

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04991

研究課題名(和文) 活性化型Ras遺伝子の発がん過程での組織特異性および指向性の理解

研究課題名(英文) Cell and tissue type dependency of activated Ras in carcinogenesis

研究代表者

山本 雄介 (Yamamoto, Yusuke)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：60768117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん組織ごとに変異の割合が明確に異なっている活性化型Ras遺伝子(KRAS, HRAS, NRAS)に注目し発がん過程の解析を初代培養の上皮細胞を用いて実施した。肺上皮細胞を用いた解析から、肺の気管支上皮と細気道上皮細胞においてもRAS遺伝子の指向性があることが確認された。また、特定のRAS変異に対して有効な化合物の探索も行い、複数の候補化合物を同定した。細胞株を用いた検討およびマウスへの移植モデルによる検討においてもそれらの化合物がRAS変異に対して有効であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ras遺伝子の研究は広く行われているが、組織ごとの発がんへの寄与の違いは未だ解明されていない生物学的な問題である。本研究では、複数種類の上皮細胞を用いて、Ras遺伝子の感受性を総合的に検討し、その機能的な違いを見出した。さらに活性化型Rasを標的とした分子標的型の抗がん剤は長い間、期待されているが未だに開発には至っていない。細胞種ごとの活性化型Rasの指向性を解明することで、選択的に働く下流経路や活性化型Rasを有する細胞の生存に必須な経路を明らかにし、しいてはRas関連分子に対する抗がん剤の開発につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we focused on the activated RAS mutations (KRAS, HRAS, NRAS), which have been detected at different mutation rates depending on cancer tissues, and analyzed the oncogenic process using a primary epithelial cell culture system. Analysis with lung epithelial cells confirmed the different oncogenic functions of RAS mutations between bronchial epithelial cells and small airway epithelial cells of the lung. We also searched for small molecules that are selectively effective against specific RAS mutations and identified several candidate compounds. These compounds were found to be effective against RAS mutations in the experiment with cell lines and in a mouse transplantation model.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Ras 上皮細胞 発がん 組織特異性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

がん遺伝子の活性化は、がん抑制遺伝子の不活化と並び、発がんという現象を理解する上で最も重要な要素の一つである。申請者のこれまでの研究過程で、導入するがん遺伝子を変えても、生じる腫瘍の形質には大きな影響を与えないのに対し、実験的に同じがん遺伝子を導入しても、発がんに至る頻度や期間が細胞の種類によって大きく異なることを見出している。つまり、組織・細胞ごとにそれぞれのがん遺伝子への感受性に差があるという仮説が立てられた。

RAS タンパク質は全てのがんを通して 15~20%の割合で活性化型変異が検出され、KRAS, NRAS, HRAS の3種類のファミリー遺伝子が存在する。下流経路のエフェクターに多少の差があるが、総じて同様の機能を有する。興味深いことに腫瘍の種類によって検出される RAS の活性化型変異の頻度は明確に異なり、膵管がん全体では KRAS の変異は 90%近く検出される。RAS 活性化型変異の腫瘍において、膀胱がんでは 60%が HRAS 変異であり、メラノーマでは 90%以上が NRAS 変異である。

ヒト RAS 遺伝子は 1980 年代初頭に単離されて以降、数え切れないほどの成果が報告されているが、なぜほぼ同一の機能を持つ遺伝子の指向性が組織ごとにこれほど差が出るかの理由は未だに解明されていない。1つの説明として、その発現が組織ごとに制御されており、RAS はどれも同じ機能であるが、組織特異的に発現している RAS に変異が入りがん化に寄与するためと考えられたが、それに対する反証も多く報告された。つまり、RAS の役割はそれぞれ異なり、細胞種や環境に応じて活性化型 RAS はがん遺伝子として選択的に機能する可能性がある。

#### 2. 研究の目的

活性化したがん遺伝子の中にはほぼ類似した機能を持つにもかかわらず、遺伝子変異の検出頻度が、がん種ごとに大きく偏るものがある。本研究では、異なった活性化型 Ras 遺伝子を様々な上皮細胞に導入し、形態的観察や発がん効率、遺伝子発現およびエピゲノムの観点から詳細に比較検討する。それにより、同一機能を持つとされる3種の活性化型 Ras 遺伝子の発がん過程での組織特異性および指向性の違いについて包括的な理解を目指す。

#### 3. 研究の方法

発がん効率の検証やその過程での遺伝子の発現変化を生体外で検証するために、ヒト重層上皮細胞を無血清培地化で Rho キナーゼ阻害剤と TGF シグナル阻害剤を添加することで長期間培養可能な手技の構築を行った。次に、ヒトパピローマウィルスのタンパク質である E6E7 を導入することで、細胞が不死化され継代を重ねても安定的に培養可能にした。Ras 遺伝子を導入した際に起きる Oncogene-induced senescence を防ぐために、myc 遺伝子を導入した細胞株を用意した。それらの細胞に各 RAS 変異遺伝子を導入し、発がんの効率を細胞増殖ならびにソフトウェアによって検証した。

また、特定の RAS 遺伝子に対する選択的殺細胞性を示す薬剤のスクリーニングを上記で作成した細胞ならびに細胞株で実施した。

#### 4. 研究成果

ヒト重層上皮細胞を無血清培地化で培養し、ヒトパピローマウィルスのタンパク質である E6E7 を導入することで、細胞の不死化を行った。どの上皮細胞においても E6E7 の導入によって細胞が不死化され継代を重ねても安定的に培養することが可能になった。段階的に発がんを誘導するために活性化型の myc 遺伝子の導入を行った。それにより、完全ながん化は起こしていないものの、悪性度の進んだ細胞を全ての上皮細胞において樹立することに成功した。次に、活性化変異を有する Kras および Hras 遺伝子の導入をそれぞれの細胞で行った。Kras と Hras の導入

によって、がん化の誘導効率が細胞ごとに異なることを明らかにした(図1)。さらに、発がんの過程で、活性化するRAS下流経路が異なっていることと、有効なRAS下流を対象とした抗がん剤に効能に違いがあることを見出した。

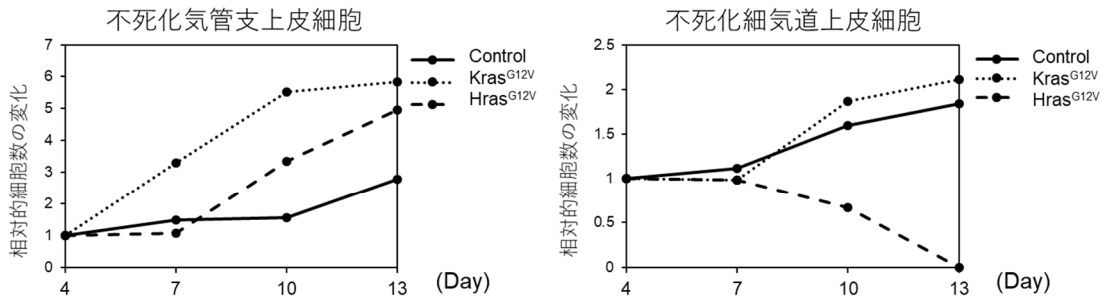


図1. 細胞の種類による活性化RAS変異の発がん効率の違い

さらに、特異的な遺伝子変異を持つ細胞株や、上記の方法でがん遺伝子を導入した細胞を用いて、遺伝子変異特異的に細胞を殺傷する薬剤の同定を試みている。これまでの結果として、Kras変異を持つがん細胞を選択的に殺傷する薬剤を1200以上の薬剤が含まれているライブラリーから同定した。それらはベンゾイミダゾール構造を持っている薬物群であり、それらとRas下流のタンパク質を阻害する分子標的薬の併用により、相乗的にKras変異を持つ肺がん細胞を殺傷することが可能なことも生体外ならびに生体内の解析によって明らかにした(図2)。また、Hippo経路の阻害剤として報告されている化合物がHippo経路の阻害とは異なる機能を発揮し、それによってKras特異的な殺細胞性に関わっていることを見出している。

