様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ５ 月 ２６ 日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｋ０８８２６

研究課題名（和文）肝内胆管癌多層オミックス解析と機械学習によるリポジショニング薬の同定

研究課題名（英文）Intrahepatic Cholangiocarcinoma Multilayer Omics Analysis and Machine Learning to Identify Repositioning Drugs

研究代表者
高橋　純一（Takahashi, Junichi）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：６０８６９５６９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：複数症例に共通するドライバー変異として腫瘍抑制遺伝子BAP1に着目し、BAP1変異症例の遺伝子発現プロファイルに基づきロットレリンを候補化合物として同定した。BAP1ノックダウンを施したICC細胞株にロットレリンを投与したところ、FOXK1のmRNA発現が抑制された。ロットレリン投与により代謝、細胞周期、増殖能に関わる遺伝子の発現が変化した。細胞周期アッセイでは、ロットレリンは細胞周期進行を抑制し、BAP1ノックダウンは促進した。RNAシークエンス解析により、ロットレリンは細胞周期関連遺伝子およびSLCトランスポーター関連遺伝子の発現を変化させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究は、極めて予後不良な肝内胆管癌において、腫瘍抑制遺伝子BAP1変異に着目し、その分子病態を多層的に解析するとともに、ドラッグ・リポジショニングによりロットレリンを有望な治療薬候補として同定した。BAP1変異による細胞周期異常の分子機構を明らかにし、治療標的としての妥当性を実証した点は、肝内胆管癌の個別化医療に資する重要な学術的成果である。加えて、既存薬の再活用は新薬開発の時間とコストを大幅に削減し、難治がん治療の選択肢を広げ、医療経済にも貢献する社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：We focused on the tumor suppressor gene BAP1 as a common driver mutation shared among multiple cases and identified rottlerin as a candidate compound based on the gene expression profile of BAP1-mutant cases. In TCGA data, mRNA expression of E2F4 and FOXK1 was elevated in BAP1-mutant cells.
In contrast, administration of rottlerin to ICC cell lines with BAP1 knockdown resulted in suppressed FOXK1 mRNA expression. Rottlerin treatment altered the expression of genes involved in metabolism, cell cycle progression, and proliferation. In cell cycle assays, rottlerin suppressed cell cycle progression, while BAP1 knockdown promoted it. RNA sequencing analysis revealed that rottlerin altered the expression of cell cycle-related genes and genes related to SLC transporters.

研究分野：肝内胆管癌の治療

キーワード：肝内胆管癌　BAP1変異　腫瘍内不均一性　ドラッグ・リポジショニング　細胞周期制御　ロットレリン

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

本研究の学術的背景：肝内胆管癌は 5 年生存率は 20-35%と予後は不良の極めて難治な癌であり、有効な治療薬も少なく本疾患に有効な治療薬の開発が求められている。一般にがんは腫瘍内不均一性（Intratumor Heterogeneity，ITH）のため難治性を呈することから、ITH 創出機構の解明なくして肝内胆管癌の根治はない。ゲノム、転写産物、代謝酵素および代謝産物の多層オミックスレベルにおける肝内胆管癌の腫瘍内多様性及び進化に基づいて肝内胆管癌の診断法と治療法の改善に貢献した研究はない。腫瘍内多様性はがんの治療抵抗性や再発・転移の原因となりがん難治の重要な因子である。われわれは消化器癌のマルチサンプリング解析を実施した(PLoS Genet 2016, Nat Commun 2018, Nature 2019)。左図 1 黄色の『がん根絶』のための標的は『幹』のイベントが重要である。そこで、われわれは 2014 年 10 月から 2016 年 5 月までに根治切除された肝内胆管癌 10 例においてマルチサンプリング検体について、ゲノム(WES)、トランスクリプトーム(RNA Seq)、プロテオーム(iMPAQT 法)そしてメタボロームを行った。また、近年、ある疾患に有効な治療薬から、別の疾患に有効な薬効を見つけ出すドラッグリポジショニングは開発期間の短縮や医療費の抑制の点でも注目されている。研究協力者の山西芳裕教授は発現パターンを打ち消す関係性を示すツール化合物を探索するアプローチを用いて、これまでに炎症性大腸炎、前立腺癌、大腸癌などで治療薬候補を同定している（Lamb et al, Science, 2006; Iorio et al, Proc Natl Acad Sci, 2010; Dudley et al., Sci Transl Med, 2011;　Kosaka et al., Cancer Sci, 2013; van Noort et al., Cancer Res, 2014）。

２．研究の目的

肝内胆管癌（ICC）は、治療抵抗性および有効な治療薬の欠如により予後不良である。さらに、既存薬の再活用（ドラッグ・リポジショニング）は、薬剤開発の時間とコストを削減し、医療費の抑制にも貢献する。本研究の目的は、ICC に対して有効なリポジショニング薬を同定し、その作用機序を解明することである。

３．研究の方法

公的データセット：本研究では The Cancer Genome Atlas（TCGA）データベースを解析した。mRNA 発現データセットを胆管がん（CHOL；35 例の腫瘍組織）から取得。変異データセットは、肝内胆管がん（ICC；変異組織 6 例、野生型組織 22 例)、腎透明細胞がん（KIRC；変異組織 37 例、野生型 380 例)、肝細胞がん（LIHC；変異 11 例、野生型 187 例)、およびぶどう膜黒色腫（UVM；変異 26 例、野生型 54 例）より取得した。

ヒト肝内胆管がん細胞株（SSP25）：RIKEN BRC CELL BANK より購入した。BAP1 特異的 siRNA および陰性対照 siRNA は、それぞれ Abcam（San Francisco, USA）および Santa Cruz Biotechnology（CA, USA）より購入した。細胞株へのトランスフェクションは、製造元の指示に従って Lipofectamine RNAiMAX（Thermo Fisher Scientific）を用いて実施した。トランスフェクション後の細胞は下流の解析に使用した。

RNA 抽出と RT-qPCR：凍結組織および細胞株からの総 RNA を抽出した。RNA は、M-MLV 逆転写酵素（Invitrogen, CA, USA）を用いて逆転写した。qPCR は、LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix（Roche, Switzerland）を使用して実施した。BAP1、GAPDH。さらに BAP1 の mRNA 発現は GAPDH で正規化された。

あ

ウエスタンブロット解析：ウエスタンブロットはに従って実施。

コロニー形成アッセイ、MTT アッセイによる増殖評価

４．研究成果

肝内胆管癌における進化系統樹の構築：　我々は、ICC における変異数および進化系統樹の比較解析に基づき、複数の症例に共通するドライバー変異として NRAS、BAP1、SMAD4、ARID1A を選定した。

変異型と野生型間の遺伝子発現差の比較：　NRAS、BAP1、SMAD4、ARID1A について、変異型および野生型の症例間で遺伝子発現レベルを比較した。

L1000 データベースの活用：　978 遺伝子の発現プロファイルと、1112 種の既存薬を 66 種類の細胞株に投与したデータからなる L1000 データベースを用いて、薬剤投与により発現が反転する（低発現→高発現、高発現→低発現）遺伝子ペアを検索した。

BAP1 と ARID1A の発現相関解析：　本研究データおよび TCGA データにおける BAP1 および ARID1A の mRNA 発現量を比較したところ、ARID1A には有意な相関が認められなかった（$r = -0.107$, $p < 2.2e-16$）のに対し、BAP1 には正の相関が認められた（$r = 0.289$, $p < 2.2e-16$）。

この結果から、ARID1A は解析対象から除外し、BAP1 に焦点を絞った。

BAP1 の機能概要：　BAP1 は BRCA1 の N 末端に結合し、ユビキチンリガーゼ活性を抑制する因子である。脱ユビキチン化酵素活性を有し、DNA 損傷修復、細胞周期制御、クロマチン修飾、細胞死、免疫応答など多様な生物学的過程を通じて腫瘍抑制因子として機能する。BAP1 の変異は、ぶどう膜黒色腫、悪性胸膜中皮腫、腎細胞がんなど、さまざまな癌種で報告されている〔Chan-On, 2013 #23〕。ICC においては、ERK1/2 および JNK/c-Jun 経路の抑制を通じて腫瘍抑制機能を発揮するが、変異によってこの機能が失われる。

候補薬剤の選定：　候補薬剤として以下の 5 剤を選定した。TCGA および臨床検体においてコサイン類似度が上位 100 位に共通する 3 剤：ブチオニン-スルホキシミン、AG-490、トレチノイン。臨床検体で最上位だったノルエチステロン、および TCGA で最上位だったロットレリン。

ロットレリンの概要：　ロットレリンは 1994 年にクスノキ科植物から単離された化合物で、心保護作用を有する。当初はタンパクキナーゼ阻害剤として同定され、肝細胞癌を含む複数の癌種において抗腫瘍活性を示す。細胞周期を G1 期で停止させ、NF-κB/サイクリン D 経路の阻害を通じて細胞増殖の抑制、アポトーシス誘導、細胞侵襲の抑制に関与する。

BAP1 変異によるシグナル経路変化の探索：　BAP1 変異群では、BAP1 の機能領域に位置する FoxK1 の mRNA 発現が上昇しており、FoxK1 関連のタンパク質代謝や PAK-2p34 の活性化変化が示唆された。また、細胞周期関連因子である E2F4 も上昇しており、細胞周期制御の異常が疑われた。

薬剤投与の影響（mRNA・タンパク質レベル）：　BAP1 ノックダウン状態において FoxK1 の mRNA 発現がロットレリン投与により抑制された。Western blot 解析では、増殖マーカー MCM2 の発現がロットレリンで抑制され、G2/M 期停止マーカーであるヒストン H3 pSer10 の発現は、BAP1 コントロール群では変化しなかったが、BAP1 ノックダウンかつロットレリン高濃度群では上昇した。これらの結果は、ロットレリンが G2 から M 期への細胞周期進行を抑制することを示唆している。

細胞周期解析：　BAP1 コントロール群およびノックダウン群においてロットレリンを投与後、細胞周期解析を実施（Fig.4(a), (b)）。ノックダウンにより細胞周期進行が促進されるが、ロットレリンによりその進行が抑制されることが示唆された。

RNA シークエンス解析：　ロットレリン投与によって発現が変化した遺伝子を抽出した。BAP1 ノックダウン群において特異的に変化した遺伝子は 2273 個であった。一方で、BAP1 の変異とは無関係にロットレリン投与により変化した遺伝子も 507 個同定された。これらには、**細胞周期関連遺伝子（CAMK2D, E2F6, E2F7）および SLC トランスポーター群（SLC10A3, SLC25A13, SLC25A18, SLC30A5, SLC35F3, SLC39A7, SLC39A8, SLC46A3）**が含まれていた。

