様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　２ 月 １８ 日現在

機関番号：８２５０４
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ０７２５９

研究課題名（和文）ゲノム変異標的分子による予後不良膵腺管がん治療戦略の構築

研究課題名（英文）Development of therapeutic strategy using molecules of targeting genomic mutation for pancreatic ductal carcinoma

研究代表者

渡部　隆義（Watanabe, Takayoshi）

千葉県がんセンター（研究所）・がん研究開発グループ・研究員

研究者番号：６０５２６０６０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：難治癌である膵癌の多くではKRAS遺伝子変異が発がんの原因になっているが、この活性型変異KRASは薬剤開発の難しい標的として知られている。我々は本研究を通じてKRAS遺伝子変異(G12D/V)を標的とした化合物KR12がヒト由来の膵線管癌細胞株に対し高い細胞紹介活性を示すことを見出し、更に別の化合物CCC002がPDAC細胞株に対し非常に強い抗腫瘍効果を示すことを見出した。更にDNA修復と転写調節異常に関連する候補遺伝子を示唆するマイクロアレイと経路分析を行った。その結果、9種類の候補遺伝子を見出し、特にRAD51がKRAS非依存的なPDACの新たな治療標的遺伝子と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
膵線管癌が全ての癌の中で最も予後不要の難治性癌の一種であり、有効性の高い治療薬の開発が望まれている。本研究で示したアルキル化PIP化合物KR12がヒトの膵線管癌に対し抗腫瘍効果を示したことは新たな治療薬に成りうることを示した。またマイクロアレイ解析により、膵線管癌に対する新たな治療標的となりうる9つの候補遺伝子を見出し,その中でもRAD51がKras非依存的な治療標的となりうることを見出だしたことはPIPだけでなく、他の小分子や抗体医薬を用いた新たな治療標的を提供しうることになり難治性の膵線管癌を克服する可能性を広げたといえる。

研究成果の概要（英文）：In many pancreatic cancers which are intractable cancers, the KRAS gene mutation causes carcinogenesis, but this active mutant KRAS is known as a difficult target for drug development. Through this study, we found that the compound KR12, which targets the KRAS gene mutation (G12D / V), shows high cell-introducing activity against human-derived pancreatic ductal carcinoma cell line, and another compound, CCC002, is a PDAC cell line. It has been found that it has a very strong antitumor effect against. In addition, microarrays and pathway analyzes suggesting candidate genes associated with DNA repair and transcriptional dysregulation were performed. As a result, they found 6 types of candidate genes, and found that these candidate genes could be new therapeutic target genes for PDAC.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ピロールイミダゾールポリアミド　アルキル化剤　膵線管癌

※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。

１．研究開始当初の背景

(1)　膵腺管がん(PDAC)は治療困難な難治性がんであり、その内の約90%でKRASのコドン12に変異が起こっている。このKRASを標的とした治療薬はわずかにKRASのG12C変異を標的とした分子が報告されているのみであり、KRAS の変異で 80%以上を占める最も重要なG12D及びG12Vの変異に対する治療薬は存在していない。これはKRASの変異タンパク質に小分子が入り込むポケットが無く、治療薬の開発が困難なためであった。

(2)　我々はKRASのG12V及びG12D変異陽性の大腸癌に対する有効な治療薬を開発するために、KRASの変異遺伝子をコードするDNA配列に直接結合し、DNAのアルキル化により変異遺伝子の発現を阻害する薬剤の開発に着手した、この薬剤はキャリア分子であるピロール(Py)-イミダゾール(Im) ポリアミド (PIP)と DNA のアルキル化剤 CBI を有する PIP-CBI複合化合物KR12であり、このKR12が大腸がんに対して顕著な抗腫瘍効果を示したことから1) PDAC に対する治療薬になりうると考え、PIP-CBI 化合物の膵線管癌への薬剤開発に取り組んだ。

２．研究の目的

(1)　予備試験としてKR12がPDACの自然発症モデルマウスに投与することで腫瘍の顕著な縮小を確認したことから本研究ではPDACの自然発症モデルにおけるKR12の腫瘍に対する影響や副作用の検証を行う。
(2)　KrasG12D/V変異陽性のヒトPDAC細胞株に対するKR12の抗腫瘍効果を検討する。
さらにKR12以外のPIP-CBIを合成し抗腫瘍効果を検討する。
(3)シグナル解析及びマイクロアイレイ解析によってPDACの発現に重要なKras以外の遺伝子を明らかにする。

