

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07740

研究課題名(和文) BRAF変異シグナル依存性に影響を及ぼす lncRNAの同定

研究課題名(英文) Identification of lncRNAs that influence BRAF mutation signal dependency

研究代表者

加藤 俊介 (Kato, Shunsuke)

順天堂大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40312657

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)：悪性黒色腫を始め、肺がん、大腸がんなどの一部で見られるBRAF遺伝子の変異は発がんを引き起こす。そのためBRAF遺伝子変異の機能異常を抑える分子標的阻害薬(BRAF阻害剤)が治療目的で開発されているが、薬剤耐性が問題となっている。本研究ではその原因の一因にいくつかの非コーディングRNA分子が関与していることを明らかにした。非コーディングRNA分子は細胞内の蛋白質やRNAの安定性を調節する役割を果たすことが知られており、今回の研究で同定された非コーディングRNA分子は、MITF蛋白質を始めとしたBRAF阻害剤耐性に関与している蛋白質の発現を制御することで耐性機序に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療の現場では、遺伝子の変異に応じてその機能を制御する様々な分子標的薬剤の開発が進んでいるが、治療過程で薬剤に対する耐性が生じることが臨床的な問題となっている。BRAF阻害剤の耐性メカニズムの一因に非コーディングRNA分子が関わっていることを明らかにした今回の成果を応用し、腫瘍内の非コーディングRNA分子を定量化することで、治療効果予測が事前にでき、効果が期待できる患者に必要な治療を提供することが可能となるとともに、抵抗性が予測される患者には非コーディングRNAの制御療法を併用することで治療効果を上げることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：BRAF V600E mutation is a typical driver mutation in oncogenesis reported across different types of cancer, such as malignant melanoma, thyroid cancer, lung cancer, colorectal cancer etc. Molecular target drugs (BRAF inhibitors) that suppress the dysfunction of BRAF gene mutations have been developed for therapeutic purposes, but drug resistance has become a problem. In this study, we clarified that some non-coding RNAs are involved in the resistance mechanism against BRAF inhibitors. Non-coding RNA molecules are known to play a role in regulating the stability of intracellular proteins and RNA. Our data showed that the identified non-coding RNA regulate the RNA expression level of genes known to be involved in resistance mechanisms, such as the MITF gene.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：drug resistance melanoma BRAF long non-coding RNA

1. 研究開始当初の背景

がん遺伝子 BRAF の変異は甲状腺がんをはじめ、悪性黒色腫、大腸がん、非小細胞肺癌など様々な臓器がんでは報告されている代表的なドライバー変異である。もっともよく知られた変異は BRAF V600E であり、この変異はキナーゼ活性が亢進する機能獲得型変異であることが知られている。そのため、キナーゼ活性を阻害する様々な BRAF 阻害剤がこれまで開発されてきたが、BRAF 阻害剤単剤での治療効果は由来臓器に依存し大きく異なっている。例えば Vemurafenib に対する奏効率は悪性黒色腫においては 50%程度であるのに対し、大腸癌では 5%程度にとどまることが報告されている。

BRAF 阻害剤に対する感受性の違いについて、BRAF 阻害剤に対する後天的な耐性機序の解析の報告から、BRAF 遺伝子の増幅、NRAS や PIK3CA の変異による CRAF の活性化など、BRAF 遺伝子自身あるいは増殖シグナルに関わる他の遺伝子の構造の変化により引き起こされることが報告されている。しかし、これら遺伝子構造変異の発生は薬剤負荷による後天的な耐性機序であり、個々の臓器がんが元来有する BRAF 阻害剤の感受性の違いの説明にはならない。また、大腸がんや悪性黒色腫の TCGA の網羅的な遺伝子構造解析の比較を行っても、BRAF 変異依存度や BRAF 阻害剤感受性の差異を説明するコーディング領域の構造的遺伝子変化は観察されないことから、これら差異は臓器特異的な遺伝子発現に影響を与えるエピジェネティックな修飾や翻訳後修飾変化が影響を与えている可能性が高いと想起するに至った。そして、転写、RNA プロセッシング、RNA 分解、miRNA の発現量の調節 (ceRNA)、翻訳、翻訳後修飾など、遺伝子・蛋白発現の様々な段階に影響を与える long non-coding RNA (以下 lncRNA) に着目した。

2. 研究の目的

ゲノム編集技術を利用した網羅的 lncRNA 発現制御システムを用いて、BRAF 変異依存性に影響を与える lncRNA の単離、機能解析を行う。さらに本研究成果をもとに、lncRNA 発現情報を加味した BRAF 変異腫瘍患者の治療反応性・予後予測バイオマーカーの確立と治療の最適化に関わる研究基盤を確立することを最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) 網羅的スクリーニング

BRAF V600E 変異を有する悪性黒色腫由来細胞株 A375 細胞株に Genome-scale dCRISPR-Cas9 synergistic activation mediator (SAM) システムを構築した。これは、不活化 Cas9 と非特異的転写誘導ドメインの融合タンパク質を用いることで、ガイド RNA による標的遺伝子の発現を誘導することができる。ガイド RNA は 10,504 種類の lncRNA の 96,458 か所の転写開始点に設定したライブラリーを用いた (#1000000106, Addgene, USA)。ガイド RNA を導入後、細胞群をダブルフェニブ添加群・非添加群に分け、ダブルフェニブ存在下で残存する細胞から gDNA を抽出し、ガイド RNA 配列部分を PCR したのち次世代シーケンサーで解析を行い (北海道システムサイエンスに解析委託)、ダブルフェニブ耐性に関与すると推測される BRAF 阻害剤耐性 lncRNA 候補を単離した。

(2) データベースを用いた lncRNA 発現量と BRAF 阻害剤感受性との相関解析

網羅的スクリーニングにより単離した上位 50 の lncRNA について、TANRIC データベースおよび DepMap データベースを用いて、BRAF V600E 変異を有する複数の悪性黒色腫細胞株における BRAF 阻害剤耐性 lncRNA 候補の発現レベルとダブルフェニブに対する IC50 との相関解析を行い、lncRNA 発現量と IC50 値の間に正の相関がある lncRNA を同定した。この解析により 3 個の lncRNA を同定した。

(3) in silico による候補 lncRNA の機能解析

TANRIC データベースよりその発現量が候補 lncRNA の発現量と正の相関関係がある mRNA を、この mRNA の発現量を調節する可能性のある miRNA を miWalk データベースおよび miRTarBase データベースを用いて同定した。最後に DIANA-LncBase v3 データベースを用いて、候補 lncRNA と相互作用することが実験的に証明されている miRNA を同定し、lncRNA-miRNA-mRNA ネットワークを構築した。さらに候補 lncRNA の発現に関連する mRNA 群について KEGG および GO 解析を行った。

(4) 候補 lncRNA および mRNA の発現多寡による生存曲線解析

TCGA データベースを用いて、今回の解析で同定された lncRNA, miRNA, mRNA の発現量の多寡による予後への影響について、生存曲線解析を行った。

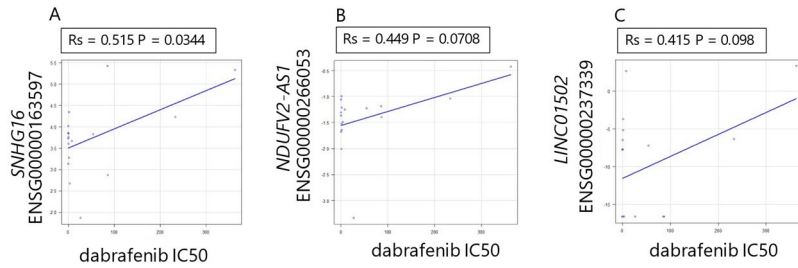
4. 研究成果

網羅的スクリーニングにより複数の TCONS ID を得ることができ、ゲノムの位置情報と照らし合わせ、上位 50 個の Ensemble ID を有する lncRNA 遺伝子を同定した。

次に、BRAF V600E 遺伝子変異を有する悪性黒色腫細胞 13 細胞株のダブルフェニブに対する IC50 のデータを DepMap データベースから、それぞれの細胞株における lncRNA の発現レベルのデー

タを TANRIC データベースから抽出し、ダブラフェニブと発現量の間には正の相関がある 3 つの lncRNA (*SNHG16*, *NDUFV2-AS1*, *LINC01502*) を同定した (図 1)。

図 1. BRAF V600E 変異悪性黒色腫細胞株 (13 種) の dabrafenib IC50 と遺伝子発現レベルの相関

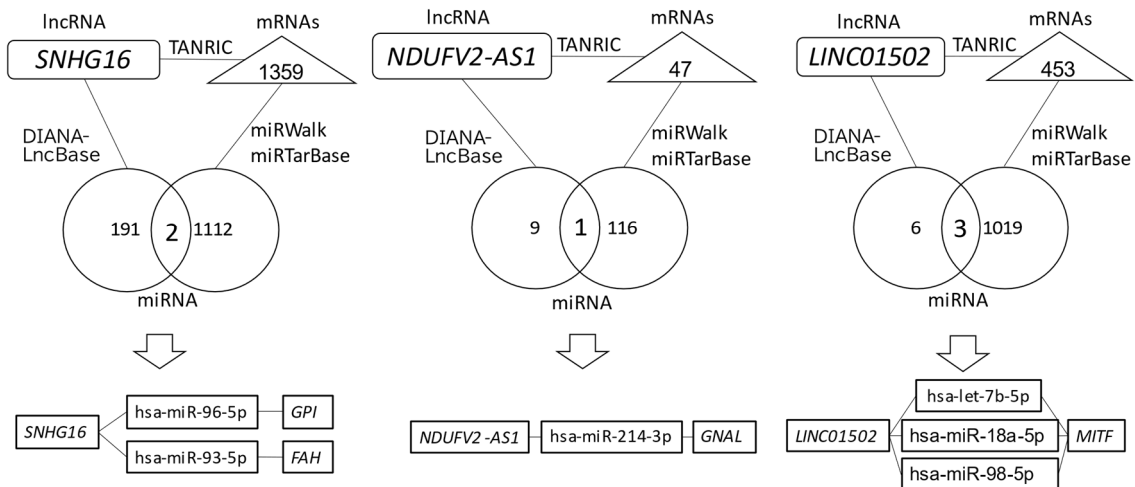


なお、今回同定された lncRNA は BRAF 変異を有する大腸がん細胞株などにおいては高発現を認めなかったが、これは BRAF 変異を有する大腸がん細胞株のデータが少なかったことにも起因していると考えられた。

た。

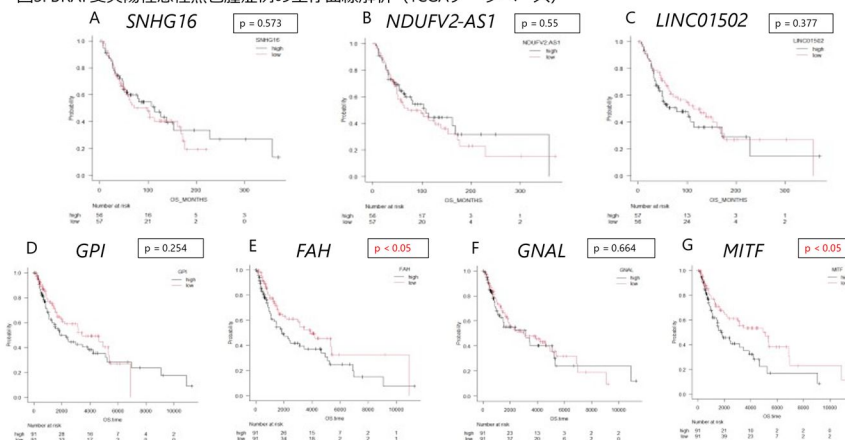
次に、これら lncRNA が、miRNA と結合することで mRNA の遺伝子発現に影響を及ぼす ceRNA (competing endogenous RNA) として機能している可能性についてデータベースを利用して解析を行った。まず、TANRIC データベースを用いて、各 lncRNA についてその発現量が mRNA の発現量と正の相関にある遺伝子群をそれぞれ単離した。次に miRWalk, miRTarBase を利用して、相補的な配列を有して実験的にも mRNA の発現量を制御することが知られている miRNA 群を単離した。DIANA-LncBase v3 データベースを用いて、候補 lncRNA と相互作用することが実験的に証明されている miRNA を同定し、ceRNA 機能として働く lncRNA-miRNA-mRNA ネットワークを構築した (図 2)。

図 2. lncRNA-miRNA-mRNA ネットワーク解析



使用したデータベース (miRWalk, miRTarBase, DIANA-LncBase v3) は配列上の相互作用の予測だけでなく、実験的にも発現制御をしているデータにも基づいていることから、*GPI*, *FAH*, *GNAL*, *MITF* の各遺伝子の発現制御に、これら lncRNA が関与している可能性が強く示唆された。なお BRAF 阻害剤に対する耐性獲得に *MITF* の発現上昇が観察されることは過去に報告されており、今回の報告で発現誘導のメカニズムに *LINC01502* が関わっている可能性が示唆された。また、GO 解析および KEGG 解析では、これら lncRNA の発現レベルと正相関を示す mRNA 群は代謝経路や ERK パスウェイに關する遺伝子群が多く含まれることが明らかになった。

図 3. BRAF 変異陽性悪性黒色腫症例の生存曲線解析 (TCGA データベース)



最後に今回同定した lncRNA および mRNA の発現レベルと悪性黒色腫症例の予後について、TCGA データを用いて解析を行った (図 3)。それぞれの遺伝子の発現レベルの中央値で患者を 2 群に分けて生存解析を行ったところ、BRAF 遺伝子変異を有する患者では、

MITF の発現レベルが高い患者で有意に予後が不良であったが、LINC01502 では発現レベルの違いで統計学的な予後に差はみられなかった。しかしながら、LINC01502 の高値群で予後が不良となる傾向が観察され、MITF 発現レベルの上昇を引き起こすメカニズムの一つとして LINC01502 が関与していることを示唆しているものと考えられる。

今回の研究結果から BRAF 阻害剤に対する感受性に影響を与える因子として lncRNA の存在を明らかにした。さらに、今回用いた手法は BRAF 阻害剤だけでなく、他の分子標的薬剤の耐性獲得機序の解明にも応用が可能であり、臓器横断的にみられるドライバー変異の臓器毎の感受性の違いを解明するのに役立つものと考えられる。

(本研究成果については、現在英文論文に投稿準備中)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Suzuki K, Igata H, Abe M, Yamamoto Y, Iwanaga T, Kanzaki H, Kato N, Tanaka N, Kawasaki K, Matsushita K, Samashima R, Tsukino K, Yokomizo A, Miyashita Y, Sumiyoshi I, Kato S, et al.	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Multiple cancer type classification by small RNA expression profiles with plasma samples from multiple facilities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	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.15309	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 Kido H, Kato S, Funahashi K, Shibuya K, Sasaki Y, Urita Y, Hori M, Mizumura S.	4. 巻 11
2. 論文標題 The metabolic parameters based on volume in PET/CT are associated with clinicopathological N stage of colorectal cancer and can predict prognosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EJNMMI Res	6. 最初と最後の頁 87
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 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 Nakano S, Imawari Y, Mibu A, Kato S, Yamaguchi S, Otsuka M, Sano M.	4. 巻 89
2. 論文標題 Molecular Targeted Therapy for Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor 2-Negative Metastatic Breast Cancer in Clinical Practice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Nippon Med Sch.	6. 最初と最後の頁 88-94
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 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 Funato M., Tsunematsu Y., Yamazaki F., Tamura C., Kumamoto T., Takagi M., Kato S., Sugimura H., Tamura K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Characteristics of Li Fraumeni Syndrome in Japan; A Review Study by the Special Committee of JSHT	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	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.14919	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 Nakano S., Imawari Y., Mibu A., Kato S., Yamaguchi S., Otsuka M., Sano M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Use of molecular targeted therapy for hormone receptor-positive, human epidermal growth factor 2-negative metastatic breast cancer in real-world clinical practice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	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) 10.1272/jnms.JNMS.2022_89-203	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 Yamashiro Y., Kurihara T., Hayashi T., Suehara Y., Yao T., Kato S., Saito T.	4. 巻 11
2. 論文標題 NTRK fusion in Japanese colorectal adenocarcinomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-021-85075-y	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 Kato S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Tumour-Agnostic Therapy for Pancreatic Cancer and Biliary Tract Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 252 ~ 252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics11020252	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 Suehara Y., Kohsaka S., Yamaguchi S., Hayashi T., Kurihara T., Sano K., Sasa K., Akaike K., Ueno T., Kojima S., Ikegami M., Mizuno S., Okubo T., Kim Y., Kaneko K., Saito T., Kato S., Mano H.	4. 巻 478
2. 論文標題 Assessment of Predictive Biomarkers of the Response to Pazopanib Based on an Integrative Analysis of High-grade Soft-tissue Sarcomas: Analysis of a Tumor Sample from a Responder and Patients with Other Soft-tissue Sarcomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Orthopaedics & Related Research	6. 最初と最後の頁 2461 ~ 2476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CORR.0000000000001322	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 Naito Y., Mishima S., Akagi K., Igarashi A., Ikeda M., Okano S., Kato S., Takano T., Tsuchihara K., Terashima K., Nishihara H., Nishiyama H., Hiyama E., Hirasawa A., Hosoi H., Maeda O., Yatabe Y., Okamoto W., Ono S., Kajiyama H., Nagashima F., Hatanaka Y., Miyachi M., Kodera Y., Yoshino T., Taniguchi H.	4. 巻 25
2. 論文標題 Japan society of clinical oncology/Japanese society of medical oncology-led clinical recommendations on the diagnosis and use of tropomyosin receptor kinase inhibitors in adult and pediatric patients with neurotrophic receptor tyrosine kinase fusion-positive advanced solid tumors, cooperated by the Japanese society of pediatric hematology/oncology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 403 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-019-01610-y	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 Takakuwa Kazuya, Mogushi Kaoru, Han Min, Fujii Tomoaki, Hosoya Masaki, Yamanami Arina, Akita Tomomi, Yamashita Chikamasa, Hayashida Tetsu, Kato Shunsuke, Yamaguchi Shigeo	4. 巻 10
2. 論文標題 A novel diagnostic system to evaluate epidermal growth factor receptor impact as a prognostic and therapeutic indicator for lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-020-63200-7	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 HAN MIN, YAMAGUCHI SHIGEO, ONISHI MAI, FUJII TOMOAKI, HOSOYA MASAKI, WEN XUAN, KIDO HIDENORI, KATO SHUNSUKE	4. 巻 42
2. 論文標題 The <i>MDM2</i> and <i>CDKN2A</i> Copy-number-variation Influence the <i>TP53</i>-signature-score in Wild-type <i>TP53</i> Luminal Type Breast Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2277 ~ 2288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15707	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 ONISHI MAI, YAMAGUCHI SHIGEO, WEN XUAN, HAN MIN, KIDO HIDENORI, ARUGA TOMOYUKI, HORIGUCHI SHIN-ICHIRO, KATO SHUNSUKE	4. 巻 43
2. 論文標題 <i>TP53</i> Signature Score Predicts Prognosis and Immune Response in Triple-negative Breast Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1731 ~ 1739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16326	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高桑和也、山口茂夫、茂櫛薫、加藤俊介、野崎由美、秋田智后、山下親正
2. 発表標題 早期肺腺癌におけるEGFR pathway依存度と予後との関係
3. 学会等名 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会
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	藤井 智明 (Fujii Tomoaki) (10511420)	順天堂大学・医学部・非常勤助教 (32620)	
研究分担者	山口 茂夫 (Yamaguchi Shigeo) (40747797)	順天堂大学・医学部・非常勤助教 (32620)	

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