

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08546

研究課題名(和文)新規癌治療ターゲットとしてのベータアレスチン経路の可能性

研究課題名(英文) Potential roles of beta-arrestin pathway in colorectal cancer

研究代表者

坂本 渉 (Sakamoto, Wataru)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40622337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アレスチン1/2はG蛋白共役受容体(GPCR)に結合し、脱感作を起こすと考えられていたが、近年アレスチン自身が固有のシグナル伝達を担い、PI3K, AKT, ERKシグナルの活性化を起こすことが示された。本研究では、アレスチンを特異的に刺激する実験系確立を目指し、アレスチン1/2の臨床的意義を検討した。アレスチン1/2を特異的に活性化できる細胞株は効果的に確立できていない。一方、複数の大腸癌コホートを用いて、アレスチン1/2発現とドライバー変異との関連や臨床的意義を明らかにした。特にKRAS変異型大腸癌やCMS3大腸癌では、アレスチン2の発現が有意に低下しているという新規の知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞において重要なシグナル伝達を媒介すると思われるアレスチンについて、その意義を解明することは、癌の生物学的機構の理解を深めることだけでなく、将来の癌治療にも寄与し得ると考える。特に大腸癌におけるドライバー変異や分子サブタイプとの関連が大腸癌治療の個別化への端緒となることを期待する。

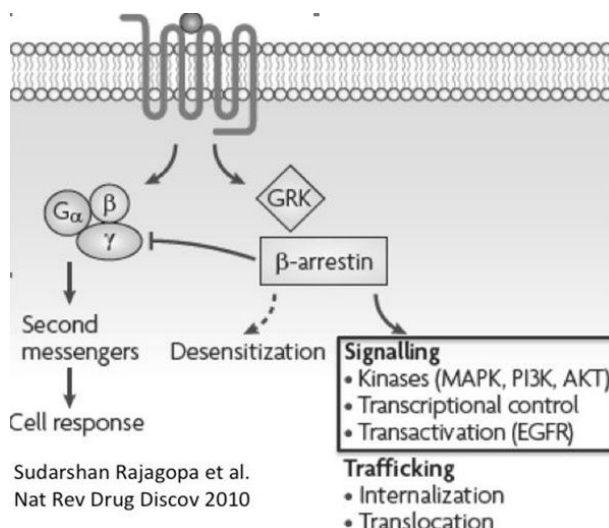
研究成果の概要(英文)：-arrestins were first thought to only regulate desensitization and internalization of G protein coupled receptors (GPCR). It has recently been demonstrated that -arrestins can activate PI3K, AKT and ERK signaling, independent of GPCR. In the present study, although cell models of -arrestin 1/2-specific activation remain to be established in our laboratory, we addressed the clinical and genomic roles of -arrestin 1/2 in colorectal cancer. We found that KRAS-mutant tumors as well as CMS3 tumors demonstrated significantly decreased levels of -arrestin 2 expression in multiple cohorts of colorectal cancer.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 -arrestin

1. 研究開始当初の背景

G 蛋白共役受容体 (GPCR) は細胞膜受容体としては最大のスーパーファミリーを形成し、ほぼすべての生理学的機能に関与する受容体である。リガンドと結合、活性化した GPCR は共役する G タンパク質 (Gq/11, Gs, Gi) を介して細胞内にシグナルを伝達し、その後 G 蛋白質共役受容体キナーゼ (GPK) によりリン酸化され、アレスチン 1/2 と結合することで desensitize/internalize されていくことが知られていた。ごく近年の研究により、このアレスチン 1/2 自身も固有のシグナル伝達を担い、PI3K, AKT, ERK カスケードなどの活性化を引き起こすことが明らかとなり注目を集めている (右図)。

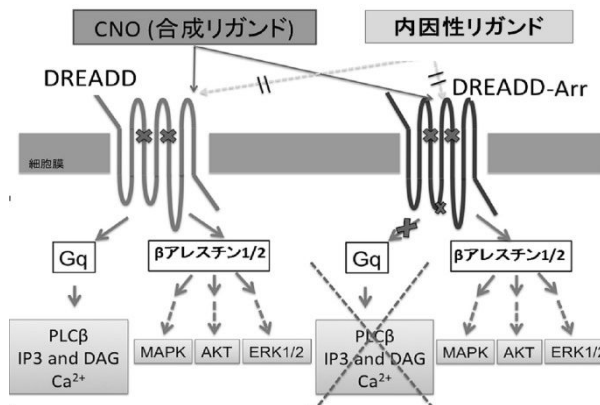


2012年に申請者が所属していた研究室において、新たな変異 GPCR が開発された。このレセプター (arrestin-biased DREADD [designer receptors exclusively activated by designer drug], 以下 DREADD-Arr) は、内在性リガンドには全く反応せず、薬理的に不活性である Clozapine-N-Oxide (CNO) にも反応し、G タンパク質とは独立してアレスチン経路のみを刺激できる点にある。つまりこの DREADD-Arr を用いることで、CNO 存在下で効果的にアレスチン経路のみを刺激することができる (下図)。

