

トランスポゾンベクターによる長鎖非翻訳 RNA の機能評価を 活用した変異 *KRAS* 肺癌の合成致死

名古屋大学大学院医学系研究科 教授 佐藤光夫

1. 研究の背景・目的

変異 *KRAS* 肺癌は有効な治療法が確立されていない肺癌の遺伝学的なサブタイプの一つである。変異 *KRAS* による強力な増殖シグナルの薬物的遮断が困難であり、治療方法の開発上の障壁となっている[1]。そこで、本課題は別の方法として合成致死に着目した。合成致死は正常細胞への影響が少ない癌特異的な治療法として期待される[2]。しかし、変異 *KRAS* に関して再現性が確認された合成致死遺伝子の報告はない[3]。

一方、癌において非翻訳 RNA の一つである長鎖非翻訳 RNA (long non-coding RNA; lncRNA) が重要な役割を果たすことが明らかとなった[4]。lncRNA は他の細胞内分子との相互作用を通じて癌の悪性形質を制御するネットワークを形成するため、変異 *KRAS* と相互作用する lncRNA が存在する可能性が高いと推測し、lncRNA を変異 *KRAS* の合成致死誘導の標的とする本課題を着想した。

2. 研究の対象ならびに方法

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 博士から受領した[5]。肺癌細胞株 H2009 細胞は American Type Culture Collection(ATCC)から購入した。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[6]。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、HBEC4KT 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。すべての細胞培養を加湿された 5%CO₂ インキュベーター内で実施した。

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-OPELECTS ベクターの供与を受けた[7]。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 10 : 1 の比率で混合し、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 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。

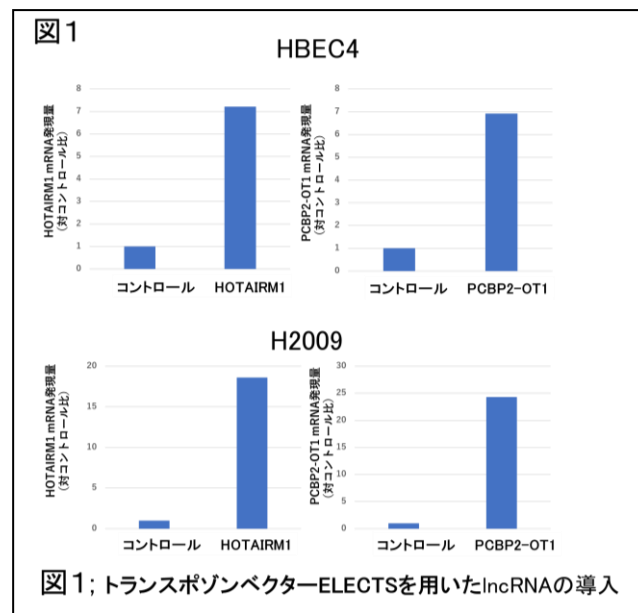
7. 統計

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。

3. 結果

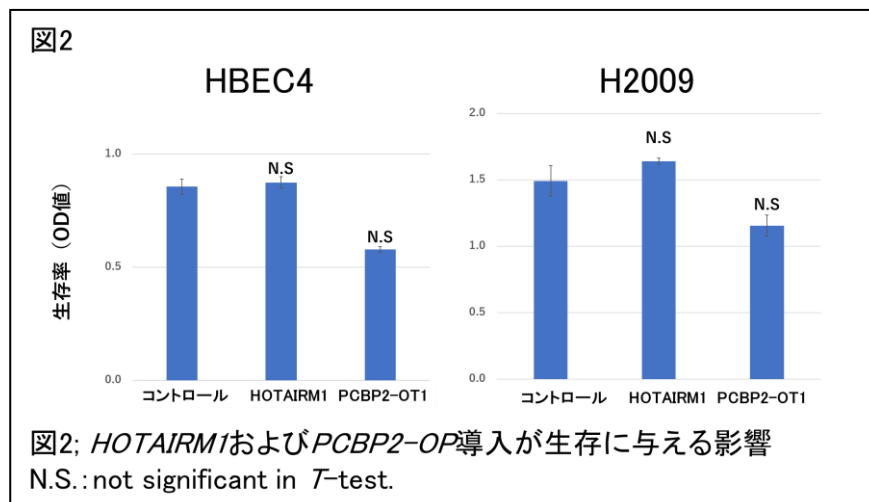
1. トランスポゾンベクター-ELECTS を用いた lncRNA の導入

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(図1)。



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(図2)。



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(表 1)。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* の変異 *KRAS* による発現増加を確認した(図 3)。*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(図 4)。