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　0件／うちオープンアクセス　4件）

１．著者名 Nakano Yusuke、Masuda Takaaki、Sakamoto Takeharu、Tanaka Noritaka、Tobo Taro、Hashimoto Masahiro、Tatsumi Takanari、Saito Hideyuki、Takahashi Junichi...Mimori Koshi	４．巻 65
２．論文標題 SHARPIN is a novel gene of colorectal cancer that promotes tumor growth potentially via inhibition of p53 expression	５．発行年 2024年
３．雑誌名 International Journal of Oncology	６．最初と最後の頁 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2024.5701	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 Hashimoto M, Masuda T, Nakano Y, Tobo T, Saito H, Koike K, Takahashi J, Abe T, Ando Y, Ozato Y, Hosoda K, Higuchi S, Hisamatsu Y, Toshima T, Yonemura Y, Hata T, Uemura M, Eguchi H, Doki Y, Mori M, Mimori K.	４．巻 -
２．論文標題 Tumor suppressive role of the epigenetic master regulator BRD3 in colorectal cancer.	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Cancer Sci.	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.16129.	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 Kosai K, Masuda T, Kitagawa A, Tobo T, Ono Y, Ando Y, Takahashi J, Haratake N, Kohno M, Takenaka T, Yoshizumi T, Mimori K.	４．巻 30(12)
２．論文標題 Transducin Beta-Like 2 is a Potential Driver Gene that Adapts to Endoplasmic Reticulum Stress to Promote Tumor Growth of Lung Adenocarcinoma.	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Ann Surg Oncol.	６．最初と最後の頁 7538-7548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-023-13864-y.	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 Hosoda K, Toshima T, Takahashi J, Yonemura Y, Hisamatsu Y, Hirose K, Masuda T, Motomura Y, Abe T, Ando Y, Dairaku K, Nakano Y, Hashimoto M, Hiraki Y, Soejima Y, Yoshizumi T, Mimori K.	４．巻 12(4)
２．論文標題 Successful multidisciplinary treatment with complete response to atezolizumab plus bevacizumab in a 90-year-old patient with hepatocellular carcinoma recurrence.	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Int Cancer Conf J.	６．最初と最後の頁 274-278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13691-023-00618-6.	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 Kitagawa A, Osawa T, Noda M, Kobayashi Y, Aki S, Nakano Y, Saito T, Shimizu D, Komatsu H, Sugaya M, Takahashi J, ... Mimori K.	4．巻 128(12)
2．論文標題 Convergent genomic diversity and novel BCAA metabolism in intrahepatic cholangiocarcinoma.	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Br J Cancer.	6．最初と最後の頁 2206-2217.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-023-02256-4.	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 Yoshikawa Y, Fukunaga M, Takahashi J, Shimizu D, Masuda T, Mizushima T, Yamada K, Mori M, Eguchi H, Doki Y, Ochiya T, Mimori K.	4．巻 30(1)
2．論文標題 Identification of the Minimum Combination of Serum microRNAs to Predict the Recurrence of Colorectal Cancer Cases.	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Ann Surg Oncol.	6．最初と最後の頁 233-243.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-022-12355-w.	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 Kitagawa A, Osawa T,Noda M,Kobayashi Y, Aki S,Nakano Y,Saito T,Shimizu D,Komatsu H,Sugaya M,Takahashi J,...Mimori K.	4．巻 -
2．論文標題 Convergent genomic diversity and novel BCAA metabolism in intrahepatic cholangiocarcinoma	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Br J Cancer	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-023-02256-4.	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 Takahashi J, Masuda T, Kitagawa A, Tobo T, Nakano Y, Abe T, Ando Y, Kosai K, Kobayashi Y, Matsumoto Y, Yoshizumi T, Mori M, Mimori K.	4．巻 100(2)
2．論文標題 Fanconi Anemia Complementation Group E, a DNA Repair-Related Gene, Is a Potential Marker of Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma.	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Oncology.	6．最初と最後の頁 101-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000520582.	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2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 高橋 純一(九州大学病院別府病院 外科)，増田 隆明，橋本 雅弘，中野 祐輔，大楽 勝司，阿部 正，斉藤 秀幸，大里 祐樹，安東 由貴，中野 貴文，久松 雄一，戸島 剛男，米村 祐輔，吉住 朋晴，三森 功士
2．発表標題 24 網羅的ハブ遺伝子解析に基づく肝細胞癌におけるハブ遺伝子MFSD10発現の臨床的意義(会議録)
3．学会等名 第122回日本外科学会定期学術集
4．発表年 2022年

1．発表者名 内田 博喜(中津市立中津市民病院 外科)，北川 彰洋，高橋 純一，梅田 健二，江頭 明典，折田 博之，増田 隆明，三森 功士
2．発表標題 肝内胆管癌における新規ドライバー遺伝子NTSR1の同定とその臨床的意義
3．学会等名 第122回日本外科学会定期学術集
4．発表年 2022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	三森　功士 (Mimori Koshi) (50322748)	九州大学・大学病院・教授 (17102)	
研究分担者	岩田　通夫 (Iwata Michio) (60746642)	九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授 (17104)	

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