

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462057

研究課題名(和文) KRAS/BRAF変異大腸癌に対するマイクロRNAを利用した新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel microRNA-based therapy against KRAS/BRAF-mutant colorectal cancer

研究代表者

田澤 大 (TAZAWA, HIROSHI)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90415513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：KRAS/BRAF変異大腸癌は、抗癌剤に抵抗性を示し、高率に転移や再発を起こす予後不良な疾患である。KRAS/BRAF変異大腸癌はEGFRシグナルが恒常的に活性化しており、EGFRシグナルを強力に抑制する治療法の開発が重要である。本研究では、腫瘍融解アデノウイルス製剤がEGFRシグナルを抑制するマイクロRNAの活性化やアポトーシスやオートファジーに関連する細胞死の誘導を介してKRAS/BRAF変異大腸癌に対して強力に抗腫瘍効果を発揮する事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：KRAS/BRAF-mutant colorectal cancer is an intractable disease that frequently shows the refractory to chemotherapy, recurrence and metastatic progression. Since EGFR signaling pathway is constitutively activated in KRAS/BRAF-mutant colorectal cancer, the development of novel therapy for strongly suppressing EGFR signaling pathway is important issue. Here we show that oncolytic adenoviruses have profound antitumor effect through activation of EGFR-suppressive microRNA and induction of apoptosis- and autophagy-related cell death against KRAS/BRAF-mutant colorectal cancer.

研究分野：分子腫瘍学、遺伝子治療学

キーワード：マイクロRNA 大腸癌 KRAS BRAF EGFR

1. 研究開始当初の背景

KRAS/BRAF 変異大腸癌は、KRAS/BRAF 正常大腸癌に比べて抗癌剤に抵抗性を示し、高率に転移や再発を起こす予後不良な疾患である。そのため、KRAS/BRAF 変異の有無に応じた分子標的薬剤による個別化医療の開発が進められている。KRAS/BRAF 正常大腸癌は、抗上皮成長因子受容体 (EGFR) 抗体 (セツキシマブ、パニツムマブ) に感受性を示す一方、KRAS/BRAF 変異大腸癌は EGFR の下流にある RAS/RAF/MEK シグナルが恒常的に活性化しており、抗 EGFR 抗体に抵抗性を示す。また、BRAF 阻害剤は BRAF 変異メラノーマに治療効果を示すが、BRAF 変異大腸癌にほとんど治療効果を示さない事が報告されている。つまり、KRAS/BRAF 変異大腸癌に対する有効な治療法はいまだ確立していないのが現状である。

細胞内シグナルを強力に抑制する因子として、マイクロ RNA による調節機構が注目されている。腫瘍抑制遺伝子 p53 によって誘導されるマイクロ RNA-34 は、複数のターゲット遺伝子の抑制を介して癌細胞に細胞周期停止、アポトーシス、細胞老化を誘導する事が報告されており、次世代の抗癌治療として臨床応用が進められている。我々は、腫瘍特異的に増殖するアデノウイルス製剤テロメライン (開発コード: OBP-301) がマイクロ RNA-7 の誘導による EGFR の抑制を介して抗腫瘍効果を発揮する事を最近明らかにした。マイクロ RNA-7 は EGFR 以外に RAF、MEK などの EGFR 関連シグナルの複数の遺伝子を抑制する事が報告されており、p53 によって誘導されるマイクロ RNA-34 も EGFR を抑制する。つまり、EGFR シグナル抑制マイクロ RNA は KRAS/BRAF 変異大腸癌に対して強力な抗腫瘍効果を発揮する事が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、KRAS/BRAF 変異大腸癌の治療抵抗性における EGFR シグナルの活性化を検証し、EGFR シグナル抑制マイクロ RNA の誘導を利用した KRAS/BRAF 変異大腸癌に対する新規治療法の実現を行う事を目的とした。KRAS/BRAF 変異大腸癌の治療抵抗性に関与する EGFR シグナルの活性化や EGFR シグナル抑制マイクロ RNA の治療効果に関する分子基盤を得ることが期待される。

3. 研究の方法

(1) KRAS/BRAF 変異大腸癌における血清飢餓状態に対する抵抗性獲得の検討

KRAS 変異大腸癌細胞株 2 種類 (SW620、DLD1)、BRAF 変異大腸癌細胞株 2 種類 (HT29、RKO) を用いて、臨床で用いられる血管新生阻害剤に対する治療感受性を評価するために、血清飢餓状態で 48 時間培養した場合のアポトーシスやオートファジーに関連する細胞死の誘導能をウェスタンブロット法で

検討する。

(2) KRAS/BRAF 変異大腸癌に対する血清飢餓状態による EGFR シグナル活性化の検討

KRAS/BRAF 変異大腸癌細胞株 4 種類を用いて、血清飢餓状態で 48 時間培養した場合の EGFR や下流の Akt/Erk シグナルの活性化状態についてウェスタンブロット法で検討する。

(3) KRAS/BRAF 変異の異なる大腸癌に対する EGFR シグナル抑制マイクロ RNA を誘導する腫瘍融解アデノウイルス製剤の治療効果の検討

KRAS/BRAF の変異を持たない大腸癌細胞株 2 種類 (SW48、Colo320DM) を加えた KRAS/BRAF 変異の異なる大腸癌細胞株 6 種類を用いて、EGFR 抑制マイクロ RNA を誘導する腫瘍融解アデノウイルス製剤 OBP-301、OBP-702 の治療効果を XTT アッセイ法にて検証する。

(4) KRAS/BRAF 変異の異なる大腸癌に対する EGFR シグナル抑制マイクロ RNA を誘導する腫瘍融解アデノウイルス製剤の細胞死誘導能の検討

KRAS/BRAF 変異の異なる大腸癌細胞株 6 種類を用いて、EGFR 抑制マイクロ RNA を誘導する腫瘍融解アデノウイルス製剤 OBP-301、OBP-702 のアポトーシスやオートファジーに関連する細胞死の誘導能をウェスタンブロット法で検討する。

(5) KRAS/BRAF 変異の異なる大腸癌に対する EGFR シグナル抑制マイクロ RNA を誘導する腫瘍融解アデノウイルス製剤の EGFR シグナル抑制効果の検討

KRAS/BRAF 変異の異なる大腸癌細胞株 6 種類を用いて、EGFR 抑制マイクロ RNA を誘導する腫瘍融解アデノウイルス製剤 OBP-301、OBP-702 の感染による EGFR や下流の Akt/Erk シグナルの抑制効果についてウェスタンブロット法で検討する。

(6) KRAS/BRAF 変異の異なる大腸癌に対する EGFR シグナル抑制マイクロ RNA の治療効果の検討

KRAS/BRAF 変異の異なる大腸癌細胞株 6 種類を用いて、EGFR 抑制マイクロ RNA の発現誘導による治療効果について XTT アッセイ法で検討する。

4. 研究成果

(1) KRAS/BRAF 変異大腸癌における血清飢餓状態に対する抵抗性獲得の検討

血清飢餓状態の培養条件下で KRAS 変異大腸癌細胞株はアポトーシスやオートファジーの誘導を認めしたが、BRAF 変異大腸癌細胞株ではアポトーシスやオートファジーの誘導を認めなかった。

(2) KRAS/BRAF 変異大腸癌に対する血清飢餓状態による EGFR シグナル活性化の検討

血清飢餓状態の培養条件下で KRAS 変異大腸癌細胞株は、EGFR の発現や下流の Akt/Erk のリン酸化が著明に抑制されたのに対し、BRAF 変異大腸癌細胞株は EGFR の発現が上昇し、Akt/Erk のリン酸化も維持された。

(3) KRAS/BRAF 変異の異なる大腸癌に対する EGFR シグナル抑制マイクロ RNA を誘導する腫瘍融解アデノウイルス製剤の治療効果の検討

KRAS/BRAF 変異を持たない大腸癌細胞株と KRAS 変異大腸癌細胞株は、OBP-301 と OBP-702 の感染後 72 時間の生存率が著明に抑制され高感受性を示した。一方、BRAF 変異大腸癌細胞株は OBP-702 によって生存率が抑制され感受性を示したが、OBP-301 によって生存率があまり低下せずやや抵抗性であった。

(4) KRAS/BRAF 変異の異なる大腸癌に対する EGFR シグナル抑制マイクロ RNA を誘導する腫瘍融解アデノウイルス製剤の細胞死誘導能の検討

OBP-301 は、KRAS/BRAF 変異を持たない大腸癌細胞株と KRAS 変異大腸癌細胞株に対して濃度依存的にオートファジーを主体とする細胞死を誘導したが、BRAF 変異大腸癌細胞株に対してオートファジーを誘導しなかった。一方、OBP-702 は KRAS/BRAF 変異の異なる全ての大腸癌細胞株に対してアポトーシスとオートファジーに関連する細胞死を濃度依存的に誘導した。

(5) KRAS/BRAF 変異の異なる大腸癌に対する EGFR シグナル抑制マイクロ RNA を誘導する腫瘍融解アデノウイルス製剤の EGFR シグナル抑制効果の検討

OBP-301 は、KRAS/BRAF 変異を持たない大腸癌細胞株と KRAS 変異大腸癌細胞株における EGFR-KRAS-Erk シグナルの抑制を示したが、BRAF 変異大腸癌細胞株の EGFR-BRAF-Erk シグナルの抑制を示さなかった。一方、OBP-702 は KRAS/BRAF 変異の異なる全ての大腸癌細胞株において EGFR-KRAS/BRAF-Erk シグナルの抑制を示した。

(6) KRAS/BRAF 変異の異なる大腸癌に対する EGFR シグナル抑制マイクロ RNA の治療効果の検討

OBP-301 と OBP-702 が誘導する EGFR 抑制マイクロ RNA のマイクロ RNA-7 は KRAS 変異大腸癌細胞株の生存率を低下させ、OBP-702 が誘導する EGFR 抑制マイクロ RNA のマイクロ RNA-34 は BRAF 変異大腸癌細胞株の生存率を低下させた。

以上の結果から、KRAS/BRAF 変異大腸癌に対して腫瘍融解アデノウイルス製剤 OBP-301、OBP-702 は EGFR シグナル抑制マイクロ RNA の誘導を介して EGFR シグナルを強力に抑制して細胞死を誘導する新規治療法となる可能性が示唆された。

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 18 件)

Kikuchi S, Kishimoto H, Tazawa H, Hashimoto Y, Kuroda S, Nishizaki M, Nagasaka T, Shirakawa Y, Kagawa S, Urata Y, Hoffman RM, Fujiwara T. Biological ablation of sentinel lymph node metastasis in submucosally invaded early gastrointestinal cancer. *Mol Ther* 2015;23:501-509. (査読あり)

Shigeyasu K, Tazawa H, Hashimoto Y, Mori Y, Nishizaki M, Kishimoto H, Nagasaka T, Kuroda S, Urata Y, Goel A, Kagawa S, Fujiwara T. Fluorescence virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumor cells for non-invasive companion diagnostics. *Gut* 2015;64:627-635. (査読あり)

Shimoyama K, Kagawa S, Ishida M, Watanabe M, Noma K, Takehara K, Tazawa H, Hashimoto Y, Matsuoka J, Kobayashi H, Fujiwara T. Viral transduction of HER2-extracellular domain expands trastuzumab-based photoimmunotherapy for HER2 negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2015;149:597-605. (査読あり)

Yano S, Miwa S, Mii S, Hiroshima Y, Uehara F, Kishimoto H, Tazawa H, Zhao M, Bouvet M, Fujiwara T, Hoffman RM. Cancer cells mimic in vivo spatial-temporal cell-cycle phase distribution and chemosensitivity in 3-dimensional gelfoam histoculture but not 2-dimensional culture as visualized with real-time FUCCI imaging. *Cell Cycle* 2015;14:808-819. (査読あり)

Yano S, Miwa S, Kishimoto H, Toneri M, Hiroshima Y, Yamamoto M, Bouvet M, Urata Y, Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T, Hoffman RM. Experimental curative fluorescence-guided surgery of highly-invasive glioblastoma multiforme selectively labeled with a killer-reporter adenovirus. *Mol Ther* 2015;23:1182-1188. (査読あり)

Yano S, Miwa S, Kishimoto H, Uehara F, Tazawa H, Toneri M, Hiroshima Y, Yamamoto M, Urata Y, Kagawa S, Bouvet M, Fujiwara T. Targeting tumors with a killer-reporter adenovirus for curative fluorescence-guided surgery of soft-tissue sarcoma. *Oncotarget* 2015;6:13133-13148. (査読あり)

Yano S, Hiroshima Y, Maawy A, Kishimoto H, Suetsugu A, Miwa S, Toneri M, Yamamoto M,

Katz M, Fleming J, Urata Y, Tazawa H, Kagawa S, Bouvet M, Fujiwara T. Color-coding cancer and stromal cells with genetic reporters in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) model of pancreatic cancer enhances fluorescence-guided surgery. *Cancer Gene Ther* 2015;22:344-350. (査読あり)

Toda K, Nagasaka T, Umeda Y, Tanaka T, Kawai T, Fuji T, Taniguchi F, Yasui K, Kubota N, Takehara Y, Tazawa H, Kagawa S, Sun DS, Nishida N, Goel A, Fujiwara T. Genetic and epigenetic alterations of netrin-1 receptors in gastric cancer with chromosomal instability. *Clin Epigenetics* 2015;7:73. (査読あり)

Kanda Y, Kawaguchi T, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Kobayashi T, Takahashi N, Tazawa H, Habelhah H, Hamada JI, Kobayashi M, Hirahata, M, Onuma K, Osaki M, Nakamura K, Kitagawa T, Hosokawa M, Okada F. Fascin regulates chronic inflammation-related human colon carcinogenesis by inhibiting cell anoikis. *Proteomics* 2014;14:1031-1041. (査読あり)

Yano S, Zhang Y, Miwa S, Tome Y, Hiroshima Y, Uehara F, Yamamoto M, Suetsugu A, Kishimoto H, Tazawa H, Zhao M, Bouvet M, Fujiwara T, Hoffman RM. Spatial-temporal FUCCI imaging of each cell in a tumor demonstrates locational dependence of cell cycle dynamics and chemoresponsiveness. *Cell Cycle* 2014;13:2110-2119. (査読あり)

Yano S, Zhang Y, Zhao M, Hiroshima Y, Miwa S, Uehara F, Kishimoto H, Tazawa H, Bouvet M, Fujiwara T, Hoffman RM. Tumor-targeting salmonella typhimurium A1-R decoys quiescent cancer cells to cycle as visualized by FUCCI imaging and become sensitive to chemotherapy. *Cell Cycle* 2014;13:3958-3963. (査読あり)

Kuroda S, Kubota T, Aoyama K, Kikuchi S, Tazawa H, Nishizaki M, Kagawa S, Fujiwara T. Establishment of a non-invasive semi-quantitative bioluminescent imaging method for monitoring of an orthotopic esophageal cancer mouse model. *PLoS One* 2014;9:E114562. (査読あり)

Kagawa S, Shigeyasu K, Ishida M, Watanabe M, Tazawa H, Nagasaka T, Shirakawa Y, Fujiwara T. Molecular diagnosis and therapy for occult peritoneal metastasis in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol* 2014;20:17796-17803. (査読あり)

Yano S, Miwa S, Mii S, Hiroshima Y, Uehara F, Yamamoto M, Kishimoto H, Tazawa H, Bouvet M, Fujiwara T, Hoffman RM. Invading cancer cells are predominantly in G0/G1 resulting in chemoresistance demonstrated by real-time FUCCI imaging. *Cell Cycle* 2014;13:953-960. (査読あり)

Tazawa H, Kawaguchi T, Kobayashi T, Kuramitsu Y, Wada S, Satomi Y, Nishino H, Kobayashi M, Kanda Y, Tanaka H, Osaki M,

Kitagawa T, Hosokawa M, Okada F. Chronic inflammation-derived nitric oxide converts human colonic adenoma cells into adenocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 2013;319:2835-2844. (査読あり)

Yano S, Tazawa H, Hashimoto Y, Shirakawa Y, Kuroda S, Nishizaki M, Kishimoto H, Uno F, Nagasaka T, Urata Y, Kagawa S, Hoffman RM, Fujiwara T. A genetically engineered oncolytic adenovirus decoys and lethally traps quiescent human cancer stem-like cells into S/G2/M-phases. *Clin Cancer Res* 2013;19:6495-6505. (査読あり)

Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T. Advances in adenovirus-mediated p53 cancer gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2013;13:1569-1583. (査読あり)

Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T. Oncolytic adenovirus-induced autophagy: tumor-suppressive effect and molecular basis. *Acta Med Okayama* 2013;67:333-342. (査読あり)

[学会発表](計 14 件)

Tamura S, Tazawa H, Hori N, Koujima T, Kikuchi S, Kuroda S, Kishimoto H, Nagasaka T, Nishizaki M, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T. Companion diagnostics-based telomerase-specific oncolytic virotherapy: preclinical evaluation in human colorectal cancer cell lines differentially affected in the RAS/RAF/MEK signaling pathway. *106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, 2015 年 4 月 20 日、Philadelphia, USA

Tamura S, Tazawa H, Hori N, Koujima T, Kikuchi S, Kuroda S, Kishimoto H, Nagasaka T, Nishizaki M, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T. Preclinical evaluation of tumor-specific oncolytic virotherapy against human colorectal cancer cells with different KRAS/BRAF mutation and microsatellite stability. *第21回日本遺伝子治療学会*, 2015 年 7 月 24 日、大阪

田村周太、田澤 大、堀 直人、國府島 健、菊地覚次、黒田新士、岸本浩行、永坂岳司、西崎正彦、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義：KRAS/BRAF 変異を持つ大腸癌に対する新たな腫瘍融解ウイルス療法の開発。 *第74回日本癌学会学術総会*, 2015 年 10 月 8 日、名古屋

Takehara K, Tazawa H, Hashimoto Y, Kishimoto H, Narii N, Mizuguchi H, Fujiwara T. A novel photodynamic therapy with virus-mediated delivery of photosensitive cytotoxic fluorescent protein KillerRed for human cancers. *105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, 2014 年 4 月 6 日、San Diego, USA

Osaki S, Omori T, Tazawa H, Hasei J, Yamakawa Y, Sasaki T, Kunisada T, Urata Y,

Ozaki T, Fujiwara T. Telomerase-dependent oncolytic adenovirus sensitizes human osteosarcoma cells to chemotherapy through Mcl-1 downregulation. *105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, 2014年4月6日、San Diego, USA

田澤 大、河口徳一、蔵満保宏、神田裕介、尾崎充彦、藤原俊義、北川知行、岡田 太：慢性炎症に伴う一酸化窒素生成はヒト大腸腺腫細胞から大腸癌細胞を誘導する。第14回日本NO学会学術集会、2014年5月16日、佐賀

Takehara K, Tazawa H, Hashimoto Y, Kishimoto H, Narii N, Mizuguchi H, Fujiwara T. Virus-mediated delivery system of photosensitive cytotoxic fluorescent protein KillerRed in novel photodynamic therapy for human cancers. 第20回日本遺伝子治療学会、2014年8月7日、東京

竹原清人、田澤 大、橋本悠里、岸本浩行、成井信博、水口裕之、香川俊輔、藤原俊義：ウイルスベクターを用いた光感受性細胞傷害性蛍光タンパク質 KillerRed による新規光線力学療法。第73回日本癌学会学術総会、2014年9月27日、横浜

田澤 大、河口徳一、蔵満保宏、神田裕介、尾崎充彦、藤原俊義、北川知行、岡田 太：慢性炎症に伴うNO生成はアノキス抵抗性を介し大腸腺腫細胞から大腸癌細胞を誘導する。第25回日本消化器癌発生学会総会、2014年11月14日、博多

Takehara K, Tazawa H, Hashimoto Y, Kishimoto H, Narii N, Mizuguchi H, Fujiwara T. Cytotoxic effect of photosensitive fluorescent protein KillerRed-expressing adenovirus against human cancer cells. *104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, 2013年4月9日、Washington DC, USA

Yano S, Tazawa H, Kishimoto H, Fujiwara T, Hoffman RM. Telomerase-specific oncolytic adenovirus OBP-301 kills quiescent peritoneally disseminated cancer cells. *104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, 2013年4月7日、Washington DC, USA

Tazawa H, Takakura M, Katagiri N. A novel adenovirus-based CTC detection technique and its clinical applications. 第19回日本遺伝子治療学会、2013年7月6日、岡山

Tazawa H, Yamasaki Y, Hashimoto Y, Kuroda S, Yano S, Yoshida R, Uno F, Mizuguchi H, Ohtsuru A, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T. A novel apoptotic mechanism of genetically engineered adenovirus-mediated tumor-specific p53 overexpression through E1A-dependent p21 and MDM2 suppression. 第19回日本遺伝子治療学会、2013年7月5日、岡山

田澤 大、長谷井 嬢、大西哲平、矢野修也、香川俊輔、藤原俊義：腫瘍融解ウイルス療法におけるE2F1誘導性マイクロRNAの腫

瘍抑制的機能。第72回日本癌学会学術総会、2013年10月5日、横浜

〔図書〕(計 2 件)

田澤 大、矢野修也、香川俊輔、白川靖博、藤原俊義：テロメラーゼ活性依存的腫瘍融解ウイルスによるがん治療。科学評論社、腫瘍内科6月号、2014、817-823

Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T. Tumor Suppressor Genes: Functions, Regulation and Health Effects. Nova Science Publishers, 2013, 81-103

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田澤 大(TAZAWA HIROSHI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：90415513

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし