

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591974

研究課題名(和文)大腸癌におけるKRAS遺伝子変異を介した糖代謝およびFDG集積機構の解析

研究課題名(英文)FDG accumulation related to KRAS oncogene

研究代表者

長谷川 傑 (HASEGAWA, Suguru)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10362500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：FDG-PET検査は糖代謝の亢進を定量化し画像化する癌診断法として、大腸癌を始めとした種々の癌において用いられている。癌におけるKRAS遺伝子変異は糖代謝に関与することが分子レベルで近年報告されており、実際に大腸癌手術の切除標本を使用した検討でKRAS遺伝子変異はグルコース・トランスポーターの発現を介してFDG集積に有意に関与していた。FDG-PET検査はKRAS遺伝子変異の有無を予測することで、大腸癌における分子標的治療薬である抗EGFR抗体の適応の有無を判断し大腸癌治療に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：KRAS gene mutations occur in approximately 40 % of colorectal cancers (CRCs) and are associated with resistance to anti-EGFR antibody therapy. We demonstrated FDG accumulation in positron emission tomography (PET) was significantly higher in CRCs with mutated KRAS than in those with wild-type KRAS in a clinical setting. Moreover, using paired isogenic human CRC cell lines that differ only in the mutational status of KRAS gene, we demonstrated that mutated KRAS caused higher FDG accumulation possibly by up-regulation of GLUT1; moreover, HIF-1 additively increased FDG accumulation in hypoxic lesions. FDG-PET might be useful for predicting the KRAS status noninvasively.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 FDG-PET検査 KRAS遺伝子 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

1) FDG-PET 検査は糖代謝の亢進を定量化し画像化する癌診断法として、大腸癌を始めとした種々の癌において全身検索や再発診断、さらには治療効果判定などに用いられている。

2) 一般的に腫瘍細胞では糖代謝が亢進しており、多くの癌腫において癌細胞への FDG 集積に関わる重要な因子は、グルコース・トランスポーターである GLUT1 (Glucose transporter 1) と、解糖系酵素のヘキソキナーゼ-II (HK-II : hexokinase type-II) の 2 つであると報告されている。大腸癌においては特に GLUT1 の役割が大きいという報告が多い。

3) KRAS 遺伝子変異は肺癌、大腸癌、膵臓癌など多くの癌腫で認められ、癌の悪性化において重要な役割をもっている。また大腸癌の分子標的治療薬である上皮成長因子受容体のモノクローナル抗体 (抗 EGFR 抗体: Cetuximab および Panitumumab) は現在最も注目されている抗癌剤であるが、両薬剤とも KRAS 遺伝子変異がない大腸癌症例でのみ治療効果を発揮することが複数の臨床試験から明らかとなったことより両薬剤の使用に先立ち KRAS 遺伝子変異の検討を行うことが推奨され 2010 年より KRAS 遺伝子変異検査は保険適応となった。しかしながら遺伝子検査には腫瘍病巣の生検もしくは手術での摘出といった侵襲的処置が不可欠であり、とくに転移巣の場合は生検することが手技的にも困難であることが多い。

4) 2009 年に Johns Hopkins 大学より大腸癌における KRAS/BRAF 遺伝子変異は GLUT1 の発現を増加し糖代謝が亢進することが細胞株を使った実験により報告された (*Science* 325:1555-1559, 2009)。さらに近年では種々の癌において KRAS 遺伝子変異は糖代謝をはじめとしたエネルギー代謝経路に関与することが分子レベルで明らかとなってきた。

2. 研究の目的

FDG-PET 検査において腫瘍部への FDG 集積に関わる最も重要な因子は GLUT1 であることから、本研究では KRAS 遺伝子変異と糖代謝および FDG 集積との関連についてその機序を解析するとともに、実地臨床の FDG-PET 検査において大腸癌への FDG 集積程度を定量的に評価することで KRAS 遺伝子変異の有無を予測し大腸癌治療に応用できるか検討することを目的とする。

KRAS 遺伝子変異検査ではパラフィン切片からの DNA 抽出が必要なため、原発巣および転移巣からの生検または手術での腫瘍摘出といった侵襲的処置が必須であり、また腫瘍の

heterogeneity という性質上から精度面での限界がある。もし FDG-PET 検査という非侵襲的検査で簡便に KRAS 遺伝子変異の有無が予測することができ、また腫瘍全体を包括的に評価することで抗 EGFR 抗体の治療効果をより正確に治療開始前に予測できたら実地臨床での有用性は高い。

3. 研究の方法

(1) 京大病院で 2009/4~2010/9 までに大腸癌原発巣に対して手術を行った症例のうち、術前に FDG-PET 検査をうけた 51 症例に注目し、大腸癌原発巣への FDG 集積程度を SUV 値 (standardized uptake value) を用いて定量的に評価する。

(2) これらの切除標本のパラフィン標本より各原発巣における DNA を抽出し、KRAS および BRAF の遺伝子変異の有無をダイレクトシークエンス法にて検討する。KRAS/BRAF 遺伝子については変異群と野生群の 2 群にわけ、それぞれの群の SUV 値とあわせることで両者の間に相関性があるかどうか検討する。

(3) FDG 集積に関与する因子と考えられている GLUT1 および HK-II については免疫組織染色法にて定量的に評価し、KRAS/BRAF 遺伝子変異や SUV 値との間に相関性があるかを検討する。

(4) 大腸癌細胞株を使って KRAS 遺伝子変異と FDG 集積との関連性についての分子生物学的機序についての検討を行なう。KRAS 遺伝子変異のある大腸癌細胞株 HCT116 と、HCT116 に対し相同遺伝子組替えにて KRAS 遺伝子を野生型に戻した細胞株 HKe-3、HKh-2 を樹立した。

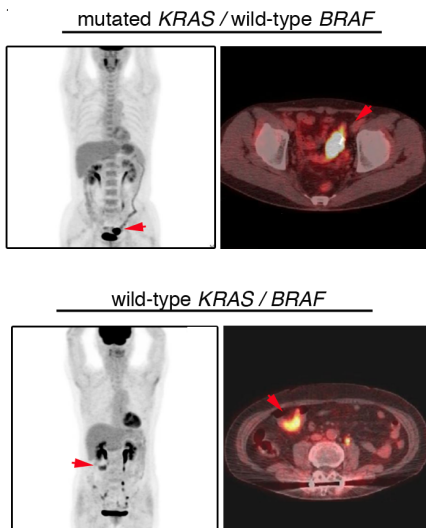
(5) 上述の大腸癌細胞株を用いて、in vitro 実験で FDG 集積量を測定する。また siRNA 法にて KRAS 遺伝子、GLUT1、HK-II それぞれの発現を抑制した場合の FDG 集積量にどのような変化が生じるかを検討する。また細胞株への FDG 集積量が通常酸素条件 (20%) と低酸素条件 (1%) でどのように変化するかもあわせて調べることで、HIF-1 α (Hypoxia inducible factor) の影響についても検討する。

(6) 上述の大腸癌細胞株をマウスに接種し腫瘍を形成させてのち、小動物用 PET 機器を用いて in vivo における FDG 集積についても評価する。さらに腫瘍の切除標本のパラフィン標本を使って GLUT1、HK-II、HIF-1 α などについては免疫組織染色法にて評価する。

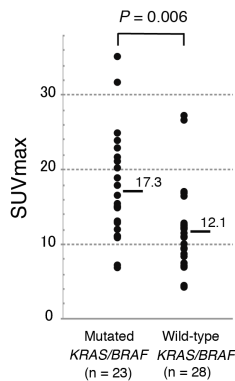
4. 研究成果

(1) 遺伝子検査の結果、KRAS 遺伝子についてはコドン 12 に変異を認められたのが 19 例 (37%)、コドン 13 に変異を認められたのが 3 例 (6%)、BRAF 遺伝子について変異を認められたのは 1 例 (2%) であった。一方、KRAS および BRAF 遺伝子のいずれにも変異を認めなかったのは 28 例 (55%) であった。

KRAS/BRAF 遺伝子解析の結果に基づき、いずれの遺伝子も変異を認めなかった群 (wild-type KRAS/BRAF 群: n=28) と、どちらかの遺伝子に変異を認められた群 (mutated KRAS/BRAF 群: n=23) の 2 群にわけて、臨床病理学的因子とのあいだの相関性について単変量解析を行なった。年齢、性別、検査前血糖値、検査前 CRP 値、腫瘍マーカー、腫瘍の深達度、リンパ節転移、遠隔転移、臨床病期 (Stage)、病理学的組織型、血管侵襲、リンパ管侵襲、腫瘍最大径らの因子については 2 群間に有意な差は認められなかったが、原発巣への FDG 集積に関しては wild-type KRAS/BRAF 群に比べ mutated KRAS/BRAF 群では有意に高いことが分かった。



すなわち、SUVmax では wild-type KRAS/BRAF 群が 12.1 ± 5.7 なのに対し、mutated KRAS/BRAF 群では 17.3 ± 7.1 であった ($P = 0.006$)。また単変量解析で P 値が 0.25 以下であった因子による多変量解析でも、原発巣への FDG 集積 (SUVmax) は KRAS/BRAF 遺伝子変異と有意な相関性があることがわかった。

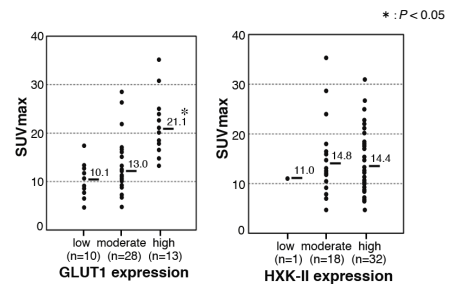


FDG 集積程度により KRAS/BRAF 遺伝子変異の有無を予測できないか、ROC 解析 (Receiver

operating characteristic) を行なったところ、SUVmax の cut-off 値を 13 もしくは 14 で分けた場合には 75% の精度で KRAS/BRAF 遺伝子変異の有無を予測できることが分かった。例えば、cut-off 値を 13 とした場合には、KRAS/BRAF 遺伝子変異の感度 (sensitivity) は 74%、特異度 (specificity) は 75%、正確度 (accuracy) は 75% であった (下記表参照)。

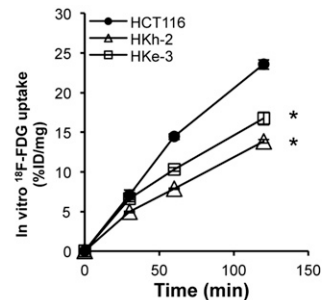
Threshold	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
SUVmax			
13	74	75	75
14	65	82	75

GLUT1 および HXK-II の発現については、免疫組織染色にて腫瘍細胞の発現陽性割合により 3 群 (low, moderate, high) に分けて検討したところ、GLUT1 の発現は SUVmax と有意な相関性を示したが、HXK-II に関しては SUVmax と相関性は認めなかった。

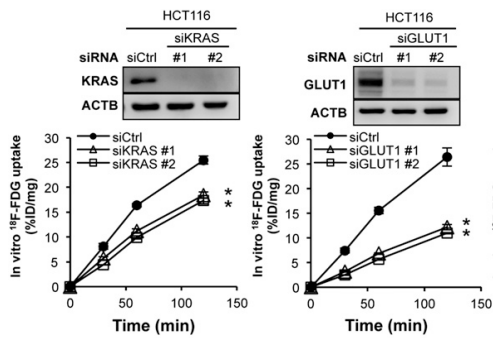


さらに KRAS/BRAF 遺伝子変異と GLUT1 の間にも有意な相関性が認められたが ($P < 0.001$; a chi-square test)、KRAS/BRAF 遺伝子変異と HXK-II の間には相関性は認められなかった ($P = 0.80$; a chi-square test)。

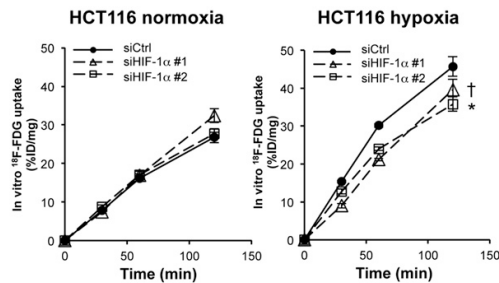
(2) 大腸癌細胞株 HCT116 (KRAS 遺伝子変異あり) と、HKe-3、HKh-2 (KRAS 遺伝子変異なし) における細胞内への FDG 集積量を定量カウントして検討したところ、HCT116 は他の 2 株に比べ有意に高いことが分かった。



さらに siRNA 法にて KRAS, GLUT1, HXK-II それぞれの発現を抑制した場合で検討したところ、KRAS, GLUT1 を抑制した場合は有意な差を持って大きく FDG 集積が減弱するのに対し、HXK-II の場合はあまり変化を認めなかった。

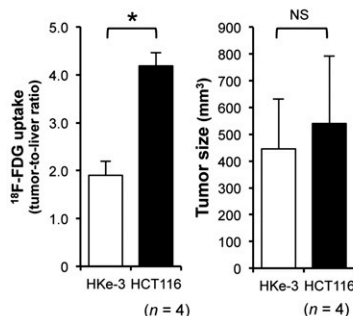
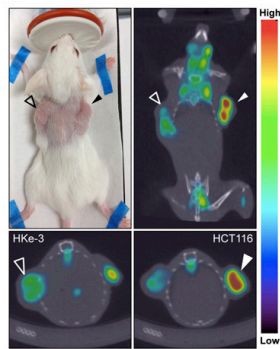


さらに通常酸素条件下と低酸素条件下での比較では、低酸素条件下ではFDG集積が有意に増加することが確認された。さらに、この低酸素下にて増加したFDG取り込みはsiRNA法でHIF-1 α をノックダウンすると有意に減弱することが分かった。以上の結果は、KRAS遺伝子変異におけるFDG集積亢進における低酸素条件やHIF-1 α の関与を示している。

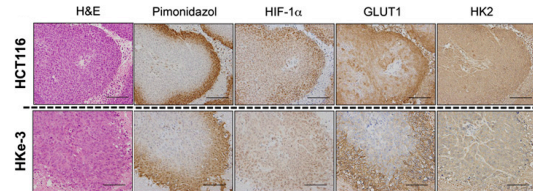


最後にヌードマウスの背中右側にHCT116を、左側にHKe-3を接種して腫瘍を形成させてのちPET検査を行なった。

腫瘍サイズにおいては差を認めなかったにもかかわらず、腫瘍部へのFDG集積程度(SUVmax)はHCT116の方が有意に高いことが確認された。



腫瘍組織の免疫染色の結果は、HCT116とHKe-3はほぼ同様の腫瘍組織であり、低酸素マーカー(Pimonidazol)と一致するようにHIF-1 α が発現していた。重要なことに、GLUT1はそれらとほぼ同様の発現分布パターンであるのに対しHK2-IIは一致しておらず、またHCT116のほうがHKe-3に比べHIF-1 α 、GLUT1の染色強度が強いという結果であった。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

① Kawada K, Nakamoto Y, Kawada M, Hida K, Matsumoto T, Murakami T, Hasegawa S, Togashi K, Sakai Y. Relationship between ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose accumulation and KRAS/BRAF mutations in colorectal cancer Clin Cancer Res. 18(6):1696-703. 2012. 査読有り、doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1909.

② Iwamoto M, Kawada K, Nakamoto Y, Itatani Y, Inamoto S, Toda K, Kimura H, Sasazuki T, Shirasawa S, Okuyama H, Inoue M, Hasegawa S, Togashi K, Sakai Y. Regulation of ¹⁸F-fluorodeoxyglucose Accumulation in Colorectal Cancer Cells with Mutated KRAS J Nucl Med. 55(12):2038-44. 2014. 査読あり doi: 10.2967/jnumed.114.142927.

③ 河田健二、中本裕士、長谷川傑、岩本哲好、坂井義治。消化器癌におけるFDG-PETイメージング G. I. Research, 第 22 巻, 第 1 号, 64-71, 2014 年. 査読無し

[学会発表](計 2 件)

① Iwamoto M, Kawada K, Nakamoto Y, Hasegawa S, Togashi K, Sakai Y. Regulation of ¹⁸F-FDG Accumulation in Colorectal Cancer Cells with Mutated KRAS. The American Society of Colon & Rectal Surgeons. 2014/5/17-21, Florida, USA.

②河田健二、中本裕士、長谷川傑、岩本哲好、坂井義治。
大腸癌における KRAS 遺伝子変異と FDG 集積
第 79 回大腸癌研究会. 2013/10/5. 大阪

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

「大腸癌における FDG-PET 検査での FDG 集積と KRAS/BRAF 遺伝子変異との相関性について」「大腸癌遠隔転移巣における FDG-PET/CT 検査での FDG 集積と KRAS 遺伝子変異との相関性について」として京都大学医学部の倫理委員会の承認を受けており、京都大学医学部消化管外科のホームページにも公表している。

<http://gisurg.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 傑 (HASEGAWA SUGURU)
京都大学・大学院医学研究科. 講師
研究者番号：10362500

(2) 研究分担者

河田 健二 (KAWADA KENJI)
京都大学・大学院医学研究科. 講師
研究者番号：90322651

(3) 連携研究者 なし