

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06847

研究課題名(和文) 変異KRASが制御する微小環境と発癌分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism for regulating microenvironment and cancer development by mutant KRAS

研究代表者

角田 俊之 (Tsunoda, Toshiyuki)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：70444817

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)：本研究では、変異KRAS制御シグナルにより、制御される微小環境、及び、癌分子機構を解明し、微小環境の構築を阻害する物質を同定することを試みた。まず、HCT116ヒト大腸癌細胞より変異型KRASを欠失させたHKe3細胞に再度、野生型または変異型KRASを強制発現させた、遺伝的背景が均一な細胞を用いた3次元浮遊培養システムを樹立した。このシステムを使用し、約400種天然物由来化合物のスクリーニングを行い、変異KRAS特異的に細胞塊の縮小をきたす8個のコア化合物を取得した。さらに、これらの派生化合物121個を「変異KRAS関連シグナル阻害用組成物」として、特許申請した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to find the compounds through the elucidation of the mechanism for regulating microenvironment and cancer development by the mutated KRAS. Three-dimensional (3D) floating culture system using the isogenic cell lines expressing wild-type KRAS or mutant (mt) KRAS were established from HKe3 cells, derived from colorectal cancer (CRC) HCT116 cells and disrupted at mtKRAS gene, and employed for the drug screening. During screening for 400 core-compounds from natural products which selectively suppress growth of human CRC spheroids with mtKRAS, we found 121 derivatives from 8 core-compounds and obtain a patent as inhibitors for signalling pathway associated with mtKRAS.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：KRAS 3次元培養 低分子化合物

1. 研究開始当初の背景

RAS 遺伝子の変異、あるいは、RAS 経路に位置する分子の変異・発現異常は全腫瘍の約 80% 以上に観察されるが、変異 KRAS そのものをターゲットにする抗癌剤は未だ開発されていない。申請者らはこれまでにヒト大腸癌 HCT116 細胞において活性化 KRAS のみを破壊した HKe3 細胞 (Shirasawa et al. *Science*, 1993 ; Tsunoda, Shirasawa et al. *Cancer Research*, 2000) を用いてマトリジェル 3 次元細胞塊培養を行うと、経時的な解析より内腔にアポトーシスを誘導し、in vivo における大腸クリプト様の増殖様式を示すことが分かり、変異 KRAS が正常な細胞形態を阻害する鍵となる分子であることが分かった (Tsunoda et al. *Neoplasia*, 2010)。そこで、変異 KRAS が 3 次元特異的に制御する分子のうち PDE4B を PDE4B 阻害剤 Rolipram にて阻害すると HCT116 細胞塊に内腔のアポトーシスを伴う極性構造が誘導されることが分かり (Tsunoda et al. *Molecular Cancer* 2012)、癌において形態関連分子が標的と成り得ることが示唆された。その後の変異 KRAS 陽性細胞が、周囲の間質や免疫細胞などの微小環境に作用し、それらの性質を変化させる働き (フィールドエフェクト) の解析の中で、間質成分であるマトリゲルを除去しても、HCT116 細胞および HKe3 細胞は細胞同士の接着および EMT 様変化により独自のいわゆる微小環境を形成し細胞塊を形成する能力を有することが分かり、特に変異 KRAS を有する HCT116 細胞では微小環境構築能が高いことが分かった。我々は、変異 KRAS が 3 次元培養において制御する分子の発現プロファイルを比較した結果、KRAS に変異のある HCT116 細胞塊は幹細胞に関連する WNT シグナル関連分子等や Myofibroblast や EMT に関連する MEF2C 等の主に大腸クリプト底部の幹細胞ニッチにおいて重要な分子群の発現が強く、野生型 KRAS の HKe3 細胞塊は、BMP シグナルの増強等、極性が誘導された分化した形態で大腸クリプト頂部における発現プロファイルに酷似していた。さらには細胞外マトリックスに関連している分子群の中で、HCT116 は幹細胞ニッチと関連すると言わ

