代シーケンスによってカウントし、*in vivo*で脱落あるいは増殖を来したcDNA/shRNAを同定する

大腸菌 cDNA を用いたスクリーニングによって抽出された代謝関連遺伝子あるいは代謝経路については、ヒトがん治療へ応用するための介入法を探るためにもその意義づけが今後の重要な研究課題である。メタボローム解析やヒト遺伝子発現解析などの網羅的データを駆使することによって、ヒトには存在しない cDNA のヒト代謝経路における機能ががん治療における細胞生物学的な意義づけの解析を進めていきたい。

## (2) 詳細

本さがけ研究では以下の研究計画(A)(B)(C)を進めた。

### (A) 微生物 cDNA ライブラリを用いた機能的ゲノミクス・スクリーニング系の開発

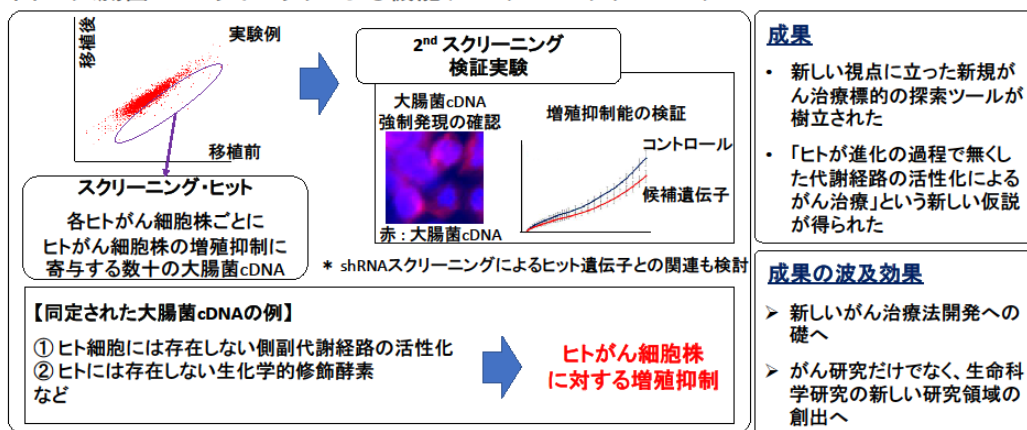
大腸菌 K12 株の全 cDNA 約 4,500 種をヒト細胞で強制発現可能なレンチウイルスプラスミドに網羅的にクローニングし、大腸菌遺伝子の包括的レンチウイルス・ライブラリを樹立した。幾度かのトライアルアンドエラーを繰り返し、プラスミドライブラリの段階で各 cDNA コピー数が 2 桁のレンジに収まる均質なライブラリの構築に成功した。同時に、ヒトとかけ離れた環境で生存する好熱菌株の全 cDNA を用いたスクリーニングにも興味を持ち、ライブラリ構築を進めたが、高温環境に適した GC リッチなゲノム組成のため正確な遺伝子配列を保持したままの包括的クローニングが困難であり、以後のスクリーニングには使用しなかった。完成した大腸菌 cDNA ライブラリについては、複数種のプラスミドについて強制発現後の Immunoblot を実施し、ヒト細胞における強制発現の確認を行った。

胃がん、肝細胞がん、大腸がん、膵がんなどのさまざまなヒトがん株に対して、細胞株ごとに感染細胞数、cDNA レンチウイルス・ライブラリのウイルス濃度、感染後の puromycin 濃度、感染後の細胞死の程度等を詳細に条件検討し、digital PCR 法等を評価系として用いながら、各細胞集団中の細胞1個あたり1種の大腸菌 cDNA がゲノム導入される実験条件を確定した。条件の確定した細胞株から順次、*in vivo* における細胞増殖あるいは細胞死を指標とした機能ゲノミクス・スクリーニングを継続的に進めた。具体的には、*in vivo* 腫瘍を移植する前後における cDNA 感染クローンの増減を次世代シーケンサによって網羅的に数え上げ、腫瘍環境で有意にクローンの減少あるいは増加をきたした cDNA を同定し、細胞株ごとにがん細胞の増殖や生存に大きく寄与する大腸菌 cDNA の候補を抽出した。

