

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460395

研究課題名(和文) ゲノム編集を施したヒト気道上皮細胞株を基盤とするKRASシグナル経路の解析

研究課題名(英文) Defining the KRAS signaling cascade using a genome-edited human bronchial epithelial cell line

研究代表者

シバスダラン カルナン (Sivasundaram, Karnan)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：30557096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：KRAS遺伝子は肺癌など様々な癌で活性化変異を起こしている。そこで、癌原性KRAS変異をノックインした非癌ヒト気管支上皮細胞株を用いて変異KRAS遺伝子の機能を解析した。変異KRASは、細胞の形態を癌細胞様に変化させ、足場非依存性増殖能を与え、細胞の運動能、マトリゲル浸潤能を亢進させていた。また細胞内で増殖シグナルを核に伝えるMEK-ERK経路を過剰活性化していた。遺伝子およびタンパク質の網羅的発現解析の結果、これらの細胞特性の変化を説明する分子の発現量の変化を見出した。本研究の成果は変異KRASの機能の全容解明に貢献し、将来的にはKRAS変異癌の治療薬開発に道を開くものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The KRAS gene is mutated and constitutively activated in many types of cancers including lung cancer. In this study, we utilized a non-tumorigenic human bronchial epithelial cell line which had undergone targeted knock-in of an oncogenic KRAS mutation to investigate the biological function of the mutant KRAS gene. We found that the mutant KRAS induced an altered cellular morphology similar to cancer cells, conferred the capacity of anchorage-independent cell growth, and augmented cell migration and invasion into Matrigel. The MEK-ERK pathway which promotes cell proliferation was hyperactivated in the mutant KRAS-knocked-in cells. Comprehensive analysis of mRNA and protein expression in the cells revealed the increased expression of some molecules potentially explaining the transformed phenotype seen in the mutant KRAS-knocked-in cells. This study helps us to understand the biological function of mutant KRAS and will assist in the development of medicine for KRAS-mutated cancers.

研究分野：がんの分子生物学的研究

キーワード：KRAS 変異ノックイン 気管支上皮細胞株

1. 研究開始当初の背景

肺癌、特に肺腺癌では高頻度に *KRAS* 癌遺伝子の活性化変異が存在する¹⁾。また、*KRAS* と同一シグナル経路上の他の分子にも活性化変異が認められるなど、*KRAS* シグナル経路は高頻度に恒常的な過剰活性化をきたしている。したがって、変異 *KRAS* 分子の機能を正確に理解することは、肺癌の解明と克服に向けて重要と考えられる。

一方、*KRAS* 変異細胞を特異的標的とする増殖阻害剤は、肺癌治療薬の候補として合理的であり有望と考えられる。また、*KRAS* 変異は肺癌以外にも罹患率・死亡率の高い膵癌・大腸癌など多くの癌種で認められるため¹⁾、このような薬剤は複数の癌種に対して増殖抑制効果を期待できる。しかし、現在のところ、明確な臨床的有効性を示す *KRAS* 阻害剤は見出されていない。その理由のひとつとして、*KRAS* タンパク質に対する阻害剤のデザインが比較的困難であることがあげられる。

この問題を解決するため、変異 *KRAS* タンパク質自身の代わりに変異 *KRAS* シグナルの重要な媒介分子を治療標的として薬剤を探索する戦略や、*KRAS* 変異を持つ細胞環境でのみ毒性を発揮する(*KRAS* 変異と合成致死性を持つ)薬剤を同定する戦略に則って研究が行われ、得られた候補化合物の臨床試験も進められてきた²⁾。しかし、多剤併用による副作用が出現することや個々の癌の遺伝的背景によって感受性が異なることなどの問題があり、*KRAS* 変異癌に対する決定的な治療薬は未だ同定されていない。より効果的な医薬を開発する努力が現在も続けられているのが実状である。

