

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10670

研究課題名(和文) gain of functionに対し合成致死を誘導するKRAS変異肺癌の治療

研究課題名(英文) Development of synthetic lethality on lung cancer harboring KRAS mutation

研究代表者

桜田 晃 (Sakurada, Akira)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：60360872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：KRAS遺伝子変異をもつ肺癌細胞A549を用いてp190RhoGAP一つの候補とし、もう一つの分子スクリーニングする実験を行った。isogenic cellモデルを構築してsiRNAライブラリーを使用する予定であったが、A549の蛍光発現が安定しないため、p190RhoGAPの上流にあるSrcを阻害薬で抑制し、それに相乗的に細胞増殖を抑制する分子を同定することにした。p190RhoGAPを安定的にノックアウトするとStat3の発現が亢進し生存に寄与することが確認されたため、SrcとSTAT3それぞれの阻害薬を同時投与の効果を検証したところ、相乗的な細胞増殖抑制効果が得られることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、KRAS遺伝子変異を有する肺癌細胞株を用いた実験で、SRC阻害薬とSTAT3の阻害薬がいずれも増殖抑制効果を示すこと、また、両者を併用すると相乗的で強力な細胞増殖抑制効果が得られることを示した。肺癌の分子標的治療は進歩しているが、これまでKRAS遺伝子変異を有する肺癌に対しては有効な治療法が確立しておらず、今回の結果は新たな治療の可能性を示すものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Synthetic lethality on lung cancer cells harboring KRAS gene mutation was tested. p190RhoGAP was assumed as one target and additional targets were intended to identify by using isogenic cell culture model in combination with siRNA library screening. As integration of autofluorescent gene was unstable, we switched isogenic model to combination of inhibitors. We confirmed that inhibition of Src, a upstream regulator of p190RhoGAP, strongly downregulates p190RhoGAP activity. Then, we identified that Stat3 was upregulated and contributed for cell survival after stable knock down of p190RhoGAP. We demonstrated that simultaneous inhibition of Stat3 and SRC synergistically suppress cell proliferation of A549 cell.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 腺癌 KRAS 合成致死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌においては EGFR 遺伝子をはじめとしてドライバー遺伝子の同定とそれを標的にした治療薬の開発が進んでいる。一方、以前より肺癌において変異があることが知られている KRAS 遺伝子については、治療薬の開発が成功しておらず、化学療法にも反応が乏しいため、予後の改善が急務である。近年、二つの遺伝子を標的とする合成致死という概念が乳癌において導入された。厳密には、DNA 複製にかかわる遺伝子を標的とする治療であるが、肺癌においては、二つの遺伝子を標的とすることで KRAS 遺伝子変異を有する肺癌細胞の強力な増殖抑制が得られるかどうかは検討の価値があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、gain of function タイプの分子異常である KRAS 変異型肺癌に対して、KRAS を抑制することと同時に、もう一つの分子を抑制することで合成致死あるいは著明な増殖抑制効果を誘導することが可能になるような分子を特定することである。申請者は、KRAS の活性化を抑制する方法として p190RhoGAP の抑制が有効であることを明らかにしているが、これまでの研究成果をさらに発展させ、現在治療の確立されていない KRAS 変異をドライバー変異として有する肺癌の治療を開発するための基盤を築くことを目指す。

3. 研究の方法

(1) 合成致死性のスクリーニング

合成致死のスクリーニングとしては、isogenic cell line を用いることにした。本実験では、変異型 KRAS を抑制し、同時にさらに別な標的をスクリーニングすることで合成致死に有効な分子を特定することを想定している。したがって、KRAS 変異細胞株である A549 を用いて、KRAS の抑制を行った isogenic cell line を作製して親株と共培養を行い、siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行う。KRAS の抑制は、p190RhoGAP の安定ノックダウンにより得られることを A549 を用いて確認しているため、A549 の親株と共培養する isogenic cell line として使用する。これらに、蛍光を発する遺伝子を導入し、安定的に発現することが確認できれば、次のスクリーニングのステップに進む。

(2) siRNA ライブラリーによるスクリーニング

創薬を想定した siRNA ライブラリーが発売されているので、キナーゼや細胞増殖、細胞制御に関わるライブラリーを用いてスクリーニングを行う。96 ウェル培養プレートで isogenic cell line と親株を共培養した状態で、siRNA の導入を行い、72 時間後に各ウェルの蛍光色素強度を測定する。これによって、有意に KRAS 変異細胞において相乗的に細胞増殖抑制効果を示す分子の特定を目指す。

(3) 既存の細胞株の大規模シークエンスプロジェクトの結果を用いた標的の絞り込み

siRNA ライブラリースクリーニングによって有望な分子が特定されなかった場合、既存の国際的な大規模遺伝子変異同定プロジェクトである COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) ですでに同定されている、肺癌細胞株の遺伝子変異の結果を利用して成果を出すことを検討する。

(4) Src 阻害薬による p190RhoGAP の抑制と併用薬剤の検討

Isogenic cell line を用いた方法が予定通り進まなかった場合、p190RhoGAP をそのシグナル伝達上の上流に位置する SRC を阻害薬により抑制することを軸として、さらに併用する薬剤を検討することも視野に入れる。

4. 研究成果

(1) isogenic cell line モデル

A549 親株と A549p190KD (A549 の p190RhoGAP ノックダウン細胞株) のそれぞれに、異なる蛍光を発する遺伝子の導入を進めた。それぞれの細胞に対して、A549 親株に対しては GFP、A549p190KD に対しては赤色蛍光をプラスミドベクターで導入することとした。A549 に対する GFP の発現は成功し、十分な強度の蛍光発現が確認された。一方、A549p190KD に対する赤色蛍光の導入は不十分であった。後者が不成功であったため、isogenic cell line モデルによる研究は断念することとした。

(2) 大規模データベースによる候補分子の検索

COSMIC の cell line project を検索し、A549 で遺伝子変異が 552 個で、そのうち pathogenic な意義のあるものが 293 であった。A549 と同様に KRAS 遺伝子に変異をもつ H460 細胞で同様に変異のある遺伝子を検索すると、に重要と考えられるものが 567 個で、そのうち pathogenic な意義のあるものは 293 であった。これらを比較し、KRAS 以外で機能的に重要性のあると考え得る共通する遺伝子は 8 つで、ITPKC、KEPA1、LRP2、MMP2、NIPBL、PLEK2、RTTN、STK11 であった。これらは、KRAS 遺伝子変異とともに肺癌の悪性化に関与している可能性があると考えられた。

(3) Src 阻害薬、Stat3 阻害薬の効果に関する実験

我々は、A549 において p190RhoGAP (遺伝子名 ARHGAP35) を安定的にノックダウンすると、ウェスタンブロットでシグナル伝達の上流に当たる Src 蛋白の発現が p190RhoGAP の発現をドライブするように上昇することを確認した(図 1)。同時に、直接のシグナル伝達経路にはない Stat3 蛋白の発現が亢進し、これが細胞の生存に必要な代替的な働きをしていると考えられた。Akt や MEK は明らかな代替経路としては作用していないと考えられた。従って、200 μM の Stat3 阻害薬を作用させた場合、p190RhoGAP (遺伝子名 ARHGAP35) を安定的にノックダウンした A549 細胞はノックアウトしていない細胞に比較して、細胞増殖の抑制効果 (effect ratio) が 40% と著明に増加することを確認した(図 2)。PRKCD も p190RhoGAP の抑制により発現の亢進が認められたが、今回は検討に至らなかった。

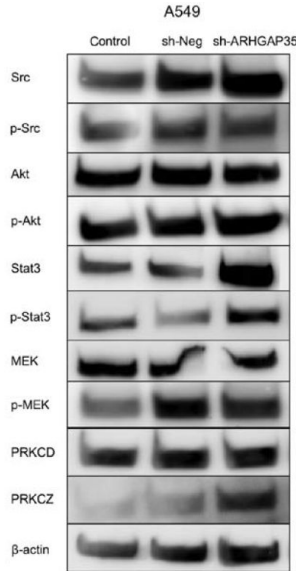


図 1

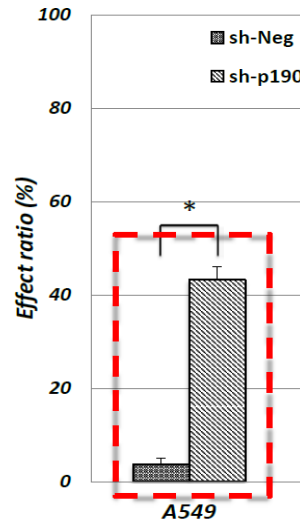


図 2

これらの知見を踏まえて、A549 細胞において Src 阻害薬と Stat3 阻害薬を併用して効果を確認した(図 3) Stat3 阻害薬 100 μM、Src 阻害薬 2.5 μM のそれぞれ比較的低濃度の暴露を行った場合でも、著明な増殖抑制効果が得られることが示された。この効果が、相乗的なものかを Chou-Talalay 法に基づいて評価を行ったところ、Combination Index が 0.61 と、相乗効果の基準とされる 0.9 を下回るという条件を満たす結果が得られた。KRAS 遺伝子変異を有する肺癌において、Src 阻害薬と Stat3 阻害薬の併用が有望な治療法となる可能性が示唆された。

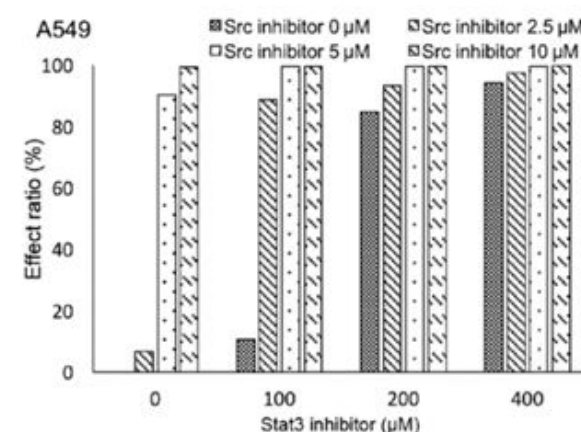


図 3

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Sagawa M, Oizumi H, Suzuki H, Uramoto H, Usuda K, Sakurada A, Chida M, Shiono S, Abe J, Hasumi T, Sato M, Sato N, Shibuya J, Deguchi H, Okada Y. A prospective 5-year follow-up study after limited resection for lung cancer with ground-glass opacity. *Eur J Cardiothorac Surg* 53:849-856, 2017.

Matsumura Y, Suzuki H, Ohira T, Shiono S, Abe J, Sagawa M, Sakurada A, Katahira M, Machida Y, Takahashi S, Okada Y. *Lung Cancer* 114:23-30, 2017.

Kawakami T, Ito K, Matsuda Y, Noda M, Sakurada A, Hoshikawa Y, Okada Y, Ogasawara K. Cytotoxicity of natural killer cells activated through NKG2D contributes to the development of bronchiolitis obliterans in a murine heterotopic tracheal transplant model. Am J Transplant 17:2338-2349, 2017.

Ishida H, Kasajima A, Kamei T, Miura T, Oka N, Yazdani S, Ozawa Y, Fujishima F, Sakurada A, Nakamura Y, Tanaka Y, Kurosumi M, Ishikawa Y, Okada Y, Ohuchi N, Sasano H. SOX2 and Rb1 in esophageal small-cell carcinoma: their possible involvement in pathogenesis. Mol Pathol 30:660-671, 2017.

Onodera K, Sakurada A, Notsuda H, Watanabe T, Matsuda Y, Noda M, Endo C, Okada Y. Growth inhibition of KRAS- and EGFR- mutant lung adenocarcinoma by cosuppression of STAT3 and the SRC/ARHGAP35 axis. Oncol Rep 40:1761-1768, 2018.

〔学会発表〕(計 2 件)

Onodera K, Sakurada A, Notsuda H, Watanabe T, Matsuda Y, Noda M, Hoshikawa Y, Okada Y. Cosuppression of Stat3 and Src/p190RhoGAP leads synergistic growth inhibition in KRAS mutant lung adenocarcinoma. American Thoracic Society 2016 International Conference, 2016.

桜田 晃、星 史彦、江場俊介、大石 久、松田安史、佐渡 哲、野田雅史、岡田克典、開胸により初めて判明する胸膜病変のリスク因子について. 第 58 回日本肺癌学会総会、2017.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。