

令和元年6月14日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08674

研究課題名(和文) 肺癌におけるRASA1遺伝子変異の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of lung cancers with RASA1 mutations

研究代表者

林 大久生 (Hayashi, Takuo)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70569128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：不死化ヒト肺上皮細胞(HBEC)を用いたin vitroでの実験を行い、RASA1遺伝子変異がHBECにおいてRASシグナル伝達系及びその下流のMEK-ERK、PI3K-AKTシグナル伝達の活性化、細胞増殖亢進を引き起こす事、さらにはRASA1/NF1遺伝子変異陽性細胞はMEK阻害薬であるGSK1120212により、増殖が抑制されることを明らかにした。

日本人613例の非喫煙者及び軽喫煙者の肺腺癌で同定されたドライバー遺伝子異常と臨床病理学的検討を行ったところ、肺腺癌はドライバー遺伝子異常ごとに各々特徴的な臨床病理像を呈していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RASA1/NF1遺伝子変異陽性細胞はMEK阻害薬であるGSK1120212により、増殖が抑制されることが明らかとなり、GSK1120212がRASA1/NF1遺伝子変異陽性症例に対して新規治療薬となる可能性を示した。一方、TCGAのデータセットでは、RASA1の遺伝子変異は2.2%と報告されており、本件研究のコホートにおいても10～30症例程度RASA1遺伝子変異を有する症例を同定できると仮定していたが、非喫煙者・軽喫煙者ではRASA1遺伝子変異陽性の患者は同定されなかった。KRAS遺伝子変異と同様に人種間で変異率に差異がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Knockdown of RASA1 in HBECs activated signaling downstream of RAS and promoted cell growth. Conversely, restoration of RASA1 expression in RASA1-mutated cells reduced MAPK and PI3K signaling. While growth of cell lines with inactivation of only one of these two RasGAPs showed moderate and variable sensitivity to inhibitors of MEK or PI3K, cells with concurrent RASA1/NF1 mutations were profoundly more sensitive (IC50: 0.040uM GSK1120212). To better understand the histopathological features of these tumor, we compared histological features of 613 surgically resected lung adenocarcinomas in never or light smokers between each mitogenetic driver alteration. 79% of cases in our archive had mitogenetic driver alterations; METex14 was the sixth most frequently altered gene (13 tumors, 2.1%), and other alterations included mutations of EGFR (59%), KRAS (6.0%), ERBB2 (2.5%), BRAF (2.5%), MAP2K1 (1.1%), fusions of ALK (2.6%), RET (1.0%), ROS1 (1.4%), and NRG1 (0.5%).

研究分野：分子病理学、人体病理学

キーワード：肺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の飛躍的な進歩は、悪性腫瘍における特異的変異遺伝子の発見等、悪性腫瘍の疾患概念自身をも大きく変えつつある。肺癌の分野においても分子標的薬の登場及びバイオマーカー研究の進歩により、肺癌治療の個別化医療が実現しつつあり、2015年に改訂されたWHO分類においても組織形態に加え、個別化医療の患者選択に繋がる分子診断が強調されている。肺腺癌ではこれまで *EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *HER2*, *BRAF*, *MAP2K1* 遺伝子変異の他、*ALK*, *RET*, *ROS1* 融合遺伝子が、癌の発生・進展に直接的に重要な役割を果たすドライバー遺伝子として報告され、分子治療の標的とされている。しかしながら全肺腺癌の中でドライバー遺伝子変異が占める割合は64%程度であり、未だ30%以上の肺腺癌においてドライバー遺伝子及び分子治療標的が不明である。

一方、RasGAPs タンパクファミリーに属する *RASA1* 遺伝子異常は肺癌の他、頭頸部、消化管、乳癌、前立腺癌等に3-12%程度の頻度で見られる。肺癌においては、腺癌の2.2%、扁平上皮癌の5.6%を占めており、他臓器癌と比し、全変異の63%を truncating mutation が占めている点、及び RasGAP, SH2, SH3 といった *RASA1* の機能ドメインに遺伝子変異が比較的多く集中している点から、*RASA1* 遺伝子異常は肺癌の発生・進展に重要な役割を果たしているドライバー遺伝子可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、*RASA1* 遺伝子異常を有する肺癌の臨床病理学的特徴を明らかにするとともに、治療標的となりうる候補薬剤を選択する。

