

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07114

研究課題名（和文）MyD88阻害によるKRAS変異大腸がんの新規治療法の開発

研究課題名（英文）Identification of novel therapeutic targets for colorectal cancer with KRAS mutations by MyD88 inhibition.

研究代表者

梶野 リエ（Kajino, Rie）

愛知県がんセンター（研究所）・がん病態生理学分野・主任研究員

研究者番号：20633184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：大腸がん細胞の増殖はMyD88の働きを阻害すると抑えられるが、Kras遺伝子に変異が生じて悪性化したがん細胞ではその効果が弱くなる。変異型Krasの働きに関わる因子を探索して得られた候補因子のうち3つについて調べたところ、1つの因子ががん細胞の増殖に関わることが示唆された。この因子の阻害剤とMyD88阻害剤を併用することで、Kras遺伝子変異により悪性化したがん細胞の増殖が効果的に抑えられることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における2020年のがん死亡数をみると、大腸がんは男性で第2位、女性では第1位と多く、効果的な大腸がんの治療法が必要とされている。Kras遺伝子変異は悪性化したがん細胞でよく見られるが、変異型Krasを標的にした治療薬は創薬が難しいとされている。本研究で得られた候補因子を阻害すると変異型Krasの働きを打ち消してがん細胞の増殖を抑えやすくする可能性が考えられ、大腸がんに対する新しい治療法につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The growth of colorectal cancer cells can be inhibited by loss of MyD88 function. However, this effect is diminished in cancer cells with Kras mutations. Examination of three candidate molecules identified in the search for factors related to the function of mutant Kras suggested that one molecule is significantly involved in the growth of cancer cells. A combination of inhibitors targeting the molecule and MyD88 inhibitors is expected to effectively suppress the growth of cancer cells with Kras mutations.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん オルガノイド培養

### 1. 研究開始当初の背景

(1) がんの薬物療法は、外科的治療後のがん再発予防のため、および外科的治療が困難な進行・再発がんの場合に行われるが、がん細胞だけでなく正常細胞にも作用するため様々な副作用を生じる。重篤な副作用はその後の治療選択を限定し、また生活の質の低下につながるため、正常細胞への悪影響が少なく、がん細胞の増殖・生存を効果的に抑制する抗がん治療法の開発が必要である。

(2) APC がん抑制遺伝子は、家族性大腸腺腫症 (familial adenomatous polyposis: FAP) の原因遺伝子であり、散発性大腸がんの約 80% が APC 変異を持つ。しかしながら、APC 変異によって活性化される Wnt/  $\beta$ -catenin 経路を標的とした治療法の開発は残念ながら困難な状況である。Apc<sup>T16</sup> 変異(以下 Apc 変異) マウスは大腸がん初期のマウスモデルで、腸管に腺腫性ポリープを自然発症する。これまでに我々は、腸管腫瘍の発症メカニズム解明と大腸がんの治療標的探索を目的とした研究を行い、IL-1 や TLR シグナル伝達経路のアダプター分子である MyD88 の機能欠損は、マウスの腸管の正常上皮細胞への影響は少ないが Apc 変異腫瘍細胞において「合成致死」を誘導することを明らかにした。

次に、Apc 変異と同様に Wnt/  $\beta$ -catenin 経路を活性化する Ctnnb1 変異(C)に加えて大腸がん関連遺伝子に変異をもつ腫瘍オルガノイド (C, CK, CKS, CKSP) を作製し(図 1)、悪性化進展した腸管腫瘍細胞の増殖・生存にも MyD88 が関与するか検討したところ、MyD88 阻害剤 ST2825 はいずれのオルガノイドの生育も抑制したが、Kras 変異(K)があると抑制効果が低下した(図 2)。これらの結果から、「MyD88 の機能阻害は Wnt 経路に変異を持つ大腸がんの生育を抑制するが、変異型 Kras が生育抑制に抵抗性をもたらす」ことが示唆された。

(3) 大腸がんの分子標的治療薬として、KRAS 上流の EGF 受容体を標的とした Cetuximab や Panitumumab が承認されているが、これらは KRAS 遺伝子野生型のみに適応され、KRAS 変異を有する症例に対しては効果が期待できないことが報告されている。近年、KRAS(G12C)変異特異的阻害剤が報告されたが、G12C 変異の頻度は大腸がんでは低く、マウスを使った解析において阻害剤投与後に急速に阻害剤への適応が生じることが明らかになっており、変異型 KRAS の影響を抑制する治療法が必要とされている。

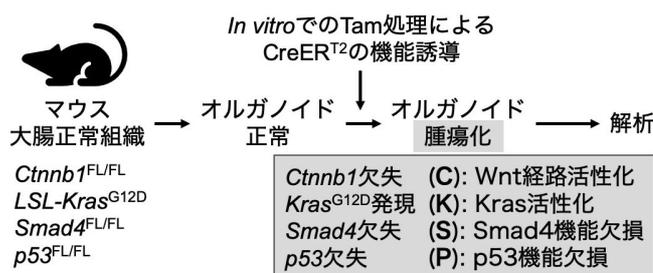


図1: 大腸がん関連遺伝子の変異をもつオルガノイドの作成

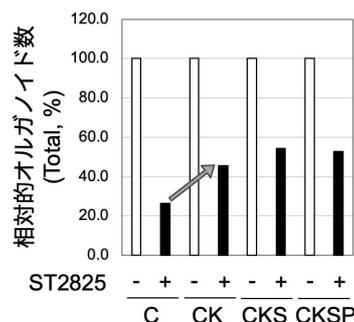


図2: 生育数の比率

### 2. 研究の目的

MyD88 の機能阻害による大腸腫瘍オルガノイドの生育抑制効果は Kras 変異があると低下する。本研究の目的は、大腸腫瘍細胞の Kras 変異が MyD88 阻害による増殖抑制・細胞死誘導に対して抵抗性をもたらす分子メカニズムを解明し、Kras 変異の影響を打ち消す標的因子を同定することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 候補因子の探索

タモキシフェン誘導型 *Ctnnb1*<sup>FL/FL</sup>(C) 変異マウスおよび *Ctnnb1*<sup>FL/FL</sup>; *LSL-Kras*<sup>G12D</sup>(CK) 変異マウスの大腸正常上皮から大腸正常オルガノイドを作製した後、in vitroでタモキシフェン処理により変異誘導をしてマウス大腸腫瘍 C(Wnt 経路活性化変異)オルガノイドと CK(Wnt 経路活性化変異+Kras 活性化型変異)オルガノイドを作製した。分子メカニズムの解明の手がかりとして C オルガノイドと CK オルガノイドで発現が変化する遺伝子を探索するため、これらのオルガノイドの MyD88 阻害剤未処理および処理サンプルを調製し、RNA-seq 解析を実施した。

## (2) 候補因子の検討・同定

得られた候補因子について、上記のマウス腸管腫瘍組織や腫瘍オルガノイドを用いてリアルタイム PCR やウェスタンブロットによりその変動を検討して再現性を確認した。また、ヒト検体を対象とした各種データベースの情報を元に候補因子の絞り込みを行って優先順位をつけた。その後の *in vitro* の検討では、発現抑制による増殖・生存への影響を調べた。個体レベルでの検討では、大腸がん初期のマウスモデルである *Apc* 変異マウスを用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 候補因子の探索

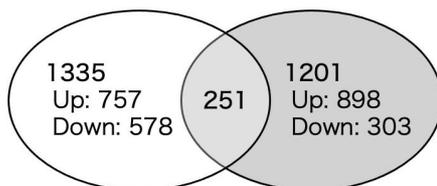
MyD88 阻害剤処理有りおよび処理無しのカオルガノイドとCKオルガノイドでRNA-seq解析を実施した結果から、変化している因子や経路をパスウェイ解析等により探索したところ、複数の標的因子の候補が挙げられた(図3、図4)。

### (2) 候補因子の検討・同定

マウス腸管腫瘍組織や腫瘍オルガノイドにおける発現変動の再現性と、ヒト検体を対象とした各種データベースの情報を元に絞り込んだ3つの遺伝子について解析を進めた。マウス腸管腫瘍細胞やヒト大腸がん細胞において発現を抑制させたところ、1つの遺伝子については増殖・生存への影響が顕著に見られ、1つの遺伝子の遺伝子については弱く見られた。

個体レベルでの検討では、大腸がん初期のマウスモデルである *Apc* 変異マウスを用いた。検討に必要なMA-Cre、MAK-CreとAK-Cre(M:タモキシフェン誘導型 *MyD88* 変異, A: *Apc* 変異, K: タモキシフェン誘導型 *Kras* 活性化変異, Cre: Villin-CreERT2) 複合変異マウスを作成したが、候補因子の機能阻害による腸管腫瘍の抑制効果については結論づける十分なデータを得られていない。

さらに研究を進め、候補因子の中から腫瘍細胞の増殖・生存を抑制し、かつ正常細胞への悪影響が少ない標的因子を同定することにより、革新的な大腸がん治療戦略を開発する基盤につながる事が期待される。



- C\_MyD88阻害剤 vs C\_Vehicle
- CK\_MyD88阻害剤 vs CK\_Vehicle

図3: 発現変動遺伝子の数

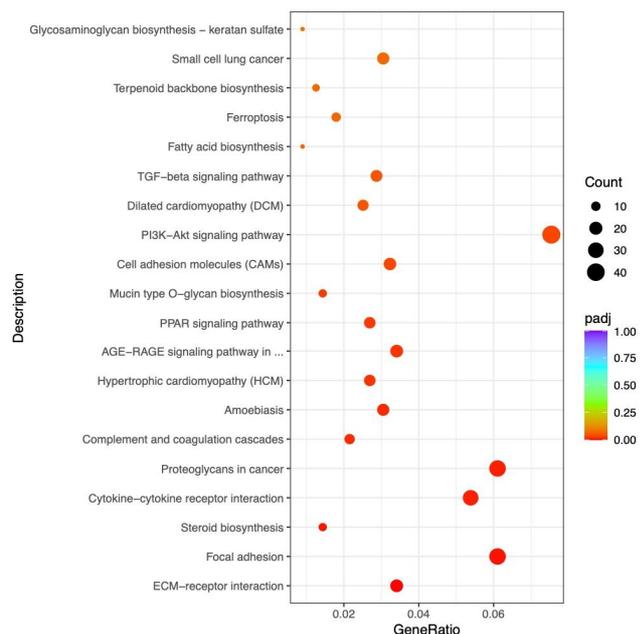


図4: *Kras*変異により発現が増加する因子のKEGGパスウェイ解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 梶野 リエ
2. 発表標題 Exploring therapeutic targets for colorectal cancer using synthetic lethality of MyD88 loss and Wnt pathway mutations
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梶野 リエ
2. 発表標題 Mechanism of synthetic lethality induced by MyD88 loss in intestinal tumor cells with Wnt pathway mutations
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（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
研究分担者	青木 正博  (Aoki Masahiro)  (60362464)	愛知県がんセンター（研究所）・がん病態生理学分野・副所長兼分野長   (83901)	

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