

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16876

研究課題名（和文）新規抗ASCT2モノクローナル抗体を用いたKRAS遺伝子変異癌の治療戦略の開発

研究課題名（英文）Effects of novel anti-ASCT2 monoclonal antibody on human tumor harboring KRAS mutation

研究代表者

原 雄大 (Hara, Yuta)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：20803779

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、申請者らが独自に取得したグルタミントランスポーターASCT2を認識するモノクローナル抗体による、抗がん効果について検討した。本抗体の処置により、KRAS遺伝子変異したヒト大腸癌細胞のグルタミン取込みが有意に減少した。さらに、これらの細胞由来の腫瘍の増殖も有意に低下した。しかしながら、KRAS遺伝子変異していない大腸癌細胞では、本抗体の処置によるグルタミン取込みおよび腫瘍増殖に変化は認められなかった。以上の結果より、KRAS遺伝子変異した大腸癌において、ASCT2は有用な治療標的である可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KRAS遺伝子は、多くのがんで変異が認められる。分子標的治療薬の登場により、がん治療は格段に進歩したが、未だKRAS遺伝子変異のあるがんに対しては治療法が存在しない。また、KRAS遺伝子変異した大腸癌以外のがん種においても、その生存・増殖がグルタミン代謝に非常に強く依存していることが知られている。したがって、本研究で見出したASCT2の阻害によるグルタミン取込みの抑制がKRAS遺伝子変異の大腸癌の増殖を阻害するという知見は、KRAS遺伝子変異のある様々ながん種に対する治療戦略の開発に貢献出来ると考えている。

研究成果の概要（英文）：Mutations in KRAS are detected in various human cancers. However, there are few effective drugs for KRAS-mutated cancers. Glutamine is thought to be one of the pivotal nutrients for proliferation and survival of cancer cells. ASCT2 (SLC1A5) is a multi-pass transmembrane protein that transports neutral amino acids. ASCT2 is reported to be highly expressed in many cancer cells, and is thought to work as a major transporter for glutamine. We have developed a novel monoclonal antibody (mAb) against the extracellular domain of human ASCT2. In the present study, we examined the effects of the mAb on KRAS-mutated colorectal cancer cells. Treatment with anti-ASCT2 mAb decreased the concentration of intracellular glutamine and in vivo tumor growth. However, these effects were not observed in colorectal cancer cells which harbor wild-type KRAS. These results suggest that ASCT2 is a promising therapeutic target for KRAS-mutated cancers.

研究分野：薬理学

キーワード：ASCT2 KRAS 大腸癌 モノクローナル抗体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

以前より、抗がん効果を有する抗体医薬品ががん治療に使われており、一定の成果を上げている。近年では、抗 PD-1 抗体であるオプジーボの登場により、がん免疫領域の研究がさらなる飛躍を遂げている。大腸癌においても、抗 EGFR 抗体医薬品であるセツキシマブ、パニツムマブが使用されており、それらが使用される以前と比べ、生存期間が1年以上延長した。しかしながら、これらの医薬品は、KRAS 遺伝子が正常の場合にしか効果が無いことが知られている。大腸癌の患者において、約 40%に KRAS 遺伝子の変異が認められる。また、難治癌として知られている膵臓癌では約 95%に、全がん死亡率のおよそ 5 分の 1 を占める肺癌では約 25%にそれぞれ KRAS 遺伝子の変異が認められる。このように、KRAS 遺伝子に変異した癌の患者数は多いが、KRAS 遺伝子に変異した癌の分子病態および性状は未だ不明である。

がん細胞や腫瘍は、正常細胞と比べ、増殖の速度が非常に早く、それを支えるために、アミノ酸やグルコースなどの栄養分を正常細胞よりも多く取り込んでいる。そのため、がん細胞ではこれらの取り込みに関わるトランスポーターが高発現していることが知られている。しかしながら、このようなトランスポーターを標的とした低分子および抗体医薬品は未だ存在しない。

2. 研究の目的

グルタミンは、がん細胞の主要な栄養源の1つである。グルタミンの主要なトランスポーターとして ASCT2 が同定されており、多くのがんで高発現していることが報告されている。申請者らは、これまでに、ヒト ASCT2 を認識するモノクローナル抗体を独自に取得した。そして、この抗体を用いて、KRAS 遺伝子に変異のあるがん細胞株において、ASCT2 の発現が多いこと、さらに、予備実験により、KRAS 遺伝子に変異のある大腸癌細胞株由来の腫瘍の増殖が抑制されることを見出した。本申請課題では、KRAS 遺伝子に変異を持つがん治療の標的として、ASCT2 が有用であるのかを目的とし、我々が独自に取得した抗 ASCT2 mAb (Ab3-8) がヒト大腸癌細胞に与える影響について追究する。

3. 研究の方法

(1)細胞

細胞は、ヒト大腸癌細胞株 HT29、SW1116、HCT116 (ATCC)、ヒト胎児腎細胞 HEK293 (Invitrogen)、ラット肝癌細胞 RH7777 (田辺三菱製薬・Dr. Chiba より提供)を使用した。すべての細胞は、D-MEM および RPMI-1640 を等量で混合した培地に 7% FBS および抗生物質を添加し、37 °C、5% CO₂ 存在下で培養した。

(2)動物

オスの 6 週齢 KSN ノードマウスを、日本 SLC 株式会社より購入した。SPF 環境下において、12 時間の明暗サイクル、室温 23 ± 1 °C で飼育した。餌・水は自由に摂取できるようにした。動物実験は、「近畿大学実験動物規程」を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。

(3)フローサイトメトリー

細胞 (1×10^6) を、10 μ g/mL の抗 ASCT2 モノクローナル抗体 (mAb) と 1 時間、その後 2 次抗体として PE 標識した抗ラット IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) と 45 分間それぞれ氷上で反応させた。BD LSR Fortessa (Becton Dickinson) で測定を行い、FlowJo ソフトウェア (TreeStar) を用い解析した。

(4)グルタミン取込みの測定

35 mm ディッシュで一晩培養した細胞 (2×10^6) を、抗 ASCT2 mAb (30 μ g/mL)、D-グルコース (1 g/L) およびピルピン酸ナトリウム (0.11 mg/mL) を含有した D-PBS で 2 時間インキュベートした。L-グルタミン (2 mmol/L) を添加し、10 分後に細胞を回収した。細胞内のグルタミン濃度は、glutamine/glutamate-Glo Assay キット (Promega) を用いて、添付のプロトコールに従って測定した。化学発光は、FilterMax F3 マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) により測定し、結果は、総タンパク質量で補正した。

(5)抗体のインターナリゼーション活性の測定

GFP を融合したヒト ASCT2 を過剰発現した HEK293 および RH7777 細胞と、抗 ASCT2 mAb (10 μ g/mL) を 37 °C で 1 時間反応させた。蛍光顕微鏡 (Keyence) にて画像を取得した。

ヒト大腸癌細胞 (2×10^6) と抗 ASCT2 mAb (10 μ g/mL) を 4 °C で 30 分間反応させた。その後、その細胞を 2 つに分け、片方は 4 °C のまま、もう一方は 37 °C で 1 時間静置した。PE を標識した抗ラット IgG 抗体を 4 °C で 1 時間反応させ、フローサイトメトリーにより蛍光強度を測定した。

(6)ウエスタンブロット

細胞 (3×10^6) を、血清およびグルタミン不含の D-MEM (1 g/L D-グルコース、0.11 mg/mL ピルビン酸ナトリウム添加) 中、抗 ASCT2 mAb (30 μ g/mL) の存在下もしくは非存在下で 24 時間培養した。L-グルタミン (2 mmol/L) を添加し、15 分後に細胞を回収し、lysis buffer により細胞を溶解した。タンパク質濃度を測定後、SDS-PAGE を行い、PVDF メンブレンに転写した。3% スキムミルクでブロッキングを行った後、抗リン酸化 AKT (Ser473)、リン酸化 ERK (Thr202/Tyr204) 抗体 (Cell Signaling) をそれぞれ 4 で一晩反応させた。HRP 標識の抗ウサギ IgG 抗体と室温で 2 時間反応させた後、Chemi-Lumi 試薬 (Nacalai Tesque) で発光させた。ストリッピングを行い、抗 AKT、ERK、GAPDH 抗体 (Cell Signaling) をそれぞれ反応させた。

(7)マウスを用いた抗腫瘍活性の評価

細胞 (5×10^6) をヌードマウスに皮下投与した。腫瘍の生着が確認できた日を 1 日目とし、1 日目および 9 日目に、抗 ASCT2 mAb (100 μ g/mouse) を腹腔内投与した。経時的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積 (mm^3) は、長径 (mm) \times 短径 (mm) \times 短径 (mm) $\times 0.5$ の式により算出した。

(8)免疫染色

マウスより腫瘍を摘出し、凍結した。10 μ m 厚の新鮮凍結切片を作製し、4% PFA で固定後、抗リン酸化 AKT (Ser473)、リン酸化 ERK (Thr202/Tyr204)、Ki67 抗体 (Thermo Fisher Scientific) でそれぞれ染色した。各 2 次抗体を反応させ、DAB により発色させた。

(9)統計解析

結果は、平均値 \pm 標準偏差で表した。In vitro の実験は、独立した試行をドットで示した。統計解析は、GraphPad Prism 7 (GraphPad Software) を用いて、マン・ホイットニーの U 検定により行った。

4. 研究成果

(1) 抗 ASCT2 mAb がグルタミン取込みに与える影響

ヒト大腸癌細胞株である SW1116 および HCT116 は、KRAS 遺伝子が変異していること、一方、HT29 は KRAS 遺伝子が正常であることが知られている (Ahmed et al., *Oncogenesis*, 2013)。本研究では、KRAS 遺伝子変異の有無による、抗 ASCT2 mAb の影響について検討するため、これらの細胞株を使用して検討を行った。

まず、ASCT2 が、がん細胞に発現している主要なグルタミントランスポーターであることより、抗 ASCT2 mAb (Ab3-8) の処置により、細胞内へのグルタミン取込みが変化するのか検討した。図 1 に示すように、SW1116 および HCT116 細胞内のグルタミン濃度が、抗 ASCT2 mAb 処置により有意に低下した。しかしながら、HT29 細胞ではグルタミン濃度に差はなかった。

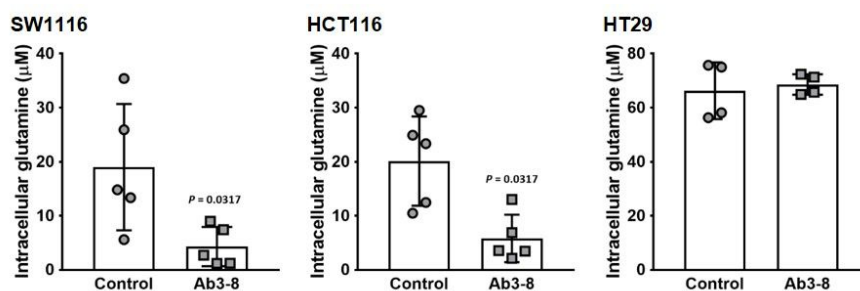


図 1 抗 ASCT2 mAb 処置が細胞内グルタミン取込みに与える影響

(2) 抗 ASCT2 mAb のインターナリゼーション活性

抗体医薬品の作用機序の 1 つとして、標的分子を細胞内に取り込む、インターナリゼーション活性が知られている。そこで、GFP を融合したヒト ASCT2 を過剰発現した HEK293F および RH7777 細胞を用い、抗 ASCT2 mAb 処置後の ASCT2 タンパク質の局在を蛍光顕微鏡により観察した。抗 ASCT2 mAb 処置前では、細胞表面に GFP のシグナルが観察された。抗体を処置したところ、緑色の蛍光が細胞内に局在した (図 2 左)。

さらに、フローサイトメトリー法により、細胞表面上の ASCT2 タンパク質発現を定量的に解析した。細胞膜の流動性が活発になる 37 $^{\circ}$ C、および流動性が低下する 4 $^{\circ}$ C において、それぞれ抗体を処置した際の細胞表面の ASCT2 発現量を測定したところ、SW1116 および HCT116 細胞では、ASCT2 発現量が低下した。一方、HT29 細胞ではこのような変化は認められなかった (図 2 右)。

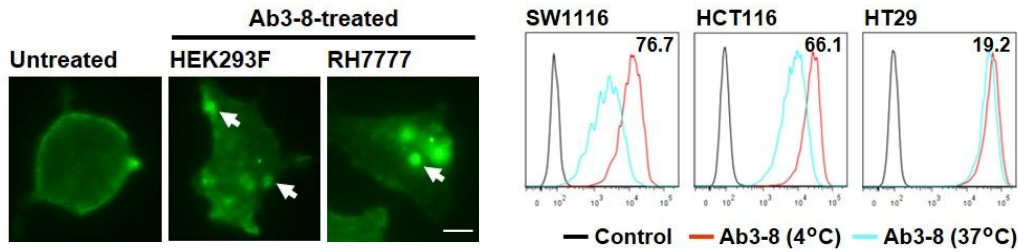


図2 抗 ASCT2 mAb による ASCT2 のインターナリゼーション

(3) 抗 ASCT2 mAb による細胞内シグナルの変化

AKT および ERK は、がん細胞の生存および増殖に深く関わるシグナル分子である。続いて、抗 ASCT2 mAb 処置がこれらのシグナル分子に与える影響について検討した。図 3 に示すように、SW1116 細胞では、抗 ASCT2 mAb 処置により AKT および ERK とともにリン酸化レベルが有意に減少した(図 3 左)。一方、HT29 細胞では、両分子のリン酸化に影響はなかった(図 3 右)。

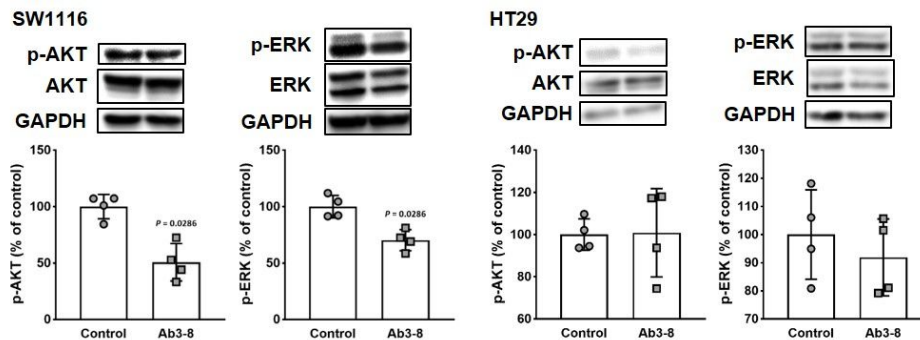


図3 抗 ASCT2 mAb がシグナル分子に与える影響

(4) 抗 ASCT2 mAb が腫瘍の増殖に与える影響

In vivo での抗腫瘍効果について検討した。各ヒト大腸癌細胞株をヌードマウスに移植し、生着を確認後、抗 ASCT2 mAb を投与した。SW1116 および HCT116 細胞株由来の腫瘍の増殖は、抗 ASCT2 mAb 処置により有意に低下した。さらに、抗 ASCT2 mAb を処置したマウス由来の腫瘍では、AKT および ERK のリン酸化レベルの減弱、増殖マーカーである Ki67 の減少が認められた。しかしながら、HT29 細胞由来の腫瘍は、抗 ASCT2 mAb 処置で変化は認められなかった(図 4)。

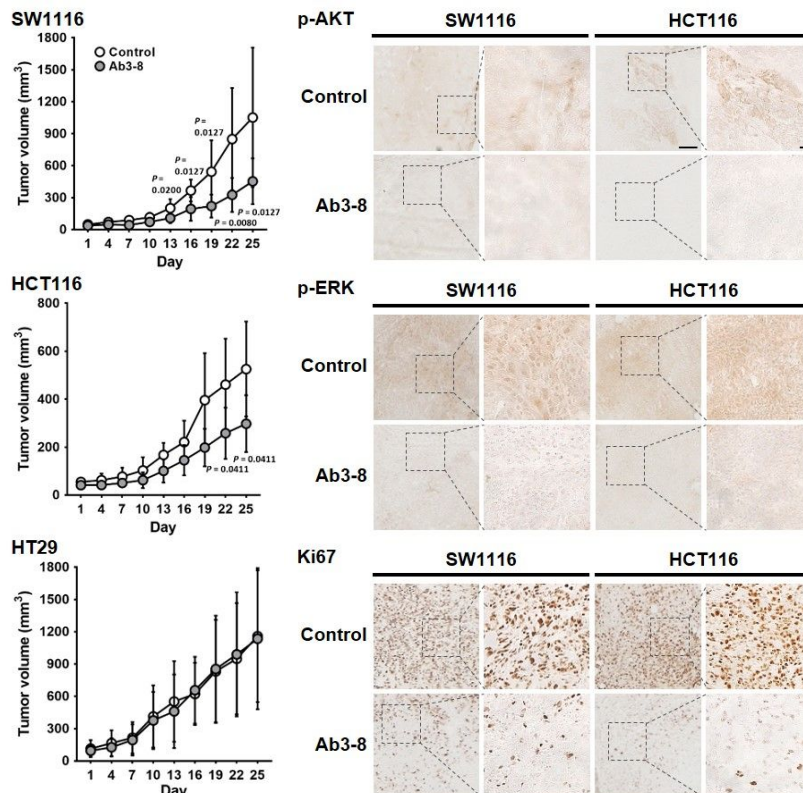


図4 抗 ASCT2 mAb が腫瘍増殖に与える影響

以上より、本抗 ASCT2 mAb は、*KRAS* 遺伝子に変異のある大腸癌細胞のグルタミン取込みを抑制し、腫瘍の増殖を阻害することが明らかとなった。これまでに、膵臓癌や肺癌などの他のがん腫においても、*KRAS* 遺伝子に変異しているものに関しては、その生存・増殖がグルタミン代謝に非常に大きく依存していることが知られている (Son et al., *Nature*, 2013; Romero et al., *Nat. Med.*, 2017)。したがって、本研究の成績は、ASCT2 の阻害を介したグルタミン取込みの抑制が、*KRAS* 遺伝子に変異した種々のがんの治療戦略となり得る可能性を示している。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuta Hara, Yushi Minami, Soshi Yoshimoto, Natsumi Hayashi, Akitaka Yamasaki, Shiho Ueda, Kazue Masuko, Takashi Masuko	4. 巻 9
2. 論文標題 Anti tumor effects of an antagonistic mAb against the ASCT2 amino acid transporter on KRAS mutated human colorectal cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 302-312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.2689	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Soshi Yoshimoto, Yuta Hara, Toshiyuki, Ishiwata, Takashi Masuko
2. 発表標題 Anti-cancer effects and internalization activity of novel anti-ASCT2 mAb on human colorectal and pancreatic cancers
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Okura, Takashi Masuko, Yuta Hara
2. 発表標題 Anti-cancer antibody therapy targeting CAT1/SLC7A1
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rikuto Miyake, Akitaka Yamasaki, Yuta Hara, Yoshiya Ono, Takashi Masuko
2. 発表標題 Characterization of HER3/MET-KO human colon cancer cells
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------