

令和 2 年 11 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20968

研究課題名（和文）環境調節型がん遺伝子としてのBRAF遺伝子変異の意義

研究課題名（英文）Significance of BRAF gene mutation on tumor microenvironment

研究代表者

佐伯 亘平（SAEKI, Kohei）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任助教

研究者番号：30769005

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：犬移行上皮癌(cTCC)におけるBRAF変異のがん遺伝子としての働きを腫瘍細胞自身に与える増殖作用とCOX2-PGE2を介して周囲環境を調節する作用の両面から検討した。その結果、BRAF変異により活性化されるRAF/MEK/ERK経路がcTCC細胞の細胞増殖に与える影響は大きくないが、阻害時にはバイパス経路が活性化することが示唆された。むしろBRAF経路の活性化は腫瘍細胞のCOX2発現とPGE2産生に強く関与することを明らかにした。臨床検体における検討ではBRAF変異症例でCOX2が高発現する傾向を見出し、またBRAF変異の有無によりCOX2が形成する炎症環境が大きく異なる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではイヌの移行上皮癌をもちいてがん遺伝子に起こった変異とそれにより直接活性化された細胞内シグナルが、がん微小環境の炎症状態を誘導している可能性を明らかにした。癌に対する抗炎症治療を実施する上で新たな概念を立証した重要な一歩である。

研究成果の概要（英文）：In this study, significance of BRAF gene mutation on both of cell proliferation/survival and tumor microenvironment/inflammation was evaluated using canine transitional cell carcinoma (cTCC). As a result, impact of activation of RAF/MEK/ERK pathway, subsequent to BRAF gene mutation, on cTCC cell proliferation was not significant or dispensable due to presence of other possible bypass pathways. On the other hand, activation of BRAF pathway was strongly associated with COX expression and PGE2 production in the tumor cells. In evaluation of cTCC clinical samples, it was revealed that BRAF-mutant cTCC tissues tended to have higher COX2 immunostaining score. In addition, it was suggested that inflammatory environment induced by COX-2 was not identical between wild-type cTCC and BRAF mutant.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：BRAF COX2 PGE2 がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

多くの悪性腫瘍において炎症が腫瘍の進展に深く関与することが知られている。その中で中心的な働きを示すのが COX2-PGE2 経路であり腫瘍細胞増殖・炎症細胞浸潤や血管新生・透過性亢進を誘導することで腫瘍の悪性化を引き起こす。犬の移行上皮癌(cTCC)や前立腺癌は COX2 が過剰発現していることからこれらの関与が強く疑われる腫瘍であり、COX2 阻害効果を持つ NSAIDs が抗腫瘍効果を示すことが臨床的に知られている。申請者らは犬腫瘍における NSAIDs の抗腫瘍効果が直接的な細胞障害作用ではなく、癌微小環境やそこに存在する他の細胞との相互作用を介することを支持する結果を得ており、同時に cTCC 細胞が他の犬悪性腫瘍細胞と比較して膨大な量の PGE2 を産生していることを見出した。

2015 年に cTCC におけるがん遺伝子変異として BRAFV595E が同定された。同一の BRAF 変異は人の皮膚悪性黒色腫のがん遺伝子であり、腫瘍細胞の増殖がこの遺伝子変異に強く依存している (=Oncogene addiction)ことが明らかになっている。申請者らが犬悪性腫瘍細胞株の遺伝子型を検討したところ、cTCC の全ての細胞株が BRAF 変異保有株であったが、BRAF 阻害に対しては強い抵抗性(IC50 >1000 nM)を示した。この結果は犬の腫瘍において BRAF 遺伝子変異は単純に腫瘍の無秩序な増殖を引き起こしているのではないことを示唆している。