2. 研究の目的

本研究では、肺癌発生の初期段階で *KRAS* の活性化変異が果たす役割を解明し、*KRAS* 変異癌に特異的な治療標的分子を同定することを究極の目標とした。できる限り信頼性の高いアッセイ系を確保するため、まず遺伝子改変技術を用いて *KRAS* 遺伝子研究用のモデル細胞株を作製し、樹立したクローンを用いて各種の解析を行う方針とした。

そこでまず、本研究の前段階において、アデノ随伴ウイルスベクターを利用した遺伝子ターゲティング法³⁾によって非癌ヒト気管支上皮細胞株 NuLi-1 の *KRAS* 遺伝子を改変した。その結果、同細胞株の持つ2本の野生型 *KRAS* アレルのうち1本を癌原性の活性化型 *KRAS*^{G12V} 変異アレルに置換(変異ノックイン)し、クローンを単離することに成功した。これにより、対照クローンと合わせて、*KRAS* 変異の有無を唯一の遺伝的相違とする非癌ヒト気管支上皮細胞クローンのペアが樹立された。

本研究では、このクローンペアの表現型を様々な生化学的アッセイおよび腫瘍生物学的アッセイで比較し、気管支上皮細胞における *KRAS* 変異の生物学的意義を多面的に理解

することを目指した。またクローンペアのマイクロアレイ解析、プロテオーム解析などを行い、*KRAS* の下流で機能するシグナル伝達分子群のうち気管支上皮細胞の悪性化の重要な鍵となるシグナル媒介分子の同定を目指す方針とした。

3. 研究の方法

(1) *KRAS* 変異が細胞にもたらす生化学的・細胞生物学的変化を解析するため、樹立した *KRAS* 変異ノックインクローンと対照クローンの表現型を様々なアッセイを用いて比較検討した。具体的には、まずそれぞれの細胞クローンを低血清濃度培地で培養した後、細胞抽出液を回収してウェスタンブロットを行い、*KRAS* タンパク質の下流に位置するシグナル伝達分子の発現量およびリン酸化の定量的解析を行った。

また、単層培養における各クローンの増殖速度を決定し、軟寒天培地中で各クローンが形成する足場非依存性コロニーの個数を計測した。

さらに、Boyden Chamber を一定時間内に通過する細胞の割合を決定することで各クローンの運動能を検討した。また、同 Chamber にマトリゲルを装用した後同じ実験を行い、各クローンのマトリゲル浸潤能を検討した。

(2) *KRAS* 変異癌に対する治療薬の新規標的分子を検索するためのアプローチのひとつとして、マイクロアレイによる細胞クローンの遺伝子発現解析を行った。まず *KRAS* 変異ノックインクローン3個と対照クローン4個(親株1検体を含む)を低濃度血清含有培地で培養した後、細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析に供用した。解析結果に基づいて各クローンの遺伝子発現プロファイルを決定し、クローン間で比較検討した。また、*KRAS* 変異クローンにおいて発現異常(特に発現亢進)を示す遺伝子群を同定した。

実験には Agilent Technologies 社のオリゴ DNA マイクロアレイシステムを使用し、同社の Feature Extraction ソフトウェアによってデータ測定を行った。クラスター解析は Gene Cluster および Tree View ソフトウェアを用いて行った。

(3) *KRAS* 変異ノックインクローンと対照クローンの網羅的プロテオーム解析を行った。まず各クローンを低濃度血清含有培地中で培養した後、タンパク質の抽出・トリプシン消化・精製を行い、質量分析システム TripleTOF 5600 (ABSciex 社)によるタンパク質の発現解析を行った。また、*KRAS* 変異ノックインによって発現亢進をきたす分子の生物学的役割を分析するため、*KRAS* 変異ノックインクローンに対して CRISPR-Cas9 システムによる遺伝子ノックアウトを行った。

4. 研究成果

(1) 本研究では、研究の予備段階で樹立したヒト気管支上皮由来 *KRAS* 変異ノックインクローンとその対照クローンの特性を生化学的・腫瘍生物学的アッセイによって比較し、肺癌発生における *KRAS* 変異の役割を解析した。

