

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07230

研究課題名(和文) Ras阻害剤による乳がん骨転移抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of suppressing breast cancer bone metastasis by Ras inhibitors

研究代表者

吉川 陽子 (Yoshikawa, Yoko)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命准教授

研究者番号：50775864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究を通じて、申請者らが独自に開発したRas阻害物質：Kobe0065が、細胞レベルで難治性triple-negative breast cancer (TNBC)の細胞遊走や細胞増殖を阻害することを示した。さらに個体レベルにおいて、Kobe0065がTNBCの骨転移と腫瘍増殖を顕著に阻害したことから、Ras阻害物質はTNBCを標的とした抗腫瘍および抗転移活性を有する画期的な新薬になる可能性が示唆された。さらに、Kobe0065はマウスに異種移植したTNBCの腫瘍増殖抑制および腫瘍内でのRasシグナル伝達経路の下流因子ERKの活性化を阻害することをex-vivoレベルで確認するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ras阻害剤の開発研究は、多くの世界的有名製薬企業においてのみならず、米国にてRas阻害剤開発の巨大プロジェクトが発足するなど競争激化の様相を呈している。2021年になりKRasG12Cを標的とした分子標的薬ソトラシブが承認されたが、そのニーズはがん全体の約1%と非常に小さく、がん全体の約30%を占める他の活性型変異Rasに対する分子標的薬の開発が切望されている。申請者らが独自に開発したRas阻害物質は、他の化合物とは作用機序が大きく異なり、また本研究成果である難治性乳がんに対する腫瘍増殖抑制や転移抑制作用の確認は、世界初の革新的なRas分子標的がん治療薬の開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that the Ras inhibitor, Kobe0065, which was originally developed by us, inhibits cell migration and proliferation of intractable triple-negative breast cancer (TNBC) at the cellular level. Furthermore, Kobe0065 markedly inhibited TNBC bone metastasis and tumor growth in vivo, suggesting that Ras inhibitors may become a breakthrough new drug with anti-tumor and anti-metastasis activity targeting TNBC. Finally, xenografted assay of TNBC in mice showed that Kobe0065 inhibits the tumor growth and the activation of ERK, a downstream molecule of the Ras signaling pathway at the ex-vivo level.

研究分野：がん創薬

キーワード：がん 抗がん剤 Ras LOX がん増悪 がん転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本国民の死因の第一位疾患はがんであり、がん制圧のための治療薬の開発は、国民の健康増進を図る上での危急的課題である。*ras* がん遺伝子産物 Ras (H-, N-, K-Ras) は、がん全体の約 30%においてその突然変異による恒常的活性化が認められ、特に大腸がんでは約 60%、膵臓がんでは約 90%と極めて高頻度に活性化が確認されていることから、Ras を分子標的とした抗がん剤の開発研究が世界中で繰り広げられている。申請者らは、不活性型 Ras の分子表面に低分子有機化合物が結合可能なポケット構造を世界で初めて発見し、このポケットに結合して Ras の活性化を阻害する Ras 阻害物質の同定に成功した。この Ras 阻害物質は、Ras と Raf やホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) など種々の下流エフェクターとの結合を阻害することにより個体レベルで市販薬に匹敵する腫瘍増殖抑制作用を示した (Shima F & Yoshikawa Y (co-first author), *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110 8182-8187, 2013)。さらに、PI3K およびその下流因子 AKT の活性化を制御することにより、がん転移に密接な関与が示唆されているリシルオキシダーゼ (LOX) の発現制御を介したがん転移抑制作用を示したことから、Ras 阻害物質は腫瘍の増殖のみならず転移をも阻止する市販薬にはない革新的な抗がん剤の開発候補になりうる可能性が示唆された {Yoshikawa Y, *et al.* Cancer Letters pii: S0304-3835(17)30567-0, 2017}。

(2) 近年、乳がんの骨転移に LOX が重要な役割を果たすことが報告された (Cox TR, *et al.* Nature 522 106-110, 2015)。乳がんは女性がん患者の最大の死因であり、その死因のほとんどは遠隔臓器、特に骨への転移が原因となっている。骨転移は、転移性乳がん患者の 80%以上にもおよび、その多くが治療不能となることから、治療法確立のための骨転移を引き起こす分子メカニズムの解明は、がん研究における重要課題となっており、LOX がその分子メカニズム解明の糸口になると期待されているが、Ras の関与は未だ報告されていない。

(3) 元来、原発性乳がんにおける活性型 Ras 変異の頻度は低く、Ras シグナル伝達経路阻害を利用した乳がんの治療戦略は効果が低いと予想されていた。しかしながら実際は、転移能を獲得した高悪性化乳がん (Triple Negative Breast Cancer: TNBC) の約 80%において、Ras の上流因子である EGFR (epidermal growth factor receptor) の過剰発現 (von Linting FC, *et al.* Breast Cancer Research Treatment 51-62, 2000) や Ras の下流因子 MEK のリン酸化阻害剤 AZD6244 による骨転移病変での乳がん細胞増殖抑制が報告されている (Bosma NA, *et al.* OncoScience 1 821-829, 2014)。

2. 研究の目的

以上のことから、TNBC の骨転移やがん細胞増殖において Ras シグナル伝達経路の関与の可能性が示唆された。そこで本研究では、TNBC の骨転移および転移巣での腫瘍の増殖における Ras の関与を培養細胞レベルおよび個体レベルで検証し、その機構を解明する。そして、申請者らが同定した Ras 阻害物質をツール化合物として利用することにより、Ras 阻害物質が乳がんの骨転移やがん増殖を阻止できる新規抗がん剤として抗がん剤開発に新局面を開拓する可能性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) TNBC における LOX や EGFR の発現レベルを確認することにより、TNBC が本研究の研究対象になりうるかどうかを検討する。

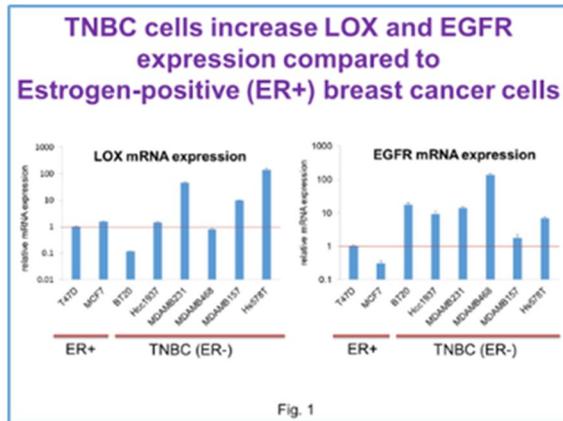
(2) TNBC を申請者らが同定した Ras 阻害物質: Kobe0065 もしくは Ras の siRNA で処理することにより、Ras が TNBC の細胞遊走や細胞増殖に与える影響について解析する。また細胞内での LOX 発現および Ras シグナル伝達経路の下流因子の活性化 (リン酸化) レベルを解析することにより、その機構について解明する。

(3) 骨転移モデルマウスを用いた骨転移試験を実施し、Kobe0065 が乳がんの新規骨転移抑制剤として世界に発信できるか検証する。検証方法としては、TNBC 細胞株 MDA-MB-231 をマウス尾動脈に移植すると同時にマウスへの Kobe0065 の連続投与 (5 投 2 休) も開始する。一か月後、マウス後肢 (大腿骨および脛骨) を取り出し、固定および脱灰後に骨切片を作成し、マッソントリクロムによる組織学的染色を実施して、Kobe0065 が転移組織 (病巣) に与える影響について詳細な解析を行う。

(4) TNBC 細胞株 MDA-MB-231 をヌードマウスに異種移植し、Kobe0065 が腫瘍増殖に与える影響について検証すると共に、腫瘍内での Ras シグナル伝達経路の下流因子の活性化 (リン酸化) レベルを解析することにより、腫瘍増殖に対して Ras 阻害物質が与える影響について *ex-vivo* レベルで解明する。

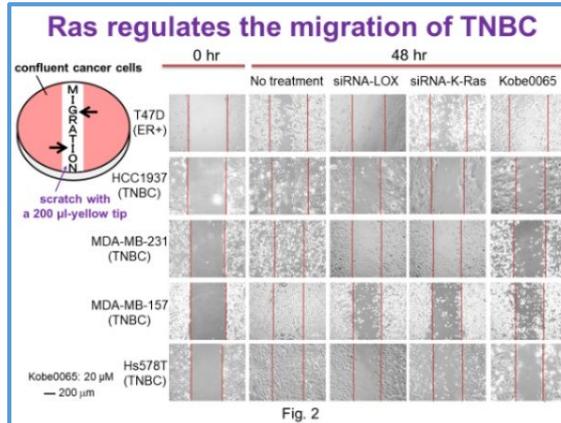
4. 研究成果

(1) まず、TNBCにおけるLOXやEGFRの発現を mRNA レベルで確認したところ、non-TNBC と比較して、LOX や EGFR の発現レベルが上昇していることが確認できた。このことから、TNBCでのLOXやEGFRに関するRasシグナル伝達経路関与の検証は可能と判断した (Fig. 1)。

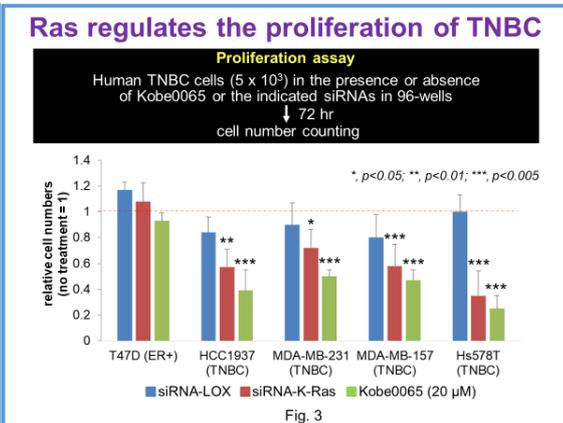


(2) 次に、TNBCをKobe0065もしくはRasのsiRNAで処理したところ、TNBCの細胞遊走や細胞増殖の抑制が確認できたことから、Rasの関与が示唆された。一方、non-TNBCでは、上記の処理による細胞遊走や細胞増殖への影響は確認できなかった (Fig. 2&3)。

