

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15238

研究課題名(和文) KRAS変異大腸癌に有効な治療標的分子の解析

研究課題名(英文) Investigation of effective therapeutic target molecules for KRAS-mutated colorectal cancer

研究代表者

北沢 将人 (Kitazawa, Masato)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：10467152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：変異型KRASは発癌や増殖、浸潤・転移等に強く関与しているが、それを標的とした治療は未だ見出されていない。我々はIn vitroでKRAS変異大腸癌に有効な薬剤をスクリーニングし得るミックスカルチャーアッセイを確立し、KRAS変異大腸癌細胞はMEK阻害剤の感受性が高いこと、MEK阻害剤が抗アポトーシスタンパクBCL-XLの発現を誘導すること、MEK阻害剤とBCL-XL阻害剤の併用はより選択性の高い分子標的治療になり得ることを明らかにした。さらに、ヌードマウスに皮下移植実験にてMEK阻害剤とBCL-XL阻害剤の併用が、KRAS変異大腸癌に有効であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KRAS変異は最も重要な遺伝子変異であるが、今までそれに対する有効な治療方法は確立されていないかった。本研究によりKRAS変異大腸癌に対してMEK阻害剤とBCL-XL阻害剤のコンビネーション治療が有効である可能性が示唆された(Int J Oncol.2020;57:1179-91)。またKRAS変異G12C大腸癌に新規薬剤AMG510とMEK阻害の2剤併用、さらにはBCL-XL阻害剤を加えた3剤併用の効果を細胞実験で証明し報告した(Mol Clin Oncol. 2021;15:148.)。本研究により予後不良であったKRAS変異癌に対する有効な治療戦略が確立されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mutant KRAS is strongly implicated in carcinogenesis, proliferation, invasion, and metastasis, but targeted therapeutics against it have not yet been found. We established Mix culture assay that can screen effective drugs for KRAS-mutant colorectal cancer in vitro. Our study demonstrated that (1) KRAS-mutant colorectal cancer cells are sensitive to MEK inhibitors, (2) MEK inhibitors induce expression of the anti-apoptotic protein BCL-XL, and (3) the combination of MEK inhibitors and BCL-XL inhibitors can be a more selective molecular targeted therapy. Furthermore, we demonstrated that the combination of MEK inhibitor and BCL-XL inhibitor is effective for KRAS-mutant colorectal cancer in vivo.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 KRAS MEK BCL-XL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

KRAS の遺伝子変異は大腸癌の約 40% の頻度で存在し、抗 EGFR 抗体薬に耐性を示し、野生型と比較し予後不良である。KRAS 変異は下流の RAF、MEK 等を恒常的に活性化し、発癌や癌の増殖・浸潤・転移に広く関与している。研究開始当初は大腸癌のコンパニオン診断として、KRAS 変異検査が保険収載されたばかりであった。KRAS 変異の有無を検査し、KRAS 野生型に対して抗 EGFR 抗体薬を使用できたが、変異型は同薬剤に耐性を示すため、KRAS 変異を標的とした有効な治療は存在しなかった。

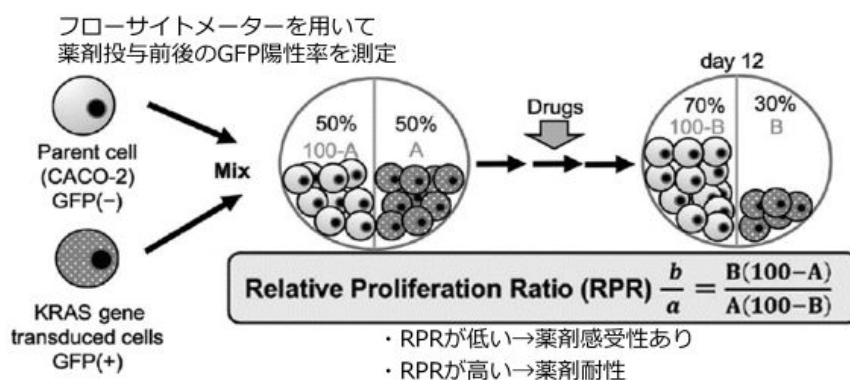
2. 研究の目的

悪性度の高い KRAS 変異大腸癌に対する有効な治療戦略を基礎研究により見出し、さらにはそのメカニズムを証明することを目的とした。In vitro で大腸癌細胞の薬剤感受性を評価するミックスカルチャーアッセイを確立し、KRAS 変異大腸癌細胞に対する有効な分子標的薬をスクリーニングし、さらには複数の分子標的薬の併用効果を評価した。同アッセイで有効であった分子標的薬の有効性をヌードマウス皮下移植モデルで検証した。

3. 研究の方法

- 1) ミックスカルチャーアッセイの確立：KRAS 野生型のヒト大腸癌細胞株 CACO-2 に KRAS 変異遺伝子 (G12D, G12V, G13D, G12A, G12C, G12S, A146T および Q61H) を PMX-IRES-GFP ベクターを用いて、レトロウイルスにて恒常的遺伝子導入を行った。初日に GFP 陽性の遺伝子導入細胞と非遺伝子導入母細胞 (GFP 陰性、インターナルコントロール) とを 1:1 の割合で混合し、薬剤投与下で 12 日培養し、GFP の陽性率の変化をフローサイトメーターで評価した (以下ミックスカルチャーアッセイ)。薬剤耐性を示す指標 (遺伝子導入細胞の増殖率/コントロール細胞の増殖率) として、Relative Proliferation Ratio (RPR) = $B(100-A)/A(100-B)$ [A: 培養初日の GFP 陽性%、B: 培養 12 日目の GFP 陽性%] を算出し、比較検討を行った。RPR 高値は薬剤耐性、RPR 低値は薬剤感受性であることを示す。

ミックスカルチャーアッセイの概要



- 2) ミックスカルチャーアッセイによるスクリーニング：KRAS 変異大腸癌細胞に感受性の高い分子標的薬を上記ミックスカルチャーアッセイにてスクリーニングした。さらに、併用効果のある薬剤も同定した。
- 3) ウェスタンブロッティングによるシグナル解析：KRAS 変異大腸癌細胞に有効な薬剤を投与した際のシグナル変化をウェスタンブロッティングで評価した。そのシグナル変化から、耐性を克服するための併用薬を類推した。
- 4) ヌードマウスの皮下移植実験：恒常的に KRAS 変異を遺伝子導入した CACO-2 細胞をヌードマウスの皮下に移植し、In vitro 有効であった薬剤の効果を評価した。

4. 研究成果

我々の確立したミックスカルチャーアッセイは、KRAS 変異大腸癌に有効な薬剤のスクリーニングに有効で、さらには併用効果も安定して評価可能であった。また、我々の研究結果は以下の～を明らかにした。

KRAS 変異大腸癌細胞は MEK 阻害剤の感受性が高い：ミックスカルチャーアッセイにより MEK 阻害剤トラメチニブ投与により KRAS 変異大腸癌細胞の RPR が有意に低下した。一方、KRAS 野生型大腸癌では RPR の有意な変化は認めなかった。

KRAS 変異大腸癌細胞は MEK 阻害剤の長期使用により抗アポトーシスタンパク (BCL-2 や BCL-XL) の発現が上昇する：KRAS 変異大腸癌細胞にトラメチニブを投与すると、BCL-2 と BCL-XL

のタンパク発現が有意に上昇することをウエスタンブロッティングで明らかにした。トラメチニブ耐性のメカニズムに抗アポトーシスタンパクである BCL-2 と BCL-XL が関与している可能性が高いと考えられた。

MEK 阻害剤と BCL-XL 阻害剤の併用は KRAS 変異大腸癌に対する選択性の高い分子標的治療になり得る：ミックスカルチャーアッセイで MEK 阻害剤と BCL-XL 阻害剤 (ABT-263) を併用時の RPR は、MEK 阻害剤単剤、BCL-XL 阻害剤単剤の RPR と比較し有意に低下しており、併用効果があることが証明された。

KRAS 変異大腸癌細胞は野生型と比較し、BCL-XL のタンパク発現量が有意に高く、BCL-XL 阻害剤にてアポトーシスが誘導される：KRAS 変異大腸癌は野生型と比較し、BCL-XL タンパクの発現量が有意に多いことをウエスタンブロッティングで明らかにした。また、ABT-263 投与により Cleaved-Caspase3 の発現が上昇し、アポトーシスが誘導され易いことを明らかにした。

In vivo でも MEK 阻害剤と BCL-XL 阻害剤の併用は KRAS 変異大腸癌の腫瘍形成能を強く抑制した：ヌードマウスの皮下移植モデルを用いて、KRAS 変異大腸癌に対して、MEK 阻害剤と BCL-XL 阻害剤の併用は、それぞれ単剤と比較し有意に腫瘍形成能を抑制することを証明した。

本研究の成果は、International Journal of Oncology (Koyama M, Kitazawa M, et al. Int J Oncol.2020;57:1179-91 に掲載され、2020 年日本癌治療学会総会にて報告した。2021 年の消化器癌発生学会のシンポジウムでもその内容を報告し、優秀演題賞を受賞した。また KRAS 変異 G12C 大腸癌に新規薬剤 AMG510 と MEK 阻害の 2 剤併用、さらには BCL-XL 阻害剤を加えた 3 剤併用の効果を In vitro で証明し報告し (Kitazawa M, et al. Mol Clin Oncol. 2021;15: 148.)、2021 年日本癌治療学会で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koyama Makoto, Kitazawa Masato, Nakamura Satoshi, Matsumura Tomio, Miyazaki Satoru, Miyagawa Yusuke, Muranaka Futoshi, Tokumaru Shigeo, Okumura Masahiro, Yamamoto Yuta, Ehara Takehito, Hondo Nao, Takahata Shugo, Takeoka Michiko, Miyagawa Shinichi, Soejima Yuji	4. 巻 57
2. 論文標題 Low-dose trametinib and Bcl-xL antagonist have a specific antitumor effect in KRAS-mutated colorectal cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1179-1191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2020.5117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北沢将人
2. 発表標題 AMG510は大腸癌のUndruggable KRAS変異を突破できるか?
3. 学会等名 日本癌治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小山誠、北沢将人
2. 発表標題 KRAS変異型大腸癌治療におけるBCL-XLのバイオマーカーとしての有用性
3. 学会等名 日本癌治療学会
4. 発表年 2020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
---------	---------