このアレスチン経路はごく近年、癌の発生から薬剤耐性の獲得まで幅広く癌と関わっていることが示唆されるようになった。例えば、マウス骨髄性白血病モデル、マウス大腸腫瘍モデルにおいて、腫瘍の発生にアレスチン経路が Wnt/ catenin signaling を介して関わるという報告 (Fereshteh M et al. PNAS 2012, Bonnans C et al. PNAS 2012) や、アレスチンが MDR1 の発現を調節して抗癌剤耐性に関わっているという報告 (Jing X et al. Int J Clin Exp Pathol, 2015)、乳癌細胞においてアレスチンが直接 LPA-induced migration を調節するという報告 (Alemayehu M et al. PLoS One, 2013) などである。

2. 研究の目的

近年の研究によりアレスチン経路は GPCR 下流の経路として、G 蛋白質とは独立して、ERK, AKT といった増殖系のシグナル活性化に寄与することが明らかになってきている。これはアレスチン経路が癌の進展に関与する可能性を強く示唆している。本研究は、上述の DREADD-Arr を用いた刺激モデルを用いて、特に大腸癌におけるアレスチン経路の機能的意義を検索することを目的としている。さらに大腸癌におけるアレスチン経路の臨床的意義の解析をもうひとつの目的としている。



3. 研究の方法

本研究手法は下記の2点が主軸である (詳細は研究成果の欄に述べる)。

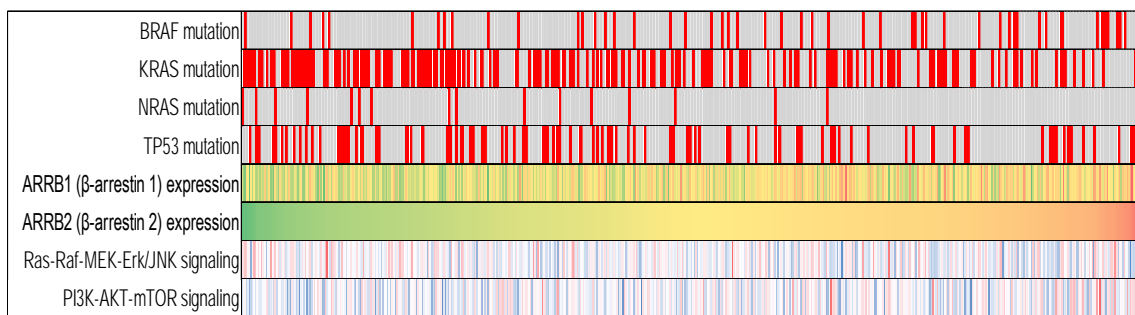
- 大腸癌細胞株を用いた DREADD-Arr の導入および安定細胞株の作製および phenotype の検討
- 大腸癌サンプルにおけるアレスチン関連遺伝子の臨床的意義の検討

4. 研究成果

当初は DREADD-Arr の導入と安定細胞株の確立、その機能的検討を主体として進める予定であった。しかしながら、当研究者の旧所属先からの上述のコンストラクト入手に関しては順調であったのに対し、細胞株への導入など、分子生物学的な諸所のステップにおいて、効果的にその機能の評価ができるような実験系を確立するに至らなかった。

上記の経緯から、研究期間の後半からは、第2のテーマであった大腸癌における臨床的、ゲノム医学的な意義の検討に主眼を移して解析を進めることとした。

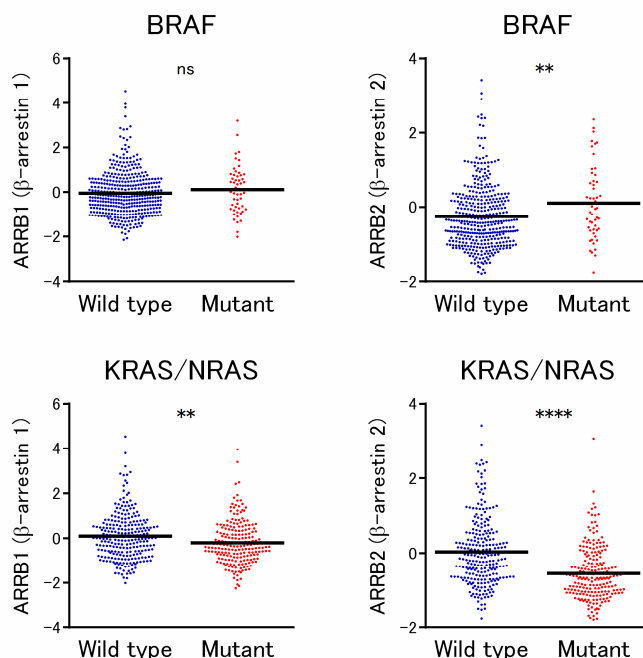
下図ヒートマップに示すように アレスチン遺伝子、つまり ARR1 (β -arrestin 1)、ARR2 (β -arrestin 2) 発現と、大腸癌におけるゲノム異常 (BRAF 変異、KRAS/NRAS 変異、TP53 変異)、関連するシグナル活性化 (RAS-RAF-MEK-ERK/JNK : 計 26 遺伝子、および PI3K-AKT-mTOR : 17 遺伝子) との関連について、総計 500 例超のマルチオミクスデータを用いて検討した。



