

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15597

研究課題名（和文）膵癌転写調節領域を指標にした抗がん剤耐性に関与するマスター分子の探索

研究課題名（英文）Investigation of master molecules involved in transcriptional regulatory region of pancreatic anticancer drug resistance

研究代表者

田中 貴子（Tanaka, Takako）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：50866415

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）：膵癌細胞、抗癌剤耐性に関与する機能性RNA分子の探索を行った。KRAS G12Cの変異を有する膵癌細胞株MIAPaCa-2へKRAS inhibitorを導入しソトラスブを投与すると、投与前に比べ12種類のmicroRNAの発現上昇が確認された。膵癌機能性RNAプロファイルによる解析から、miR-1224-5p、miR-296-5pを薬剤暴露初期に発現が誘導される機能性RNA分子と仮定し、現在それぞれのmicroRNAの膵癌細胞株を用いた機能解析や制御する分子の探索などを行いながら、マスター分子の分子機構について研究を進めている最中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、癌のサブタイプに応じた治療最適化が進められているが、膵癌治療において最も重要な役割を占めているのは化学療法である。治療開始直後に有効だった薬剤が治療経過とともに効果を失う癌細胞の治療抵抗性の獲得に対し、早急に新しい治療法を開発する必要がある。

本研究ではこれまでに作成した「膵癌・機能性RNA発現プロファイル」をもとに、抗癌剤暴露時のSE情報を統合することで、抗癌剤耐性に関与する「マスター分子」の同定を進めている。「マスター分子」を同定することで、癌細胞の抗癌剤治療抵抗性を克服する新しい治療法の開発に繋げることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We searched for functional RNA molecules involved in pancreatic cancer cells and anti-cancer drug resistance. 12 microRNAs were upregulated after treatment of MIAPaCa-2, a pancreatic cancer cell line with KRAS G12C mutation, with Sotrasib by introducing a KRAS inhibitor. Based on the analysis of pancreatic cancer functional RNA profiles, we hypothesized that miR-1224-5p and miR-296-5p are functional RNA molecules whose expression is induced early after drug exposure. We are currently investigating the molecular mechanism of the master molecule by analyzing the function of each microRNA in pancreatic cancer cell lines and searching for regulatory molecules.

研究分野：消化器外科関連

キーワード：スーパーエンハンサー 膵癌 マスター分子

## 1. 研究開始当初の背景

治療の個別化が様々な癌種で進められているが、膵癌では未だ確立されていない。癌細胞の命運を左右する極めて重要な場面において、ゲノム上で「スーパーエンハンサー」という強力な転写制御領域が形成され、癌細胞の運命を決定する機能性分子を発現・誘導するという概念が提唱された。この概念を抗癌剤耐性癌細胞に適応すると、癌細胞が抗癌剤に暴露された際に、癌細胞は自らの生存を賭けてSEを形成し、抗癌剤耐性に関与する機能性RNA分子を発現すると考えた。申請者が作成してきた「膵癌・機能性RNA発現プロファイル」と、抗癌剤暴露時のSE情報を統合することで、抗癌剤耐性に関与する「マスター分子」を同定する事が可能である。近年、癌のサブタイプに応じた治療最適化が進められているが、膵癌においては未だ確立されておらず、現在もなお、膵癌治療において最も重要な役割を占めているのは化学療法である。治療開始直後に有効だった薬剤が、癌細胞の治療抵抗性の獲得によって、治療経過とともに効果を失うことがしばしばある。このような治療抵抗性を獲得した癌細胞に対して、早急に新しい治療法を開発する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、抗癌剤耐性に関与する機能性RNA分子の時間的階層性を探索し、その中から「マスター分子」を特定し、その役割を検討する。「マスター分子」を同定することで、癌細胞の抗癌剤治療抵抗性を克服する新しい治療法の開発に繋げることが期待される。

## 2. 研究の方法

- ① 膵癌細胞、薬剤暴露時に形成されるスーパーエンハンサーの同定。  
膵癌細胞に対して抗癌剤（ゲムシタピン、S-1、シスプラチンなど）を投与し、時間経過に伴い形成されるスーパーエンハンサー領域を検出する。スーパーエンハンサーの検出は免疫沈降法（Chromatin immunoprecipitation: ChIP）と次世代シーケンサーを組み合わせたChIP-sequenceにより行う。ChIPに用いる抗体として、H3K27AC/BRD4/MED1などを予定している。またゲノム上のオープンクロマチン領域の情報を得るための解析法として、ATAC（Assay for Transposase-Accessible Chromatin）シーケンス法がある。次世代シーケンスと組み合わせることで転写が活性化されている場所とその頻度を調べる事が可能である。ChIP-sequenceと並行してATACシーケンスによる解析も行う。
- ② 膵癌細胞、薬剤暴露初期に発現が誘導される機能性RNA分子の探索。  
①と同様に膵癌細胞に対して抗癌剤を投与し、経時間的にRNAを回収し、蛋白コード遺伝子およびマイクロRNAの発現プロファイルを作成する。未処理の細胞と比較して、抗癌剤投与時に発現変動する機能性RNA分子の情報を収集する。蛋白コード遺伝子の発現解析にはアレイ解析法を採用し、マイクロRNAの発現解析にはRNAシーケンスにより行う。
- ③ 膵癌細胞、抗癌剤耐性に関与する機能性RNA分子の選択。  
①で探索した薬剤投与に伴い形成されるスーパーエンハンサー領域またはオープンクロマチン領域の情報と、②で得られた抗癌剤投与時に発現が誘導される機能性RNA分子情報、更に申請者が作成している膵癌抗癌剤耐性・機能性RNA発現プロファイルの情報を融合させることで、膵癌細胞の抗癌剤投与時に発現する機能性RNA分子の時間的階層性を明らかにする。
- ④ 抗癌剤耐性を解除する戦略の考案と実証。  
③の解析により、抗癌剤耐性に関与する機能性RNA分子の時間的階層性の探索から「マスター分子」を選択し、抗癌剤耐性に関与するか否か検討する。方法は、申請者が作成したゲムシタピン耐性細胞やシスプラチン耐性細胞から「マスター分子」をゲノム編集技術（CRISPR-Cas9）により機能を消失させ、耐性が解除されるか検討を行う。抗癌剤耐性に関与する「マスター分子」が見つければ、in silico解析によるドッキング・シミュレーションにより「マスター分子」に対する低分子化合物の探索を行う。

## 4. 研究成果

まず、手技的に確立している膵癌細胞、抗癌剤耐性に関与する機能性RNA分子の探索を行った。膵癌細胞株は当科で所有しているPANC-1、MIAPaCa-2を用いた。マスター分子の機能消失による耐性解除は薬剤の50%阻害濃度(IC50)の測定により証明する計画であったため、前実験として、膵癌で一般的に使用されるゲムシタピンのIC50を測定したが、ゲムシタピン単剤の阻害効果では50%まで細胞増殖が阻害されず、IC50を測定することはできなかった。代替の抗癌剤として、膵癌では近年KRAS G12C変異に対する阻害剤であるソトラシブの臨床試験が進行中であったため、ソトラシブの耐性に関する分子の探索に移った。KRAS G12Cの変異を有する膵癌細胞株MIAPaCa-2にKRAS inhibitorを導入すると、IC50の測定を行った。また、MIAPaCa-2にソトラシブを投与し、投与6時間後、24時間後、48時間後にそれぞれRNAを回収し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、ソトラシブ投与前に比べ、12種類のmicroRNA(miR-1224-5p, hsa-miR-4516, miR-449b-5p, miR-4488, miR-4508, miR-3609, miR-7704, miR-

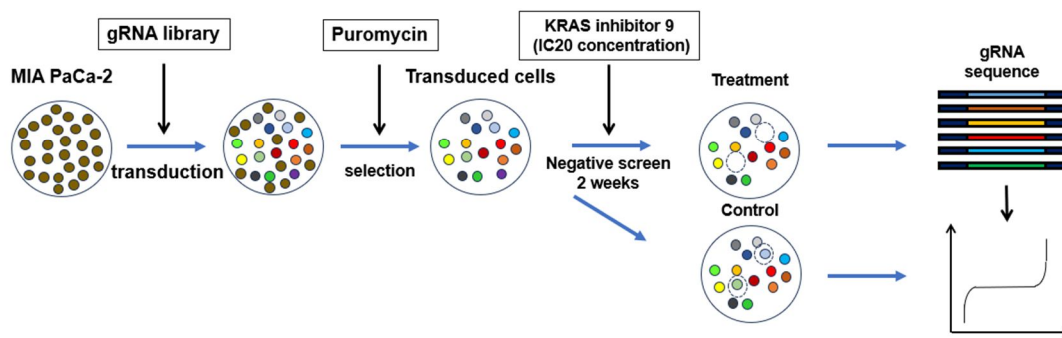
4497, miR-296-5p, miR-4690-3p, miR-489-3p, miR-5010-3p)の発現上昇が確認された。(Log FC>2.0) TCGA database や GEO database、当院の膵癌機能性 RNA プロファイルによる解析でこれらの microRNA のうち、miR-1224-5p, miR-296-5p を薬剤暴露初期に発現が誘導される機能性 RNA 分子と仮定した。現在それぞれの microRNA の膵癌細胞株を用いた機能解析や制御する分子の探索などを行いながら、マスター分子の分子機構について研究を進めている最中である。

また、マスター分子の探索における実験系確立のため、並行して癌抑制型の microRNA とその標的である分子を調べることで、機能性 RNA 分子から癌促進型の分子を探索する実験を行った。当教室における膵癌機能性 RNA 発現プロファイルと in silico 解析を組み合わせ、miR-30a-5p の膵癌抑制効果を機能解析し、癌抑制型 microRNA としての機能を証明した。miR-30a-5p が制御する分子を探索し、膵癌における癌促進分子として RRM2 を見出した。(Nepa et al, Impact of Oncogenic Targets Controlled by Tumor-Suppressive miR-30a-5p in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Anticancer Res.2021) また、大腸癌における miR-490-3p, miR-139-3p の癌抑制機能を証明し、それぞれが制御する分子である IRAK1, KRT80 の同定と癌促進機能の確認を行った。(Hozaka et al, RNA-Sequencing Based microRNA Expression Signature of Colorectal Cancer: The Impact of Oncogenic Targets Regulated by miR-490-3p. Int J Mol Sci. 2021)( Yasudome R et al, Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer: Impact of Oncogenic Targets Regulated by Tumor Suppressive miR-139-3p. Int J Mol Sci. 2022) また、肝内胆管癌における癌抑制型 microRNA、miR-29-3p family とそれが制御する癌促進型遺伝子 ITGA1, ITGB1 の研究も行った。(Hozaka et al, Molecular Pathogenesis and Regulation of the miR-29-3p-Family: Involvement of ITGA6 and ITGB1 in Intra-Hepatic Cholangiocarcinoma. Cancers (Basel) .2021)

膵癌細胞、薬剤暴露時に形成されるスーパーエンハンサーの同定は、ChIP-sequence、ATAC-sequence の実験系の確立に時間がかかり、現在までシーケンスの提出には至っていない。代替の実験系として、CRISPR Cas9 による薬剤耐性スクリーニングを行うこととした。膵癌細胞株 MIA PaCa-2 に 763 種類のヒトゲノムにコードされたキナーゼをノックアウトする Human Kinome Knockout lentivirus Library を感染させ、kinome knockout MIA PaCa-2 ライブラリを作成した。KRAS inhibitor の MIA PaCa-2 の阻害効果が耐性スクリーニング (positive screen)を行うには十分ではなかったため、KRAS inhibitor との薬剤併用効果の期待できる薬剤を探索するための negative screen に方針転換した(Fig 1)。

Figure1

### CRISPR Screen



上記スクリーニングにより、KRAS inhibitor との併用により相乗効果の期待できる阻害剤として、CDK1 inhibitor、CSF1R inhibitor、DNA-Pk inhibitor が候補として抽出された。In vitro の実験で KRAS inhibitor とこれらの薬剤の併用効果が実証され、現在論文作成にむけて準備を進めている段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hozaka Yuto, Kita Yoshiaki, Yasudome Ryutaro, Tanaka Takako, Wada Masumi, Idichi Tetsuya, Tanabe Kan, Asai Shunichi, Moriya Shogo, Toda Hiroko, Mori Shinichiro, Kurahara Hiroshi, Ohtsuka Takao, Seki Naohiko	4. 巻 22
2. 論文標題 RNA-Sequencing Based microRNA Expression Signature of Colorectal Cancer: The Impact of Oncogenic Targets Regulated by miR-490-3p	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9876 ~ 9876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22189876	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 NEPAL PRAMOD, HOZAKA YUTO, TANAKA TAKAKO, WADA MASUMI, ASAI SHUNICHI, MINEMURA CHIKASHI, IDICHI TETSUYA, ARIGAMI TAKAAKI, KURAHARA HIROSHI, SEKI NAOHIKO, OHTSUKA TAKAO	4. 巻 41
2. 論文標題 Impact of Oncogenic Targets Controlled by Tumor-Suppressive <i>miR-30a-5p</i> in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4821 ~ 4836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15297	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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