まず、細胞形態の観察の結果、*KRAS* 変異ノックインクローンが上皮細胞の特徴である敷石状の外観から疎な紡錘形細胞様へ変化していることがわかった。また、ウェスタンブロット解析により、*KRAS* を経由する増殖シグナルの媒介経路である MEK-ERK 経路が同クローンで恒常的に活性化していることがわかった。さらに、軟寒天培地での培養によって、同クローンが足場非依存的なコロニー形成能を獲得していることが示された。最後に、Boyden chamber に基づく解析により、同クローンが対照クローンよりも有意に高い運動能およびマトリゲル浸潤能を持つことが明らかになった。これらのことから、本研究で用いた非癌ヒト気管支上皮細胞株 NuLi-1 は、野生型 *KRAS* アレル 2 本中 1 本への活性化変異の導入によって癌形質の少なくとも一部を獲得することがわかった。

一方、意外なことに、低血清濃度培地における単層培養で、*KRAS* 変異ノックインクローンは対照クローンに比べて増殖速度が遅いという結果が得られた。従来、マウスモデルなどでは、*KRAS* 下流の増殖シグナル伝達経路の恒常的活性化が *KRAS* 変異に伴う発癌機構のひとつと考えられてきた⁴⁾。しかし、本研究の遺伝子改変ヒト気管支上皮細胞株の実験結果からは、*KRAS* 変異による増殖速度の亢進は肺癌発生の分子機構において副次的であることが示唆された。

(2) *KRAS* 変異ノックインクローン 3 検体と対照クローン 4 検体の遺伝子発現をマイクロアレイで解析し、その結果に基づいてクラスター解析を行ったところ、7 検体は *KRAS* 変異の有無によって順当に 2 大別された。したがって、NuLi-1 細胞株の遺伝子発現プロファイルは *KRAS* 変異ノックインによって一定の変化を起こすことがわかった。

個々の遺伝子の変動を見ると、*KRAS* 変異ノックインクローンにおいて *COL1A2* や *COL5A2* など上皮間葉転換の指標となる遺伝子⁵⁾の発現が亢進し、*CDH1* や *MST1R* など上皮マーカーとされる遺伝子⁵⁾の発現が低下していることがわかった。クローン群の細胞生物学的な解析を行った際、*KRAS* 変異ノックインクローンでは細胞形態が紡錘形細胞様に変化し、運動能・マトリゲル浸潤能が亢進しているという知見が得られたが、マイクロアレイ解析の結果はこれらの現象を分子レベルで説明するものと考えられた。

(3) プロテオーム解析の結果、*KRAS* 変異ノックインクローンは対照クローンに比べて、

コラーゲンタンパク質の特定サブタイプやコラーゲン合成を制御する酵素タンパク質を有意に過剰発現することがわかった。マイクロアレイおよび定量的 RT-PCR 解析でも *KRAS* 変異ノックインクローンにおけるこのサブタイプのコラーゲンの発現亢進が認められていたので、遺伝子レベルとタンパク質レベルの発現解析が合致する結果となった。また、*KRAS* 変異ノックインによってペントースリン酸経路（解糖系の分枝経路）に關与する特定の酵素タンパク質が高発現することも明らかになった。

見出された分子の生理機能を考慮すると、これらの分子の発現亢進が *KRAS* 変異ノックインクローンの増殖能や浸潤能に關与していることが示唆される。さらには、これらの遺伝子・タンパク質を抑制することによって *KRAS* 変異細胞の癌細胞様形質を制御しうる可能性も考えられる。そこで、まずこれらの分子の *KRAS* 変異細胞の形質における役割を探るため、*KRAS* 変異ノックインクローンに対して CRISPR-Cas9 システム⁶⁾を使用し、遺伝子ノックアウトを行った。単離したサブクローンの表現型解析を通じて、今後、変異 *KRAS* 由来の増殖シグナルを媒介する重要な下流因子を同定し、創薬標的分子としての可能性を検討する方針である。