さらに申請者は犬腫瘍における BRAF 変異の意義を探索する中で、PGE2 過剰産生株と BRAF 変異保有株が完全に一致していたことに着目した。そこで BRAF 及びその下流の MAPK/ERK 経路分子(MEK,ERK)を阻害し関連分子の変化を調べたところ、MAPK 経路阻害は複数の BRAF 変異細胞に対し COX2 発現及び PGE2 産生を強く抑制することを発見した。また、動物移植モデルにおいても BRAF 変異株は移植部位依存的な生着・成長を見せ、周辺環境との相互作用が非常に重要であることが示唆された。これらの結果から「犬の移行上皮癌における BRAF 遺伝子変異は細胞に BRAF-addicted な細胞増殖を誘導するのではなく、過剰な COX2-PGE2 の産生を介して周囲の細胞に作用し、腫瘍組織としての成長を助ける環境調節型のがん遺伝子なのではないか」との仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究では、BRAF 変異のがん遺伝子としての働きを「腫瘍細胞自身に与える増殖作用」と「COX2-PGE2 を介して周囲環境を調節する作用」の両面から検討し、環境調整型がん遺伝子という新規概念の検証を目的とする。

(1) 腫瘍細胞において BRAF 阻害が細胞増殖に与える影響を多面的に検証し、

BRAF-addicted な細胞増殖の有無を精密に評価する。

(2) BRAF 遺伝子変異が細胞の COX2-PGE2 の過剰発現を引き起こすかどうかを明らかにし、またそのメカニズムを解明する。

(3) 症例検体を用いて生体内での BRAF 遺伝子変異の有無と COX2-PGE2 発現量の関連、またこれらが腫瘍の性状に与える影響を調査する。

3. 研究の方法

(1) BRAF 阻害が BRAF 変異 cTCC 細胞株の細胞増殖に与える影響の評価

変異 cTCC 細胞株に BRAF 阻害薬を含む各種 ERK/MAPK 阻害薬を 10 μM で暴露し、細胞障害性を評価した。また BRAF 阻害剤 (Dabrafenib) ・ MEK 阻害剤 (PD0325901) ・ ERK 阻害剤 (SCH772984) に関しては、cTCC3 株を用いて用量反応曲線を作成した。さらに cTCC 細胞株を dabrafenib 1 μM に 12 時間暴露したのちに細胞の mRNA を回収し、トランスクリプトーム解析を実施した。

BRAF 阻害薬添加時の細胞内シグナル評価にはウエスタンブロッティング法を用いて、p-ERK、p-AKT の評価を行った。

(2) BRAF 遺伝子変異と COX2-PGE2 産生の関連とそのメカニズムに関する検討

変異 cTCC 細胞株に文部科学省が提供する低分子化合物ライブラリ (SCADs inhibitor kit 1-4) を添加し 12 時間後の PGE2 産生量の変化を評価した。また dabrafenib 1 μM 暴露時の COX2 mRNA 及びタンパク量、ERK リン酸化、さらに PGE2 産生量の変化を経時的に評価した。同様の評価を pan-RAF 阻害剤である LY3009120 を用いて評価した。

(3) cTCC 症例において BRAF 変異が腫瘍性状に与える影響の評価

cTCC 症例 30 検体を用いて、digital PCR 法を用いて BRAF 遺伝子型を判定した。また、免疫組織化学染色法にて COX-2 の発現強度と IBA-1 (マクロファージ)、CD3 (Tcell)、CD20 (Bcell)、myeloperoxidase (好中球)、CD31 (血管新生)、SMA (がん関連線維芽細胞) 陽性細胞数を評価し、相互の関連を評価した。

4. 研究成果

(1) BRAF 阻害が BRAF 変異 cTCC 細胞株の細胞増殖に与える影響の評価

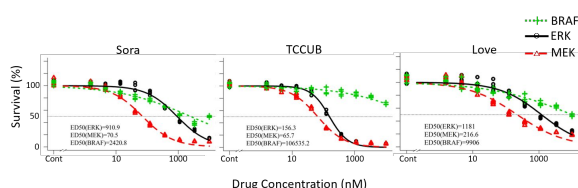
RAF/MEK/ERK 阻害薬を BRAF 変異細胞株 (Sora) に添加し 48 時間後の細胞生存率を評価したところ、いずれの薬剤も高い細胞障害活性を示さなかった (表 1)。

表1 ERK/MAPK の細胞障害効果

薬剤	標的分子	細胞生存率 (% Control)
ERK inhibitor II	ERK	61.9
MEK inhibitor I	MEK	47.2
PD 98059	MEK	71.1
RAF1 kinase inhibitor I	RAF	90.3
Tpl2 kinase inhibitor	TPL2	64.5
U0126	MEK	57.1
Vemurafenib	RAF	75.6
ZM 336372	RAF	97.9

また BRAF 変異株に BRAF 阻害薬を様々な濃度で添加しても、高濃度でのみ細胞障害活性が見られるのみであった(図1)。

図1 BRAF 変異cTCC 株に対する RAF/MEK/ERK 阻害薬の細胞障害効果

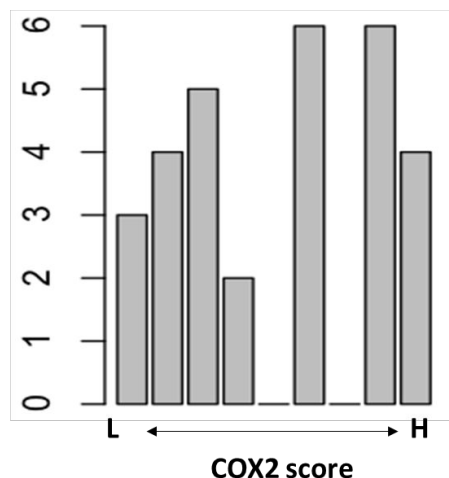


(2)SCADs inhibitor kit を用いて BRAF 変異 cTCC 細胞株(Sora)の PGE2 産生量に与える影響を評価し、50%以上 PGE2 産生を抑制した薬剤に関してパスウェイ解析を行ったところ、Sora における PGE2 産生には ERK/MAPK 経路、アラキドン酸カスケード、p38/JNK 経路が大きく関与することが示唆された。各種阻害剤を用いて検討を追加したところ、ERK、p38 経路の活性化は COX2 発現を誘導し、JNK 経路は抑制していることが判明した。

(3)cTCC 症例では 100%の症例が COX2 を発現していたが、その発現強度は 2 鋒性を示し、有意ではないものの BRAF 変異症例の方が発現強度が高い傾向にあった(図2)。

図2 cTCC 症例における COX2 発現強度

症例



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 1 件)

Ryohei YOSHITAKE[†], Kohei SAEKI[†], Manabu WATANABE, Nanako NAKAOKA, Siew Mei Ong, Mimu HANAFUSA, Choisunirachon NAN, Naoki FUJITA, Ryohei NISHIMURA, Takayuki NAKAGAWA. Molecular investigation of the direct anti-tumour effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in a panel of canine cancer cell lines. The Veterinary journal Vol.221(2017) pp.38-47. (査読あり)

Ryohei YOSHITAKE, Kohei SAEKI[†], Shotaro Eto, Masahiro SHINADA, Rei NAKANNO, Hiroshi SUGIYA, Yoshifumi ENDO, Naoki FUJITA, Ryohei NISHIMURA, Takayuki NAKAGAWA. Aberrant expression of the COX2/PGE 2 axis is induced by activation of the RAF/MEK/ERK pathway in BRAF V595E canine urothelial carcinoma. Scientific Reports 10, 7826, 2020.

〔学会発表〕(計 5 件)

吉竹涼平、佐伯亘平、藤田直己、西村亮平、中川貴之. Anti-tumor effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on canine transitional cell carcinoma cells in an orthotopic in vivo model. 第16回東京大学生命科学シンポジウム.

佐伯亘平. がん と NSAIDs. 日本獣医学臨床フォーラム 2016 年次大会 (招待講演)

Ryohei YOSHITAKE, Kohei SAEKI, Ryohei KINOSHITA, Kazuyuki UCHIDA, Takayuki NAKAGAWA, Ryohei NISHIMURA. Impact of BRAF genotype on prognosis after total cystectomy in canine urinary bladder transitional cell carcinoma. 6th Conference of Asian Society of Veterinary Surgery.

佐伯亘平. がん と NSAIDs 犬と猫における抗腫瘍効果を科学する. 第17回日本獣医がん学会 (招待講演)

吉竹涼平、衛藤翔太郎、佐伯亘平、田中由依子、加藤大貴、吉本翔、西村亮平、中川貴之. BRAFV595E 変異犬尿路上皮癌におけるプロスタグランジン E2 産生と細胞増殖を標的とした薬剤スクリーニング. 先端モデルプラットフォーム成果発表会.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特に無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 巨平 (SAEKI, Kohei)

東京大学 農学生命科学研究科 特任助
教

研究者番号：30769005

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()