れている VCAN (Versican) の発現異常が変異 KRAS により誘導され、HKe3 細胞では多くのがんで発現が抑制されている FBLN1 (Fibulin 1) が発現しており、独自のマトリックス成分を産生していることが示唆された (図 1)。これらの結果は、変異 KRAS 陽性細胞は癌幹細胞化等を介して独自の癌微小環境を自己構築していることを示唆する。本研究では、この変異 KRAS が制御する癌微小環境構築能に焦点をあて、微小環境を形成する過程における変異 KRAS の役割のシングルセルレベルでの解明と、細胞塊における変異 KRAS 制御ドライバー分子群の極性阻害機構の解明、さらには癌細胞塊形態を正常に変化させうる化合物の同定を本研究期間内に行う。

2. 研究の目的

細胞には、それ自身が微小環境を構築する能力を有しており、細胞塊 (スフェロイド) はマトリックス成分がない浮遊培養でも自らでマトリックス成分を産生し、微小環境を構築している。近年我々は変異 KRAS 陽性癌細胞は独自の癌微小環境を構築していることを突き止めた。本研究では、変異 KRAS カスケードが発現制御する微小環境、及び、癌分子機構をシングルセルレベルで解明し、微小環境の構築を阻害する物質の同定により、新たな癌治療法への基盤を構築する。

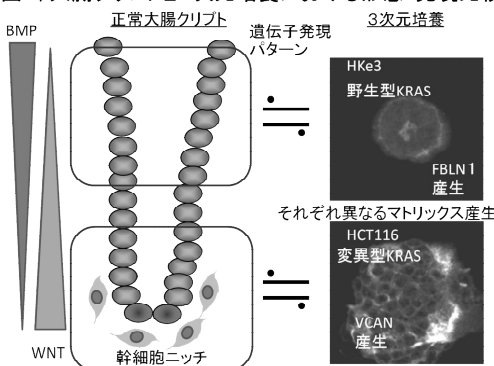
3. 研究の方法

本研究計画では変異 KRAS 陽性細胞による癌微小環境自己構築能に関連する、変異 KRAS が制御する極性形態形成阻害機構の分子レベルでの解明と天然化合物由来阻害剤の選別を行う。HKe3 細胞に wild type (wt) KRAS または mutant (mt) KRAS を強制発現した細胞による 3 次元浮遊培養に天然物由来化合物をスクリーニングする。また、3 次元培養下での変異 KRAS シグナルの解明とともに、このシグナルに影響を及ぼす化合物の結合蛋白も同定する。

4. 研究成果

HKe3-wtKRAS および HKe3-mtKRAS を使用し、600 cell/well ずつ、丸底非接着性 96 well dish に播種し、理研より先行取得している約 400 種の天然化合物パイロットライブラリーの阻害効果を検討した。具体的には培養 3 日目、6 日目に 1 well にひとつ形成された細胞塊の画像を In cell analyzer で取得し、断面積を計測した。一次スクリーニングでは HKe3-mt KRAS を、二次スクリーニングでは、毒性の有無を正常クリプト様の構造をなす HKe3-wtKRAS にて変化がないことを条件に取り込むことで、副作用が少ないと期待できる 8 個のコア化合物の選別が可能であった。さらに、これらの派生物 121 個を「変異 KRAS 関連シグナル阻害用組成物」として、特許申請した。そのうちいくつかはヌードマウスモデルに

図 1) 大腸クリプトと 3 次元培養における形態・発現比較



使用し、良好な結果が得られ、最もよい効果を示すものを STAR2 (仮称) とし、現在 STAR2 に結合する蛋白の同定を行い、標的候補としてハブ蛋白 X を同定した。また STAR2 の制御するシグナリングパスウェイを解析するために、STAR2 投与下での 3 次元培養細胞塊における RNA-seq を施行した。

また、核酸類似構造を有する STAR1 を含む 5-bromouridine 派生物に関しては、3 次元培養での抗腫瘍効果を解析し、*Anticancer Research* 誌に投稿し、受理された。

また、変異 KRAS が発現制御する遺伝子のうち、AKT シグナルの活性化に關与する PDE4 や DNA 修復遺伝子群の発現誘導に關する ALPK2 に変異導入し安定発現細胞を樹立し、機能解析を行った。その結果、細胞塊における PDE4 阻害剤の有効性や ALPK2 の希少変異の存在及びその変異によって生じる細胞極性の異常を解明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Naemura M, Kuroki M, Tsunoda T, Arikawa N, Sawata Y, Shirasawa S, Kotake Y. The Long Noncoding RNA OIP5-AS1 Is Involved in the Regulation of Cell Proliferation. *Anticancer Res*, 38(1):77-81, 2018 査読有

Nishi K, Iwaihara Y, Tsunoda T, Doi K, Sakata T, Shirasawa S, Ishikura S. ROS-induced cleavage of NHLRC2 by caspase-8 leads to apoptotic cell death in the HCT116 human colon cancer cell line. *Cell Death Dis*, 8(12):3218, 2017 査読有

Nishi K, Luo H, Nakabayashi K, Doi K, Ishikura S, Iwaihara Y, Yoshida Y, Tanisawa K, Arai T, Mori S, Sawabe M, Muramatsu M, Tanaka M, Sakata T, Shirasawa S, Tsunoda T. An Alpha-kinase 2 Gene Variant Disrupts Filamentous Actin Localization in the Surface Cells of Colorectal Cancer Spheroids. *Anticancer Res*, 37(7):3855-3862, 2017 査読有

Nishi K, Luo H, Ishikura S, Doi K, Iwaihara Y, Wills L, Baillie GS, Sakata T, Shirasawa S, Tsunoda T. Apremilast Induces Apoptosis of Human Colorectal Cancer Cells with Mutant KRAS.

Anticancer Res, 37(7):3833-3839, 2017 査読有

Ishikura S, Iwaihara Y, Tanaka Y, Luo H, Nishi K, Doi K, Koyanagi M, Okamura T, Tsunoda T, Shirasawa S. The Nuclear Zinc Finger Protein Zfat Maintains FoxO1 Protein Levels in Peripheral T Cells by Regulating the Activities of Autophagy and the Akt Signaling Pathway. *J Biol Chem*. 2016 Jul 15;291(29):15282-91. 査読有

Luo H, Umabayashi M, Doi K, Morisaki T, Shirasawa S, Tsunoda T. Resveratrol Overcomes Cellular Resistance to Vemurafenib Through Dephosphorylation of AKT in BRAF-mutated Melanoma Cells. *Anticancer Res*. 2016 Jul;36(7):3585-9. 査読有

Lapa GB, Tsunoda T, Shirasawa S, Baryshnikova MA, Evseev GG, Afanasyeva DA, Chigorina EA. Synthesis of New Congeners of 1-methyl-3-aminoisoquinolines, Evaluation of Their Cytotoxic Activity, In Silico and In Vitro Study of Their Molecular Targets as PDE4B. *Chem Biol Drug Des*. 2016 Apr;87(4):575-82. 査読有

Ishikura S, Tsunoda T, Nakabayashi K, Doi K, Koyanagi M, Hayashi K, Kawai T, Tanaka Y, Iwaihara Y, Luo H, Nishi K, Okamura T, Shirasawa S. Molecular mechanisms of transcriptional regulation by the nuclear zinc-finger protein Zfat in T cells. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Nov;1859(11):1398-1410. 査読有

Naemura M, Tsunoda T, Inoue Y, Okamoto H, Shirasawa S, Kotake Y. ANRIL regulates the proliferation of human colorectal cancer cells in both two- and three-dimensional culture. *Mol Cell Biochem*. 412(1-2):141-6, 2016 査読有

Iwaihara Y, Ishikura S, Doi K, Tsunoda T, Fujimoto T, Okamura T, Shirasawa S. Marked Reduction in FoxO1 Protein by its Enhanced Proteasomal Degradation in Zfat-deficient Peripheral T-Cells.

Anticancer Res. 35(8):4419-23,
2015. 査読有

Tsunoda T, Ishikura S, Doi K,
Iwaihara Y, Hidesima H, Luo H,
Hirose Y, **Shirasawa S**.
Establishment of a
Three-dimensional Floating Cell
Culture System for Screening Drugs
Targeting KRAS-mediated
Signaling Molecules. *Anticancer
Res.* 35(8):4453-9, 2015. 査読有

[学会発表](計9件)

西 憲祐、羅 昊、梅林 雅代、森
崎 隆、**白澤 専二**、**角田 俊之**．三次元
共培養法を用いた、KRAS 変異大腸癌
に対する Cytokine-activated killer 細胞
と免疫チェックポイント阻害薬併用効
果の検討．第21回バイオ治療法研究会
学術集会，福岡，12月2日，2017

土井佳子，石倉周平，**角田 俊之**，小柳
緑，田中陽子，中林一彦，**白澤 専二**．T
細胞における転写制御分子 ZFAT の分
子機構の解明．日本人類遺伝学会第 62
回大会，神戸，11月15-18日，2017

角田 俊之，**白澤 専二**．PDE4 阻害剤アプ
レミラストは変異 KRAS 陽性大腸癌
細胞株にアポトーシスを誘導する．第
76回日本癌学会学術総会，横浜，9月
28-30日，2017

西 憲祐、羅 昊、**角田 俊之**、**白澤 専
二**．ALPK2 の Q1853E 変異は大腸癌の
造腫瘍活性を促進する 第 20 回バイ
オ治療法研究会学術集会，福岡，12月
10日，2016

羅 昊、西 憲祐、**角田 俊之**、**白澤 専
二**．PDE4 阻害剤 Apremilast の抗腫瘍効
果の検討 第 20 回バイオ治療法研
究会学術集会，福岡，12月10日，2016

角田 俊之，**白澤 専二**．レスベラトロー
ルは AKT を脱リン酸化し BRAF 変異
メラノーマのベムラフェニブ耐性を
抑制する 第 75 回日本癌学会学術総
会，横浜，10月6-8日，2016

角田 俊之、土井佳子、**白澤 専二**．3 次元
特異的変異 KRAS 制御分子 KRAP の造
腫瘍メカニズムの解明 第 19 回バイ
オ治療法研究会学術集会，新宿，12月

5日，2015

角田 俊之，新井富生、森聖二郎、沢辺
元司、村松正明、田中雅嗣、**白澤 専二**．
大腸癌造腫瘍能における ALPK2 遺伝
子変異の機能的解析 日本人類遺伝学
会第 60 回大会，新宿，10月14-17日，
2015

角田 俊之，**白澤 専二**．変異 KRAS 制御
シグナル関連分子を標的とする薬剤を
スクリーニングするための 3 次元浮遊
培養システムの構築 第 74 回日本癌学
会学術総会，名古屋，10月8-10日，
2015

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称：変異 KRAS 関連シグナル阻害剤
発明者：白澤 専二、角田 俊之
権利者：福岡大学
種類：特願
番号：2017-140139
出願年月日：2017年7月19日
国内外の別：国内

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
福岡大学医学部細胞生物学
[http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/cellbio/
top.html](http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/cellbio/top.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

角田 俊之 (TSUNODA, Toshiyuki)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：70444817

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

神武 洋二郎 (KOTAKE, Yojiro)

近畿大学・産業理工学部・准教授

研究者番号：90531963

白澤 専二 (SHIRASAWA, Senji)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：10253535

佐々木 隆光 (SASAKI, Takamitsu)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：00382284

(4)研究協力者

廣瀬 由美子 (HIROSE, Yumiko)

磯山 千代 (ISOYAMA, Chiyo)