

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17653

研究課題名(和文) 核酸治療によるKRAS遺伝子変異陽性肺癌に対する新規治療の確立

研究課題名(英文) Developing the novel therapeutic strategy with the oligonucleotide therapy against KRAS mutation-positive lung cancer

研究代表者

三上 浩司(Mikami, Koji)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：70567205

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)：これまでに色々な遺伝子変異を持った肺癌に対する治療法が開発されてきたが、KRAS遺伝子変異を有する肺癌の治療法は確立されていない。私達は、DNAから蛋白が作られる際の間物質であるRNAに対する治療薬としてmicroRNAに注目した。これまでに開発してきたmiR-4689、MIRTXの効果を検討し、さらにKRAS変異肺癌で低下しているmicroRNAを網羅的に探索し、その中から最も良くKRAS変異癌に効くmiR-329-3pを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MicroRNAは22塩基程度の短いRNA鎖であり、メッセンジャーRNA(mRNA)の3'UTR(非翻訳領域)に結合して、mRNAの蛋白への翻訳を阻害する。今回、我々が新たに見出したmiR-329-3pは低濃度でKRAS変異を導入したH292細胞の増殖をよく抑制し、更に悪性度の極めて高い肺小細胞癌に対しても著明な抗腫瘍効果を示した。これらの結果は、従来満足のいく治療法がなかった肺癌の治療に大きな希望を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：In our earlier studies, we developed miR-4689 and MIRTX (miR-29b-1-5p complementary sequence) for KRAS mutated colon cancer. In this study, we tried to test whether these microRNA would be effective in inhibiting KRAS mutated non-small cell lung cancer or small cell carcinoma because these diseases are major clinical problems. MIRTX, rather than miR-4689 had a stronger tumor suppressive effect, but it was still not sufficient. RNA sequence analysis indicated many microRNAs that were down-regulated in the KRAS mutated H292 cells as compared with KRAS wild type H292 lung cancer cells. Among them we found that miR-329-3p efficiently inhibited KRAS mutated tumor cells and also small cell carcinoma cells.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：KRAS遺伝子変異 肺癌 核酸治療 microRNA

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌の分子標的治療は目覚ましい進歩を遂げ、現在、EGFR 遺伝子変異、ALK 融合遺伝子、ROS1 融合遺伝子、BRAF 遺伝子変異の非小細胞肺癌(Non-Small Cell Lung Cancer: NSCLC) においては、実臨床でそれぞれの分子標的治療薬が使用され、従来の細胞障害性抗癌化学療法と比較して極めて高い治療効果が得られている。さらに、近年の次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析の普及により、無数の新たな遺伝子変異が明らかとなり、肺癌診療においては個別化医療の実現が現実のものとなりつつある。しかしながら、その一方で、全ての遺伝子変異が治療対象となる actionable mutation という訳ではない。アンメットニーズとして KRAS 変異肺癌 (非小細胞肺癌 10%) と小細胞肺癌については未だ有効な治療法がない。KRAS 遺伝子変異は、EGFR に次ぐ第 2 の Driver Oncogene である。しかし、変異型 KRAS を標的とした薬剤でこれまでに統計学的に無再発生存期間、全生存期間共に有効性を示すことができたものは存在せず、現状では、「遺伝子変異陰性 NSCLC」として細胞障害性化学療法や免疫チェックポイント阻害薬による治療が行われている。そのため、新規治療法の開発が切望されている。また、肺小細胞癌の治療法も現在のところ困難であり予後不良である。

2. 研究の目的

核酸医薬は抗体医薬品と異なり、速やかにかつ比較的安価に合成が可能である事から、次世代の癌治療の主力となり得ると期待されている。本研究では、核酸医薬が KRAS 遺伝子変異陽性肺癌の新たな治療選択肢となりうるかを検証する。MicroRNA は標的遺伝子の 3' 非翻訳領域と結合することで蛋白発現を制御し、細胞増殖や分化に関与する。これまでに KRAS 変異型大腸癌において miR-4689 や MIRTX (miR-29b-1-5p complementary sequence) が抗腫瘍効果を発揮したことから、本研究では肺癌に対してこれら核酸医薬の効果を検証するとともに、新たに KRAS 変異株を作成し、新たな microRNA 治療剤を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) まずこれまで KRAS 変異陽性大腸癌に対する治療剤として開発を進めてきた miR-4689 や MIRTX が KRAS 遺伝子変異陽性肺癌に対しても有効であるかどうかを検討する。

(2) 細胞株としては、KRAS 変異陽性肺癌細胞株である A549 と H441、KRAS 野生型として粘表皮癌細胞 H292 と H1925 (EGFR 変異あり)、小細胞癌は SBC3 用いた。

(3) さらに詳細な検討を行うため、KRAS 遺伝子変異を持たない粘表皮肺癌細胞 H292 に非小細胞肺癌(NSCLC) で高頻度に認められる G12C 変異を有する KRAS タンパクを過剰発現させるプラスミドを導入し、恒常発現細胞株 KRAS-H292 を作製する。

(4) KRAS 変異 NSCLC で発現が変化する microRNA を同定するために、G12C 変異を有した KRAS タンパク過剰発現細胞株、wild-type 細胞株のサンプルを microRNA-seq に提出し、網羅的な解析を行う。野生型に比べて KRAS-H292 で発現低下を示す microRNA のうち 12 個を抽出し、最も抗腫瘍効果の高い microRNA を同定する。

4. 研究成果

当初は wild type (WT) の KRAS を発現している H292 細胞の WT KRAS を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウト (KO) した上で、WT または mutant の KRAS を導入し、H292-KRASwt 細胞と H292-KRAS mut 細胞における核酸医薬の効果の違いを観察する予定であったが、KO 細胞の作製

がうまくいかなかったため計画を変更し、H292 細胞に NSCLC で高頻度に認められる G12C 変異を有する KRAS タンパクを過剰発現させるプラスミドを導入し、恒常発現細胞株 (KRAS-H292) を作製した。MiR-4689 は H292 (KRAS wild), SBC3, H441 の細胞増殖を抑制したが、H292 (KRAS mut), A549, H1975 に無効であった。MIRTX は概してよく効いたが小細胞癌には無効であった。H292 (KRAS wild) と H292 (KRAS mut) の small RNA を抽出し microRNA seq を行い、KRAS 変異型で 2 分の 1 以下に発現減少する 12 種類の miRNA を選択し、KRAS 変異株に添加した時に抗腫瘍効果を示す miRNA を探索した。4 種類の miR が KRAS wild H292 に比べて KRAS mut H292 に高い抗腫瘍効果を示した (図 1、矢印)。このうち miR-329-3p は小細胞癌 SBC3 を含む全ての肺癌細胞に有効であった (図 2)。以上から、肺癌治療のアンメット領域において miR-329-3p は次世代の肺癌治療剤として期待されると考えられた。

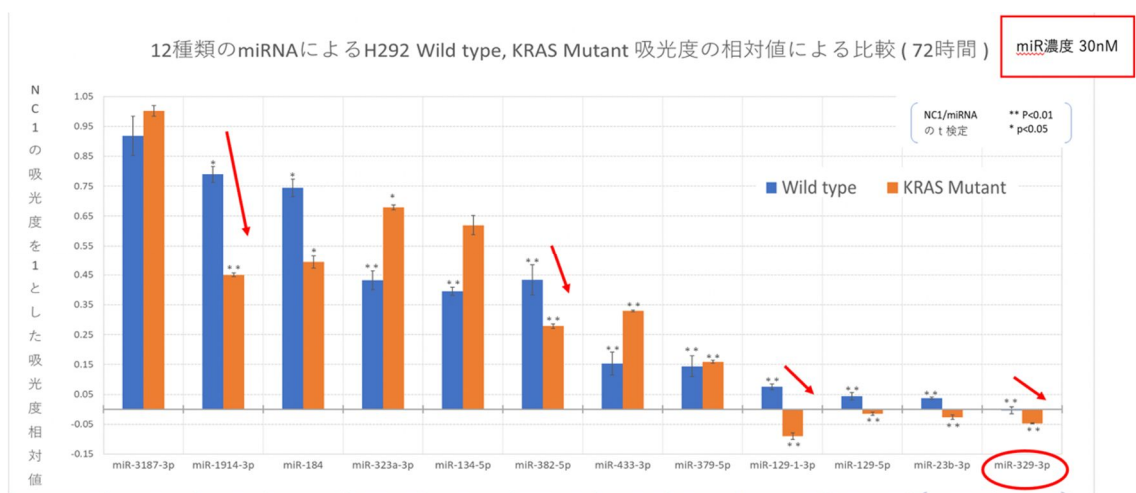


図 1. KRAS mutated H292 で発現低下した 12 種類の miRNA のうち、KRAS wild H292 よりも KRAS mut H292 によく効いた miRNA を 4 種類同定した (赤矢印)。

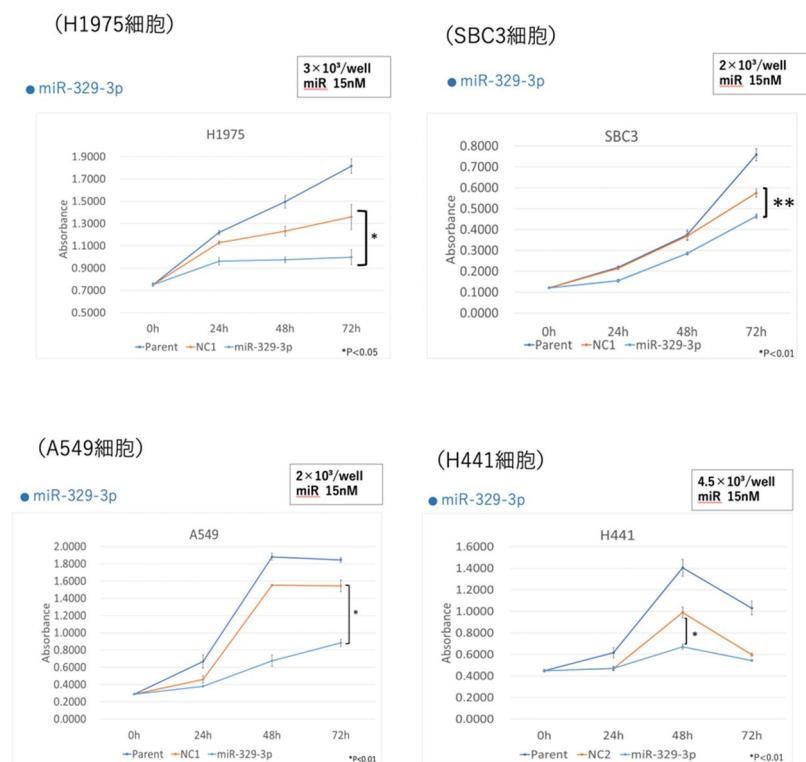


図 2. 増殖アッセイ miR-329-3p は KRAS 変異肺癌、小細胞癌の増殖を有意に抑制した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Ishigaki Hirotooshi, Minami Toshiyuki, Morimura Osamu, Kitai Hidemi, Horio Daisuke, Koda Yuichi, Fujimoto Eriko, Negi Yoshiki, Nakajima Yasuhiro, Niki Maiko, Kanemura Shingo, Shibata Eisuke, Mikami Koji, Takahashi Ryo, Yokoi Takashi, Kuribayashi Kozo, Kijima Takashi | 4. 巻 519 |
| 2. 論文標題 EphA2 inhibition suppresses proliferation of small-cell lung cancer cells through inducing cell cycle arrest | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 846 ~ 853 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.076 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 AKANO YUMIKO, KURIBAYASHI KOZO, FUNAGUCHI NORIHIKO, KODA YUICHI, FUJIMOTO ERIKO, MIKAMI KOJI, MINAMI TOSHIYUKI, TAKAHASHI RYO, YOKOI TAKASHI, KIJIMA TAKASHI | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Analysis of Pleiotropic Effects of Nivolumab in Pretreated Advanced or Recurrent Non-small Cell Lung Cancer Cases | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 In Vivo | 6. 最初と最後の頁 507 ~ 514 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11503 | 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Horio Daisuke, Minami Toshiyuki, Kitai Hidemi, Ishigaki Hirotooshi, Higashiguchi Yoko, Kondo Nobuyuki, Hirota Seiichi, Kitajima Kazuhiro, Nakajima Yasuhiro, Koda Yuichi, Fujimoto Eriko, Negi Yoshiki, Niki Maiko, Kanemura Shingo, Shibata Eisuke, Mikami Koji, Takahashi Ryo, Yokoi Takashi, Kuribayashi Kozo, Kijima Takashi | 4. 巻 111 |
| 2. 論文標題 Tumor associated macrophage derived inflammatory cytokine enhances malignant potential of malignant pleural mesothelioma | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 2895 ~ 2906 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14523 | 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 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 三上浩司 横井崇 大搦泰一郎 柴田英輔 中島康博 二木麻衣子 幸田裕一 祢木芳樹 赤野友美子 石垣裕敏 多田陽郎 東山友樹 亀井貴雄 南俊行 高橋良 栗林康造 木島貴志 |
| 2. 発表標題 胸水合併T790M変異陽性肺癌へのオシメルチニブの有効性の検討 |
| 3. 学会等名 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 二木麻衣子 横井崇 三上浩司 大搦泰一郎 柴田英輔 中島康博 幸田裕一 柁木芳樹 赤野友美子 石垣裕敏 多田陽郎 東山友樹 亀井貴雄 南俊行 高橋良 栗林康造 木島貴志 |
| 2. 発表標題 抗PD-1抗体治療歴を有する進行非小細胞肺癌に対する抗PD-L1抗体の検討 |
| 3. 学会等名 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柴田英輔 横井崇 三上浩司 大搦泰一郎 中島康博 二木麻衣子 幸田裕一 柁木芳樹 赤野友美子 石垣裕敏 多田陽郎 東山友樹 亀井貴雄 南俊行 高橋良 栗林康造 木島貴志 |
| 2. 発表標題 当院における手術不能局所進行非小細胞肺癌に対するDurvalumab投与経験 |
| 3. 学会等名 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 R.Takahashi, E.Shibata, T.Higashiyama, T.kamei, A.Tada, H.Ishigaki, Y.Nakajima, Y.Negi, M.Niki, K.Mikami, T.Minami, T.Yokoi, K.Kuribayashi, T.Kijima |
| 2. 発表標題 Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictive factor for hyperprogressive disease in NSCLC patients treated with immune checkpoint inhibitor |
| 3. 学会等名 ESMO Asia Congress 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀尾大介 南俊行 北井秀美 中島康博 幸田裕一 藤本英利子 柁木芳樹 金村晋吾 柴田英輔 三上浩司 高橋良 横井崇 栗林康造 木島貴志 |
| 2. 発表標題 悪性胸膜中皮腫微小環境中の腫瘍関連マクロファージにおけるインフラマソームの役割 |
| 3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Koji Mikami, Takashi Yokoi, Ryo Takahashi, Eisuke Shibata, Maiko Niki, Yasuhiro Nakajima, Yoshiki Negi, Hirotoishi Ishigaki, Akio Tada, Tomoki Higashiyama, Takao Kamei, Toshiyuki Minami, Kozo Kuribayashi, Takashi Kijima |
| 2. 発表標題 Efficacy and safety of nivolumab for malignant mesothelioma in the real world. |
| 3. 学会等名 2020 American Society of Clinical Oncology (国際学会) |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|