<引用文献>

- 1) Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49, 4682-4689, 1989.
- 2) Papke B and Der CJ. Drugging RAS: Know the enemy. *Science*, 355, 1158-1163, 2017.
- 3) Russell DW and Hirata RK. Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet*, 18, 325-330, 1998.
- 4) Malumbres M and Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*, 3, 7-13, 2003.
- 5) Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, and Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*, 11, 761-774, 2011.
- 6) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, and Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 816-821, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計16件)

1. Ota A, Nakao H, Sawada Y, **Karnan S**, Wahiduzzaman M, Inoue T, Kobayashi Y, Yamamoto T, Ishii N, Ohashi T, Nakade Y, Sato K, Ito K, **Konishi H**, **Hosokawa Y**, and Yoneda M. Delta40p53 suppresses tumor cell proliferation and induces cellular senescence in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Sci*, 130: 614-625, 2017. 査読有
doi: 10.1242/jcs.190736
2. **Karnan S**, Ota A, **Konishi Y**, Wahiduzzaman M, Tsuzuki S, **Hosokawa Y**, and **Konishi H**. Efficient AAV-mediated gene targeting using 2A-based promoter-trap system. *Bio-Protoc*, 6: e2058, 2016. 査読有
doi: 10.21769/BioProtoc.2058
3. Ito K, Ota A, Ono T, Nakaoka T, Wahiduzzaman M, **Karnan S**, **Konishi H**, Furuhashi A, Hayashi T, Yamada Y, **Hosokawa Y**, and Kazaoka Y. Inhibition of Nox1 induces apoptosis by attenuating the AKT signaling pathway in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol Rep*, 36: 2991-2998, 2016. 査読有
doi: 10.3892/or.2016.5068.
4. **Karnan S**, Ota A, **Konishi Y**, Wahiduzzaman M, **Hosokawa Y**, and **Konishi H**. Improved methods of AAV-mediated gene targeting for human cell lines using ribosome-skipping 2A peptide. *Nucleic Acids Res*, 44: e54, 2016. 査読有
doi: 10.1093/nar/gkv1338
5. Tanaka M, Miura Y, Numanami H, **Karnan S**, Ota A, **Konishi H**, **Hosokawa Y**, and Hanyuda M. Inhibition of NADPH oxidase 4 induces apoptosis in malignant mesothelioma: Role of reactive oxygen species. *Oncol Rep*, 34: 1726-1732, 2015. 査読有
doi: 10.3892/or.2015.4155
6. Ono T, Ota A, Ito K, Nakaoka T, **Karnan S**, **Konishi H**, Furuhashi A, Hayashi T, Yamada Y, **Hosokawa Y**, and Kazaoka Y. Plumbagin suppresses tumor cell growth in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Dis*, 21: 501-511, 2015. 査読有
doi: 10.1111/odi.12310
7. Mizuno S, Hanamura I, Ota A, **Karnan S**, Narita T, Ri M, Mizutani M, Goto M, Gotou M, Tsunekawa N, Shikami M, Iida S, **Hosokawa Y**, Miwa H, Ueda R, Nitta M, Takami A. Overexpression of salivary-type amylase reduces the sensitivity to bortezomib in multiple myeloma cells. *Int J Hematol*, 102: 569-578, 2015. 査読有
doi: 10.1007/s12185-015-1859-0
8. Asai A*, **Karnan S*** (* Contributed equally), Ota A*, Takahashi M, Damdindorj L, **Konishi Y**, Hossain E, **Konishi H**, Nagata A, Yokoo K, and **Hosokawa Y**. High-resolution 400K oligonucleotide array comparative genomic hybridization analysis of neurofibromatosis type 1-associated cutaneous neurofibromas. *Gene*, 558: 220-226, 2015. 査読有
doi: 10.1016/j.gene.2014
9. Hossain E, Ota A, **Karnan S**, Takahashi M, Mannan SB, **Konishi H**, and **Hosokawa Y**. Lipopolysaccharide augments the uptake of oxidized LDL by up-regulating lectin-like oxidized LDL receptor-1 in macrophages. *Mol Cell Biochem*, 400: 29-40, 2015. 査読有
doi: 10.1007/s11010-014-2259-0
10. Damdindorj L*, **Karnan S*** (* Contributed equally), Ota A, Hossain E, **Konishi Y**, **Hosokawa Y**, and **Konishi H**. A comparative analysis of constitutive promoters located in adeno-associated viral vectors. *PLoS ONE*, 9: e106472, 2014. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0106472
11. Guo Y, Takeuchi I, **Karnan S**, Miyata T, Ohshima K, and Seto M. Array-comparative genomic hybridization profiling of immunohistochemical subgroups of diffuse large B-cell lymphoma shows distinct genomic alterations. *Cancer Sci*, 105: 481-9, 2014. 査読有
doi: 10.1111/cas.12378
12. Suguro M, Yoshida N, Umino A, Kato H, Tagawa H, Nakagawa M, Fukuhara N, **Karnan S**, Takeuchi I, Hocking TD, Arita K, Karube K, Tsuzuki S, Nakamura S, Kinoshita T, and Seto M. Clonal heterogeneity of lymphoid malignancies correlates with poor prognosis. *Cancer Sci*, 105: 897-904, 2014. 査読有
doi: 10.1111/cas.12442.
13. Nakaoka T, Ota A, Ono T, **Karnan S**, **Konishi H**, Furuhashi A, Ohmura Y, Yamada Y, **Hosokawa Y**, and Kazaoka Y.

