

平成30年6月8日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10138

研究課題名(和文) KRAS遺伝子変異に伴う癌代謝変化の診断および治療への応用

研究課題名(英文) Targeting metabolic reprogramming in KRAS-mutated colorectal cancer

研究代表者

長谷川 傑 (HASEGAWA, Suguru)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10362500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：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る。大腸癌遠隔転移巣の切除標本を検討したところ、KRAS遺伝子変異は糖代謝に関与することでFDG-PET検査における転移巣へのFDG集積に関与しており、SUVmaxを計測することで71.4%の精度でKRAS遺伝子変異の有無が予測できた。FDG-PET検査は大腸癌における抗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。また大腸癌におけるKRAS遺伝子変異特異的な代謝経路の検討から、グルタミン・アスパラギン代謝の阻害はKRAS遺伝子変異を有する大腸癌に対する新規治療ターゲットとして期待できる。

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. From the analysis with the 55 metastatic CRC tumors, no significant correlation was found between SUVmax and KRAS status. We next analyzed only tumors larger than 10mm to minimize bias of partial volume effect, and found that SUVmax was significantly higher in the KRAS mutated group than in the wild-type group. KRAS status could be predicted with an accuracy of 71.4% when a SUVmax cutoff value of 6.0 was used. FDG-PET/CT scans might be useful for predicting the KRAS status of metastatic CRC. Moreover, 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. 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

1. 研究開始当初の背景

(1) KRAS 遺伝子変異は多くの癌腫で認められる代表的な癌遺伝子であり、近年では大腸癌の分子標的治療薬である抗 EGFR 抗体の治療効果を予測するバイオマーカーとしても注目されている。抗 EGFR 抗体は 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、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。

(2) 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、また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。さらに遺伝子検査の限界として 1) 単一腫瘍内での KRAS 遺伝子状態の不均一性のため 1,2 力所からの生検では腫瘍全体の KRAS 遺伝子状態を反映できない、2) 原発巣と転移巣との間で KRAS 遺伝子状態が異なること、などが挙げられる。

(3) 2009 年に大腸癌における KRAS 遺伝子変異はグルコース・トランスポーターである GLUT1 (Glucose transporter-1) 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 (Yun J, et al. *Science* 325:1555-1559.2009)。大腸癌における FDG (fluorodeoxyglucose) 集積に関わる最も重要な因子は GLUT1 であることから、我々は FDG-PET 検査により大腸癌原発巣への FDG 集積程度を定量評価することで KRAS 遺伝子変異の有無を予測できないかを 51 症例の手術標本で解析したところ、遺伝子変異群は遺伝子変異を認めない群よりも原発巣への FDG 集積が有意に高く 75% の精度で KRAS/BRAF 遺伝子変異の有無を予測できることを明らかにした (Kawada K, et al. *Clinical Cancer Res* 18:1696-703.2012)。これは“癌における KRAS 遺伝子変異 糖代謝亢進”が実地臨床の FDG-PET 検査に応用できる可能性を示した初めての論文であるが、大腸癌原発巣については大腸内視鏡検査での生検材料を用いた遺伝子検査がそれほど困難なく行なえるため臨床的な面での有用性は限られたものであった。

(4) 癌細胞では嫌氣的解糖系の亢進という代謝変化が観察されることは Warburg 効果として 1920 年代から知られている現象であったが、長年その分子機構や癌における役割については不明であった。近年、KRAS 遺伝子変異が糖代謝およびグルタミン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り、またその制御機序が癌治療に結びつくことが膵臓癌モデルマウスを用いた研究などで報告された。

2. 研究の目的

本研究では KRAS 遺伝子変異による大腸癌の代謝変化に着目し、1) 診断への応用 (大腸癌の遠隔転移巣において FDG-PET 検査で FDG 集積程度を定量評価することで遠隔転移巣における KRAS 遺伝子変異の有無をどの程度予測できるか) や、2) 治療への応用 (KRAS 遺伝子変異のある大腸癌に特異的な代謝経路をターゲットにした治療法の開発) の可能性について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 2009 年 4 月～2014 年 3 月までに京大病院で大腸癌遠隔転移巣 (肝臓、肺、遠隔リンパ節) を切除した 35 症例、55 転移巣に注目し、手術前の FDG-PET/CT 検査における大腸癌転移巣への 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転移巣における DNA を抽出し、KRAS 遺伝子変異の有無をダイレクトシーケンシング法にて検討する。KRAS 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。

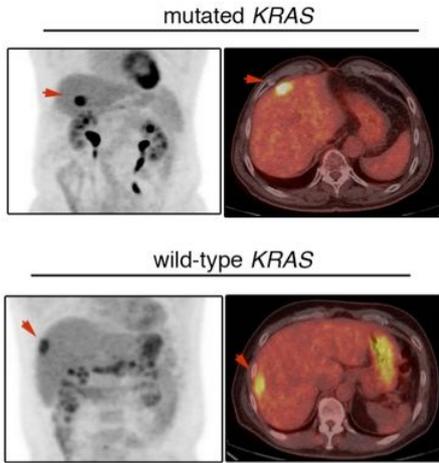
(3) 原発巣切除した症例については原発巣への FDG 集積程度の測定や KRAS 遺伝子変異の有無も測定し、原発巣と遠隔転移巣間での差異についても検討する。

(4) 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。

(5) 上記スクリーニングにより検出された因子について、細胞株に強制発現されたり siRNA 法にて発現抑制させることで、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細胞株やマウスモデルを用いて明らかにする。

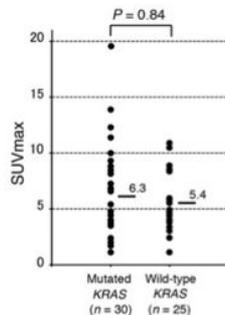
4. 研究成果

(1) 京大病院において 2009 年 4 月より PET/CT が導入されたことより、共同研究者である中本裕士 (放射線医学講座講師) らの協力のもと、大腸癌遠隔転移巣 (55 転移巣) への FDG 集積 (SUV_{max}: 1 ピクセルあたりの最大 SUV) を計測した。



(2) 遺伝子検査の結果、KRAS 遺伝子については変異を認めたのが 30 転移巣 (mutated KRAS 群) 遺伝子変異を認めなかったのが 25 転移巣 (wild-type KRAS 群) であった。

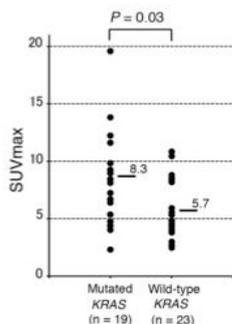
大腸癌遠隔転移巣への FDG 集積 (SUVmax : 1 ピクセルあたりの最大 SUV) に違いがあるかを検討した。



全症例での解析では KRAS 遺伝子変異群は遺伝子変異なし群に比べ FDG 集積に有意な差は認められなかった (6.3 ± 4.2 vs 5.4 ± 2.6; P = 0.84)。

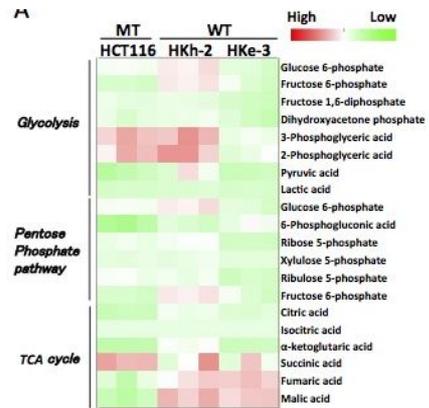
しかしながら腫瘍サイズの分布をみると KRAS 遺伝子変異群のほうが遺伝子変異なし群に比べ有意ではなかったもののサイズが小さい傾向にあった (18.8 ± 14.8mm vs 23.2 ± 13.2mm; P = 0.06) ため、腫瘍サイズが 10mm 以上のものに絞ってサブグループ解析を行った。

KRAS 遺伝子変異群 (n=19 転移巣) は遺伝子変異なし群 (n=23 転移巣) に比べ FDG 集積が有意に高かった (8.3 ± 4.1 vs 5.7 ± 2.4; P = 0.03)。

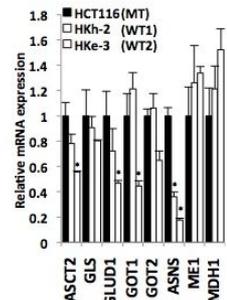
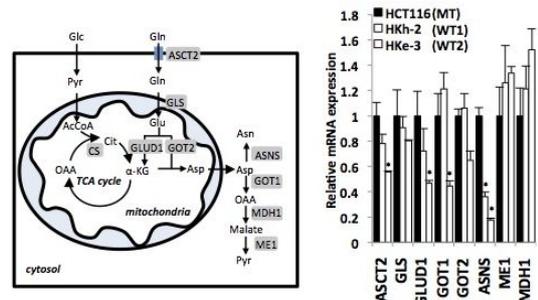


(3) 55 転移巣のうち、原発巣の KRAS 遺伝子の status が評価可能であった 49 転移巣 (89%) について検討したところ、7 転移巣 (14%) は原発巣と KRAS status が異なっていた。また、同一患者の転移巣のなかで KRAS status が転移巣間で異なっている症例が 1 例認められた。

(4) 今回の我々のメタボローム解析の結果では、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。

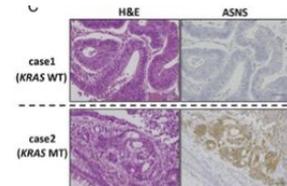


さらに詳細にアミノ酸代謝をみていくと、特にアスパラギン酸 (Asp) が KRAS 変異型で低下していたため、我々はアスパラギン酸 (Asp) の代謝 (以下の図を参照) に着目し、Asp の生成に関与する各種酵素の発現をスクリーニングしたところ、アスパラギン合成酵素 (ASNS: Asparagine synthetase) の発現が増加していることを見出した。



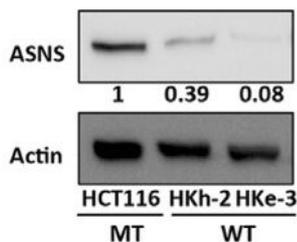
つぎに臨床検体を用いて、93 例の大腸癌原発巣をアスパラギン合成酵素 (ASNS) の発現程度を免疫組織染色で検討した。

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

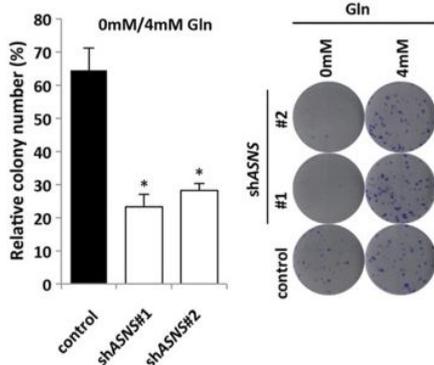


野生型と比較して ASNS の発現が有意に高いことが分かった (74.3% vs 31.5%; $P < 0.01$)。また大腸癌細胞株をもちいて ASNS の発現にどのような KRAS 下流シグナルが関与しているか検討したところ、PI3K 経路および mTOR 経路が関与していることが明らかとなった。

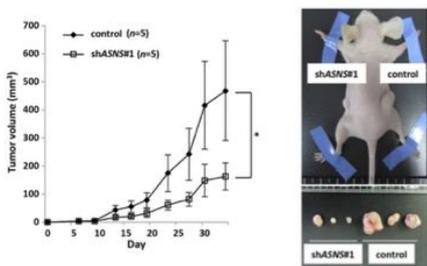
(5) つぎに ASNS が KRAS 遺伝子変異型大腸癌に対する新規治療法のターゲットになりえるかを検討するため、shRNA 法による ASNS 発現抑制株を樹立した。



shRNA 法により ASNS 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。

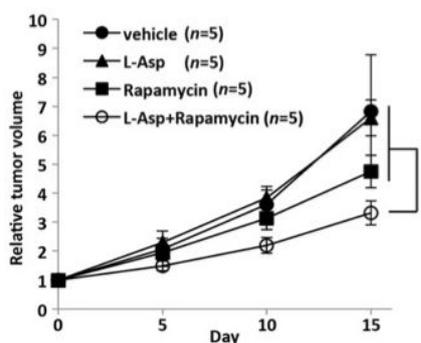


つぎに in vivo モデルで検証したところ、ASNS の発現を抑制すると著明に腫瘍の増殖が抑制された。免疫組織染色の結果では細胞分裂能の指標である Ki67 の陽性細胞数が ASNS 抑制群では低下していた。



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。上記の結果から 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 を用いた。

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。



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)

Kawada K, Toda K, Nakamoto Y, Iwamoto M, Hatano E, Chen F, Hasegawa S, Togashi K, Date H, Uemoto S, Sakai Y.

“Relationship between FDG-PET/CT scans and KRAS Mutations in Metastatic Colorectal Cancer”

J Nucl Med.56:1322-7.2015. 査読有り.
doi: 10.2967/jnumed.115.160614.

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.

Kawada K, Iwamoto M, Sakai Y.

“Mechanisms underlying 18F-fluorodeoxyglucose accumulation in colorectal cancer”

World J Radiol . 2016 Nov 28;8(11):880-886.
査読有り.

〔学会発表〕(計 3 件)

河田健二、戸田孝祐、岩本哲好、長谷川傑、坂井義治
“Relationship between FDG-PET/CT scans and KRAS mutations in metastatic colorectal cancer” 第 74 回日本癌学会学術総会 (平成 27 年 10 月 8 日、名古屋)

河田健二、戸田孝祐、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 KRAS 遺伝子と FDG 集積との相関性” 第 53 回日本癌治療学会学術集会 (平成 27 年 10 月 29 日、京都)

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

長谷川 傑 (HASEGAWA, Suguru)

京都大学・大学院医学研究科・客員研究員
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