

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19918

研究課題名(和文) アミノ酸代謝に着目した新規大腸癌治療法の開発

研究課題名(英文) Novel treatment strategy based on amino acid metabolism of colorectal cancer

研究代表者

岩本 哲好 (IWAMOTO, Masayoshi)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80769422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はKRAS遺伝子変異による大腸癌の代謝変化に着目し新規治療の開発を目的とする。大腸癌細胞株をもちいたメタボローム解析により、KRAS遺伝子変異はアミノ酸代謝変化、とくにグルタミン-アスパラギン酸代謝と関連することがわかり、アスパラギン合成酵素(ASNS)およびアミノ酸・トランスポーターであるASCT2(SLC1A5)の2つが治療ターゲットとして見いだされた。代謝阻害剤を用いた検討から、ASNSの発現を抑制するmTOR阻害剤(Rapamycin)と血清のアスパラギンを阻害するL-Asparaginaseの併用療法は新規治療法になり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A number of studies have shown that KRAS mutations in colorectal cancer (CRC) result in the lack of response to anti-EGFR-based therapy. Using CE/MS metabolomic analysis, We found that KRAS mutation in CRC caused alteration in amino acid metabolism. We demonstrated that the expression of asparagine synthetase (ASNS), an enzyme that synthesizes asparagine from aspartate, was upregulated by mutated KRAS. Importantly, we demonstrated that KRAS-mutant CRC cells could become adaptive to glutamine depletion through asparagine biosynthesis by ASNS, and that asparagine addition could rescue the inhibited growth and viability of cells grown under the glutamine-free condition in vitro. Combination of L-asparaginase plus rapamycin markedly suppressed the growth of KRAS-mutant CRC xenografts in vivo, ASNS might be a novel therapeutic target against CRCs with mutated KRAS.

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

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 分子標的治療薬である上皮成長因子受容体 (EGFR) のモノクローナル抗体 (Cetuximab および Panitumumab) は治療切除不能な進行・再発大腸癌の生存期間延長に寄与することから現在最も注目されている抗癌剤であるが、複数の大規模臨床試験の結果、その効果は *KRAS* 野生型の大腸癌 (約 5~6 割) に対してのみ認められることが明らかとなった。一方で *KRAS* 遺伝子に変異を有する大腸癌 (約 4~5 割) に対しては特異的な治療法は未だ見つかっておらず、現状の大腸癌治療において重要な課題となっている。

(2) 2013 年にダナ・ファーマー癌研究所から、マウス腭癌細胞株を用いたメタボローム解析の結果、*KRAS* 遺伝子変異がグルタミン-アスパラギン酸代謝を利用して細胞の酸化還元状態を維持し、その代謝因子を阻害するとマウスモデルにおいて腫瘍の増殖が著明に抑制されることが *Nature* 誌に報告された (Son J, et al. *Nature* 2013;496:101-5)。 *KRAS* 遺伝子変異とグルタミン-アスパラギン酸代謝の関連を初めて示したこの結果がヒト癌で当てはまるかについては、大腸癌はおろか膵臓癌でも未だ報告がない。

(3) 癌の個別化医療実現には癌細胞の初代培養が有望な方法と考えられ古くから研究が進められてきたが、未だ初代培養技術は確立されていない。そんな中、近年報告された患者腫瘍組織から作成したスフェロイド培養法は基礎研究と臨床研究との橋渡しをする手法として注目されている。スフェロイド培養法の利点としては、切除標本と比較して純粋な癌細胞集団である点、細胞株と比較して 3 次元構造を保っている点、個々の患者自身の癌から樹立されたものである点 (オーダーメイド) にある。また、患者検体から樹立した PDX (patient-derived xenograft) は、従来の癌細胞株を用いた異種移植片と比較し個々の患者の腫瘍組織に近い遺伝子発現、組織学的特徴を維持しており、薬剤感受性試験などの個別化医療における革新的手法として近年注目されている。

2. 研究の目的

KRAS 遺伝子は大腸癌における抗 EGFR 抗体治療のさいのバイオマーカーであるが、*KRAS* 変異型大腸癌では抗 EGFR 抗体治療が無効であり治療方針の選択に苦慮する。本研究では、*KRAS* 変異型大腸癌に特異的なグルタミン-アスパラギン酸代謝に着目し、*KRAS* 変異型大腸癌に対する新規の治療ターゲットになりうるかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *KRAS* 遺伝子変異を相同組換え法により野生型に戻した 2 種類の大腸癌細胞株 (HCT116, DLD-1) を用いたメタボロミクス解析を行って、*KRAS* 遺伝子変異のある大腸癌に特異的な代謝経路についての包括的スクリーニングを行う。

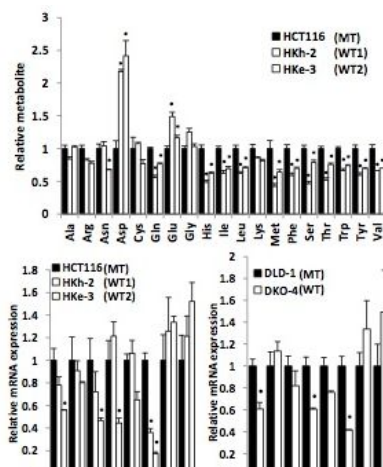
(2) 上記スクリーニングにより検出されたグルタミン-アスパラギン酸代謝関連因子について、大腸癌細胞株に強制発現させたり siRNA 法にて発現抑制させることで、大腸癌細胞のエネルギー代謝がどのように変化するか、また増殖・転移といった癌悪性化にどのように関与するかを *invitro* および *in vivo* 実験で明らかにする。

(3) 手術で摘出した大腸癌組織からスフェロイド培養法を行い、*KRAS* 変異型、野生型のスフェロイドについてメタボローム解析を行い比較することで *KRAS* 変異型大腸癌に特異的な代謝経路を ASNS を含め検討する。さらにその代謝経路が *KRAS* 変異型大腸癌に対する新規治療ターゲットになりうるかを、スフェロイド培養から PDX モデル (*in vivo*) で検証する。

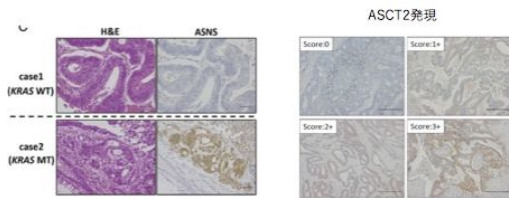
4. 研究成果

(1) 今回の我々の大腸癌細胞株 (HCT116, DLD-1) を用いたメタボローム解析では、*KRAS* 変異は従来報告されてきたような解糖系、PPP (ペントースリン酸系) との関連は明らかではなく、アミノ酸代謝との関連が強く認められた。

アミノ酸の中でも特にアスパラギン酸 (Asp) の発現は *KRAS* 変異型で著しく低下していたため、我々はグルタミン-アスパラギン酸代謝に着目し、Asp の生成に関与する各種酵素の発現をスクリーニングしたところ、アスパラギン合成酵素 (ASNS: Asparagine synthetase) およびアミノ酸・トランスポーターである ASCT2 (*SLC1A5*) の発現が増加していることを見出した。



つぎに臨床検体を用いて、93例の大腸癌原発巣をアスパラギン合成酵素(ASNS)およびASCT2(*SLC1A5*)の発現程度を免疫組織染色で検討した。

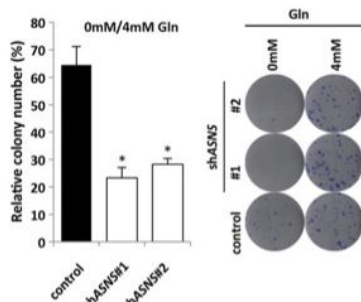


ASNSの発現は、高発現(46例)と低発現(47例)の2群に分類され、KRAS変異型では野生型と比較してASNSの発現が有意に高いことが分かった(74.3% vs 31.5%; $P < 0.01$)。

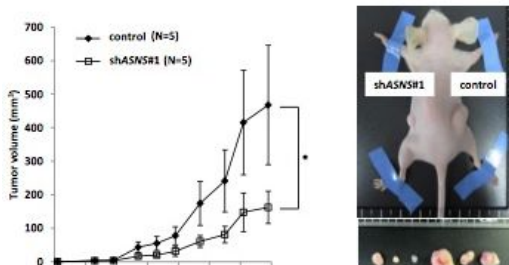
ASCT2(*SLC1A5*)の発現も同様に、KRAS変異型では野生型と比較して有意に高いことが分かった(43.6% vs 24.1%; $P = 0.04$)。

(2) つぎにASNSおよびASCT2(*SLC1A5*)がKRAS遺伝子変異型大腸癌に対する新規治療法のターゲットになりえるかを検討するため、shRNA法によりそれぞれの発現抑制株を樹立した。

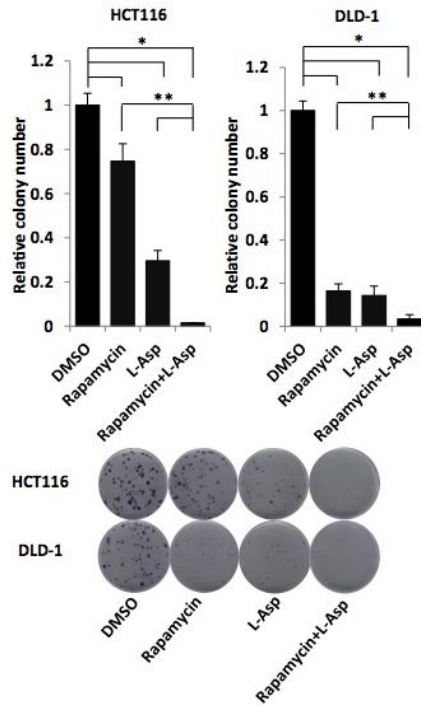
shRNA法によりASNSの発現抑制させた株を樹立し細胞増殖を比較したが、グルタミンが十分にある環境下では差を認めなかった。しかしながら、培地中のグルタミンを欠乏させたところ、ASNS抑制株は著明に増殖が抑制された。



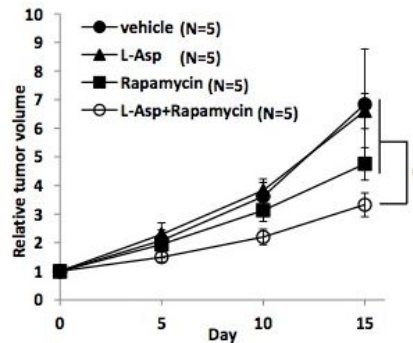
さらにマウスの皮下腫瘍モデルでもASNS knockdown株の腫瘍増殖はcontrolに比べ有意に抑制された。



つぎに代謝阻害剤を用いた検討を行うこととした。アスパラギン代謝を阻害するためにはASNSで細胞内で合成されるアスパラギンと、血清から細胞内に取り込まれるアスパラギンの両者を阻害する必要がある。ASNSの発現がmTOR阻害剤(Rapamycin)により阻害されることから、Rapamycinと血清のアスパラギンを阻害するL-Asparaginaseの併用療法の可能性について検討した。

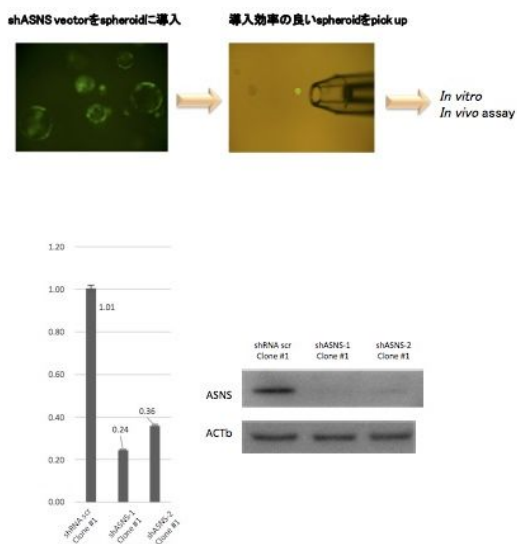


さらにin vivoモデルとして、HCT116細胞を免疫不全マウスに接種し皮下腫瘍が一定のサイズになったところで薬剤を投与したところ、L-AsparaginaseとRapamycinの併用群はそれぞれ単剤投与と比して有意に腫瘍の増殖を抑制した。

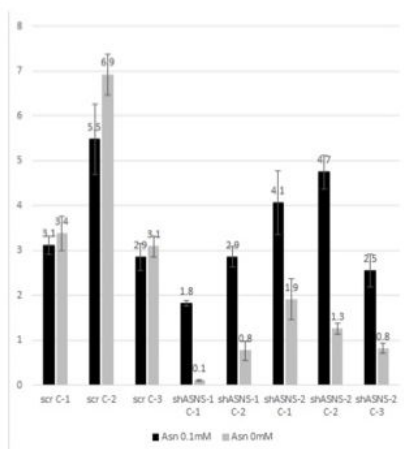


(3)すでに当科では手術で摘出した大腸癌組織からスフェロイド培養法を行い、100以上の株を樹立した。それらのスフェロイド細胞にASNSをノックダウンさせるshRNA

ベクターを導入し数種類の安定 knockdown 株を樹立させた。



In vitro における細胞増殖能は、培養液中のアスパラギン濃度が低くすると ASNS ノックダウン株ではコントロール株に比べ有意に抑制されることを見出した。



今後はさらに ASNS ノックダウン株を免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) の皮下に注射することで PDX モデルを作成し、コントロールと比較し腫瘍径の変化を経時的に測定することを予定している。さらに、スフェロイド細胞にルシフェラーゼ酵素遺伝子を導入し、同所性移植を行いリアルタイム *in vivo* イメージングシステムを用いて薬剤による転移能 (肝、肺、リンパ節) の変化について検討する予定である。

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 2 件)
Toda K, Kawada K, Iwamoto M, Inamoto S, Sasazuki T, Shirasawa S, Hasegawa S, Sakai Y.
“Metabolic alterations caused by KRAS mutations in colorectal cancer contribute to cell adaptation to glutamine-depletion by upregulation of asparagine synthetase”
Neoplasia.18.2016.654-665. 査読有り.
doi: 10.1016/j.neo.2016.09.004.

Toda K, Nishikawa G, Iwamoto M, Itatani Y, Takahashi R, Sakai Y, Kawada K.
“Clinical Role of ASCT2 (SLC1A5) in KRAS-Mutated Colorectal Cancer”
Int J Mol Sci.2017;18(8).pii:E1632. 査読有り.
doi: 10.3390/ijms18081632.

[学会発表] (計 1 件)

戸田孝祐、河田健二、中本裕士、岩本哲好、長谷川傑、坂井義治
“大腸癌遠隔転移巣における FDG-PET/CT 検査と KRAS 遺伝子変異” 第 116 回日本外科学会学術集会 (平成 28 年 4 月 16 日、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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 哲好 (IWAMOTO, Masayoshi)
京都大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号：80769422

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

河田 健二 (KAWADA, Kenji)
京都大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号：90322651