

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02819

研究課題名(和文) ドライバー癌遺伝子により誘導される細胞老化(OIS)を利用した肺癌治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutics that utilize driver oncogene-induced senescence

研究代表者

佐藤 光夫 (Sato, Mitsuo)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・教授

研究者番号：70467281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,450,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は増殖を停止させる癌遺伝子誘導細胞老化(oncogene-induced senescence; OIS)という現象に基づく変異KRASの治療開発を目的とした。OIS誘導標的遺伝子の同定を目的として、変異KRASを制御下に発現する不死化正常気管支上皮細胞におけるプール型shRNAライブラリースクリーニングを実施した。スクリーニングから遺伝子Xを有望な標的として同定した。続いて、コンパウンドライブラリーによるハイスループットスクリーニングから遺伝子Xの阻害候補コンパウンドを複数特定した。しかし、阻害効果を評価するアッセイ系の確立が困難であったため継続を一旦中断とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変異KRASは固形癌において最も高頻度なドライバー癌遺伝子である。ドライバー癌遺伝子は癌細胞の増殖や生存に必須とされ、有効な治療標的となる。本課題は、未だ高い効果を示す治療が開発されていない変異KRAS肺癌の治療開発に取り組んだ。成果として治療標的候補遺伝子Xを特定し、同遺伝子の阻害作用を示すコンパウンドも特定した。変異KRAS癌の治療開発に役立つ知見を得たと考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a treatment for mutant KRAS based on the phenomenon of oncogene-induced cellular senescence (OIS) that inhibits proliferation. Using an immortalized normal human bronchial epithelial cell line that expresses mutant KRAS under the control, we performed a pooled shRNA library screening. Gene X was identified as a promising target, followed by high-throughput screening with a compound library to identify multiple candidate compounds that inhibit gene X. However, we stopped the project because of difficulty in developing a further assay system to evaluate inhibitory efficacy of identified compound.

研究分野：肺癌

キーワード：変異KRAS 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

肺癌の治療はドライバー遺伝子を標的とする分子標的治療薬の登場により大きな進歩を遂げた。しかし、その成績は未だ不十分であり、より有効な治療アプローチの開発が急務である。ドライバー癌遺伝子の一つ変異 *KRAS* は肺腺癌の 20%程度と高頻度に認められる。しかし、その治療開発は *EGFR* などに比べ大きく遅れている。これは、変異 *KRAS* の薬物的な遮断が困難なためである[1]。また、*EGFR* 変異、*ALK* 融合変異を標的とするこれまでの肺癌の分子標的治療は、ドライバー癌遺伝子の活性化に起因する癌化シグナルの遮断を目標としてきた。しかし、それらは必ず耐性化を来すため、別の治療開発が必要である。

代表者は、肺癌の発癌機序の解明のために、気管支上皮細胞の正常モデルである不死化正常気管支上皮細胞 HBEC 実験系を開発した[2, 3]。HBEC は世界で利用され応募者の共著論文を含め *Nature*, *JCI* など 30 報以上の一流誌論文で使用されてきた[4]。代表者は変異 *KRAS* を HBEC に導入すると、悪性度を増強するにもかかわらず細胞分裂を停止に導くことを見出した。この一見矛盾する現象は、ドライバー癌遺伝子による異常な癌化シグナルが引き起こす細胞老化であり増殖停止を伴う。これは、正常細胞が癌化を防ぐ機構の一つであり癌遺伝子誘導細胞老化 (oncogene-induced senescence; OIS) と呼ばれる。完全に癌化に至った細胞は増殖し続けているため、別の遺伝子異常の獲得等によって OIS 機能を喪失した細胞がクローン増殖していると推測される。

以上より、ドライバー癌遺伝子を持つ肺癌は OIS 機能喪失の原因となる遺伝子異常を持つと考えた。さらに、それらを標的としドライバー癌遺伝子の遮断ではなく、OIS という細胞が本来持つセーフティネットの再活性化を活用する治療の開発を着想した。

その実現のために、まず、HBEC をモデルとし機能的スクリーニングの表現型を変異 *KRAS* による OIS の抑制作用とするプール shRNA スクリーニングを実施した。結果において、特に小分子化合物の標的となる可能性を持つ *GRK4* に注目した。

2. 研究の目的

変異 *KRAS* 肺癌の OIS 誘導治療開発

3. 研究の方法

3.1. 細胞培養

肺癌細胞株は American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。テキサス大学 Minna 研究室にて樹立された不死化正常気管支上皮細胞株 HBEC3 は Minna 博士の好意により受領を受けた。ドキシサイクリン (DOX) 添加により変異 *KRAS*V12 を発現する HBEC3-RIN2 細胞株は HBEC3 から ViraPower™ HiPerform™ T-REx™ Gateway™ Vector Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat#A11144)を用いて作成した。

3.2. プール shRNA ライブラリースクリーニング

DECIPHER library human Module 1 および Module 2 (#DHPAC-M1-P) was obtained from Collecta Inc. (Mountain View, CA, USA)をライブラリーとして使用した。ウイルスパッケージは Packaging Plasmid Mix (Collecta Inc.)を 293FT にトランスフェクションして実施した。HBEC3-RIN2 細胞にウイルスを感染させ、引き続いてドキシサイクリン添加により変異 *KRAS* を発現させた。変異 *KRAS* 発現前をコントロールとした変異 *KRAS* 発現後の個々の shRNA の定量は次世代シーケンサーを用いた個々の shRNA 固有のバーコードのシークエンスにより実施した。

3. 3. 肺癌細胞株のマウス異種移植

GRK4shRNAにより安定ノックダウンA549肺癌細胞を樹立し、ヌードマウス（6~8週齢、雌）の側腹部に100万個移植した。

3.4 ウェスタンブロット

一次抗体として抗GRK4抗体（Santa Cruz, sc-376891）を1:1000となるよう5%スキムミルクで希釈し使用した。2次抗体としてマウスモノクローナル抗体（GE Healthcare, Code No.NA931-1ML）1:2000で希釈し、使用した。マウスActin抗体（SIGMA, Cat#A2228）をタンパクローディングのコントロールとした。

3.5.リアルタイムPCR

RNA抽出にはRNeasy®Mini Kit (250) (QIAGEN, Cat#74106)を使用した。cDNA合成にはSuperScript™IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, ThermoFisherScientific, Cat#18090010)のキットを使用した。Power Up SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Cat. # A25742)を使用し Step One™ Real-Time PCR System でリアルタイムPCRを行った。

3.6. 統計

コントロールとの比較をt検定にて実施した。

4. 研究成果

4.1. プールshRNAライブラリースクリーニングによる治療標的遺伝子Xの特定

HBEC3-RIN2細胞において変異KRAS発現によって、次世代シーケンスのリードshRNA数が減少した遺伝子は同遺伝子のノックダウンが変異KRASによるOISを増強させ、結果として細胞増殖が抑制された可能性が高いと推測した。そのような遺伝子群をOISバイパス遺伝子とした。それらの中で、特に創薬標的としての可能性を持つGRK4に着目した。GRK4のタンパク発現をウェスタンブロットにて評価したところ、正常細胞に比較し、大部分の肺癌細胞における発現増加を認めた(図1A)。この結果はGRK4の治療標的としての可能性を示唆した。さらにA549肺癌細胞におけるノックダウン実験はin vitroおよびin vivoにおける増殖抑制を示した(図1B)。

4.2.ハイスループットスクリーニングによるGRK4標的コンパウンドの特定

ラクオリア創薬株式会社との共同研究にて構造多様性指向および遺伝子機能に特化した2種類のコンパウンドライブラリー（それぞれ5万化合物を含み合計10万化合物）によるハイスループットスクリーニングを実施した。GRK4の酵素活性を阻害する有望な化合物をシーズ候補化合物を複数特定した。

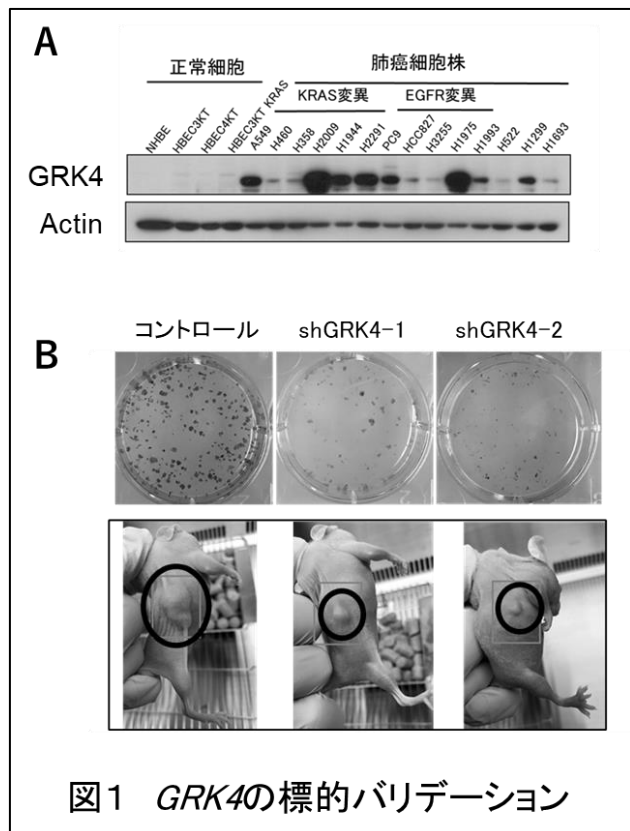


図1 GRK4の標的バリデーション

シーズ候補化合物の特異性を確認するために、GRK4に近い機能を持つ酵素に対する阻害活性を確認した。同定化合物間に特異性の違いがあることを確認した(図2)。肺癌細胞株に対する増殖抑制効果の評価したところ、化合物の幾つかは増殖抑制を示した(図3)。