３．研究の方法

(1)　KR12 による腫瘍の抑制効果を検討するために KR12 を投与した PDAC 自然発症モデルマウス
から腫瘍を摘出し、HE染色による腫瘍組織の病理学的検査を行う。
(2)　KR12 による副作用の検討のために他の臓器の病理学的検査や血液生化学検査を行う。
(3)　ヒトPDAC細胞株に対するKR12の効果を検討するためにKRASG12D変異を持つKP4と、KRASG12Dの変異を持たないMIAPaca-2に対するKR12の抗腫瘍効果を検討する。
(4)　ヒトPDAC細胞移植モデルマウスによる動物実験を行う。
(5)　他のPDAC細胞株に対するKR12の抗腫瘍効果の検討を行う。
(6)異なるDNA塩基配列を認識するアルキル化PIP化合物(CCC-002、CCC-003)を用いて膵癌由来細胞株に対する薬理効果を検討する。
(7)感受性および耐性に関わる遺伝子の網羅的検索を行う。

４．研究成果

(1) KR12 による腫瘍組織の病理学的検査の結果、コントロール群の膵臓では増殖したがん細胞と著しい線維化が認められ、異型腺細胞と膵管内上皮病変や進行性の膵炎も観察された。一方、KR12 投与群では、非腫瘍性の膵腺房細胞やランゲルハンス島が広く認められ、

KR12 により膵機能が維持され生存日数が延長したとの知見が得られた。

(2) KR12 による副作用の検討のために他の臓器の病理学的検査や血液生化学検査を行った結果、
膵臓以外の他の器官での病理学的検査では異常を観察しなかった。
次に KR12 投与後の膵臓機能と肝機能を検討するために血液生化学検査を行った。コントロールマウスと腫瘍を形成する PKF マウスに KR12 および DMSO を投与し、3 日後にサンプル採取を行い検査したところ、KR12 または DMSO 投与での有意な差は示されなかった。これらの知見は KR12 による副作用が低いことを示唆し、KR12 による膵機能及び肝機能に影響が少ないため生存延長の効果が得られたと考えられた。

(3) KRASG12D 変異を持つ KP4 と、KRASG12D の変異を持たない MIAPaca-2 に対する KR12 の抗腫瘍効果を WST アッセイによって検証した。その結果、IC50 が KP4 に対し 3.6 nM、MIAPaca-2 に対し 49.9nM で KRASG12D 変異を有する KP4 で細胞増殖抑制効果が高いことが示された。
さらに KR12 を投与した細胞株における KRAS タンパク質の発現をウェスタンブロット法により検討したところ、ＫＲ12、30nM の濃度において KRAS タンパク質の発現が抑制された。

(4) 動物実験の結果、KP4 細胞を移植した異種移植マウスに KR12 を 3 ㎎/kg 投与し週 1 回ずつ 2 回に渡り投与した所、コントロールの DMSO 投与群に比べ有意に腫瘍の増殖抑制効果が認められた。以上の結果から、動物実験においても KR12 による抗腫瘍効果が示された。

(5) 膵癌細胞株 KP-4 以外の膵癌細胞株 PANC-1、CAPAN-1、CAPAN-2、AsPc-1 細胞における KR12 の IC50 値を測定した。その結果、CAPAN-1 細胞において、IC50 値は 7.1 nM と著しく低い値を示した。一方、PANC-1 や CAPAN-2、AsPc-1 細胞における IC50 値は 16–86 nM と比較的高い結果であった。

(6) 次に変異 KRAS 遺伝子配列を標的としない 2 つの PIP-CBI である CCC002 及び CCC003 を KRAS G12D 変異を持つ PDAC 細胞株である KP-4 に投与した結果、CCC002 が KR12 と同等の抗腫瘍効果及び KRAS 発現の減少を引き起こすことを見出した。このことは KR12 以外の遺伝的要因が PDAC の阻害に影響を及ぼすことを示している。

(7)そこでこの遺伝的要因を明らかにするために、 KR12、CCC002 及び CCC003 を投与した KP-4 細胞株から RNA を抽出し、マイクロアレイと経路分析を行った。トップ 10 の遺伝子発現上昇経路に基づく初期スクリーニングにより 113 個の遺伝子がヒットしこの内の 91 個がコード領域に CCC-002 の結合配列を有しており、CCC-002 ターゲットの可能性があることを示唆していた。更にカプランマイヤー生存曲線から、9 つの遺伝子（RAD51, BUB1, BUB1B, BRCA1, CLIP1, PLK1, TTK, RRAS2, CDC25）の高発現が、PDAC 患者の予後不良および CCC-002 標的遺伝子の潜在的な候補と関連していることを見出した。これらの遺伝子の内、発がんと薬剤耐性における RAD51 の役割はまだ十分に調査されていなかったため、

RAD51 に焦点を当て機能解析を行った。定量的 PCR 分析により、CCC-002 は RAD51 の mRNA 発現を有意に抑制することを確認した。

(8) RAD51 の阻害が PDAC の治療戦略になるかどうかを検討するため、RAD51 に対する siRNA を KP-4 細胞に導入したところ、細胞増殖の抑制が確認された。
更に RAD51 の阻害剤である B02 を用い PDAC 細胞における B02 の抗増殖効果を検討した。その結果、B02 は、KP-4、AsPC-1、PANC-1 細胞の増殖阻害を示した。更に KR12 と B02 の併用処理について検討を行ったところ、10μM での B02 処理により KR12 耐性株である AsPC-1 および PANC-1 細胞における KR12 の細胞毒性効果を増強した。
以上の結果から RAD51 が PDAC の予後マーカーおよび重要な治療標的になることが示唆された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計7件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 辻本彰子、高取敦志、松尾仁以奈、K.Sakthisri、L.Jason、篠崎喜脩、渡部隆義、永瀬浩喜
２．発表標題 膵癌におけるアルキル化ピロール・イミダゾールポリアミドの薬理効果と 感受性関連遺伝子の探索
３．学会等名 第27回 日本癌病態治療研究会
４．発表年 2018年

１．発表者名 辻本彰子、高取敦志、松尾仁以奈、井上貴博、渡部隆義、篠崎喜脩、永瀬浩喜
２．発表標題 膵癌におけるKRAS変異を標的にしたアルキル化ピロール・イミダゾールの抗腫瘍効果の検討
３．学会等名 第77回日本癌学会学術集会
４．発表年 2018年

１．発表者名 松尾仁以奈、井上貴博、養田祐行、高取敦志、篠崎喜脩、渡部隆義、越川信子、ジェイソンリン、永瀬浩喜
２．発表標題 膵腺管癌におけるKRAS 変異を標的にしたKR12
３．学会等名 第76回日本癌学会学術総会
４．発表年 2017年

１．発表者名 放射性小分子標識腫瘍遺伝子標的アルキル化剤によるin vivo イメージング法の開発
２．発表標題 渡部隆義、篠崎喜脩、井上貴博、越川信子、高取敦志、永瀬浩喜
３．学会等名 第76回日本癌学会学術総会
４．発表年 2017年

１．発表者名 辻本 彰子、養田 裕行、Jason Lin 、松尾 仁以奈、渡部 隆義、 篠崎 喜脩、永瀬 浩喜、高取 敦志
２．発表標題 アルキル化ピロール・イミダゾールポリアミドを用いた膵癌における 薬剤感受性関連遺伝子の探索
３．学会等名 第78回日本癌学会学術集会
４．発表年 2019年

１．発表者名 渡部 隆義、高取 敦史、養田 裕行、越川 信子、Lin Jason、篠崎 喜脩、永瀬 浩喜
２．発表標題 ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）を標的としたアルキル化PDCによる治療戦略の構築
３．学会等名 第28回日本癌病態治療研究会
４．発表年 2019年

１．発表者名 渡部 隆義、高取 敦志、養田 裕行、越川 信子、篠崎 喜脩、永 瀬 浩喜
２．発表標題 hTERT 遺伝子を標的とした PIP 化合物と抗癌活性の向上を指向し た誘導体の開発
３．学会等名 第78回日本癌学会学術集会
４．発表年 2019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
研究分担者	篠崎　喜脩 (Shinozaki Yoshinao) (00766553)	千葉県がんセンター（研究所）・がん治療開発グループ・博士研究員 (82504)	

６．研究組織（つづき）

	氏名 （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	高取　敦志 (Takatori Atushi) (40455390)	千葉県がんセンター（研究所）・がん治療開発グループ・室長 (82504)	
研究分担者	越川　信子 (Koshikawa Nobuko) (90260249)	千葉県がんセンター（研究所）・がん遺伝創薬研究室・主任上席研究員 (82504)	