表 1

増加順位	<i>lncRNA</i> 名 (名前を非公開とする)	増加比
1	<i>LINC1</i>	20.2
2	<i>LINC2</i>	16.2
3	<i>LINC3</i>	11.7
4	<i>LINC4</i>	11.6
5	<i>LINC5</i>	11.0
6	<i>LINC6</i>	10.3
7	<i>LINC7</i>	10.0
8	<i>LINC8</i>	9.0
9	<i>LINC9</i>	8.9
10	<i>LINC10</i>	8.7

表 1;変異*KRAS*により発現が増加する *lncRNA*リスト

図 3

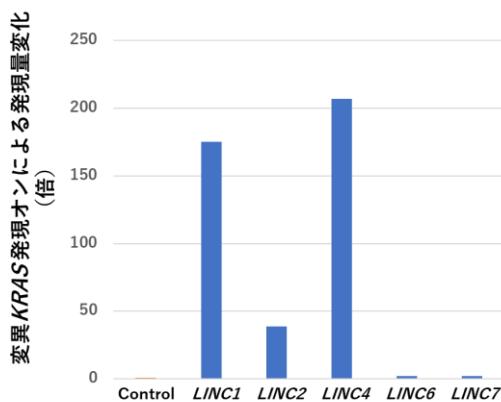


図 3; 次世代シーケンスにおける変異*KRAS*により増加した*lncRNA*発現のリアルタイムPCR

図 4

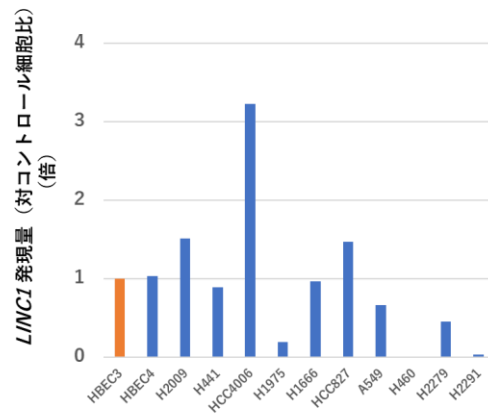


図 4; 非小細胞肺癌細胞株パネルにおける *LINC10* の発現量

4. 考察

細胞への効率的な遺伝子導入としては、導入効率に優れるウイルスベクターが広く使用されている。しかし、ウイルスベクターは lncRNA の二次構造を変化させ、lncRNA の機能を損なうことが報告された[7]。そこで、我々は同論文の著者から MTA 締結に基づき、lncRNA 導入目的に開発された ELECTS トランスポゾンベクターの供与を受けた。同ベクターを用いて既報論文が癌促進作用を報告している、2 種類の lncRNA (*HOTAIRM1* および *PCBP2-OT1*) を HBEC4 細胞および H2009 に ELECTS ベクターを用いて導入した[7, 8]。しかし、両 lncRNA の発現による細胞増殖の変化を認めなかった。その原因として、発現量の増加程度が十分でなかった可能性を考える。ELECTS ベクターを報告した論文では 100 倍以上の発現増加が示されているが、我々の実験では最高でも 20 倍程度であった。したがって、トランスフェクション条件の最適化により発現量増加を目指し、両 lncRNA の過剰発現細胞における癌促進作用の証明を目指す。