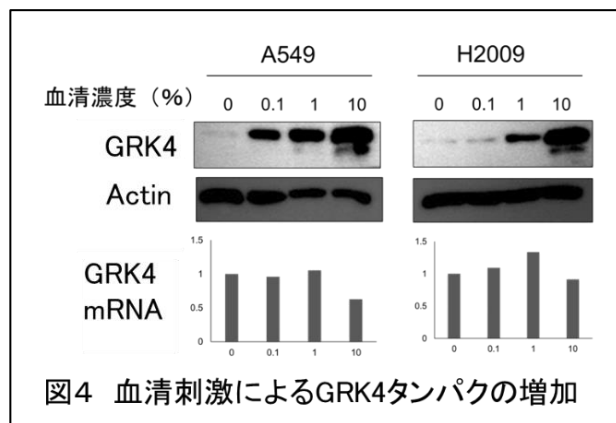
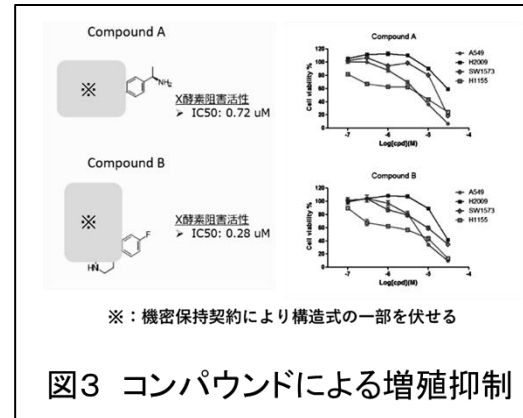
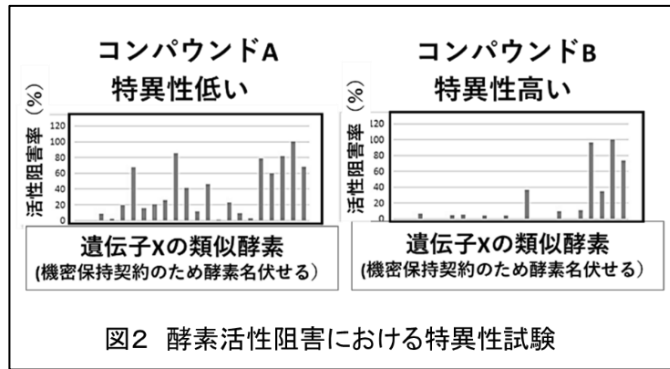
また、GRK4の発現制御機構を解析した。GRK4は肺癌細胞において、血清による増殖刺激により転写レベルには影響を与えず、翻訳レベルの急峻な発現増加を示した(図4)。代表的な癌遺伝子の一つMYCは癌細胞において血清刺激により転写、翻訳の両レベルにおいて発現が増加することが報告されている(Oncogene 1998; 17: 769-780)。したがって、GRK4もMYCと同様に癌細胞の悪性形質において中心的な役割を果たすことが推察され、GRK4が癌の治療標的として有望であることが示唆された。しかしながら、その後、コンパウンドによるGRK4阻害効果の確認アッセイの確立が困難であったため、継続を一旦中断とした。

まとめ

1. プール shRNA ライブラリースクリーニングから OIS 誘導標的として有望な遺伝子 X を特定した。
2. GRK4 は、肺癌細胞株において正常コントロールと比べ高発現していた。
3. GRK4 のノックダウンは肺癌細胞株の増殖を阻害した。
4. GRK4 阻害コンパウンドを特定し、さらに肺癌細胞株に対する増殖抑制効果を確認した。

参考文献

- [1] H. Singh, D.L. Longo, B.A. Chabner, Improving Prospects for Targeting RAS, J Clin Oncol 33 (2015) 3650-3659.
- [2] M. Sato, J.E. Larsen, W. Lee, H. Sun, D.S. Shames, M.P. Dalvi, R.D. Ramirez, H. Tang, J.M. DiMaio, B. Gao, Y. Xie, Wistuba, II, A.F. Gazdar, J.W. Shay, J.D. Minna, Human lung epithelial cells progressed to malignancy through specific oncogenic manipulations, Mol Cancer Res 11 (2013) 638-650.
- [3] M. Sato, M.B. Vaughan, L. Girard, M. Peyton, W. Lee, D.S. Shames, R.D. Ramirez, N. Sunaga, A.F. Gazdar, J.W. Shay, J.D. Minna, Multiple oncogenic changes (K-RAS(V12), p53 knockdown, mutant EGFRs, p16 bypass, telomerase) are not sufficient to confer a full malignant phenotype on human bronchial epithelial cells, Cancer Res 66 (2006) 2116-2128.
- [4] M. Sato, J.W. Shay, J.D. Minna, Immortalized normal human lung epithelial cell models for studying lung cancer biology, Respir Investig 58 (2020) 344-354.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mitsuo Sato	4. 巻 11(Suppl 9)
2. 論文標題 Chemotherapy Induced Changes to Fibrin Clots Properties in Lung Cancer: Is It Favorable?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thorac Dis .	6. 最初と最後の頁 S1126-S1128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2019.04	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 -
1. 著者名 Mitsuo Sato	4. 巻 7(Suppl 4)
2. 論文標題 Specific copy number changes as potential predictive markers for adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transl Lung Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 S346-S348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tlcr.2018.11.04	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 -
1. 著者名 Goto Daiki, Komeda Kazuki, Uwatoko Natsuki, Nakashima Moeka, Koike Mayu, Kawai Kaho, Kodama Yuta, Miyazawa Ayako, Tanaka Ichidai, Hase Tetsunari, Morise Masahiro, Hasegawa Yoshinori, Kawabe Tsutomu, Sato Mitsuo	4. 巻 38
2. 論文標題 <i>UHRF1</i>, a Regulator of Methylation, as a Diagnostic and Prognostic Marker for Lung Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Investigation	6. 最初と最後の頁 240 ~ 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07357907.2020.1747483	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 -
1. 著者名 Sato Mitsuo	4. 巻 19
2. 論文標題 Phenotypic screening using large-scale genomic libraries to identify drug targets for the treatment of cancer (Review)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3617-3626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.11512	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 -

1. 著者名 Sato Mitsuo, Shay Jerry W., Minna John D.	4. 巻 58
2. 論文標題 Immortalized normal human lung epithelial cell models for studying lung cancer biology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 344 ~ 354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2020.04.005	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 Muraki Nao, Yamada Mizuki, Doki Hinako, Nakai Riho, Komeda Kazuki, Goto Daiki, Kawabe Nozomi, Matsuoka Kohei, Matsushima Miyoko, Kawabe Tsutomu, Tanaka Ichidai, Morise Masahiro, Shay Jerry W., Minna John D., Sato Mitsuo	4. 巻 414
2. 論文標題 Resistance to mutant KRAS-induced senescence in an hTERT/Cdk4-immortalized normal human bronchial epithelial cell line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 113053 ~ 113053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2022.113053	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 Taki Shunichi, Matsuoka Kohei, Nishinaga Yuko, Takahashi Kazuomi, Yasui Hiroto, Koike Chiaki, Shimizu Misae, Sato Mitsuo, Sato Kazuhide	4. 巻 9
2. 論文標題 Spatiotemporal depletion of tumor-associated immune checkpoint PD-L1 with near-infrared photoimmunotherapy promotes antitumor immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e003036 ~ e003036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2021-003036	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Matsuoka Kohei, Sato Mitsuo, Sato Kazuhide	4. 巻 13
2. 論文標題 Hurdles for the wide implementation of photoimmunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 1427 ~ 1438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2217/imt-2021-0241	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kodama Yuta, Tanaka Ichidai, Sato Tatsuhiko, Hori Kazumi, Gen Soei, Morise Masahiro, Matsubara Daisuke, Sato Mitsuo, Sekido Yoshitaka, Hashimoto Naozumi	4. 巻 112
2. 論文標題 Oxytocin receptor is a promising therapeutic target of malignant mesothelioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3520 ~ 3532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15025	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	長谷 哲成 (Hase Tetsunari) (30621635)	名古屋大学・医学部附属病院・助教 (13901)	
研究分担者	湯川 博 (Yukawa Hiroshi) (30634646)	名古屋大学・未来社会創造機構・特任准教授 (13901)	
研究分担者	田中 一大 (Tanaka Ichidai) (40809810)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	芳川 豊史 (Yoshikawa Toyofumi) (00452334)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	川口 晃司 (Kawaguchi Koji) (10402611)	名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	川井 久美 (Kawai Kumi) (50362231)	名古屋大学・医学系研究科（保健）・准教授 (13901)	
研究分担者	横井 香平 (Yokoi Kohei) (60378007)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関