3. 研究の方法

不死化ヒト肺上皮細胞を用いた機能解析を *in vitro* での実験を行い、*RASA1* 遺伝子変異がヒト肺上皮細胞において RAS シグナル伝達系の活性化及び細胞増殖、浸潤能亢進を引き起こす事を明らかにする。また、*RASA1* 遺伝子変異を有するヒト肺癌細胞株において、それら細胞株が RAS シグナル伝達系依存性に増殖している事を確認するとともに、RAS-MEK-ERK シグナル伝達系及び RAS-PI3K-AKT シグナル伝達系阻害剤に対する薬剤感受性実験を施行し、治療標的となりうる候補薬剤を選択する。

4. 研究成果

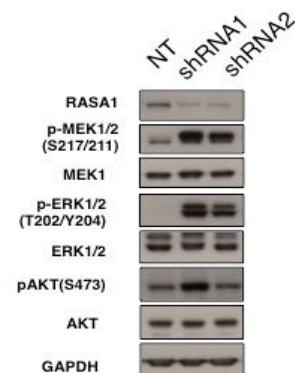
1. ヒト肺上皮細胞における *RASA1* 遺伝子の機能解析

RASA1 遺伝子ノックダウン不死化ヒト肺上皮細胞の作成

Non-target shRNA 及び 5 種類の shRNA (MISSION@Sigma-Aldrich) を用いて不死化ヒト肺上皮細胞の *RASA1* 遺伝子ノックダウンを行う。我々の preliminary data では不死化ヒト肺上皮細胞における *RASA1* タンパクの発現を確認しており、また、2種類の shRNA で *RASA1* 遺伝子ノックダウン不死化ヒト肺上皮細胞を作成した。

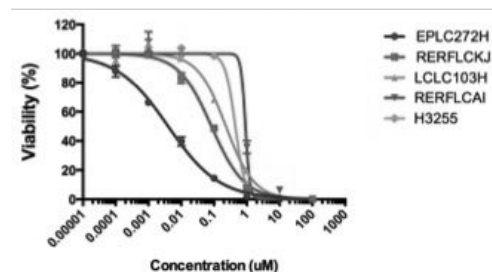
a. リン酸化キナーゼのスクリーニング

RASA1 遺伝子ノックダウン細胞から抽出したタンパク質を用いて Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D) 及び Proteome Profiler™ Human Phospho-RTK Array Kit (R&D) を用い、RAS-MEK-ERK シグナル伝達系及び RAS-PI3K-AKT シグナルの亢進及び他のシグナル伝達系の活性の有無を確認、得られた結果はウェスタンブロット法により確認したところ、*RASA1* 遺伝子ノックダウン細胞では MEK, ERK, AKT のリン酸化が亢進していた(右図)。



b. 細胞増殖の測定

Countess cell counting chamber slide を用いた細胞数測定及び CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) を用いた蛍光シグナルの測定を行った。*RASA1* 遺伝子ノックダウンにより、細胞増殖を促進された。



2. RAS-MEK-ERK 及び RAS-PI3K-AKT シグナル伝達系阻害剤に対する薬剤感受性実験

MEK inhibitor (GSK1120212, AZD6244), PI3K inhibitor (XL765, GDC0941, PI103) 等のシグナル阻害剤を用いて、細胞増殖の定量を行った。*RASA1*/NF1 遺伝子変異(共に truncating mutation) を有するヒト肺癌細胞株では GSK1120212 が著しい感受性を示した (図3)。

3. 日本人コホートでの *RASA1* 遺伝子変異陽性症例の抽出及び臨床病理学的検討。

順天堂大学呼吸器外科、呼吸器内科、整形外科、難治性疾患実用化研究室、及び、東京大学ゲノム医学講座との共同研究により、網羅的 Tyrosine Kinase 遺伝子変異・融合遺伝子検索システム (NanoStringnCounter) 及び、NGS(次世代シーケンサー)を用いた whole exome sequence, RNA sequence を施行し、順天堂大学附属順天堂医院で手術された肺腺癌 996 例のコホートにおいて、非喫煙者・軽喫煙者のドライバー遺伝子異常を網羅的に解析した。TCGA

のデータセットでは、*RASA1* の遺伝子変異は 2.2%と報告されており、10~30 症例程度 *RASA1* 遺伝子変異を有する症例を同定できると仮定していたが、非喫煙者・軽喫煙者では *RASA1* 遺伝子変異陽性の患者は同定されなかった。*KRAS* 遺伝子変異と同様に人種間で変異率に差異がある可能性が示唆された。

また、上記の 996 例に対する遺伝子結果の中で、病理組織像とドライバーとの関連を抽出するために非喫煙者及び軽喫煙者における臨床病理学的検討を施行したところ、*EGFR* (59%), *KRAS* (6.0%), *ERBB2* (2.5%), *BRAF* (2.5%), *MAP2K1* (1.1%), *fusions of ALK* (2.6%), *RET* (1.0%), *ROS1* (1.4%), *NRG1* (0.5%)融合遺伝子が同定されており、これら遺伝子異常は各組織亜型に広く分布していたが、*BRAF* (56%), *MAP2K1* (57%)陽性例は上皮内癌に多くみられた。*ERBB2* 変異は若年者に多く、33%の症例で微小乳頭状構造を認めた。*METex14* は高齢者に多く、38%の症例で pleomorphic cells の混在を認め、*ERBB2*, *METex14*, *BRAF*, *MAP2K1* 陽性肺腺癌は各々特徴的な臨床病理像を呈していた。また、*EGFR* compound mutation 陽性 64 例に対して臨床病理学的検討を施行、*EGFR* compound mutation 陽性例は、L858R, del19 といった common mutation あるいはそれ以外の稀な *EGFR* 変異例と概ね同様の臨床病理像を呈していたが、淡明な癌細胞の混在が見られ、全生存期間において予後不良であった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 29 件)

1. Hara K, Saito T, Hayashi T, Mitani K, Takamochi K, Oh S, Suzuki K, Yao T. Inverse correlation between galectin-4 and TTF-1 in lung adenocarcinoma. *Virchows Arch*. 2017 Sep;471(3):375-382.
3. Hayashi T, Desmeules P, Smith RS, Drilon A, Somwar R, Ladanyi M. *RASA1* and *NF1* are preferentially co-mutated and define a distinct genetic subset of smoking-associated non-small cell lung carcinomas sensitive to MEK inhibition. *Clin Cancer Res*. 2018 Mar 15;24(6):1436-1447.
2. Hayashi T, Takamochi K, Yanai Y, Mitani K, Tomita H, Mogushi K, Suehara Y, Takahashi F, Suzuki K, Saito T, Yao T. Non-small cell lung carcinoma with diffuse co-expression of thyroid transcription factor-1 and Δ Np63/p40. *Hum Pathol*. 2018 Aug;78:79-88.

〔学会発表〕(計 19 件)

1. Hayashi T, Patrice Desmeules, Roger S. Smith, Alexander E. Drilon, Romel Somwar, Marc Ladanyi. *RASA1* and *NF1* co-mutated non-small cell lung carcinomas: cancer genomic data and evaluation of sensitivity to MEK inhibition. 2017 ASCO Annual Meeting, McCormick Place, Chicago, IL
2. 林 大久生, 高阪 真路, 高持 一矢, 末原 義之, 茂櫛 薫, 高橋 史行, 齋藤 剛, 鈴木 健司, 間野 博行, 八尾 隆史. 肺腺癌におけるゲノム・病理組織学の統合的解析: *ERBB2*, *METex14*, *BRAF*, *MAP2K1* 陽性腺癌の臨床病理学的特徴. 107 回日本病理学会総会 2018 札幌.
3. Hayashi T, Shinji Kohsaka, Kazuya Takamochi, Fumiyuki Takahashi, Yoshiyuki Suehara, Tsuyoshi Saito, Kenji Suzuki, Hiroyuki Mano, Takashi Yao. Clinicopathological characteristics of lung adenocarcinoma with *EGFR* compound mutations. 108th USCAP Annual Meeting 2019, National Harbor, Maryland, USA

〔図書〕(計 1 件)

林 大久生. 病理診断医の立場から見たがんクリニカルシーケンス検査 -MSK-IMPACT 日本導入の経験から- *PrecisionMedicine*. 2019.2.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：齋藤 剛

ローマ字氏名: Tsuyoshi Saito

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部人体病理病態学講座

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80439736

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。