

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06953

研究課題名(和文) 癌におけるRAS発現量依存的な生存シグナルの解析

研究課題名(英文) Analysis of dose-dependent RAS mediated survival signalings

研究代表者

倉田 盛人 (Kurata, Morito)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：40451926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：RAS遺伝子群の変異は癌の6～96%で観察されるが、細胞増殖や細胞周期に与える影響の全貌は理解させていない。これまでにNRAS-G12D-変異をもつ白血病細胞THP-1を用いて、NRASをドキシサイクリンにて発現調整できる細胞を樹立した(B11細胞)。NRASシグナルの全貌を解明する為、CRISPR libraryをB11に導入し、NRAS非依存性の増殖する細胞を樹立した。結果、21個のNRAS下流で働く候補分子を同定し、確認実験の結果、DOHHとTAF6がドキシサイクリンNRAS依存性に発現が誘導されることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RASシグナルの下流として考えられているRAF-MEK-ERK-pathwayを阻害することで、一部の癌細胞では治療効果が期待できる。しかしながら、すべてのRAS変異癌細胞を制御する包括的な治療法の確立には至っていない。網羅的な解析を行えるCRISPR library によるスクリーニングを使用することで、NRASのシグナル経路に関わる新たな遺伝子を同定した。今後、更に詳細な検討が必要とされるものの、RAS経路の全貌を明らかにできる手法の確立に成功したと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mutations in RAS family are observed in 6-96% of cancer. However, the role of the magnitude of RAS activation in proliferation and cell cycle progression is not fully understood. To define the role of oncogenic NRAS dose in malignant behavior, we used a genetically engineered THP-1 cell line where the expression of NRAS-G12V is under the control of a doxycycline-responsive element. We established modified cell lines, named B11. To identify whole downstream of NRAS signals, CRISPR libraries were introduced into B11 and removing doxycycline to collect clones that can proliferate without NRAS signaling. As a result, 21 from the activation library. NRAS activation with Dox can induce the mRNA expression for DOHH and TAF6 in B11. DOHH and TAF6 are newly identified as a downstream of NRAS signaling

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん遺伝子 CRISPR screening RAS NRAS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

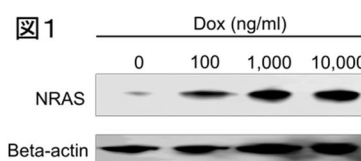
## 1. 研究開始当初の背景

RAS 遺伝子は多くの癌において変異が見られ、膵臓癌の約 90%、大腸癌の約 50%で癌の増殖に関与している。これまでに RAS シグナルの下流として考えられていた RAF-MEK-ERK-pathway を阻害することで、一部の癌細胞では治療効果が期待できる。しかしながら、すべての RAS 変異癌細胞を制御する包括的な治療法の確立には至っていない。さらに、興味深いことに、RAS は同じ癌遺伝子によるシグナルにも関わらず、増殖ではなく細胞老化も誘導することが知られている<sup>1</sup>。今日においても、新たな RAS シグナルに関与する論文が多く発表されており、これらのことは RAS シグナルの多様性と、未知のシグナル制御が存在する可能性を強く示している。RAS シグナルの多様性を再評価し、治療の対象となる RAS 発現量依存的協調分子を同定することが重要である。

## 2. 研究の目的

RAS の増殖シグナルを効率的に阻害する為には、RAS 経路の全貌を明らかにすることが必要である。常に同じシグナルを活性化するとは限らない多様性のある RAS シグナルにおいて、シグナル経路の差に応じた生存に必要な分子の同定は可能であるのか、最終的には「癌細胞の RAS シグナルパターンを適切に評価し、生存に必要な分子を同定することで、RAS 変異がある癌の治療に応用が可能ではないか」と考えている。

そこで、網羅的な解析を行える CRISPR library によるスクリーニングを使用することで、癌遺伝子の全貌を解明が可能であると考えられる。本研究では CRISPR システムを用いて NRAS のシグナル経路に関わる新たな遺伝子の同定を目的とした。