β -arrestin は G タンパク質と独立した固有のシグナル伝達を担っており、PI3K, AKT, ERK などの癌細胞における増殖促進的なシグナルカスケード活性化を起こし得ることから、 β -arrestin 1/2 遺伝子と RAS-RAF-MEK-ERK/JNK、PI3K-AKT-mTOR の両シグナルとの関連を想定し検討を行った。しかしそれらが有意に相関するという結果は得られなかった。そこで、上述のシグナルの上流である BRAF/KRAS/NRAS 変異と β -arrestin 1/2 遺伝子との関連について詳細に検討することとした。

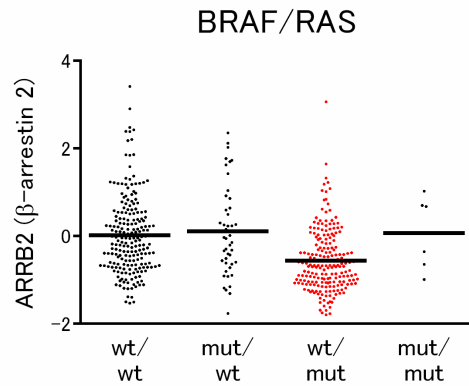
右図は RNA シークエンスによる ARR1/ARR2 遺伝子 (β -arrestin 1/2 をコードする) 発現をプロットしたものであるが、BRAF 変異症例において ARR2 は有意に高値であり、逆に RAS (KRAS/NRAS) 変異症例においては ARR1 (β -arrestin 1)、ARR2 (β -arrestin 2) いずれも低値を示し、特に後者においてのその差が著明である。

BRAF および RAS 変異は、大腸癌において通常、排他的に存在することを考慮すると、ARR2 (β -arrestin 2) は BRAF 変異で高値というより、RAS 変異症例で低値であるということが出来る。次ページ右図のよう

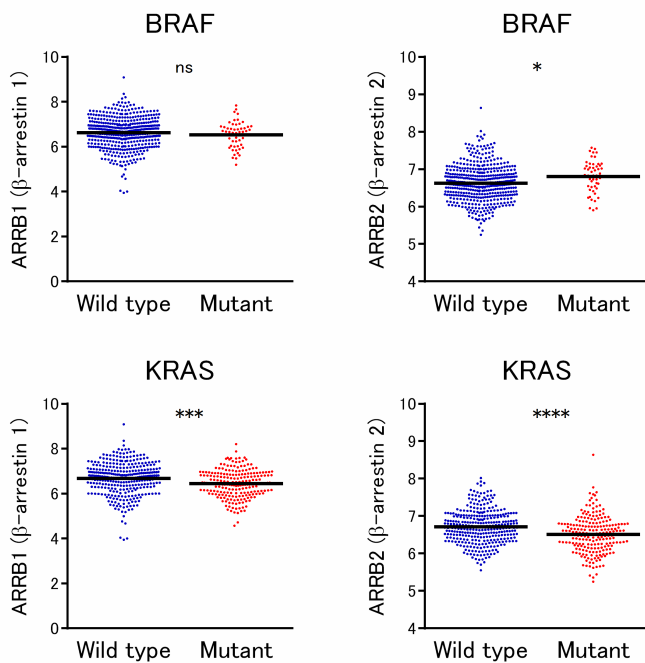


に、BRAF/RAS について 4 群で解析すると、BRAF 野生型/RAS 変異型症例では他群に比較して ARRB2 (β -arrestin 2) が有意に低値であることが明らかである。

上記の結果は過去に報告がなく、新規の知見と思われるが、網羅的解析における False discovery が高頻度に生じ得ることから、独立したデータを用いて上記結果の再現性を検証することとした。



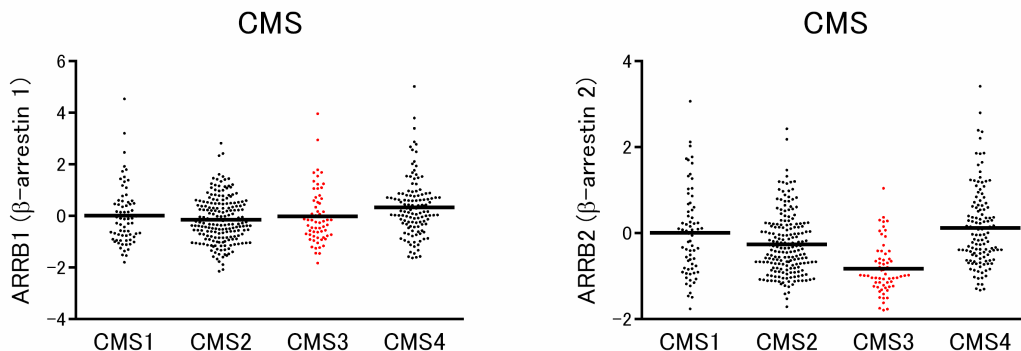
下図は 500 例超のマイクロアレイに基づく大腸癌コホートの結果であるが、上述の結果が極めて再現性よく検証されることとなった。すなわち、ARRB2 (β -arrestin 2) は KRAS 野生型に対し KRAS 変異症例で有意に低値を示す。ARRB1 (β -arrestin 1) でも類似の傾向を示すがその差は軽度である。



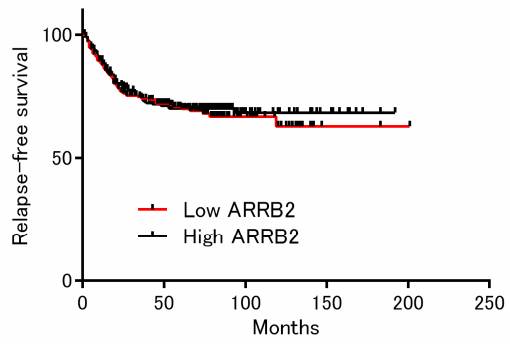
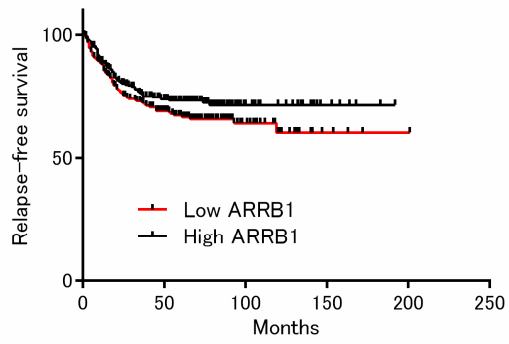
さらに大腸癌におけるトランスクリプトミクスを用いた分子サブタイプ分類として、近年最も確立した Consensus Molecular Subtype (CMS1-4) (Guinney et al. Nat Med 2015) との関連についても検討を行った。

下図に示すように、ARRB1 (β -arrestin 1) は CMS 各群で有意な変化はみられない。しかし ARRB2 (β -arrestin 2) については、CMS3 において特異的に、有意に低値を示すことがわかる。

CMS の各群はそれぞれ、CMS1:MSI_Immune (免疫細胞浸潤、マイクロサテライト不安定性、BRAF 変異、再発後の予後不良)、CMS2:Canonical (SCNA High、WNT・MYC 活性化)、CMS3:Metabolic (KRAS 変異、SCNA low、代謝異常)、CMS4:Mesenchymal (SCNA High、間質活性化、TGF 活性化、血管新生、予後不良) とされる (Nat Med 2015)。従って、RAS 変異・CMS3 症例において、ARRB2 (β -arrestin 2) 低下が特徴的に観察されることが明らかとなった。



さらに、ARRB1 (-arrestin 1)、ARRB2 (-arrestin 2) 発現が大腸癌の予後に及ぼす影響を検討した。しかしながら、下図のように、いずれも有意な relapse free survival との関連は見られなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡山洋和, 遠藤英成, 加瀬晃志, 山内直人, 松本拓朗, 早瀬傑, 藤田正太郎, 遠藤久仁, 坂本渉, 齋藤元伸, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 三村耕作, 大木進司, 河野浩二.
2. 発表標題 Chromosomal instability causes deletion of tumor suppressor genes in colorectal cancer
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Okayama H, Endo E, Ujiie D, Kikuchi T, Saito M, Saze Z, Momma T, Mimura K, Ohki S, Kono K.
2. 発表標題 Multi-omics approaches towards precision medicine in colorectal cancer.
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

〔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	岡山 洋和 (Okayama Hi rokazu) (20583397)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	

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
---------	---------