



Title	CRISPR Loss-of-Function Screen Identifies the Hippo Signaling Pathway as the Mediator of Regorafenib Efficacy in Hepatocellular Carcinoma
Author(s)	末村, 茂樹
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76237
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 末村 茂樹			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授	竹石 俊一
	副 査	大阪大学教授	南 池 章
	副 査	大阪大学教授	土岐 祐一
論文審査の結果の要旨 肝細胞癌に対するレゴラフェニブの奏功期間は限定的であり、その原因として耐性の獲得が考えられる。本論文では、CRISPRライブラリースクリーニングにより、レゴラフェニブ耐性に関与する因子を検討している。ゼノグラフトモデルを用いたCRISPRライブラリースクリーニングにより、レゴラフェニブ耐性に関わる候補遺伝子として、Hippo経路の構成因子であるLATS1/2が同定され、Hippo経路がレゴラフェニブの治療効果に関与する可能性が示唆された。肝癌細胞株でLATS2の発現を抑制すると、レゴラフェニブによるアポトーシス誘導や細胞増殖阻害効果が有意に軽減した。LATS2を抑制すると、Hippo経路のメディエーターであるYAPが活性化し、抗アポトーシス蛋白Bcl-xLや多剤排出トランスポーターABCB1の発現が上昇した。また、12種類の肝癌細胞株のレゴラフェニブに対するIC50値は、YAP, Bcl-xL, ABCB1の発現量と正の相関を認めた。YAPあるいはBcl-xLを抑制したところ、レゴラフェニブの抗腫瘍効果は有意に増強した。これらの研究の結果は、肝細胞癌においてHippo経路がレゴラフェニブの治療効果を修飾することを示したものであり、学位論文に値すると思う。			

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	末村 茂樹
論文題名 Title	CRISPR Loss-of-Function Screen Identifies the Hippo Signaling Pathway as the Mediator of Regorafenib Efficacy in Hepatocellular Carcinoma (CRISPRライブラリーを用いた機能欠損型遺伝子スクリーニングによる、肝細胞癌に対するレゴラフェニブ治療効果修飾因子としてのHippo経路の同定)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕	
肝細胞癌は、アジアやアフリカにおいて最も癌関連死の多い癌腫の一つである。長らく、ソラフェニブが進行肝細胞癌に対する唯一の分子標的薬であったが、RESORCE試験の結果2017年からソラフェニブ治療後の二次治療としてレゴラフェニブが承認された。しかし、レゴラフェニブの奏効率や生存期間の延長効果は限定的である。その原因として耐性の獲得が想定されるが、その分子メカニズムは明らかとはなっていない。一方、CRISPRライブラリーを用いた機能欠損型遺伝子スクリーニングは網羅的な遺伝子探索技術であり、様々な癌腫においてその進展や薬剤耐性に関与する遺伝子の同定に有用であることが報告されている。そこで本研究では、CRISPRライブラリースクリーニングにより、レゴラフェニブ耐性に関与する因子を検討した。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
肝癌細胞株HLFにレンチウイルスを用いてCas9を導入し、限界希釈法によりCas9が恒常的に発現する単一クローン株を作成した。このクローン株(Cas9発現HLF)のレゴラフェニブに対する感受性が親株HLFと同等であることを確認した。また、このCas9発現HLFを免疫不全マウスの皮下に移植することで、ゼノグラフトが形成されることを確認した。続いて、このゼノグラフトモデルに対してレゴラフェニブ(20mg/kg/日)の経口投与を行い、無治療群と比べ有意な腫瘍増殖抑制効果が得られることを確認した。そこで、763のキナーゼに対して各遺伝子あたり8本のguide RNA(gRNA)が設計されたプール型CRISPRライブラリーを、レンチウイルスを用いてCas9発現HLFに導入し、感染細胞を用いて免疫不全マウスの皮下においてゼノグラフトを作成した。腫瘍径が200mm³に達した時点から、レゴラフェニブ治療群(20mg/kg/日)および無治療群に各3匹ずつ振り分け、3週間治療を行った。各腫瘍内gRNA頻度分布を次世代シーケンサーで網羅的に解読し、治療群と無治療群で比較した。治療群において、設計された8本中4本以上のgRNAの存在頻度が増加した31の遺伝子を同定した。最も存在頻度が増加した遺伝子はHippo経路の構成因子であるLATS2であり、設計された8本全てのgRNAが治療群において増加していた。また、そのパラログ遺伝子であるLATS1も、検出された5本のgRNA全てが治療群において増加しており、Hippo経路がレゴラフェニブの治療効果に関与する可能性が示唆された。そこで、肝癌細胞株Hep3BおよびHuh-7において、siRNAを用いてLATS2の発現を抑制したところ、レゴラフェニブによるアポトーシス誘導が抑制され、細胞増殖阻害効果が有意に減弱した。4つの肝癌細胞株Hep3B, Huh-7, HepG2, HLFにおいて、siRNAを用いてLATS2の発現を抑制すると、Hippo経路のメディエーターであるYAPのリン酸化が抑制され、YAPの活性化が認められた。肝癌細胞株Hep3BおよびHLFにおいてsiRNAを用いてLATS2の発現を抑制すると、YAPの標的遺伝子である抗アポトーシス蛋白Bcl-xLおよび多剤排出トランスポーターABCB1の有意な発現上昇を認めた。また、今回のライブラリースクリーニングでその存在頻度が増加したLATS2を標的としたgRNA2種類を用いて、Cas9発現HLFでLATS2を抑制したところ、siRNAを用いたときと同様に、YAPのリン酸化が抑制され、Bcl-xLおよびABCB1の発現上昇を認めた。一方、肝癌細胞株Hep3Bにおいて、レゴラフェニブを投与するとBcl-xLおよびABCB1両者の発現低下を認めた。12種類の肝癌細胞株を用いて、レゴラフェニブに対するIC50値を測定したところ、YAPの蛋白発現量、並びにBcl-xLおよびABCB1のmRNA発現量と有意な正の相関を認めた。最後に、レゴラフェニブ低感受性肝癌細胞株HLFやSNU-475に対して、YAP阻害剤(Verteporfin)もしくはYAPのsiRNAを投与したところ、YAPの抑制単独では抗腫瘍効果を示さなかったが、レゴラフェニブに対する感受性を有意に増強させた。また同様に、Bcl-xL阻害剤(ABT-737)もしくはBcl-xLのsiRNAを投与したところ、レゴラフェニブ投与によるアポトーシス誘導が増強し、抗腫瘍効果の有意な増強が認められた。	
〔総 括(Conclusion)〕	
CRISPRライブラリーを用いた機能欠損型遺伝子スクリーニングにより、肝細胞癌においてHippo経路がレゴラフェニブの治療効果を修飾することが明らかとなった。	