

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

脳腫瘍における SLFN11 の機能解析

研究代表者 村井 純子¹⁾
研究分担者 棗田 学²⁾, 岡田 正康²⁾

1) 愛媛大学プロテオサイエンスセンター 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

Schlafen (SLFN) ファミリーのメンバーの1つ、SLFN11はプラチナ製剤などのDNA障害型抗がん剤の感受性増強因子として、注目されている。脳腫瘍ではしばしばDNA障害型抗がん剤を含む化学療法が適応となるが、SLFN11の発現解析や治療における有用性についての報告はほとんどない。我々は、2021-2022年度の共同研究の成果として、小児悪性脳腫瘍の最も多くを占める髄芽腫において、WNT群とSHH群の一部でSLFN11が高発現していることを突き止め、さらにSLFN11がシスプラチンなどの化学療法の効果を増大させることを明らかにした。2023年度からの新規共同研究では、抗がん剤であるPARP阻害剤や放射線照射におけるSLFN11の機能解析を、培養細胞株を用いて研究した。髄芽腫細胞株DAOYにおいて、SLFN11発現とBRCA2遺伝子のノックダウンが、相乗的にPARP阻害剤の感受性を高めることを発見し、そのメカニズムを一部明らかにした。また、放射線によるDNA損傷応答におけるSLFN11の機能についても研究中である。

A. 研究目的

SLFN11はDNA障害型抗がん剤への薬剤感受性増強因子と知られ、機能解析も進んでいるが、放射線感受性への影響は不明な点が多い。本共同研究では、SLFN11が放射線感受性に及ぼす影響とメカニズムを解析することを目的としていたが、まだ主要な実験結果がでていないため、抗がん剤であるPARP阻害剤について、脳腫瘍への応用を視野に入れて、研究目的に加えた。

B. 研究方法

すでに本共同研究をもとに、SLFN11を高発現する髄芽腫細胞株DAOYと、そこから樹立したSLFN11のノックアウト細胞(DAOY-SLFN11KO)を使用した。両細胞において、相同組み替え修復因子であるBRCA2をsiRNAで、ノックダウンさせた。以下の4種類の細胞を用いて実験を行った。1) DAOY-SLFN11KO/siRNA control, 2) DAOY-SLFN11KO/siRNA BRCA2, 3) DAOY/siRNA control, 4) DAOY/siRNA BRCA2

C. 研究結果

DAOY細胞株から作成した図1Aに示す4種類の細胞について、薬剤感受性試験を行ったところ、トポイソメラーゼ1阻害剤であるcamptothecin (CPT)に対しては、高濃度(50 nM)、低濃度(12.5 nM)ともに、DAOY/siRNA BRCA2(右端の赤い棒グラフ)が最も強い感受性を示したが、効果は相加的であった。PARP阻害剤のolaparibに対しては、高濃度(25 μM)においては相加的であったが、低濃度(6.25 μM)においては、SLFN11の効果がない(図1C右の水色vsピンク色)にもかかわらず、DAOY/siRNA BRCA2ではDAOY-SLFN11KO/siRNA BRCA2(図1C右の青色)を超える感受性を示しており、相乗効果を示した。

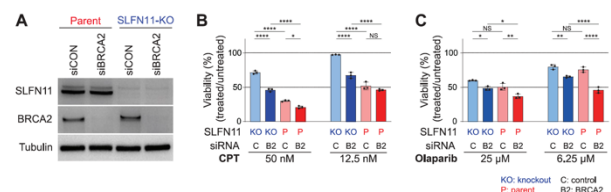


図1 : A. DAOY細胞から樹立した4種類の細胞。
B-C. 薬剤感受性試験の結果(48時間後)

別の研究報告から、PARP 阻害剤存在下において、BRCA2 の欠損があると、複製フォークの後方に single strand DNA gap が蓄積すると考えられた。そこで、我々はその ssDNA gap に SLFN11 が集積すると仮説をたて、DAOY 細胞で蛍光免疫染色法を用いて検討した。内因性の SLFN11 は共焦点顕微鏡では感度以下だったため、SLFN11 を過剰発現 (OE) した DAOY 細胞株を樹立し、その細胞においても siRNA BRCA2 が機能することを確認した (図 2A)。DAOY SLFN11-OE 細胞に、CPT を投与すると SLFN11 のクロマチン集積が認められるが、これらは RPA2 (ssDNA gap に集積するタンパク質) と共局在するものの、我々の以前の報告どおり DNA 複製 (EdU 陽性) は停止していた (図 2B)。一方で、PARP 阻害剤である olaparib を投与した時は、RPA2 と一致する SLFN11 のクロマチン集積を認めたものの、その集積パターンは CPT のときと明らかに異なっていた (図 2B vs. 図 2C)。さらに、olaparib 投与では、SLFN11 がクロマチンに集積している細胞においても DNA 複製が継続していた (EdU 陽性)。

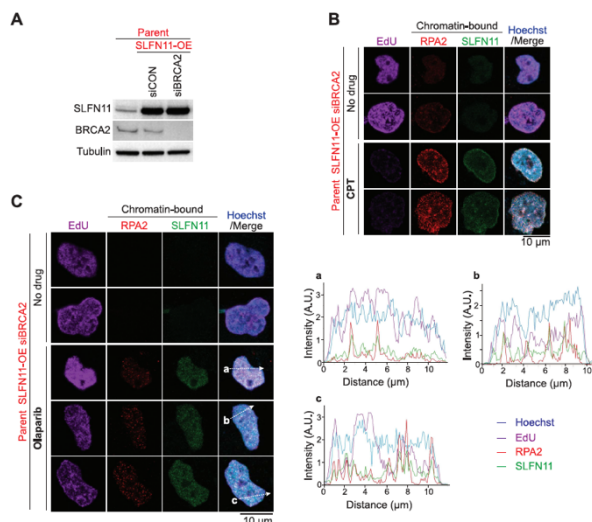


図 2 : A. DAOY 細胞に SLFN11 を過剰発現 (OE) させ、さらに BRCA2 をノックダウンさせた。B-C. SLFN11-OE 細胞で、薬剤投与後の DNA 複製 (EdU)、RPA2 と SLFN11 のクロマチン集積を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。RPA2 と SLFN11 の共局在をラインプロットで確認した (C 右)。

D. 考察

本研究は基本的には、卵巣がん細胞株をメインに実験した結果を、髄芽腫細胞株にも拡大させたものである。PARP 阻害剤は、DNA やクロマチンをターゲットにしているので、がん種を問わずに同様のメカニズムで、抗がん効果を発揮することが期待できる。BRCA1/2 の変異が、卵巣がんや乳がんによく認められるため、それらのがんに注目されがちであるが、今回の研究で脳腫瘍由来細胞においても SLFN11 が PARP 阻害剤で生じる ssDNA gap に結合することが証明できた。卵巣がん細胞の結果からすると、おそらく ssDNA gap に結合した SLFN11 が、ssDNA gap を拡大させることで感受性を高めていると考えている。

E. 結論

SLFN11 を高発現する髄芽腫細胞 DAOY は、BRCA2 を欠損させることで、PARP 阻害剤への感受性が相乗的に高まった。相同組み替え修復が抑制されている脳腫瘍では、今回の結果を応用できることが期待できる。放射線照射に対して、SLFN11 が起こす反応についても目下研究を進めている。

DAOY 細胞は、脳研共同研究者の棗田学先生からご供与いただいた。2023 年 6 月 21 日に新潟大学産婦人科でセミナーをさせていただいた際に、棗田先生と共同研究の進捗について打ち合わせを行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hiroshi Onji, Sota Tate, Tomohisa Sakaue, Nobuyuki Onishi, Takashi Matsumoto, Takashi Sugiyama, Shigeki Higashiyama, Junko Murai*

bioRxiv 2023.06.28.546820; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.06.28.546820> (Oncogene にリバイズ中)

2. 学会発表

第 82 回日本癌学会学術総会、2023 年 9 月 21 日～23 日、パシフィコ横浜 発表タイトル: Synergistic effect of PARP inhibitors by SLFN11 and BRCA2-deficiency through an accumulation of single-strand DNA gaps

恩地裕史、村井純子

第 36 回日本脳神経外科同時通訳研修会、2023 年 7 月 29 日、パシフィコ横浜 発表タイトル: 髄芽腫

における SLFN11 発現による DNA 障害型抗がん剤 への感受性増強

棗田学、中田聡、村井純子、岡田正康、塚本佳広、
大石誠、Charles Eberhart

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし