

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：83901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20952

研究課題名（和文）大腸癌のがん微小環境を模倣した3D培養系による新規KRAS阻害剤耐性機序の解明

研究課題名（英文）3D cell culture system recapitulating tumor microenvironment of colorectal cancer to elucidate resistant mechanism in new KRAS inhibitors

研究代表者

新津 宏明（Niitsu, Hiroaki）

愛知県がんセンター（研究所）・がん標的治療TR分野・主任研究員

研究者番号：60964335

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：変異KRAS蛋白質を標的とした治療薬は、ここ数年急速に進んでいる。一方で、大腸癌においてその治療効果はまだ十分ではなく、薬剤耐性克服が急務である。本研究では、3Dコラーゲン培養を用いて、より生理的な培養環境におけるKRAS阻害薬の効果ならびに薬剤耐性について検討を行なった。2D培養比べ、3D培養ではKRAS阻害薬の効果が高いことが示され、3D培養下でKRAS阻害薬長期暴露による耐性株の樹立に成功した。今後、このKRAS阻害薬耐性株における、詳細な薬剤耐性機序を解明し、臨床に即した耐性機序の克服につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KRAS阻害薬については、2D培養で中等度の感受性を示した大腸癌細胞株でも、3D培養では感受性が高いものも存在していた。したがって、2D培養で検討される薬剤感受性や耐性が、実際の人体で起こるものと同様かには疑問の余地があることが、本研究により改めて示唆された。また、より生理的環境に近い3D培養下でのKRAS阻害薬耐性株を樹立することができ、これらの細胞株を、より詳細に分子生物学的に解析することにより、実臨床で問題となる薬剤耐性、とくに獲得耐性について、そのメカニズム解明や耐性克服につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Molecularly-targeted agents against mutant KRAS is being developed in recent years. However, the efficacy of these drugs in colorectal cancers is unsatisfactory, and, therefore, resistance to the drugs need to be overcome. We utilized three-dimensional (3D) cell culture system in collagen gel to study the response and the resistance mechanism to the drugs. KRAS inhibitors were more effective in 3D culture over 2D. We also successfully established resistant clones to KRAS inhibitor in 3D culture. Investigating the mechanism of drug resistance in our KRAS inhibitor-resistant cells might be helpful to overcome the resistant mechanism of KRAS inhibitor in the clinical practice.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 3D培養 KRAS阻害薬

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の 40～50%を占める *KRAS* 遺伝子変異大腸癌には、抗 EGFR 抗体薬が無効であり、*KRAS* 遺伝子変異検査は、遺伝子変異陰性を確認することで、抗 EGFR 抗体薬の使用基準として活用されてきた。一方、変異 *KRAS* 蛋白質自体を標的とした治療薬は、長らく開発困難であったが、ここ数年、*KRAS*-G12C 阻害剤 (ソトラシブ、アダグラシブ) をはじめとした *KRAS* 阻害剤の開発が進み、多くの臨床試験が進行している。しかし、臨床試験の解析から、*KRAS*-G12C 阻害剤投与後の、2 次性遺伝子変異による耐性獲得も報告されている (Zhao Y, et al Nature 2021, Awad MM, et al NEJM 2021)。その研究モデルとして、がん細胞株を用いた *KRAS* 阻害剤耐性クローン作製が試みられてきたが、従来の二次元細胞培養 (2D 培養) では、2 次性遺伝子変異による *KRAS* 阻害剤耐性は再現できていない。治療成績向上のためには、臨床上の獲得耐性を模倣するモデルが必要であるが、どのようなモデルでそれが実現できるかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

従来、新規薬剤の有効性検証は、がん細胞株を用いた 2D 培養で行われてきた。しかし、メカニカルストレス、細胞間および細胞-細胞外マトリックス (ECM) 間相互作用、細胞分化、薬剤代謝・感受性などの点で、2D 培養は必ずしも生体内環境を模倣していない。そのため、近年、よりがん微小環境に近い 3D 培養に期待が寄せられている。実際に、*KRAS*^{G12C} 遺伝子変異肺がん細胞株において、*KRAS*-G12C 阻害剤 ARS-1620 の感受性が、通常の 2D 培養に比べ、ultra-low adherent 3D スフェロイド培養で 5～20 倍高いことが報告されている (Jane MR, et al. Cell 2018)。大腸癌でも同様に、新規 *KRAS* 阻害薬が、3D 培養より 2D 培養で高い薬剤感受性を示すことが考えられる。さらにこのような培養環境下で、薬剤を長期投与した際の耐性機序がどのようなものであるかについても明らかにする必要がある。そこで、本研究は、3D コラーゲン培養を用い、2D 培養との感受性を比較し、3D 培養で感受性をきたす細胞株を用いた薬剤長期暴露による薬剤耐性クローンの樹立、そしてその薬剤耐性メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

2D 培養は、細胞培養用プラスチックディッシュ上に細胞懸濁液を播種し、接着培養を行なった。細胞培養用培地として、10% 仔牛血清含の RPMI1640 培地を用い、培地交換は 3 日毎に行なった。3D 培養では、大腸癌細胞株の培養懸濁液を、氷上でアテロコラーゲンと混和し、12 ないしは 24 ウエルプレートに分注、さらに 37℃ 5%CO₂ の細胞培養器内に 30～60 分静置して、コラーゲン内に包埋した。この上に、2D 培養と同じ 10% 仔牛血清含の RPMI1640 培地をコラーゲングル上に重層し、培養した。なお培養液は 3 日毎に交換した。コラーゲン内で培養した大腸癌細胞株は、十分量増殖した段階で、II 型コラゲナーゼ (1mg/ml) でコラーゲンを分解したのち、遠心分離で細胞を収集し、前述と同様の手順でコラーゲン内に包埋し、継代培養を行なった。

これらの培養条件において、新規 *KRAS* 阻害薬であるソトラシブ (*KRAS* G12C 阻害薬) および MRTX1133 (*KRAS* G12D 阻害薬) について、2D 培養および 3D 培養での薬剤感受性が異なるかについて、調査した。前臨床試験で、ソトラシブ投与後に EGFR の再活性化による MAPK-ERK 経路の再活性化が指摘されていたこと、また EGFR 抗体薬投与によりこれらの再活性化が減弱することから、この EGFR 再活性化以外の薬剤耐性メカニズムを検討する目的で、3D における新規 *KRAS* 阻害薬投与には抗 EGFR 抗体薬であるセツキシマブを併用 (10 μg/ml) とした。薬剤感受性については、2D 培養では細胞継代 24 時間後より、それぞれの薬剤に 3 日間暴露し、速やかに CCK-8 による細胞増殖アッセイを行い、非治療群との割合を算出した。また 3D 培養では、細胞継代 24 時間後より、それぞれの薬剤に 6 日間暴露し、同様に CCK-8 による細胞増殖アッセイを行なった。

さらに、3D 培養において感受性を示した細胞株について *KRAS* 阻害薬および抗 EGFR 抗体薬を低濃度から高濃度へ徐々に薬剤投与量を上げながら長駆暴露を行い、薬剤耐性株を樹立した。さらに、その薬剤耐性機序について、分子生物学的な検討を行なった

4. 研究成果

1) 2D 培養下における大腸癌細胞株のソトラシブおよび MRTX1133 への感受性
KRAS G12C 変異大腸癌細胞株 6 株、および *KRAS*G12D 変異大腸癌細胞株 9 株を 2D 培養条件で培養し、それぞれ *KRAS* G12C 阻害薬であるソトラシブ、*KRAS*G12D 阻害薬である MRTX1133 に暴露し、その用量反応曲線によって感受性を検討した。*KRAS* G12D 変異細胞株では 7 株が MRTX1133 に感受性を示したのに対して、*KRAS* G12C 変異細胞株では 5 株 ソトラシブに抵抗性ないしは非感受性を示した。また遺伝子改変マウスより樹立した *KRAS* G12C 変異型大腸癌細胞株 (CKPS-G12C 細胞株) においても、2D 培養下でソトラシブ抵抗性が認められた。2D 培養で *KRAS* G12C 細胞株の

方がその阻害薬に抵抗性を示すことが多いこと、および KRAS G12C 阻害薬の臨床使用が進んでいることから、以後の検討は KRAS G12C に着目して行うこととした。

2) 3D 培養下における KRAS G12C 変異型大腸癌細胞株のソトラシブ/セツキシマブ併用療法への感受性

KRAS G12C 変異大腸癌細胞株のうち、ソトラシブに抵抗性をしめした SW837、SNU1411、CKPS-G12C 細胞株について 3D 培養下の薬剤感受性を、2D 培養と比較したところ、3 株全てにおいて、3D 培養条件の方で、より感受性が高かった。一方で、2D 培養下で、ソトラシブ感受性をしめした RW7213 細胞株については、3D 培養下で薬剤感受性を検討したが、2D・3D 培養共に良好な薬剤感受性であったため、それらの差異は認めなかった。これらの結果から、2D 培養で抵抗性を示しているも、3D 培養では感受性を示すため、実際の整理環境に近いモデル確立の必要性が示唆された。

3) SW837 および SNU1411 細胞株にソトラシブ/セツキシマブを長期暴露による耐性クローンの樹立

SW837 および SNU1411 に、ソトラシブ 1ng/ml より 1000ng/ml まで漸増しながら長期暴露(セツキシマブは 10 µg/ml で固定)を行い、ソトラシブ/セツキシマブ併用療法耐性クローンの樹立を目指した。6 ヶ月を要したが、SW837 については薬剤耐性クローンを得ることができた。SNU1411 については、暴露濃度上昇中に増殖が緩徐となり、増殖不能となったため耐性クローンの獲得は不能であった。得られた SW837 細胞株の薬剤耐性クローンについては、3D 培養下、ならびに 2D 培養下に戻した条件で、それぞれソトラシブ+セツキシマブの感受性を検討したが、いずれも親株に対して十分な薬剤耐性を認めた。この耐性クローンについて、3D 培養下で、KRAS 下流のシグナルのいくつかを調べたところ、ソトラシブ+セツキシマブ投与下でも十分な抑制がかかっていないものが存在した。上流の調節機能の活性化も検討するために、いくつかのシグナル関連分子を検討し、それらの発現上昇ないしは活性化を認めた。しかし、調べた限りではあるが、これらシグナル関連分子については、薬剤によるそれらの阻害によって耐性化の解除には至っておらず、今後は網羅的転写産物解析などによる耐性機序の解明を計画している。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 新津宏明、足立雄太、衣斐寛倫
2．発表標題 大腸がんにおけるMAPKシグナル異常と治療開発
3．学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
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
---------	---------