不死化正常気管支上皮細胞 HBEC3-RIN2 細胞において変異 *KRAS* 発現を誘導し、続いて、次世代シーケンス解析を実施した。その結果、変異 *KRAS* 発現により発現が増加する lncRNA を複数同定することに成功した。近年、lncRNA のノックダウン実験には RNA 干渉よりもアンチセンスがより優れることが示唆されているため、今後、アンチセンスによる同定 lncRNA の個別ノックダウン実験を計画している。

最近、ある研究グループが変異 *KRAS* 肺癌細胞を用いて、831 個の癌促進的な候補 lncRNA を網羅的に CRISPR ノックアウトし、続いて、増殖能や移動能などの癌特異的な機能変化に基づくスクリーニングから 80 個の変異 *KRAS* 肺癌細胞における癌促進的な lncRNA を同定した[9]。特に、*Lung lncRNA 1 (CHILLI)* と *GCAWKR* が治療標的として有望な癌促進 lncRNA であると報告した。これらの lncRNA を ELECTS ベクターにより HBEC4 細胞において過剰発現することにより、癌促進作用の確認を行い、標的としてのバリデーションを実施する。

5. 文献

- [1] M.B. Ryan, R.B. Corcoran, Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers, *Nat Rev Clin Oncol* 15 (2018) 709-720.
- [2] F. Fece de la Cruz, B.V. Gapp, S.M. Nijman, Synthetic lethal vulnerabilities of cancer, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55 (2015) 513-531.
- [3] J. Downward, RAS Synthetic Lethal Screens Revisited: Still Seeking the Elusive Prize?, *Clin Cancer Res* 21 (2015) 1802-1809.
- [4] E. Anastasiadou, L.S. Jacob, F.J. Slack, Non-coding RNA networks in cancer, *Nat Rev Cancer* 18 (2018) 5-18.
- [5] R.D. Ramirez, S. Sheridan, L. Girard, M. Sato, Y. Kim, J. Pollack, M. Peyton, Y. Zou, J.M. Kurie, J.M. Dimaio, S. Milchgrub, A.L. Smith, R.F. Souza, L. Gilbey, X. Zhang, K. Gandia, M.B. Vaughan, W.E. Wright, A.F. Gazdar, J.W. Shay, J.D. Minna, Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins, *Cancer Res* 64 (2004) 9027-9034.
- [6] N. Muraki, M. Yamada, H. Doki, R. Nakai, K. Komeda, D. Goto, N. Kawabe, K. Matsuoka, M. Matsushima, T. Kawabe, I. Tanaka, M. Morise, J.W. Shay, J.D. Minna, M. Sato, Resistance to mutant KRAS(V12)-induced senescence in an hTERT/Cdk4-immortalized normal human bronchial epithelial cell line, *Exp Cell Res* 414 (2022) 113053.
- [7] Y. Zhang, Y.X. Huang, X. Jin, J. Chen, L. Peng, D.L. Wang, Y. Li, X.Y. Yao, J.Y. Liao, J.H. He, K. Hu, D. Lu, Y. Guo, D. Yin, Overexpression of lncRNAs with endogenous lengths and functions using a lncRNA delivery system based on transposon, *J Nanobiotechnology* 19 (2021) 303.
- [8] Y. Zhao, W. Wang, C. Guan, Z. Hu, L. Liu, W. Li, X. Jiang, Long noncoding RNA HOTAIRM1 in human cancers, *Clin Chim Acta* 511 (2020) 255-259.
- [9] R. Esposito, T. Polidori, D.F. Meise, C. Pulido-Quetglas, P. Chouvardas, S. Forster, P. Schaerer, A. Kobel, J. Schlatter, E. Kerkhof, M. Roemmele, E.S. Rice, L. Zhu, A. Lanzos, H.A. Guillen-Ramirez, G. Basile, I. Carrozzo, A. Vancura, S. Ullrich, A. Andrades, D. Harvey, P.P. Medina, P.C. Ma, S. Haefliger, X. Wang, I. Martinez, A.F. Ochsenbein, C. Riether, R. Johnson, Multi-hallmark long noncoding RNA maps reveal non-small cell lung cancer vulnerabilities, *Cell Genom* 2 (2022) 100171.

6. 論文

なし