

APPLICATION NOTE

BRCA2(-/-)細胞株を用いた化合物スクリーニング: 合成致死性モデル

Suzanne Mead, Rebecca Foster and Kyla Grimshaw

はじめに

ポリ(ADPリボース)ポリメラーゼ(PARP)阻害剤はDNA一本鎖切断の修復を無効にします。修復されない場合、一本鎖切断は二本鎖切断(DSB)に変換され、致命的なレベルの損傷が蓄積する可能性があります。相同組換えDSB修復が欠損している(BRCA2の喪失によって等)癌細胞はPARP阻害剤に対する感受性の増加を示します^{1,2}。これは、新規治療のための合成致死のアプローチの1例と言えるでしょう。

Horizonの細胞株カタログには、BRCA2遺伝子をノックアウトしたDLD-1細胞株と、BRCA2遺伝子座以外は遺伝的に同質(アイソジェニック)なDLD-1親細胞株をペアとした製品をラインアップしています。DLD-1 BRCA2(-/-)細胞は、rAAV遺伝子編集技術を用いてBRCA2エクソン11の標的破壊を行うことで作製されました³。歴史的には、Capan-1などの細胞株がBRCA2欠損モデルとして使用されてきました⁴。しかしながら、これらの細胞株では、BRCA2だけでなく他の遺伝子変異に関しても異なる状態の細胞株と比較されることがあります。この研究において、我々は、PARP阻害剤に対して、遺伝子工学で作成されたBRCA2(-/-)変異細胞株に特異的な感受性を実証しました。

この細胞株システムは、他の要因に影響されずにBRCA2の役割を研究することを可能にし、そして合成致死性スクリーニングを実施するための興味深い手法を提供するものです。遺伝子ターゲットング技術の恒久的かつ特異的な特質は、一過性の遺伝子ノックダウンやオフターゲット効果などのRNA干渉技術の制限を補うものです。さらに、アイソジェニックな細胞株ペアを用いたシステムは、創薬プロセス全体を通して、in vitroおよびin vivoの双方で新規ターゲットを同定および検証するために使用することができます。

Cell Line	Genotype	Cat. No.
DLD-1	BRCA2 (-/-)	HD 105-007

方法

コロニー形成アッセイのために、細胞を24ウェルプレートに播種し、一晚培養し付着させました。次に、細胞を化合物で処理し、10日間培養しました。定量化するために、コロニーを固定し、クリスタルバイオレット溶液で染色しました。次に、染料を可溶化し、590nmで吸光度を測定しました。

細胞増殖アッセイ(Proliferationアッセイ)では、細胞を96ウェルプレートに播種し、一晚培養し付着させました。次に、細胞を化合物で96時間処理しました。細胞生存率はアラマブルーを用いて定量しました。

結果と考察

DLD-1 BRCA2 (-/-)細胞株および親細胞株を用いたコロニー形成アッセイにより、強力なPARP阻害剤であるオラパリブ(Olaparib)を試験しました。BRCA2(-/-)細胞はPARP阻害剤に感受性が高く、BRCA2(+/-)である親細胞株より1000倍以上の選択性を示しました。

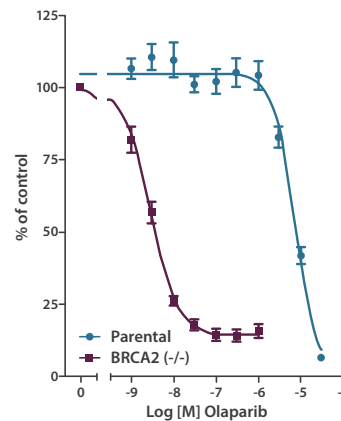


図1. 10日間のコロニー形成アッセイにおいて、DLD-1 BRCA2(-/-)細胞は、DLD-1親細胞株よりオラパリブに対する選択的感受性を示しています。

さらに、薬効の低い別のPARP阻害剤NU1025と非分子標的薬ゲムシタピン(gemcitabine)を評価しました。NU1025はBRCA2(-/-)細胞に対して明らかな選択性を示し、この化合物のin vitroでの有効性プロファイルと一致しましたが¹、オラパリブよりも有意に弱い有効性を示しました。予想どおり、ゲムシタピンは両方の細胞株において等しい有効性を示しました。

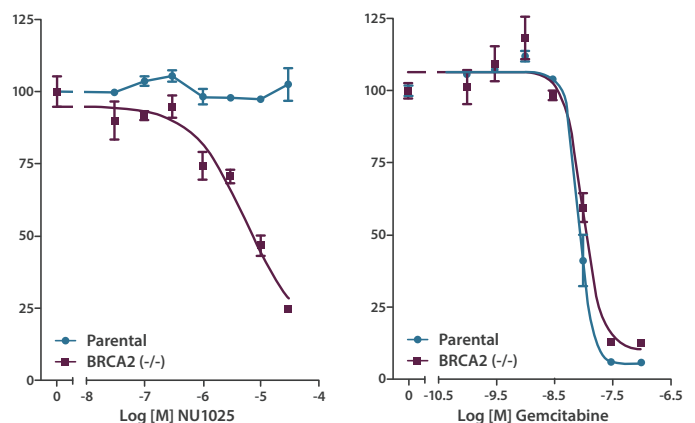


図2. コロニー形成アッセイでは、DLD-1 BRCA2(-/-)細胞はNU1025に対して選択的感受性を示しますが(左)、非分子標的薬剤ゲムシタピンに対する選択性は見られませんでした(右)。

次に、アイソジェニックな細胞株ペアを用いて、96ウェルプレートベースのハイスループットな細胞増殖アッセイでPARP阻害剤をスクリーニングしました。

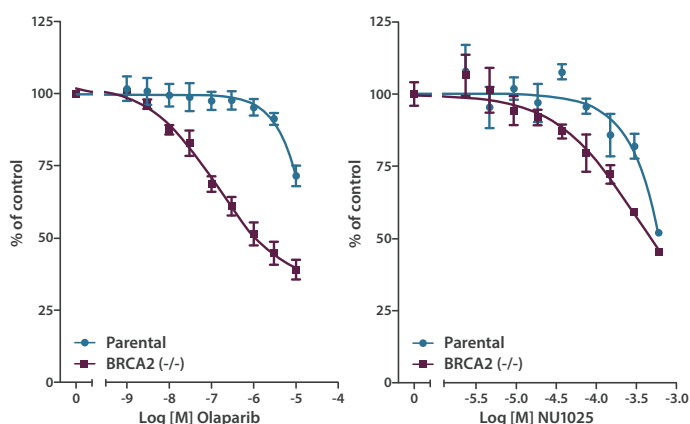


図3. BRCA2(-/-)細胞は、96時間の細胞増殖アッセイで強力なPARP阻害剤に対して感受性を示しました。

96時間の増殖アッセイにわたって、BRCA2(-/-)細胞はPARP阻害剤に対して明らかに感受性が見られましたが、より長い期間のコロニー形成アッセイで見られるよりも低い程度でした。これは、致死レベルのDNA損傷が蓄積するために複数の細胞分裂周期を必要とするこれらの化合物の作用機序と一致しています。96時間の増殖アッセイにおいて化合物添加が細胞に与える効果は(コロニー形成アッセイよりも)相対的に低くなりますが、増殖アッセイはPARP阻害剤の効力をランク付けするのに十分な感度があり、ハイスループット合成致死スクリーニングにも適用できると思われます。

結論

BRCA2アイソジェニック細胞株は、医薬品探索・開発のための強力で適切なツールであり、大きな細胞株パネルを必要とせずに単一遺伝子欠失を研究することを可能にします。BRCA2アイソジェニック細胞株ペアを用いた試験により、PARP阻害剤に対するBRCA2欠損細胞の感受性を明らかに実証しましたが、これは合成致死性の概念を例示するものです。このような創薬スクリーニングへのアプローチは、腫瘍の進行の間に生じた突然変異による癌細胞に特有の脆弱性を利用する、効果的かつ個別化された抗癌剤の発見を容易にすることを目的としています。

Horizon Support

Horizonは、遺伝的に定義された細胞株、カスタム細胞株生成、in vivoモデル、レポーター遺伝子アッセイキット、遺伝子検査用標準サンプル、および研究アッセイ/スクリーニングサービスを提供しています。これらは、学術研究、医薬品探索・開発、体外診断薬開発、バイオ医薬品プロセスの最適化などに使われています。

ホライゾン・ディスカバリー株式会社

〒150-0001東京都渋谷区神宮前4-18-6 イスルギビル #326
Tel: 03-6434-5410
rnai.jp@horizondiscovery.com
www.horizondiscoverykk.com

All trademarks are the property of Horizon Discovery Company unless otherwise specified. ©2019 Horizon Discovery Group Company—All rights reserved. First published 2015

B015-1905-v4

以下の細胞株は、本アプリケーションノートに記載されている細胞株と同様のアプローチが可能と思われます。

Cell Line	Genotype	Cat. No.
HCT116	DNA-PKcs (-/-)	HD R02-049
HCT116	LIGIV (-/-)	HD R02-063
HCT116	XRCC4 (-/-)	HD R02-076
HCT116	MLH1 (+/-)	HD 104-006
RKO	FANCC (-/-/-)	HD R05-006
RKO	FANCG (-/-)	HD R05-005
HCT116	BLM (-/-)	HD R02-011
HCT116	P53 (-/-)	HD 104-001
RKO		HD 106-002
SW48		HD 103-004
MCF10A		HD 101-005

引用論文

- McCabe et al., Cancer Biology & Therapy 2005 (4) p934
- Farmer et al., Nature 2005 (434) p917
- Hucl et al., Cancer Res. 2008 (68) p5023