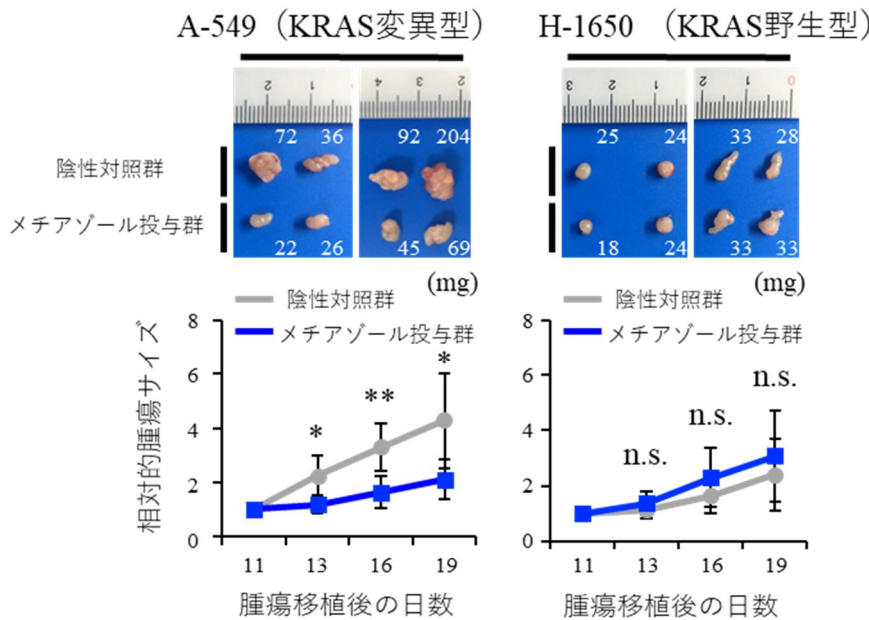


図2. KRAS変異細胞に対するメチアゾールの効果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shimomura I, Yamamoto Y, Ochiya T.	4. 巻 ;6(1)
2. 論文標題 Synthetic Lethality in Lung Cancer-From the Perspective of Cancer Genomics.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicines (Basel)	6. 最初と最後の頁 E38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicines6010038.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimomura I, Yokoi A, Kohama I, Kumazaki M, Tada Y, Tatsumi K, Ochiya T, Yamamoto Y.	4. 巻 451
2. 論文標題 Drug library screen reveals benzimidazole derivatives as selective cytotoxic agents for KRAS-mutant lung cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 11-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.03.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Prieto-Vila Marta, Ochiya Takahiro, Yamamoto Yusuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Single-cell qPCR Assay with Massively Parallel Microfluidic System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.21769/BioProtoc.3563	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sanchez Calle Anna, Yamamoto Tomofumi, Kawamura Yumi, Hironaka Mitsuhashi Ai, Ono Makiko, Tsuda Hitoshi, Shimomura Akihiko, Tamura Kenji, Takeshita Fumitaka, Ochiya Takahiro, Yamamoto Yusuke	4. 巻 in press
2. 論文標題 Long Non coding NR2F1 AS1 is Associated with Tumor Recurrence in Estrogen Receptor positive breast cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1002/1878-0261.12704	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Chikuda Junichiro, Otsuka Kurataka, Shimomura Iwao, Ito Kagenori, Miyazaki Hiroaki, Takahashi Ryou-u, Nagasaki Masahiro, Mukudai Yoshiki, Ochiya Takahiro, Shimane Toshikazu, Shirota Tatsuo, Yamamoto Yusuke	4. 巻 12
2. 論文標題 CD44s Induces miR-629-3p Expression in Association with Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 856 ~ 856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3390/cancers12040856	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kumazaki Minami, Shimomura Iwao, Kiyono Tohru, Ochiya Takahiro, Yamamoto Yusuke	4. 巻 525
2. 論文標題 Cell-type specific tumorigenesis with Ras oncogenes in human lung epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 483 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Prieto-Vila Marta, Usuba Wataru, Takahashi Ryou-u, Shimomura Iwao, Sasaki Hideo, Ochiya Takahiro, Yamamoto Yusuke	4. 巻 79
2. 論文標題 Single-Cell Analysis Reveals a Preexisting Drug-Resistant Subpopulation in the Luminal Breast Cancer Subtype	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4412 ~ 4425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Naito Yutaka, Yamamoto Yusuke, Sakamoto Naoya, Shimomura Iwao, Kogure Akiko, Kumazaki Minami, Yokoi Akira, Yashiro Masakazu, Kiyono Tohru, Yanagihara Kazuyoshi, Takahashi Ryou-u, Hirakawa Kosei, Yasui Wataru, Ochiya Takahiro	4. 巻 38
2. 論文標題 Cancer extracellular vesicles contribute to stromal heterogeneity by inducing chemokines in cancer-associated fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5566 ~ 5579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41388-019-0832-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Iwao Shimomura, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Takahiro Ochiya and Yusuke Yamamoto
2. 発表標題 Implication of targeting YAP1 in KRAS-mutant lung cancer cells
3. 学会等名 AACR-The Hippo Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iwao Shimomura, Yusuke Yamamoto, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi and Takahiro Ochiya
2. 発表標題 A Synthetic Lethal Approach Using Benzimidazole Derivatives for K-Ras Mutant Lung Cancer Cells
3. 学会等名 Sixth JCA-AACR Special Joint Conference on the Latest Advances in Lung Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minami Kumazaki, Yusuke Yamamoto
2. 発表標題 Context-dependent transformation with activated Ras isoforms in human normal epithelial cells
3. 学会等名 AACR-Targeting Ras-driven Cancers
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊崎実南、下村巖、落谷孝広、山本雄介
2. 発表標題 ヒト正常上皮細胞における活性化型Rasの機能解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下村巖、山本雄介、多田裕司、巽浩一郎、落谷孝広
2. 発表標題 K-Ras変異肺がん細胞に対するYAP1阻害剤の抗腫瘍活性の検討
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊崎 実南、落谷 孝広、山本 雄介
2. 発表標題 ヒト正常上皮細胞を用いた活性化型Rasアイソフォームの機能解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 下村 巖、横井 暁、山本 雄介、多田 裕司、巽 浩一郎、落谷 孝広
2. 発表標題 既存薬ライブラリーを用いた、活性型Ras変異がんを標的とする分子標的治療の探索
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本雄介
2. 発表標題 組織幹細胞培養の応用による前がん病変の発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iwao Shimomura, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi, Takahiro Ochiya, Yusuke Yamamoto
2. 発表標題 Small Molecule-Based Approaches in KRAS-Mutant Lung Cancer Cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本雄介
2. 発表標題 腫瘍内不均一性から紐解く薬剤耐性能の獲得メカニズム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Yusuke Yamamoto, Anna Sanchez Calle, and Takahiro Ochiya	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature Singapore Pte Ltd	5. 総ページ数 18
3. 書名 Handbook of Single Cell Technologies	

1. 著者名 Yamamoto Y, Kohama and Ochiya T	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Wiley-Blackwell	5. 総ページ数 12
3. 書名 The 6th edition of The Liver-Biology and Pathobiology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----