

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16416

研究課題名（和文）肝内胆管癌に特異的なBAP1変異を標的としたリポジショニング薬の同定

研究課題名（英文）Identification of repositioning drugs targeting BAP1 mutation specific to intrahepatic cholangiocarcinoma.

研究代表者

高橋 純一（Takahashi, Junichi）

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：60869569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ICC検体から得られたdataとpublic dataを使用し、複数の症例間で共通に存在するドライバー変異を選出し、ドライバー遺伝子の変異型症例と野生型症例間で有意に発現が異なる遺伝子を調べ、L1000データベースと合わせ、スコア化した。BAP1に注目し、有望な薬剤を選出し、薬剤をBAP1 knockdown ICC株化細胞と野生型の株化細胞に投与した。PCRではcell cycle、代謝に関わる遺伝子がBAP1 knockdown群でより強く発現が変化し、Western Blottingでは、G2M遺伝子発現が濃度依存的に発現が変化した。public dataを使用して作用機序を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、次世代シーケンサーなどの技術革新により標的分子が明確化され高い抗腫瘍効果が期待できるようになったが、治療アームの種類が乏しいために未だに難治性を呈している疾患がある。チロシンキナーゼ阻害薬対象外であるKRAS変異型大腸癌、膵癌、肝内胆管癌である。特に膵癌や肝内胆管癌は極めて高い悪性度にも拘わらず近年増加傾向にあることなどから、本研究により真の治療標的候補を絞り、創薬を目指す。また、ドラッグリポジショニングの手法を用いることで開発期間の短縮と医療費の削減を目指す。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to find a therapeutic agent for intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) using a drug repositioning approach. Ten ICC surgical resection samples were collected. Using the obtained data and public data, we selected driver mutations that were common among multiple cases, examined genes whose expression differed significantly between mutant and wild-type cases of the driver genes, and scored them in conjunction with the L1000 database. As a result, we focused on BAP1 and selected 5 drugs as promising agents. We compared the changes in proliferative ability and focused on Drug X. PCR showed that the expression of genes related to cell cycle and metabolism were more strongly altered in the BAP1 knockdown group. In Western blotting, G2M gene expression changed in a concentration-dependent manner. Public data were used to investigate the mechanism of action, and the results support the in vitro results.

研究分野：肝細胞癌、肝内胆管癌

キーワード：肝内胆管癌 ドラッグリポジショニング 創薬 BAP1 遺伝子変異

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌(Intrahepatic Cholangiocellular Carcinoma ; ICC)は原発性肝癌の一種であり、予後不良である。また、治療抵抗性を有しており、世界的には希少癌であるため、有効な治療薬も少ない。そのため、本疾患に有効な治療薬の開発が求められている。また、近年、ある疾患に有効な治療薬から、別の疾患に有効な薬効を見つけ出すドラッグリポジショニングは開発期間の短縮や医療費の抑制の点でも注目されている。研究協力者である九州工業大学山西芳裕教授は発現パターンを打ち消す関係性を示すツール化合物を探索するアプローチを用いて、これまでに炎症性大腸炎、前立腺癌、大腸癌などで治療薬候補を同定している(Lamb et al, *Science*, 2006; Iorio et al, *Proc Natl Acad Sci*, 2010; Dudley et al., *Sci Transl Med*, 2011; Kosaka et al., *Cancer Sci*, 2013; van Noort et al., *Cancer Res*, 2014)。

### 2. 研究の目的

本研究は、予後不良で治療抵抗性を有する肝内胆管癌のリポジショニング薬を発見することを目的とする。当院は独自に収集した希少癌である肝内胆管癌のマルチサンプリングデータを保有しており、その全エクソンシーケンスデータを使用し、山西芳裕教授が保有するL1000データベースと合わせることで、ドライ解析のみで肝内胆管癌に有効と考えられる薬剤を選出した部分に独自性がある。

### 3. 研究の方法

本研究では、肝内胆管癌に有効な薬剤を発見し、その効果を確認し、作用機序を明らかにする。

**肝内胆管癌に有効な薬剤の発見:** 当院保有の肝内胆管癌外科的切除症例10症例マルチサンプリング(各症例腫瘍部3-9箇所、正常肝組織1箇所)の全エクソンシーケンスデータより、突然変異数を調べ、変異アレル頻度のヒートマップを描き、クラスタリングに基づいて系統樹を描いた。Nakamuraらの報告(Nakamura H, Shibata T et al, *Nat Genet*, 2015)に基づいてドライバー変異を系統樹にマッピングした。突然変異数が多く、複数の症例間で共通に存在するドライバー変異NRAS、BAP1、SMAD4、ARID1Aを有望な遺伝子として選別した。次に、ドライバー遺伝子の変異型症例と野生型症例間で有意にmRNA発現が異なる(q value < 0.001)遺伝子を選出した。山西芳裕教授らのL1000データベースと合わせて、薬剤を使い元々高発現な遺伝子が低発現に、逆に元々低発現な遺伝子が高発現になるように逆相関となる薬剤を予想し、コサイン類似度でスコア化した。当院データのみでは偏りがある可能性を憂慮し、大規模胆管癌遺伝子データセット(TCGA)を使用し、同様の手法を用いて、コサイン類似度でスコア化した。データの有無、相関係数よりBAP1を有望な変異遺伝子とし、当院データおよび大規模胆管癌遺伝子データセットで共に上位のスコアとなった3薬剤に加えて、当院データで最上位、大規模胆管癌遺伝子データセットで上位となった2薬剤を加えた5薬剤を肝内胆管癌に有効な薬剤として選出した。

#### 薬剤の効果の検証:

- i) 肝内胆管癌 cell line の変異の確認; 当院が保有する肝内胆管癌株化細胞 2 種(HuH28、SSP25)の変異を確認するためサンガーシーケンスを行う。
- ii) siRNA による BAP1 knockdown による効果の確認; BAP1 knockdown により癌抑制因子である BAP1 の変異型と同様に増殖能の増加が認められるか、MTT assay、colony formation assay で確認する。
- iii) CRISPR-Cas9 システムによる BAP1 knockout 株による効果の確認; CRISPR-Cas9 システムでゲノム編集し、BAP1 knockout 株を作成し、MTT assay、colony formation assay による変化を確認する。
- iv) Zebrafish による in vivo の検証; 愛知県がんセンター研究所 細野祥之らとともに上記株化細胞を生後 2 日の Zebrafish に接種し、Xenograft を形成し、生育の時期に合わせて、薬剤を投与し、抗腫瘍効果(腫瘍縮小効果)の確認を行う。
- v) ノードマウスによる in vivo の検証; ノードマウスを使用し、肝内胆管癌 BAP1 knockout 株によるマウス皮下腫瘍モデルを作成し、薬剤投与による抗腫瘍効果(腫瘍縮小効果)の確認を行う。

#### 作用機序の解明:

- i) 蛋白アレイ、RNA sequence による解析; 蛋白アレイ、RNA sequence を行い、薬剤投与前後の変化をスーパーコンピュータ(SHIROKANE)を使用し、解析を行う。
- ii) オルガノイドを使用した抗腫瘍効果の評価; 同定した化合物の抗腫瘍効果の評価として、同定した分子変異の knockout もしくは knockin での in vitro での解析としてオルガノイドを使用したアプローチで検証する。
- iii) 臨床検体を使用した評価; 判明した標的変異に対して、臨床検体における変異を調べ、臨床的意義を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

ICC 外科的切除マルチサンプリング検体を 10 症例(各症例腫瘍部 3-9 ヶ所、正常肝組織 1 ヶ所)収集し、各々全エキソシーケンスと RNA sequence を施行した。得られたデータと大規模胆管癌遺伝子データセット(The Cancer Genome Atlas ; TCGA)を使用し、複数の症例間で共通に存在するドライバー変異 NRAS、BAP1、SMAD4、ARID1A を選出し、それぞれの遺伝子でドライバー遺伝子の変異型症例と野生型症例間で有意に発現が異なる遺伝子を調べ、九州工業大学 山西芳裕教授の有する L1000 データベース(既存薬 1112 種を株化細胞 66 種に投与して得られた遺伝子 978 個の発現プロファイル)と合わせ、スコア化した。その結果、BAP1 に注目し、有望な薬剤として 5 薬剤を選出した。選出した薬剤を ICC 株化細胞である SSP25 に sanger sequence を行い、BAP1 変異がないことを確認した。増殖能の変化を比較検討し、2 薬剤(薬剤 X、薬剤 Y)に注目した。BAP1 を knockdown した ICC 株化細胞と野生型の株化細胞に投与し、RNA とタンパクを抽出し、それぞれ、RT-PCR、Western Blotting を行った。PCR では cell cycle、代謝に関わる遺伝子が BAP1 knockdown 群でより強く発現が変化し、Western Blotting では、G2M 遺伝子発現が薬剤 X の濃度依存的に発現が変化した。public data を使用して作用機序を調べ、in vitro の実験結果を支持する結果が得られた。現在 RNA sequence を提出し、更なる解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋純一、増田隆明、北川彰洋、中野貴文、小斎啓祐、小林雄太、倉光正太郎、藤井昌志、野田美和、鶴田祐介、松本佳大、大津 甫、黒田陽介、内田博喜、森 正樹、三森功士
2. 発表標題 DNA修復関連遺伝子FANCEの高発現は肝細胞癌において予後不良マーカーである
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋純一、増田 隆明、北川 彰洋、小林 雄太、高尾 誠一朗、本村 有史、安東 由貴、大津 甫、武石 一樹、米村 祐輔、森 正樹、三森 功士
2. 発表標題 FA経路遺伝子の一つであるFANCEは肝細胞癌診断の有望なバイオマーカーとなりうる
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋純一、増田隆明、北川彰洋、小林雄太、倉光正太郎、松本佳大、大津 甫、内田博喜、森 正樹、三森功士
2. 発表標題 肝細胞癌(HCC)におけるDNA修復関連遺伝子FANCE高発現の臨床的意義
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋純一、増田隆明、北川彰洋、内田博喜、森 正樹、三森功士
2. 発表標題 肝細胞癌でのDNA修復関連遺伝子FANCE発現の臨床的意義の研究
3. 学会等名 第8回 がんと代謝研究会 in 佐渡
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋純一、増田隆明、細田清孝、阿部正、斉藤秀幸、安東由貴、小池健輔、久松雄一、戸島剛男、米村祐輔、吉住朋晴、三森功士
2. 発表標題 BAP1変異を有する肝内胆管癌（ICC）に有効なリポシヨニング化合物の同定
3. 学会等名 第31回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2022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
---------	---------