スクリーニングに用いる細胞株はがん種ごとに複数種類を用いることが重要であり、明確な driver mutation を有しない細胞株や代謝プロファイルに特徴を持つ細胞株などといった観点から、可能な限り多彩な細胞株を選ぶように進めた。しかしながら、当初は免疫不全ヌードマウスを用いてスクリーニングを進めたものの、細胞株ごとに *in vivo* 腫瘍の定着率や増殖スピードが極端に異なることが分かった。多種のヒト細胞株を用いたスクリーニングを進めたが、最終的に十分量かつ整合性の良いデータが取得できなかった細胞株は解析から除く方針とした。研究期間後半では、より多彩な細胞株に関するデータを首尾よく取得できるようにすることを目的として、重度免疫不全 NOG マウスを用いた *in vivo* スクリーニング系に移行し、ヌードマウスにおいて十分な定着・増殖が見られなかった細胞株についても *in vivo* 腫瘍環境におけるスクリーニング実験を実施することが可能になった。

結果として、合計 12 株のヒトがん細胞株を用いたスクリーニング実験を実施できた。腫瘍移植前後の cDNA クローンを次世代シーケンサによってカウントし、*in vivo* 環境で有意にクローンの増減をきたした大腸菌 cDNA を抽出した。がん細胞株ごとに、がんの増殖や生存に寄与する遺伝子候補が約数十遺伝子ずつ抽出された。抽出された遺伝子については、多くのがん細胞に共通して増殖抑制を呈した cDNA、あるいは特定の細胞株に限って明瞭な増殖抑制を呈した cDNA など様々なものがあり、特定の代謝活性プロファイルを有する細胞株に対してのみ強い増殖抑制効果を示すと考えられる cDNA の存在が明らかになった。前者のタイプの cDNA についてはヒト細胞全般に対する毒性が想定され、がん治療法への応用としては、後者のタイプの cDNA が適していると考えた。以後は、そのような cDNA を候補分子として検証実験に移行した。また、ある cDNA と、それと相反する機能を有する cDNA が増殖抑制の観点から真逆の作用を有するペアを探索するなど、機能的に有望な代謝関連経路の探索も進めた。大腸菌 cDNA をヒト細胞に導入することによってがん治療に利用できる代謝関連分子を探索するというスクリーニング法は、これまでに試されたことのなかった手法であり、ここで同定された候補 cDNA はそのいずれもが新規性が高いものと考えられる。大腸菌 cDNA ライブラリを用いた機能ゲノミクス・スクリーニングの全体像を図 2 にまとめる。

図2：大腸菌cDNAライブラリによる機能ゲノミクス・スクリーニング



研究計画の目標とした微生物 cDNA を用いたスクリーニング系の樹立に成功し、本さがけ研究の成果によって、微生物 cDNA の網羅的ライブラリを用いた新規スクリーニング法に基づくがん治療法の基盤構築が可能であるという Proof-of-concept が示されたとと言える。

#### (B) ヒト shRNA ライブラリを用いた機能的ゲノミクス・スクリーニング系の開発

ヒトの代謝関連遺伝子約 1,500 種をリスト化し、各々の遺伝子に対して 3~5 種の shRNA 配列を設計することで、全体で約 6,400 種の shRNA からなるヒト代謝関連遺伝子の網羅的レンチウイルス・ライブラリが完成した。プラスミドライブラリの段階で各 shRNA コピー数が 2 桁のレンジに収まるような均質なライブラリを樹立することに成功した。上記の微生物 cDNA ライブラリを用いたスクリーニング法と同様に、胃がん、肝細胞がん、大腸がん、膵がんなどのさまざまなヒトがん株に対して、各細胞集団中の細胞 1 個あたり 1 種の shRNA がゲノム導入される実験条件を確定した。

大腸菌 cDNA ライブラリによるスクリーニングと同期して、ヒト shRNA ライブラリを用いた *in vivo* 機能ゲノミクス・スクリーニングを継続的に進め、次世代シーケンサによって *in vivo* における shRNA 感染細胞のクローンサイズの変化を定量した。結果として、合計 12 株のヒトがん細胞株を用いたスクリーニング実験を実施できた。腫瘍移植前後の shRNA クローンを次世代シーケンサによってカウントし、*in vivo* 環境で有意にクローンの増減をきたした shRNA を抽出した。がん細胞株ごとに、がんの増殖や生存に寄与する遺伝子候補が約数十遺伝子ずつ抽出された。がん種ごとに共通して増殖抑制を呈した遺伝子、あるいは複数のがん種に共通して増殖抑制を呈した遺伝子など、多様な候補 shRNA が同定された。臨床腫瘍の遺伝子発現データなどを用いた遺伝子の絞り込みも併せて進めた。さらに、特定の代謝経路に集中して同定される遺伝子群を検索し、個々の遺伝子の探索だけでなく、がんの治療標的となりうる代謝経路全体の探索も進めた。さらに、上記の大腸菌 cDNA ライブラリと同じ株を用いたスクリーニングを展開していることから、細胞株ごとに、それら両方で類似した代謝経路のヒット遺伝子を抽出するなど、多角的な探索も進めた。

例えば *KRAS* に mutation を有する細胞株や *wnt-β catenin* 経路の活性化が知られる細胞株では *KRAS* や *β catenin* に対する shRNA が増殖抑制を呈するなど、positive control として合致する結果が安定的に得られた一方で、さまざまな代謝経路における新しいがん治療標的遺伝子の候補が同定された。また共同研究によって、抗腫瘍活性を有するもののその機能が明らかでなかった低分子化合物 xanthohumol の分子作用機序に関する新規役割を明らかにすることができた(論文業績を参照)。

#### (C) スクリーニング系の総合的解析によるがん治療候補分子の探索とその検証

大腸菌 cDNA とヒト代謝関連遺伝子 shRNA の網羅的ライブラリを用いた機能ゲノミクス・スクリーニングの結果を統合的に解析し、発がん分子メカニズムの本態解明に繋がるような新規標的遺伝子、あるいは新しいがん治療標的の候補となる代謝産物や代謝経路の探索を進めた。例えば、同じヒトがん細胞株を用いた大腸菌 cDNA スクリーニングとヒト shRNA スクリーニングで、同様の代謝経路に関連する遺伝子が共通して候補として同定されていることも多くみられ、ある種のがん症例に対して特異的な代謝経路に介入するようながん治療法の有用性が改めて示唆された。

### 3. 今後の展開

本さがけ研究で確立された大腸菌 cDNA ライブラリを用いた機能ゲノミクス・スクリーニングは、オリジナリティの高い競争力あるツールであり、継続的にスクリーニングを進めていくことを予定している。あるがん種に絞った上でより多くのヒトがん細胞株に対するスクリーニングを集中して実施するなど、がん治療標的の同定を目指した効率良い研究の展開を予定している。さらに、がん研究に限定せずより多様な生物学的現象を新しい視点で捉え直すための実験ツールとしての応用開発を進めたいと考えている。ヒトには存在しない遺伝子をヒト細胞内で強制発現させることに

よって、これまで実験室で捉えることができなかった細胞生物学的現象に出会うことができる可能性もあり、既知の情報を超えたところで改めて生命現象の新しい側面を認識することが可能になるような研究テーマを模索していきたい。

また、これまでのさきがけ研究期間に同定された大腸菌 cDNA については、メタボローム解析や網羅的ヒト遺伝子発現解析を行うなど、網羅的データベースを統合解析することによってヒト細胞内における機能解析を進め、がん治療としての介入の方法を検討したい。ヒトには存在しない側副代謝経路の利用などを基盤として、新しいがん治療の展開に繋がるような研究を推進していきたいと考えている。

#### 4. 自己評価

本さきがけ研究は、代謝を標的とする新しいがん治療法の探索を目的として、これまでにない新しい機能ゲノミクス・スクリーニング法を樹立することを主要な目標として開始し、結果として微生物 cDNA ライブラリを用いた機能ゲノミクス・スクリーニング法を樹立することができた。微生物 cDNA をヒト細胞内で強制発現させ、進化の中でヒトが無くした原始的代謝経路・側副代謝経路を再獲得させることによって代謝ホメオスタシスに揺さぶりをかけながらがん治療標的を探索するという、研究方針の妥当性すら明らかでなかった状態でのスタートであったが、実際のスクリーニング系を無事に立ち上げたことについては一定程度の評価が許されると思いたい。様々なヒトがん細胞株を用いた *in vivo* スクリーニングによって、ヒトには存在しない側副代謝経路やこれまでがん治療との関連であまり顧みられることのなかった分子が、がん治療における介入ポイントの候補として実際に同定されており、当初思い描いていたような新規スクリーニングツールとしての proof-of-concept は示されたといえる。しかしながら、先行研究としての成果もないゼロからのスタートではあったものの、3 年半の期間で主貢献論文の発表を達成できなかったことは大いに反省すべき点と捉えている。

本さきがけ研究期間中に研究費の増額および共同研究 FS(フィージビリティ)支援による追加予算措置を受けることができ、より高いレベルの研究を加速的に推進することができた。研究実施体制は十分であった。

上記のように期間内での主貢献論文の発表は叶わなかったが、本さきがけ研究で確立されたスクリーニング法は、がん治療標的探索に関わる研究コミュニティに対して大きなインパクトのあるものだと自負している。今後はアカデミアと創薬業界の双方に向けて、このスクリーニング法の導出を目指したい。がん治療標的の枯渇が問題とされている現状のなか、新しい視点に立った新規がん治療標的の探索ツールとして普及させていくことができれば、我が国の創薬基盤技術の底上げにつながり、科学技術・社会経済へ大きく貢献できることが期待される。さらに、がん研究に限らず広く生命現象一般に対する研究ツールとしての応用性を追求していくことで、生命科学研究の新しい研究領域の創出にも貢献したいと考えている。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Shikata Y, Yoshimaru T, Komatsu M, **Katoh H**, Sato R, Kanagaki S, Okazaki Y, Toyokuni S, Tashiro E, Ishikawa S, Katagiri T, Imoto M. *Protein kinase A inhibition facilitates the antitumor activity of xanthohumol, a valosin-containing protein inhibitor. Cancer Sci.* 2017 Apr;108(4):785-794.

##### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

##### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. **Hiroto Katoh**, Daisuke Komura, Shumpei Ishikawa. *Massively Parallel Synthesis of shRNA*

*Library and its Functional Screening Identify Actionable Metabolic Pathway Genes for Cancer Therapy*. 2018 Synthetic Biology: Engineering, Evolution & Design (SEED) (Scottsdale, AZ, USA). 2018/6/3 – 2018/6/7.

2. 加藤洋人, 河村大輔, 石川俊平. *Genome-scale Functional Genomics Screening for the Identification of Therapeutic Targets for Gastric Carcinoma*. 第 89 回日本衛生学会学術総会 (愛知県名古屋市). 2019/2/1 – 2019/2/3.
3. 加藤洋人, 山本麻未, 鈴木良平, 石川俊平. *Functional Genomics Screening Using shRNA Library for the Identification of Therapeutic Targets for Gastric Carcinoma*. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (兵庫県神戸市). 2017/12/8 – 2017/12/9.
4. 加藤洋人, 藤橋未希, 佐藤玲子, 鈴木良平, 貴志一樹, 河村大輔, 石川俊平. *Establishment of a Functional Genomics Screening by Combining Global shRNA Library and Next-Generation Sequencing*. 第 75 回日本癌学会学術総会 (神奈川県横浜市). 2016/10/6 – 2016/10/8.