

研究報告書
令和3年度：A課題

2023年 4月 24日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設	名古屋大学大学院医学系研究科 総合保健学専攻
住所	名古屋市東区大幸南 1-1-20
研究者氏名	佐藤光夫

(研究課題)

変異 KRAS 肺癌に対する長鎖非翻訳 RNA を標的とする合成致死治療の開発

令和4年 4月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【背景及び目的】

本課題は、変異 KRAS 肺癌の合成致死治療の標的となり得る長鎖非翻訳 RNA (long non-coding RNA ; lncRNA) を同定し、lncRNA を標的とする変異 KRAS 肺癌の治療開発を目的とする。同定される lncRNA の合成致死作用の機序解明も行う。実験モデルとして応募者が開発した不死化正常気管支上皮細胞 (HBEC) 実験系 (応募者総説, *Resp. Invest.* (日本呼吸器学会英文誌) 2020;58:344-354) を使用する。これまでに、HBEC 実験系は *Nature*、*Cell* などを含む 50 報以上の一流論文での使用実績がある。

変異 KRAS は固形癌において最も高頻度に認められるドライバー癌遺伝子であるが、薬物的なシグナルの直接遮断が難しく、治療薬開発は難航している。別のアプローチとして合成致死が期待されるが、従来の報告は変異 KRAS 癌の合成致死遺伝子が存在する可能性は低いことを示す。そこで、本課題は合成致死に導く標的として、遺伝子ではなく lncRNA に着目する。lncRNA はヒト転写物の中で最も数が多く、タンパクに翻訳される遺伝子数の約 3 倍の 58,000 であり、また、多彩な機能を有することが推測されるが、これまでに変異 KRAS の合成致死標的となる lncRNA を探索した報告はない。以上から、lncRNA が合成致死の標的として

高い可能性を持つと考えたため lncRNA に着目した。

【方法】

1. 細胞株および細胞培養

不死化正常気管支上皮細胞株 HBEC4KT はテキサス大学 John D. Minna 博士から受領。肺がん細胞株 H2009 細胞は American Type Culture Collection(ATCC)から購入。変異 *KRAS* 発現の精密な発現調節が可能な HBEC3-RIN2 細胞は我々のグループが既報論文で報告した。肺癌細胞株の培養は 10%ウシ胎児血清(FBS)を添加した RPMI-1640 (富士フィルム和光純薬株式会社, Cat#189-02025)を使用し、HBEC4 は EGF (gibco, Cat#10450-013)と BPE (gibco, Cat#13028-014) を添加した KSFM (gibco, Cat#17005042) を使用した。

2. トランスポゾンベクターを用いた lncRNA 導入実験

一般的に使用されるウイルスベクターは lncRNA の二次構造を変化させ、機能を損なうことが報告された。ELECTS ベクターはこの問題を克服している。我々は MTA 締結に基づく共同研究として開発者から空 ELECTS ベクター、*HOTAIRM1* 導入済み ELECTS ベクター、*PCBP2-OT1* 導入済み ELECTS ベクターの供与を受けた。リポフェクタミン 3000 試薬を使用して ELECTS ベクターと SB100X (Addgene #34879)を混合し、導入細胞にコトランスフェクションした。H2009 細胞においては、導入後 2 日後より 2 μ g/ml の puromycin (和光純薬 cat#160-23151) によるセレクションを実施し、セレクション後の安定発現細胞を樹立した。

3. リアルタイム PCR

PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific, Cat. # A25742)を使用し StepOne™ Real-Time PCR System でリアルタイム PCR を行った。 $\Delta\Delta C_t$ 法によって特定の遺伝子を相対的に定量した。

4. 細胞増殖アッセイ

CCK-8 assay kit (Dojindo, Cat#CK04)を用いた吸光度の測定により、細胞の増殖を定量した。ノックダウン細胞を 10,000/well で 96well プレートにプレートし、2~3 日培養した後、CCK-8 試薬を加え吸光度を測定した。対照細胞とノックダウン細胞間で t 検定を行うことで増殖を評価した。

5. 液体コロニーアッセイ

液体コロニー形成を確認することで、クローナルな細胞の増減を 2 次元的に観察した。ノックダウン細胞を 500/well になるよう 6well プレートにプレートし、14 日培養後、メチレンブルーで染色を行った。染色されたコロニーの数をカウントし、対照細胞とノックダウン細胞間で t 検定を行うことで増殖を評価した。

6. 次世代シーケンス解析

HBEC3-RIN2 細胞からトータル RNA を RNeasy kit (QIAGEN, Cat# 74004)を用いて抽出した。Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit (Illumina, cat#20020613) にてリボソーム RNA を除去した後、TruSeq stranded Total RNA Library Prep.Kit を使用してライブラリーを調整した。

NovaSeq6000 を使用し 100bp Paired End の条件下で、1 サンプルにつき、6000 万リードのデータ量を取得した。

7. 統計

2群間の統計学的比較には、Statistical Package for the Social Sciences v.28 (IBM, USA)ソフトを用いたスチューデントのtテストを実施した。

【結果】

1. トランスポゾンベクター-ELECTS を用いた lncRNA の導入

癌促進的な lncRNA として報告されている 2 種類の lncRNA を HBEC4KT 細胞および H2009 に ELECTS ベクターを用いて導入した。リアルタイム PCR にて *HOTAIRM1* および *PCBP2-OT1* の発現量を定量した。両 lncRNA いずれも、コントロールベクター導入細胞と比較し、導入細胞において HBEC4KT 細胞においては約 7 倍、H2009 細胞においては約 20 倍の発現増加を確認した。

2. *HOTAIRM1* および *PCBP2-OT1* 導入は HBEC4、H2009 細胞の増殖に影響を与えない

HOTAIRM1 または *PCBP2-OT1* が導入された HBEC4KT および H2009 細胞の増殖を CCK-8 アッセイ、液体コロニーアッセイで評価した。いずれの細胞においても、増殖およびコロニー形成は不変であった。

3. 変異 *KRAS* により発現が増加する lncRNA を同定

変異 *KRAS* により発現が増加する lncRNA をスクリーニングするために、変異 *KRAS* 発現のオン。オフ発現が可能な HBEC3-RIN2 細胞において次世代シーケンスを実施した。変異 *KRAS* により発現が増加する lncRNA を同定した。さらに、次世代シーケンスの結果を確認するためにリアルタイム PCR を実施した。複数の lncRNA について変異 *KRAS* による発現増加を確認した。*KRAS* 発現オンによる発現増加量が最も高かった *LINC1* (未発表データにて名前を非公開とする) の発現量を非小細胞肺癌細胞株パネルにおいて評価したところ、複数の細胞株において正常コントロール細胞 (HBEC) に比べ発現の増加を認めた。

【今後の展望】

上述したように本課題の成果として、変異 *KRAS* 発現オンによる発現が増加する lncRNA を複数同定した。今後はこれらを対象として ELECTS ベクターによる過剰発現およびアンチセンスオリゴによるノックダウン実験を実施する。これにより、変異 *KRAS* 肺癌において合成致死治療の標的となる lncRNA の同定および機能解析を行う予定である。

【謝辞】

本研究課題にご支援を賜りました公益財団法人がん研究振興財団様に心より御礼申し上げます。