

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) shRNA スクリーニングライブラリーを用いた新規分子標的治療薬の探索
および最適併用療法の確立
(英語) Exploration of novel molecular targeted therapy and the best
combination therapy by using shRNA library screening
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京大学 大学院医学系研究科 生化学・分子生物学講座
ゲノム医学講座 特任助教 高阪 真路
- 所属 役職 氏名： (英語) Department of Medical Genomics, Graduate School of Medicine, The
University of Tokyo. Assistant Professor Shinji Kohsaka
- 実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) shRNA スクリーニングライブラリーを用いた新規分子標的治療薬の探索
および最適併用療法の確立
- 開発課題名： (英語) Exploration of novel molecular targeted therapy and the best
combination therapy by using shRNA library screening
- 研究開発代表者 (日本語) 国立大学法人東京大学 大学院医学系研究科 生化学・分子生物学講座
ゲノム医学講座 特任助教 高阪 真路
- 所属 役職 氏名： (英語) Department of Medical Genomics, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo. Assistant Professor Shinji Kohsaka
- 分担研究 (日本語) shRNA ライブラリースクリーニングによる肺腺がん併用分子標的治療薬の
選定
- 開発課題名： (英語) Exploration of the best combination of molecular targeted therapy
for lung adenocarcinoma by using shRNA library screening

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学 大学院医学系研究科 生化学・分子生物学講座
細胞情報学分野 助教 曾田 学

所属 役職 氏名 : (英 語) Departments of Cellular Signaling, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo. Assistant Professor Manabu Soda

分担研究 (日本語) dual shRNA ライブラリースクリーニングによる肺腺がん併用分子標的治
療薬の選定

開発課題名 : (英 語) Exploration of the best combination of molecular targeted therapy
for lung adenocarcinoma by using dual shRNA library screening

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学 大学院医学系研究科 生化学・分子生物学講座
ゲノム医学講座 特任准教授 崔 永林

所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Medical Genomics, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo. Associate Professor Erin Sai

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

ヒト骨格筋筋芽細胞に不死化関連遺伝子を導入することで不死化に成功した。また胎児型横紋筋肉腫および胞巣型横紋筋肉腫に特異的な変異遺伝子を導入し、各組織型の横紋筋肉腫発がんモデルの構築に成功した。構築した横紋筋肉腫モデル細胞の *in vitro* での増殖能, colony formation 形成能, nude mouse および SCID mouse の皮下における *in vivo* 腫瘍形成能の評価を行い、発がん能があることが確認された。pooled shRNA ライブラリーをレトロウイルス感染を用いて、樹立した横紋筋肉腫細胞および isogenic control 細胞に導入し、ネガティブスクリーニングを行った。横紋筋肉腫の特異的遺伝子変異によってもたらされる分子標的候補遺伝子およびシグナル伝達経路を数種類同定することに成功した。肺癌研究において EGFR ΔE746-A750 変異株 (PC9), EGFR L858R_T790M 変異株 (NCI-H1975), EML4-ALK 陽性株 (NCI-H2228), CCDC6-RET 陽性株 (LC-2/ad), SLC34A2-ROS1 陽性株 (HCC78)を用いて、分子標的治療薬の投与下で shRNA ライブラリースクリーニングを行うことを予定している。EGFR 変異株にゲフィチニブ, EGFR L858R_T790M 変異株に AZD9291 (3rd generation TKI), ALK fusion, ROS1 fusion 陽性株にクリゾチニブ, RET fusion 陽性株にバンデタニブを用いた薬剤投与実験を行い, Alamar Blue assay によりそれぞれの薬に対する用量反応曲線を描き, IC₂₀ および IC₅₀ を算出した。最適な分子標的の組み合わせを判定するために vector backbone を改良し dual shRNA plasmid を作成した。さらに約 80 種類のチロシンキナーゼを標的とした shRNA 約 500 種類 (6 配列/遺伝子)を各クローニングサイトにクローニングし pooled dual shRNA ライブラリーを構築した。

英文

Human skeletal muscle myoblast was immortalized by transducing several genes related to immortalization. Rhabdomyosarcoma model was established by transducing certain genes related to embryonal or alveolar subtype of rhabdomyosarcoma. Established rhabdomyosarcoma cells were subjected to *in vitro* proliferation assay, colony formation assay and *in vivo* tumor formation assay in the subcutaneous of nude mouse and SCID mouse, and we confirmed the tumor formation activity of the established cell. Pooled shRNA library was transduced by retroviral infection into established rhabdomyosarcoma cell and isogenic control cell, and negative screening was performed to identify the targetable gene and signaling pathway which the established rhabdomyosarcoma cell depends on. As the result of the screening, we succeeded in identifying several candidates of targetable genes. In lung cancer project, we plan to perform shRNA library screen under the treatment of molecular targeted drugs in EGFR ΔE746-A750 mutant cell line (PC9), EGFR L858R_T790M mutant cell line (NCI-H1975), EML4-ALK positive cell line (NCI-H2228), CCDC6-RET positive cell line (LC-2/ad), SLC34A2-ROS1 positive cell line (HCC78). EGFR mutant cell was treated with gefitinib, EGFR L858R_T790M mutant was treated with AZD9291 (3rd generation TKI), ALK fusion or ROS1 fusion positive cell lines were treated with crizotinib, and RET fusion positive cell line was treated with vandetanib and calculated IC₂₀ and IC₅₀ drawing dose-response curve by Alamar Blue assay. To discover the best combination of molecular targeted drugs, we improved the vector backbone and develop dual shRNA plasmid. Furthermore, 500 shRNAs targeting 80 types of tyrosine kinases (6 shRNA/gene) were cloned into each cloning site and developed a dual shRNA library.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. Toda-Ishii M, Akaike K, Suehara Y, Mukaihara K, Kubota D, Kohsaka S, Okubo T, Mitani K, Mogushi K, Takagi T, Kaneko K, Yao T, Saito T. Clinicopathological effects of protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Modern Pathology*. 2016, 29, 1424-1432.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 第 75 回日本癌学会学術総会
新しい RNA-seq 法により広がる FFPE の活用法, ランチョンセミナー, 高阪真路, 間野博行, パシフィコ横浜, 2016/10/6, 国内
2. Alberta-AMED conference
Mutation in MYOD1 defines a clinically aggressive subset of rhabdomyosarcoma, ポスター, Shinji Kohsaka, Calgary, 2017/2/24-25, 海外
3. 病理組織学的アプローチによる Non-TRU タイプ肺腺癌の NKX2-1 遺伝子変異の同定, ポスター, 松原大祐, 曾田学, 吉本多一郎, 天野雄介, 上野敏秀, 小島進也, 間野博行, 仁木利郎, パシフィコ横浜, 2017/10/6, 国内.
4. 形態学的アプローチに基づく Non-TRU type 肺腺癌の解析: TTF-1 と TTF-1 の相互排他的な関係性について, ポスター, 松原大祐, 曾田学, 吉本多一郎, 天野雄介, 上野敏秀, 小島進也, 間野博行, 仁木利郎, 福岡国際会議場, 2016/12/21, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし