

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16413

研究課題名（和文）KRASの超生理的活性化を標的としたKRAS増幅胃癌フェロトーシス誘導療法の開発

研究課題名（英文）Development of ferroptosis induction therapy against KRAS altered gastric cancer

研究代表者

菊池 理（Kikuchi, Osamu）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10869366

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：KRAS増幅細胞に対してgenome-wide CRISPR screening及び検証的実験を実施し、MEK阻害剤の抗腫瘍効果を増強する可能性のある複数の候補遺伝子ノックアウト及び、抗腫瘍効果を減弱する可能性のある複数の候補遺伝子ノックアウトを同定した。これらの中でGPX4の阻害がMEK阻害剤との併用で良好な抗腫瘍効果が得られることが示唆された。今後はマウスでの前臨床試験の追加及びヒト臨床試験(phase I, II)の立案を行い、治療法開発を継続する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切除不能進行胃癌の治療成績は不十分であるが、こうした難治性の胃癌の治療法開発に貢献する研究結果を得た。また今回開発している治療戦略は、胃癌の既存の標準治療で用いる薬剤とは異なるため、既存の標準治療法を使い切った胃癌症例へのさらなる生存期間延長にも貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We performed a genome-wide CRISPR screening and confirmatory experiments on KRAS-amplified cells, identifying multiple candidate gene knockouts that may enhance anti-tumor effects of MEK inhibitors and those that may attenuate anti-tumor effects. Among these, inhibition of GPX4 showed good anti-tumor effects in combination with MEK inhibitors. In the future, we will plan to run additional pre-clinical studies in mice and human clinical studies (phase I / II) to continue development for new treatment regimens.

研究分野：消化器癌

キーワード：分子標的療法 KRAS

1. 研究開始当初の背景

胃癌は早期に診断されると予後良好であるが遠隔転移をきたすと集学的治療を行っても満足できる予後は得られず難治性の癌である。KRASは主要な癌遺伝子の一つで多くの癌腫にKRAS変異が認められるが、胃癌においては他の癌腫と比較して高頻度(7%)に「KRAS遺伝子の増幅」を認め、KRAS遺伝子の増幅を認めない胃癌と比較し予後不良と報告され、新規治療法開発が求められている(Wong, et al., *Nature medicine*. 2018)。

KRAS増幅胃癌においてMEK阻害剤を用いてMAPK経路を阻害すると、負のフィードバック経路が抑制されKRASが脱抑制、活性化される。この時KRAS遺伝子が増幅しているため大量の「非活性型KRAS」が「活性型KRAS」に変換され、通常の活性型KRASや変異に伴う活性型KRASをはるかに超えた「超生理的なKRAS活性化」を生じ(Wong, et al., *Nature medicine*. 2018)、細胞内の活性酸素および脂質過酸化物が増加する。

フェルトーシスは脂質過酸化物の過剰な蓄積による細胞死で、プログラム細胞死の一種である(Yang, et al., *Trends in cell biology*. 2016)。フェルトーシスはアポトーシス抵抗性の癌に対し細胞死を誘導しうる方法として近年着目されている。GPX4蛋白は脂質過酸化物を代謝することのできる唯一の酵素とされ、GPX4を阻害すると脂質過酸化物が過剰に蓄積し、フェルトーシスによる細胞死を誘導することが報告されている(Yang, et al., *Cell*. 2014)。

上記の知見から、申請者は「KRAS増幅胃癌細胞においてMAPK経路の阻害剤を用いてKRAS活性を超生理的に亢進することで、活性酸素及び脂質過酸化物が増加し、それにGPX4阻害を併用して脂質過酸化物の代謝を障害することにより、細胞内に脂質過酸化物が蓄積し、フェルトーシスが効率的に誘導されて有効な抗腫瘍効果を示すのではないか？」と仮説を立てた。

2. 研究の目的

目的 1: KRAS増幅胃癌細胞においてKRASの超生理的活性化が活性酸素及び脂質過酸化物を増加させる機序の解明

目的 2: KRAS増幅胃癌に対するフェルトーシス療法として効果的な併用療法候補の決定

3. 研究の方法

細胞株

KE-39、HUG1-N、YCC1、GSU細胞株は、Dana Farber Cancer Institute Belfer Instituteから提供を受けた。同研究所は、標準的なSTR分析を用いて鑑定した商用ソースから直接入手した。細胞は、10% FBSを含むRPMI1640で培養した。すべての細胞株には、1 mMのペニシリン/ストレプトマイシン、2 mMのL-グルタミンを添加し、5% CO2インキュベーターで37°Cで維持した。すべての細胞は定期的にマイコプラズマ検査を行い、汚染がないことを確認した。

Genome-wide CRISPR スクリーニング

ゲノムワイドsgRNAライブラリ(約19,000遺伝子を標的とする77,441 sgRNAを含むBrunello CRISPR knockout pooled library)のプールされたレンチウイルスは、Broad Institute Genomic Perturbation Platformから提供された。スクリーニング実験で約30%の感染率を確保するために、スクリーニング前に各細胞株で感染に必要なウイルス滴定度と体積をパイロット実験で予め決定し、同じ細胞に複数の構築物が導入される可能性を最小限に抑制した。細胞増殖のための最適な表面積は、パイロット実験で予め決定し、過剰なコンフルエンスに達することを回避した。Puromycinの濃度は、スクリーニング前にパイロット実験で予め決定した。スクリーニング実験では、 1.5×10^8 個のHUG1-NおよびKE-39細胞をレンチウイルスライブラリに感染させ、各sgRNAが平均して少なくとも500個の細胞に感染するようにした。感染細胞は4日目から8日目まで2 µg/mLのpuromycinで選択し、必要な細胞数に達するまでさらに4日間増殖させ、DMSOまたは25nM trametinib処理で並行培養に分割しました。各処理条件では少なくとも 4×10^7 個の細胞を使用し、各sgRNAの最小提示数を500個以上に保ちました。細胞は2週間(HUG1-N)または3週間(KE-39)培養し、pH 7.9 Phenol:Chloroform:IAA (#AM9730; Ambion Inc., Austin, TX)を用いてメーカーのプロトコルに従ってゲノムDNAを回収し、Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)で定量しました。PCRおよびシーケンシングはHiSeq2000 (Illumina)で行った。

RAS G-LISA assay

RAS G-LISA 活性化測定キット (Cytoskeleton, Inc, Denver, CO, USA; #BK131) を用いて行った。全細胞溶解物から 20 μ g のタンパク質を triplicate で 96 ウェルプレートに添加し、活性化した RAS を各ウェルに結合した RAS-GTP 結合タンパク質に結合させた。結合した活性 RAS は、RAS 特異的抗体で検出し、Tecan Infinite 200Pro プレートリーダーを用いて 490 nm で相対吸光度を測定することで定量した。

統計解析

統計解析は、Prism 9.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) を用いて行った。2 群間では両側検定の Student t 検定、3 群以上では 1 因子分散分析 (one-way ANOVA) を用いた。

4. 研究成果

令和 2 年度は、Trametinib (MEK 阻害剤) に加えて、GPX4 阻害剤を用いた genome-wide CRISPR screening を行った。KE-39 細胞に Cas9 を導入し、さらに CRISPR-KO のレンチウイルスライブラリー (Brunello, Broad Institute) を感染させて薬剤を投与し、培養後に生細胞を回収して DNA を抽出、sgRNA 領域の前後を挟む形でアンプリコンシーケンスを行って sgRNA の増減を解析した。DMSO 群、MEK 阻害剤群、GPX4 阻害剤群、併用群の 4 群で比較して解析を行った。その結果、GPX4 阻害剤の殺細胞効果にはフェルトーシス関連遺伝子が大きく関与すること、ERK のノックアウトが GPX4 阻害剤への感受性を亢進させること、KEAP1 のノックアウトが MEK 阻害剤と GPX4 阻害剤の併用の殺細胞効果を減弱させること、などを明らかにした。

令和 3 年度は、初年度で実施した genome-wide CRISPR screening で得られた結果に基づき、複数の候補遺伝子や興味深い結果の得られた遺伝子 (NF1, PTEN, STK11, GPX4 等) の個別のノックアウト細胞を KE39 細胞株を用いて作成した。この中で、特に GPX4 のノックアウトが MEK の阻害に対して感受性が亢進することが明らかとなった。

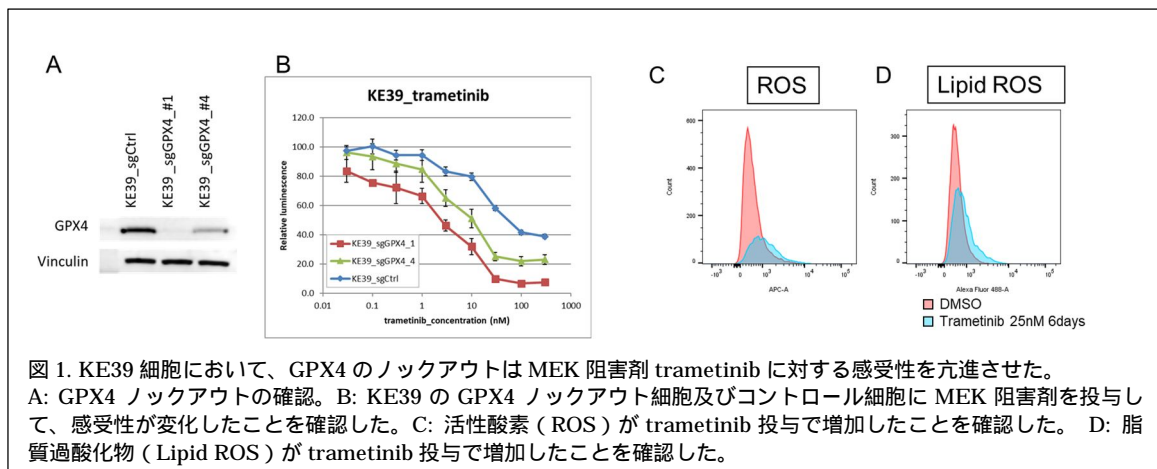


図 1. KE39 細胞において、GPX4 のノックアウトは MEK 阻害剤 trametinib に対する感受性を亢進させた。A: GPX4 ノックアウトの確認。B: KE39 の GPX4 ノックアウト細胞及びコントロール細胞に MEK 阻害剤を投与して、感受性が変化したことを確認した。C: 活性酸素 (ROS) が trametinib 投与で増加したことを確認した。D: 脂質過酸化物質 (Lipid ROS) が trametinib 投与で増加したことを確認した。

令和 3 - 4 年度にかけて、in vivo の実験を行うこととした。恒常的な GPX4 ノックアウトを行った KE39 細胞をヌードマウスに移植したが生着しなかった。さらに、より免疫抑制の強い NSG マウスでも KE39-GPX4-KO 細胞の移植を試みたが生着しなかった。Cas9 の免疫原性を疑って、今度は IPTG 誘導性の shRNA を用いた KE39-shGPX4 細胞を作成し、IPTG 投与により GPX4 遺伝子の発現が低下することを確認したが、その抑制割合は不十分であった。

そのため、これまで使用していた GPX4 阻害剤 ML210 ではなく、マウスに投与可能な他の GPX4 阻害剤を用いて、MEK 阻害剤 + GPX4 阻害剤の薬効をみる方針とし、現在実験中である。

一方、この研究を通じて、MEK を含む MAPK 経路の阻害と、KRAS 活性化機構の分子の一つである SHP2 の阻害の併用が KRAS 増幅胃癌に対して良好な抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆され、国際学会発表及び論文発表した

(JCI Insight. 2023;8(3):e152714. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.152714>.)

一連の研究により、KRAS 増幅細胞に対して GPX4 の阻害が MEK 阻害剤との併用で良好な抗腫瘍効果が得られることが示唆された。今後はマウスでの前臨床試験の追加及びヒト臨床試験 (phase I, II) の立案を行い、治療法開発を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mori Yukiko, Kikuchi Osamu, Horimatsu Takahiro, Hara Hiroki, Hironaka Shuichi, Kojima Takashi, Kato Ken, Tsushima Takahiro, Ishihara Ryu, Mukai Kumi, Uozumi Ryuji, Tada Harue, Kasai Hiroi, Kawaguchi Atsushi, Muto Manabu	4. 巻 Online
2. 論文標題 Multicenter phase II study of trifluridine/tipiracil for esophageal squamous carcinoma refractory/intolerant to 5-fluorouracil, platinum compounds, and taxanes: the ECTAS study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Esophagus	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10388-021-00905-2	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 Li Tianxia, Kikuchi Osamu, Zhou Jin, Wang Yichen, Pokharel Babita, Bastl Klavdija, Gokhale Prafulla, Knott Aine, Zhang Yanxi, Doench John G., Ho Zandra V., Catenacci Daniel V.T., Bass Adam J.	4. 巻 8
2. 論文標題 Developing SHP2-based combination therapy for KRAS-amplified cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 152714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.152714	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Osamu Kikuchi, Tianxia Li, Adam, Bass
2. 発表標題 Developing combination therapy with SHP2 inhibition for CIN-type gastroesophageal adenocarcinoma with KRAS amplification
3. 学会等名 米国AACR Annual Meeting 2022 April 8-13, 2022 (発表確定) New Orleans (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------