Combined arsenic trioxide-cisplatin treatment enhances apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Cell Oncol*, 37: 119-129, 2014. 査読有
doi: 10.1007/s13402-014-0167-7

14. Hossain E, Ota A, Karnan S, Damdindorj L, Takahashi M, Konishi Y, Konishi H, and Hosokawa Y. Arsenic augments the uptake of oxidized LDL by upregulating the expression of lectin-like oxidized LDL receptor in mouse aortic endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 273: 651-658, 2013. 査読有
doi: 10.1016/j.taap.2013.10.012
15. Wang GM, Wong HY, Konishi H, Blair BG, Abukhdeir AM, Gustin JP, Rosen DM, Denmeade S, Rasheed Z, Matsui W, Garay JP, Mohseni M, Higgins MJ, Cidado J, Jelovac D, Croessmann S, Cochran R, Karnan S, Konishi Y, Ota A, Hosokawa Y, Argani P, Lauring J, and Park BH. Single copies of mutant KRAS and mutant PIK3CA cooperate in immortalized human epithelial cells to induce tumor formation. *Cancer Res*, 73: 3248-3261, 2013. 査読有
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1578
16. Hossain E, Ota A, Takahashi M, Karnan S, Damdindorj L, Konishi Y, Konishi H, and Hosokawa Y. Arsenic upregulates the expression of angiotensin II Type I receptor in mouse aortic endothelial cells. *Toxicol Lett*, 220: 70-75, 2013. 査読有
doi: 10.1016/j.toxlet.2013.04.006

〔学会発表〕(計19件)

1. 小西裕之、遺伝子改変・ゲノム編集効率を測定するアッセイ系としてのPIGA遺伝子の利用、**第39回日本分子生物学会年会**、2016年11月30日、パシフィコ横浜(神奈川・横浜)
2. 太田明伸、NOX1はAKTシグナルを介して口腔扁平上皮癌細胞の生存に寄与する、**第75回日本癌学会学術総会**、2016年10月7日、パシフィコ横浜(神奈川・横浜)
3. 太田明伸、肝がん細胞株におけるp53アイソフォームdelta40p53の性状解析、**第89回日本生化学会大会**、2016年9月25日、仙台国際センター(宮城・仙台)
4. Md Wahiduzzaman、Combined arsenic trioxide-cisplatin treatment enhances apoptosis in leukemic cell lines、**第89回日本生化学会大会**、2016年9月25日、

仙台国際センター(宮城・仙台)

5. Sivasundaram Karnan、悪性胸膜中皮腫の早期診断の腫瘍マーカーの検討、**第89回日本生化学会大会**、2016年9月26日、仙台国際センター(宮城・仙台)
6. 小西裕之、CRISPR-Cas9システムによる変異ノックイン プロモータートラップ法の比較検討、**日本ゲノム編集学会第1回大会**、2016年9月6日、広島国際会議場(広島・広島)
7. Sivasundaram Karnan、400KオリゴアレイCGHを用いたNF1患者の皮膚神経線維腫の解析、**第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同大会**、2015年12月1日、神戸国際展示場(兵庫・神戸)
8. 太田明伸、口腔がん細胞株に対するプランバギンのプロオキシダント作用とアポトーシス誘導にはミトコンドリア遺伝子発現系が関与する、**第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同大会**、2015年12月1日、神戸国際展示場(兵庫・神戸)
9. 小西裕之、癌原性KRAS変異をノックインしたヒト気管支上皮細胞株モデルの樹立と解析、**第74回日本癌学会学術総会**、2015年10月8日、名古屋国際会議場(愛知・名古屋)
10. 太田明伸、Delta40p53はHepG2細胞に対して細胞増殖抑制効果を示す、**第74回日本癌学会学術総会**、2015年10月8日、名古屋国際会議場(愛知・名古屋)
11. 小西裕之、アデノ随伴ウイルスに基づく遺伝子改変ベクターにおいて薬剤耐性遺伝子の発現を制御するプロモーターと改変効率の関係、**第37回日本分子生物学会年会**、2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川・横浜)
12. 太田明伸、リポポリサッカライドはErk1/2シグナルを介したLOX-1の発現増加によってマクロファージの酸化LDLの取り込みを増強する、**第87回日本生化学会大会**、2014年10月16日、国立京都国際会館(京都・京都)
13. 太田明伸、プランバギンは口腔扁平上皮癌に対して活性酸素産生を介した細胞増殖抑制効果を示す、**第73回日本癌学会学術総会**、2014年9月27日、パシフィコ横浜(神奈川・横浜)
14. Sivasundaram Karnan、NF1関連の皮膚神経線維腫における400KオリゴアレイCGH

解析、**第73回日本癌学会学術総会**、2014年9月26日、パシフィコ横浜（神奈川・横浜）

15. 小西裕之、ヒト細胞株のゲノム編集によるKRAS-PI3Kシグナル経路の解析、**第72回日本癌学会学術総会**、2013年10月4日、パシフィコ横浜（神奈川・横浜）
16. 太田明伸、三酸化ヒ素（ATO）とシスプラチン（CDDP）は口腔扁平上皮癌細胞株に対して相乗的な細胞障害効果を示す、**第72回日本癌学会学術総会**、2013年10月4日、パシフィコ横浜（神奈川・横浜）
17. 太田明伸、ヒ素は酸化LDL受容体LOX-1の発現を増加させることによりマウス血管内皮細胞の酸化LDL取り込み能を増強する、**第86回日本生化学会大会**、2013年9月13日、パシフィコ横浜（神奈川・横浜）
18. Sivasundaram Karnan、KRAS変異およびPIK3CA変異のノックインを施したヒト上皮細胞株の生化学的解析、**第86回日本生化学会大会**、2013年9月11日、パシフィコ横浜（神奈川・横浜）
19. Ekhtear Hossain、Arsenic trioxide inhibits interferon-gamma-mediated nitric oxide production in mouse vascular endothelial cells、**第86回日本生化学会大会**、2013年9月11日、パシフィコ横浜（神奈川・横浜）

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

シバスングラン カルナン
(SIVASUNDARAM Karnan)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号：30557096

(2) 研究分担者

小西 裕之 (KONISHI Hiroyuki)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：20344335

細川 好孝 (HOSOKAWA Yoshitaka)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：60229193

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし