

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07215

研究課題名(和文) 大腸癌細胞塊における生体内類似変異KRAS制御シグナルの解明及び阻害剤の開発

研究課題名(英文) Elucidation of in vivo-like signal regulated by mutated KRAS in colorectal cancer spheroid and development of inhibitor.

研究代表者

角田 俊之 (Tsunoda, Toshiyuki)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：70444817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：変異KRASのシグナルの中には自身の増殖シグナル以外にも、免疫逃避シグナルが存在する。現在では生体内類似環境において変異KRASが制御するシグナルを特異的に抑制するリード化合物(STAR2)をベースに新たな化合物の開発も進めており、物質特許を出願した。またSTAR2の標的タンパク質として、ミトコンドリア外膜に存在するVDACおよび小胞体に存在するKDELの同定にも成功し、これまでにない細胞小器官を中心とした変異KRASが制御する癌増殖シグナルの存在が示唆され、現在詳細解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変異KRASは全癌の30%占めるが近年KRASのG12C変異を標的とする分子標的薬が開発されつつあり、臨床試験で効果を示している。しかしG12Cは全KRAS変異の中でも3%であり、依然として変異KRASを制御することは困難である。又、従来の抗癌剤は副作用が強く、最近の生物学的製剤などは一部の腫瘍に効果は認めるものの、薬剤耐性や高価である事などの問題点が多い。我々の開発している薬剤は安価な低分子化合物であり、癌特異的な変異KRASのシグナルを特異的に抑え、下流のハブ分子を抑えるために耐性化も認められない。二人に一人が癌を罹患する世の中において副作用の少ない抗腫瘍化合物は非常に意義がある。

研究成果の概要(英文)：KRAS mutation promotes the immune evasion other than the proliferation of cells. We have developed the lead compounds (STAR2) that suppresses the in vivo-like signal regulated by mutated (mt) KRAS and applied for patent. We also have succeeded to find the STAR2 targets, VDAC and KDEL. VDAC is localized in the outer membrane of mitochondria and KDEL is localized in endoplasmic reticulum. These results suggest the novel pathway that is regulated by mtKRAS in microorganism.

研究分野：癌

キーワード：KRAS 3次元培養 低分子化合物 免疫逃避 大腸癌 細胞内小器官

1. 研究開始当初の背景

RAS 遺伝子の変異は全癌の 30% 近くに認められ、膵臓癌で 95%、大腸癌で 45%、肺癌で 35% にも上る変異率を示すが、この 30 年間変異 KRAS 阻害剤の開発に成功していない。また変異 KRAS 陽性のがん患者に対して既存の抗がん剤は効果がない。例えば、ゲフィチニブ(イレッサ)などの EGF 受容体阻害薬は、変異 KRAS を有する癌には効果がないため保険適応がない。そこで、近年 PD-1 抗体のような免疫チェックポイント阻害剤の有用性が多くの癌腫において示され、それにもない多くの癌腫に保険適応が拡大されている。大腸がんにおいては、米国の FDA (Food and Drug Administration) はマイクロサテライト不安定性が高いまたはミスマッチ修復機構の欠損を有する化学療法抵抗性転移性大腸癌に対して免疫チェックポイント阻害剤の使用を認めた。確かに、このような癌では突然変異の頻度が上昇し、がんになりやすい一方で、T 細胞が癌抗原を認識しやすいので、免疫チェックポイント阻害剤の効果が期待できる。しかし、多くの遺伝子変異は大腸癌の進展に無関係な、いわゆるパッセンジャー遺伝子変異が多く、KRAS 変異のように一塩基異常が癌の増殖に大きく寄与するドライバー遺伝子変異の場合は免疫チェックポイント阻害剤の効果に違いがあるのかどうかという点はいまだ不明である。これまでに我々のグループでは、基盤研究にて、変異 KRAS は 3 次元環境において正常形態を阻害するという独自の働きを担っていること (Neoplasia 2010, Tsunoda et al.)、及び Phosphodiesterase4(PDE4)等の、それらの関連遺伝子を標的とすることで正常形態に誘導し癌のみを縮小させる可能性があること (Molecular Cancer 2012 Tsunoda et al.)などを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

当該研究では、変異 KRAS が微少環境にて制御するシグナルの全貌を 3 次元培養系を用いて解明し、新たな癌の治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト大腸癌 HCT116 より変異 KRAS を欠失させて得られたクローンは複数あるが(HKe3, HKh2 etc.)、その中でも、大腸クリプト様の正常形態を示す HKe3 細胞を選択し、この細胞に野生型 KRAS または変異 KRAS (G13D) を再発現させ、この細胞ペア (HKe3-wtKRAS、及び、HKe3-mtKRAS) を用いることで、他のドライバー変異の影響を受けずに、変異 KRAS カスケードのみによる変化を形態的にも遺伝子の発現においても浮き彫りにさせることが可能である。さらに日本人健常人由来のリンパ球を IL-2 や CD3 (OKT3) 刺激により培養増殖させ、MHC 非拘束性の NKG2D の発現が高い Tリンパ球と NK 細胞の混合細胞、すなわち(cytokine induced killer: CIK) 細胞とヒト大腸癌(コーカソイド由来)スフェロイドのアロジェニック(同種異系間)共培養系を用い、変異 KRAS シグナルの自然免疫系への影響を解析する。

4. 研究成果

(1) 微少環境における変異 KRAS 関連シグナルの解明。

変異 KRAS が2次元環境下で制御する増殖シグナルはこれまでの研究でよく解析されているが、実際のところ、生体内微少環境下において変異 KRAS が制御するシグナルに関しては十分に理解されているとは言えない。我々は3次元培養および3次元共培養の技術を用いて変異 KRAS シグナルの解明を試みた。以前より3次元環境における PDE4 の阻害による増殖の抑制は報告してきたが、この研究期間内ではさらに3次元浮遊培養下で resveratrol の派生物が (Okamoto et al. 2018)の効果を報告した。また日本人健常人由来のリンパ球を IL-2 や CD3(OKT3)刺激により培養増殖させ、MHC 非拘束性の NKG2D の発現が高いTリンパ球と NK 細胞の混合細胞、すなわち (cytokine activated killer: CAK) 細胞とヒト大腸癌(コーカソイド由来)スフェロイドのアロジェニック(同種異系間)共培養系を構築することに成功した(Tsunoda et al. 2020)。この系においては、MHC 非依存性のリンパ球は野生型 KRAS の場合、腫瘍塊内部に侵入できないが、変異型 KRAS の場合、スフェロイド内部に入り込み、CAK 細胞ではさらに内部に浸潤し、

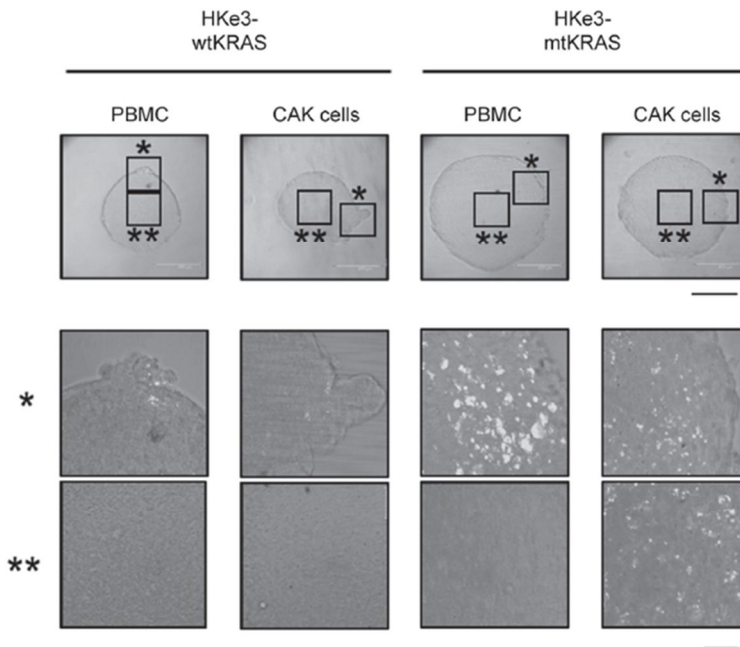


Figure 1. *mtKRAS* promotes the infiltration of cytokine-activated killer (CAK) cells into spheroids. Upper panels represent images of spheroids of HKe3 wild-type (wt) KRAS (left) and Hke3 mutant (mt) KRAS (right) co-cultured with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or CAK cells. Scale bar, 500 μ m. Enlarged images of areas enclosed by black lines in the upper panels are shown for the middle (*: the superficial part of spheroids) and lower panels (**: the central part of spheroids). The middle and lower panels represent merged images for both calcein AM and normal light signals. Scale bar, 50 μ m.

T細胞側が発現する腫瘍を認識するための TIGIT に対する腫瘍塊側のリガンドである CD155 の発現が変異 KRAS により上昇することにより免疫チェックポイントが作動し、CD155 の制御によって、変異 KRAS 陽性癌の増殖を制御できることが示唆された (Tsunoda et al. 2020)。

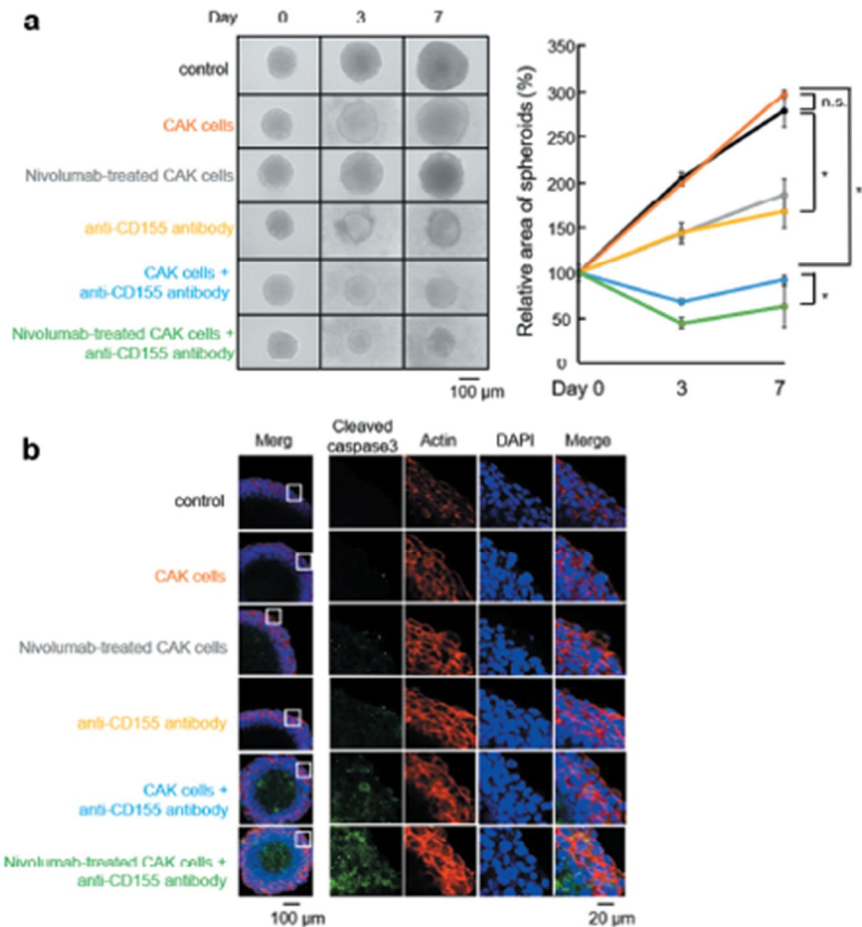


Figure 6. Cytokine-activated killer (CAK) cells under CD155 and PD-1 blockade suppress the growth of HKe3 mutant (mt) KRAS spheroids in a 3DF co-culture system via the induction of luminal apoptosis. (a) Representative images of HKe3-mtKRAS spheroids from three biological replicates (left panel). Scale bar, 100 μm. The right panel is the relative areas of HKe3-mtKRAS spheroids incubated with CAK cells, nivolumab-treated CAK cells, anti-CD155 antibody, CAK cells with anti-CD155 antibody, nivolumab-treated CAK cells, or nivolumab-treated CAK cells with anti-CD155 antibody in 3DF culture. Means±SD from three technical replicates are shown. * $p < 0.05$. ** $p < 0.001$. n.s.: not significant. (b) Representative signals for cleaved caspase-3 in HKe3-mtKRAS spheroids from three biological replicates. Enlarged images of the areas enclosed by white lines in the left panels are shown. Cleaved caspase-3, green; actin, red; DAPI, blue. Scale bar, 100 μm (low-magnification images) or 20 μm (high-magnification images).

さらに 3 次元共培養系において CAK 細胞が変異 KRAS 陽性細胞塊に特異的に浸潤する現象は、変異 KRAS 陽性大腸癌の患者標本においても認められ、具体的には、癌の浸潤先端部内において CD3 陽性 T 細胞が認められた。変異 KRAS が 3 次元培養特異的に制御する免疫チェックポイント分子として CD155 を同定し、また、KRAS の変異がない場合、細胞塊は低酸素状態では増殖が抑制されるが、KRAS 変異がある場合は低酸素状態においても通常の酸素濃度の場合と同様な増殖様式を示し（低酸素耐性化）、梅から抽出した MK615 は低酸素耐性化を HIF-1 の発現抑制を介して阻害することが分かった(Nishi et al. 2020)。また国際共同研では、変異 KRAS が制御する糖代謝のリプログラミングに関して報告した (Charitou et al. 2019)。

(2) 変異 KRAS 関連シグナル阻害剤の開発

当該研究では、HKe3-wtKRAS 細胞塊、すなわち正常モデルにおいて効果なく、HKe3-mtKRAS 細胞塊、すなわち癌モデルにおいてのみ増殖を阻害できる天然物化合物由来の化合物の取得を目指してきた。パイロットスタディとして報告した、核酸アナログの 3-Deaza-cytarabine (STAR1) は、癌モデルのみに効果を示した (Luo et al., 2018)、その後取得した化合物が、用途特許を取得した STAR2 である。新たに九州大学薬学部環境調和創薬化学分野と共同で STAR2 の改変物を合成し、物質特許を出願した(R2 年 2 月 6 日; 特願 2020-017307)。最近 STAR2 が結合する標的タンパ

クを2つ同定することができた。一つはミトコンドリア外膜上に存在する Voltage-dependent anion channel (VDAC)で、もうひとつは小胞体およびゴルジ体の膜上に存在する K-D-E-L receptor (KDELR)である。VDAC はミトコンドリアの酸化的リン酸化による ATP 産生やアポトーシスの誘導における最重要分子であり、癌においてはミトコンドリアの活性は抑制され、代わりに解糖系が亢進している(ワールブルグ効果)。KDELR は小胞体ゴルジ間のタンパク質の逆行性輸送に関与しており、タンパク質の品質管理に関与している。それぞれには多くのタンパク質が結合しており、いずれも変異 KRAS 下流の新規ハブタンパク質であることが考えられた。癌特異的なタンパク質 - タンパク質結合を阻害していることが示唆された。理論上、これまでに認められてきた、毒性の少なさ、薬剤耐性株を含む多くの癌に効果があること、CD155 タンパク局在の変化などの現象を説明しうる標的タンパクであり、生体内類似環境において変異 KRAS が制御するシグナルの全貌が一気に解明できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 NISHI KENSUKE, ISHIKURA SHUHEI, UMEBAYASHI MASAYO, MORISAKI TAKASHI, INOZUME TAKASHI, KINUGASA TETSUSHI, AOKI MIKIKO, NIMURA SATOSHI, SWAIN ANTHONY, YOSHIDA YOICHIRO, HASEGAWA SUGURU, NABESHIMA KAZUKI, SAKATA TOSHIFUMI, SHIRASAWA SENJI, TSUNODA TOSHIYUKI	4. 巻 40
2. 論文標題 Mutant KRAS Promotes NKG2D+ T Cell Infiltration and CD155 Dependent Immune Evasion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4663 ~ 4674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.14465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 NISHI KENSUKE, TSUNODA TOSHIYUKI, UCHIDA YOSHINORI, SUETA TAKAYUKI, SAWATSUBASHI MOTOHIRO, YAMANO TAKAFUMI, HASHIGUCHI YASUKO, SWAIN ANTHONY, SHIRASAWA SENJI, SAKATA TOSHIFUMI	4. 巻 40
2. 論文標題 MK615 Suppresses Hypoxia Tolerance by Up-regulation of E-cadherin in Colorectal Cancer Cells With Mutant KRAS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4687 ~ 4694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.14468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Charitou Theodosia, Srihari Sriganesh, Lynn Miriam A., Jarbouï Mohamed-Ali, Fasterius Erik, Moldovan Max, Shirasawa Senji, Tsunoda Toshiyuki, Ueffing Marius, Xie Jianling, Xin Jin, Wang Xuemin, Proud Christopher G., Boldt Karsten, Al-Khalili Szigyarto Cristina, Kolch Walter, Lynn David J.	4. 巻 121
2. 論文標題 Transcriptional and metabolic rewiring of colorectal cancer cells expressing the oncogenic KRASG13D mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 37 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-019-0477-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 DOI KEIKO, TSUNODA TOSHIYUKI, KOYANAGI MIDORI, TANAKA YOKO, YAMANO SHIORI, FUJIKANE AYA, NISHI KENSUKE, ISHIKURA SHUHEI, SHIRASAWA SENJI	4. 巻 39
2. 論文標題 Zfat Is Indispensable for the Development of Erythroid Cells in the Fetal Liver	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4495 ~ 4502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.13625	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sawata Yuuga, Matsukawa Taiji, Doi Satoshi, Tsunoda Toshiyuki, Arikawa Nagisa, Matsunaga Natsumi, Ohnuki Koichiro, Shirasawa Senji, Kotake Yojiro	4. 巻 462
2. 論文標題 A novel compound, ferulic acid-bound resveratrol, induces the tumor suppressor gene p15 and inhibits the three-dimensional proliferation of colorectal cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 25 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-019-03606-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsunoda T, Doi K, Ishikura S, Luo H, Nishi K, Matsuzaki H, Koyanagi M, Tanaka Y, Okamura T, Shirasawa S.	4. 巻 42
2. 論文標題 Zfat expression in ZsGreen reporter gene knock-in mice: Implications for a novel function of Zfat in definitive erythropoiesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Med	6. 最初と最後の頁 2595-2603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijmm.2018.3806.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Luo H, Nishi K, Ishikura S, Swain A, Morishige N, Yazaki R, Ohshima T, Shirasawa S, Tsunoda T.	4. 巻 38
2. 論文標題 Growth Suppression of Human Colorectal Cancer Cells with Mutated KRAS by 3-Deaza-cytarabine in 3D Floating Culture.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4247-4256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12721.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto H, Matsukawa T, Doi S, Tsunoda T, Sawata Y, Naemura M, Ohnuki K, Shirasawa S, Kotake Y.	4. 巻 442
2. 論文標題 A novel resveratrol derivative selectively inhibits the proliferation of colorectal cancer cells with KRAS mutation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cell Biochem	6. 最初と最後の頁 39-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-017-3191-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naemura M, Kuroki M, Tsunoda T, Arikawa N, Sawata Y, Shirasawa S, Kotake Y.	4. 巻 38
2. 論文標題 The Long Noncoding RNA OIP5-AS1 Is Involved in the Regulation of Cell Proliferation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 77-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inozume T, Tsunoda T, Morisaki T, Harada K, Shirasawa S, Kawamura T.	4. 巻 45
2. 論文標題 Acquisition of resistance to vemurafenib leads to interleukin-10 production through an aberrant activation of Akt in a melanoma cell line.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1434-1439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14651.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inozume T, Tsunoda T, Morisaki T, Harada K, Shirasawa S, Kawamura T.	4. 巻 45
2. 論文標題 Acquisition of resistance to vemurafenib leads to interleukin-10 production through an aberrant activation of Akt in a melanoma cell line.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1434-1439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14651.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 角田俊之, 西憲祐, 白澤専二
2. 発表標題 変異KRAS関連シグナルが活性化した癌細胞の増殖はVDAC1およびKDELRL1の2重調節剤により抑制される.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角田俊之, 橋本小百合, 永井正義, 西憲祐, 石倉周平, 白澤専二.
2. 発表標題 VDACおよびKDELを標的とする低分子化合物STAR2は変異KRAS関連シグナルを抑制する.
3. 学会等名 第24回バイオ治療法研究会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角田俊之
2. 発表標題 難治性腫瘍に対する副作用の少ない抗がん剤
3. 学会等名 2020イノベーションジャパン
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角田 俊之
2. 発表標題 難治性腫瘍に対する副作用のない抗がん剤
3. 学会等名 2019イノベーションジャパン
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角田俊之, 西憲祐, 白澤専二
2. 発表標題 変異KRAS関連シグナルが活性化した癌細胞株の増殖を抑制する低毒性化合物
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角田俊之, 西憲祐, 石倉周平, 梅林雅代, 森崎隆, 猪爪隆史, 衣笠哲史, 青木光希子, 二村聡, スウェイン・アンソニー, 吉田陽一郎, 長谷川傑, 鍋島一樹, 坂田俊文, 白澤専二.
2. 発表標題 変異KRASはTNK細胞の腫瘍内浸潤とCD155依存的な免疫逃避を誘導する.
3. 学会等名 第23回バイオ治療研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiyuki Tsunoda.
2. 発表標題 Inhibition of PDE4 Triggers Luminal Apoptosis in Human Colorectal Cancer Spheroids.
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. Newry, ME, US. June 10-15 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角田俊之, 西憲祐, 白澤専二
2. 発表標題 3-deaza-cytarabineは3次元浮遊培養において変異KRAS陽性大腸癌細胞塊の増殖を抑制する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会, 大阪, 9月27-29日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角田俊之, 西憲祐, 羅昊, 梅林雅代, 森崎隆, 白澤専二
2. 発表標題 KRAS変異大腸癌細胞塊とCytokine-activated killer細胞の共培養系におけるCD155/TIGIT経路の役割の解析
3. 学会等名 第22回バイオ治療研究会学術集会, 東京, 12月8日
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ピラゾール誘導体及び医薬組成物	発明者 白澤 専二、角田 俊之、大嶋 孝志、矢崎 亮、末永正彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-017307	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 フェニルテトラヒドロピリドインドール誘導体及び医薬組成物	発明者 白澤 専二、角田 俊之、大嶋 孝志、矢崎 亮	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-147801	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Institute of Cardiovascular & Medical Sciences https://www.gla.ac.uk/researchinstitutes/icams/staff/georgebaillie/ Institute of Cardiovascular & Medical Sciences https://www.gla.ac.uk/researchinstitutes/icams/staff/georgebaillie/
--

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
研究分担者	白澤 専二 (Shirasawa Senji) (10253535)	福岡大学・医学部・教授 (37111)	

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		
英国	University of Glasgow		