## 3. 研究の方法

RAS には NRAS、KRAS、HRAS の 3 種類が報告されているが、NRAS と KRAS は癌遺伝子としての作用が強く、働きも似ている為、NRAS を用いて研究を遂行することとした。

これまでに部位特異的に遺伝子編集ができる CRISPR-Cas9 とドキシサイクリン(Dox) 発現誘導ベクターを同時に用いて、内因性の NRAS をロックアウトしながら、外因性に Tet 誘導型の変異 NRAS を発現できる THP-1 細胞株の樹立に成功した。このことにより、ドキシサイクリン濃度を尺度にして発現量の調整が可能となった(図1)。今回樹立された

NRAS 発現調整細胞は、ドキシサイクリンの適量添加により、NRAS シグナルを活性化し、細胞増殖を誘導することができる。また、高発現により付加的と思われるシグナルを活性化し、細胞周期の低下に陥っていると思われる。この NRAS 発現調整細胞株は RAS シグナルの多様性を研究する上で、非常に有用であると考えられる。

CRISPR library は約 7 万種類のガイド RNA から構成される非常に強力な変異誘導システムであり、かつ、細胞死を誘導するようなガイド RNA の同定も効率的に行うことが可能である。

具体的には、NRAS 発現調整可能細胞に CRISPR library を用いてランダムなノックアウト<sup>2</sup>や活性<sup>3</sup>を誘導し、ドキシサイクリンが添加されていない状態で、細胞が死から免れるガイド RNA の同定を試みる。

CRISPR screening で得られた候補分子を細胞株において CRISPR で Knockout と Activation を用いて、細胞増殖に与える影響を検討する。可能なものは阻害剤を用いて、細胞増殖能について検討する。

NRAS 分子の下流を直接・複数阻害することによって、腫瘍細胞の増殖を完全に抑制できるようにする。

## 4 . 研究成果

### 1. CRISPR library screening による NRAS 非依存的増殖可能細胞の樹立

NRAS 発現調節可能細胞は、ドキシサイクリンの存在下で NRAS シグナルが ON になることで細胞増殖を引き起こす。NRAS シグナルによる細胞増殖機能が働いていない状態を起こすべく、NRAS 発現調節可能細胞からドキシサイクリンを添加していない状態で、CRISPR activation library にてランダムな遺伝子の活性化を行いプレートに播種したところ、5 クローン(SAM-1、2、3、4、5)のクローンが樹立された。PCR にて増幅させたガイド RNA(gRNA)を含む領域を TA クローニングし、シーケンスをしたところ、合計 21 個の NRAS 関連候補遺伝子を得た (Table 1)。

**Table 1. CRISPR SAM library**

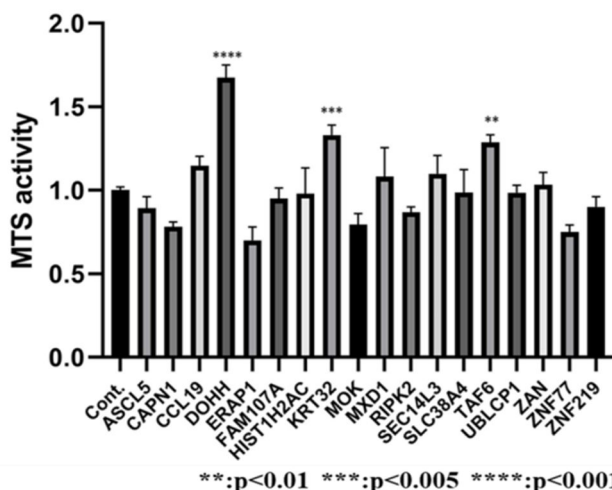
Clone	Gene name	Sequence of gRNA
SAM-1	<i>CAT</i> <i>CCL19</i> <i>DOHH</i> <i>SLC38A4</i>	GGCCAAGATTGGAAGCCCAA CCCTGTTGCCCCCTCTTC TTTTATTCCTCACCTACTTA AAAAGACGCAATTTACCAAC
SAM-2	<i>ASCL5</i> <i>CAPN1</i> <i>DHRS3</i> <i>KCNJ11</i> <i>MXD1</i> <i>TAF6</i>	TAGGGCGATGGCTCTTGTTA CGGAAGGGCACC CGGGGAA TTTTTTCTGGAGACGGGGT TCCGGATCTCTCCACTAAC TTGCGAATCCTGTCACCAGT GTTCCCTGCCTCCGTTTG
SAM-3	<i>ERAP1</i> <i>FAM107A</i> <i>HIST1H2AC</i> <i>KRT32</i> <i>SEC14L3</i> <i>ZNF219</i>	TCGGTCCCCA ACTTGAGCAC TGAAGTTCCAATGACATTCA TTGTCTCCAATTA ACTAAG ATTTGGCTAAAGCAGGAGTC TCTGTCCCCAAGCCAAGCAG ACTCCTTCCCTGGTATGTCC
SAM-4	<i>MOK</i> <i>RIPK2</i> <i>ZAN</i>	AAGGCTATCGTCCACGTAGT TGGGACGGGCGGCTGGGAAG GGACTGCAAACGGCTGGACG
SAM-5	<i>UBLCP1</i> <i>ZNF77</i>	TGTTCCGAATGAAGCTTAAA CCGCCCTGCCTGTCCTGAT

**2. 候補遺伝子に対する NRAS シグナル非存在下における細胞増殖誘導能の検証**

同定された 21 個の NRAS 関連候補遺伝子を NRAS 発現調節可能細胞に導入した。ドキシサイクリン未添加の状態では播種してから 3 日後、細胞数をコントロールと比較した。ドキシサイクリン未添加の NRAS 発現がない状態で、*DOHH*、*KRT32*、*TAF6* は統計学的に有意な細胞増殖を認めた(図 2)。コ

ントロールと比して *DOHH*: 1.59 倍、*TAF6*: 1.25 倍、*KRT32*: 1.22 倍であった。

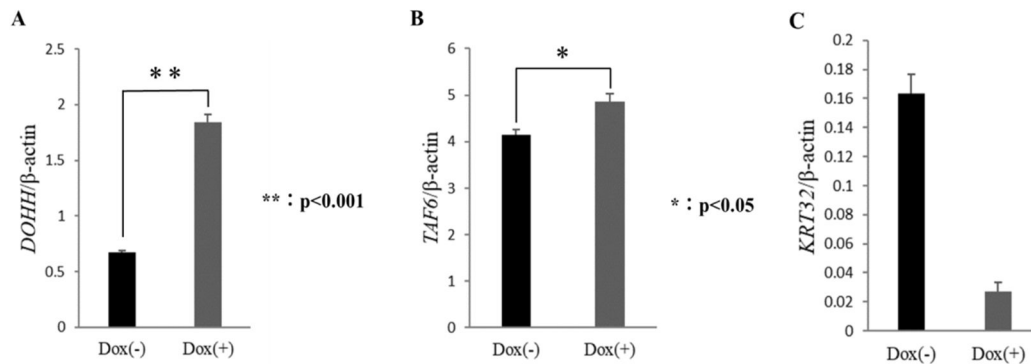
図 2



**3. 候補遺伝子に対する定量的 PCR**

NRAS 発現調節可能細胞をドキシサイクリン未添加の状態では 3 日間培養した細胞と、ドキシサイクリン存在下の細胞を比較した。*DOHH* と *TAF6* はドキシサイクリン存在下である NRAS 発現下では発現が上昇し、ドキシサイクリン未添加である NRAS 未発現下では統計学的に有意な差を認めた(図 3)。

図 3



#### 4. Q-PCR で有意な発現を認めた候補遺伝子に対する Western Blotting

NRAS 発現調節可能細胞をドキシサイクリン未添加の状態です 5 日間培養し、ドキシサイクリン(+)のものにはドキシサイクリンを添加した後、48 時間後に回収した細胞を使用した。DOHH、TAF6 はどちらもドキシサイクリンを添加していない状態と比較して、ドキシサイクリンを添加した状態での発現増加が見られた(図 4)。



#### 引用文献

- 1 . GORGOULIS, V.G. and HALAZONETIS, T.D., 2010a. Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Current opinion in cell biology*, **22**(6), pp. 816-827.
- 2 . KURATA, M., RATHE, S.K., BAILEY, N.J., AUMANN, N.K., JONES, J.M., VELDHUIJZEN, G.W., MORIARITY, B.S. and LARGAESPADA, D.A., 2016a. Using genome-wide CRISPR library screening with library resistant DCK to find new sources of Ara-C drug resistance in AML. *Scientific reports*, **6**, pp. 36199.
- 3 . KONERMANN, S., BRIGHAM, M.D., TREVINO, A.E., JOUNG, J., ABUDAYYEH, O.O., BARCENA, C., HSU, P.D., HABIB, N., GOOTENBERG, J.S., NISHIMASU, H., NUREKI, O. and ZHANG, F., 2015. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, **517**(7536), pp. 583-588.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Umemori Miyaka, Kurata Morito, Yamamoto Akiko, Yamamoto Kouhei, Ishibashi Sachiko, Ikeda Masumi, Tashiro Kojiro, Kimura Takahiro, Sato Shun, Takahashi Hiroyuki, Kitagawa Masanobu	4. 巻 Jan 13 Online ahead of print
2. 論文標題 The expression of MYC is strongly dependent on the circular PVT1 expression in pure Gleason pattern 4 of prostatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	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) 10.1007/s00795-020-00243-9	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 大西威一郎 倉田盛人	4. 巻 72(3)
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 screeningとその応用 (特集 新しい解析技術の展開) The applications of CRISPR/Cas9 screening	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科 Clinical immunology & allergology	6. 最初と最後の頁 287-292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kurata Morito, Wolf Natalie K., Lahr Walker S., Weg Madison T., Kluesner Mitchell G., Lee Samantha, Hui Kai, Shiraiwa Masano, Webber Beau R., Moriarity Branden S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Highly multiplexed genome engineering using CRISPR/Cas9 gRNA arrays	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0198714	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 倉田盛人 山本浩平 Rathe Susan David Largaespada 北川昌伸
2. 発表標題 NRAS発現量依存的な細胞老化シグナルの解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会 東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Morito Kurata, Kouhei Yamamoto, Masanobu Kitagawa, Jingmin Shu, Emily A. Pope, Wenlin Yuan, Wendy A. Hudson, Aaron L. Sarver, Nuri A. Temiz, Mark Sokolowski, Zora Modrusan, Eric Stawski, Stephen Durinck, Sekar Seshigiri, David A. Largaespada
2. 発表標題	Discovery of cancer genes and pathways operative in PI3K activated mammary cancer
3. 学会等名	第78回日本癌学会総会 大阪
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	倉田盛人, 山本浩平, Noble-Orcutt Klara, 山本阿紀子, Sachs Zohar, David Largaespada, 北川昌伸
2. 発表標題	NRAS発現調整可能細胞株を用いたシグナリングの解析
3. 学会等名	第107回日本病理学会総会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	倉田盛人, 山本浩平, 北川昌伸, Noble-Orcutt Klara, Susan K. Rathe, Alexandra Hilles heim, Zain Qarni, Zohar Sachs, David Largaespada
2. 発表標題	NRAS発現調整可能システムとシグナルの解析
3. 学会等名	第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Morito Kurata, Marie L. Antony, Klara E. Noble, Susan K. Rathe, Haruka Hirakouchi, Kouhei Yamamoto, Masanobu Kitagawa, Zohar Sachs and David A. Largaespada
2. 発表標題	Dose-dependent NRASG12V-mediated signaling controls cell cycle progression and leukemogenic signaling in a CRISPR/Cas9-modified human AML cell line
3. 学会等名	AACR Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年	2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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