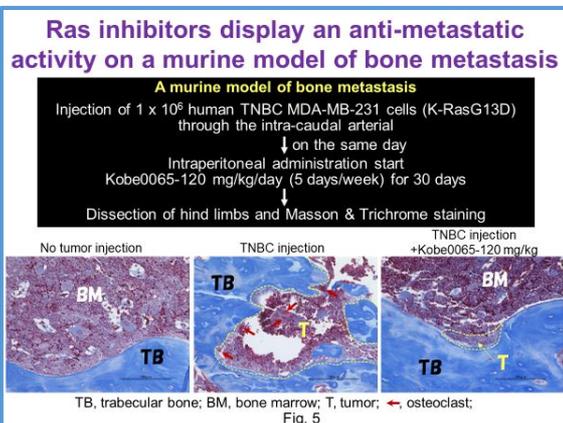
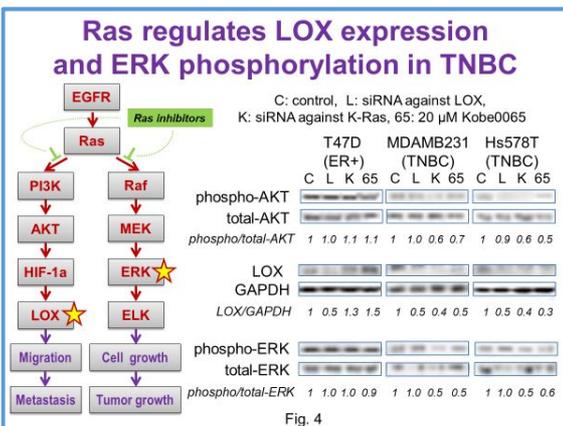
上記処理後の細胞内のRasシグナル伝達経路



の下流因子AKTやERKの活性化レベルおよびLOXの発現レベルをWestern blottingにより解析したところ、AKTのリン酸化阻害を介したLOXの発現阻害、そしてERKのリン酸化阻害を確認することができたことから、TNBCにおいて、RasによるAKT-LOXを介したがん転移、およびERKを介したがん細胞増殖の制御が示唆された (Fig. 4)。



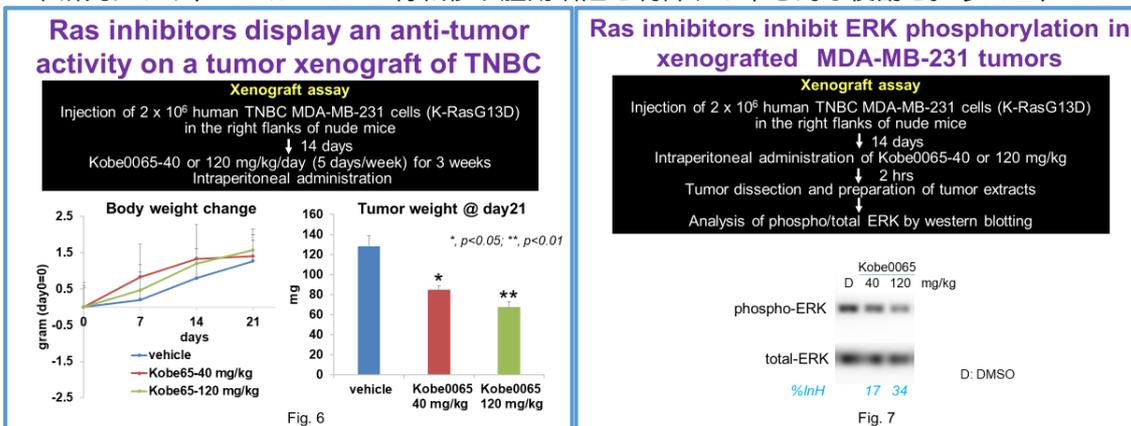
(3) そして、骨転移モデルマウスを用いた骨転移試験を実施し、Kobe0065が新規乳がん骨転移抑制剤としての有用性を検証した。その結果、Kobe0065はTNBCの骨転移巣でのがん細胞増殖を著しく阻害するとともに、骨吸収を行う破骨細胞の減少を示したことから、Ras阻害物質は難治性TNBCの骨転移や腫瘍増殖を抑制する画期的な抗がん剤になり得る可能性が示唆された。(Fig. 5)。



(4) 最後に、ヌードマウスを用いたxenograft試験において、Kobe0065は濃度依存的にTNBCの腫瘍増殖抑制を示すと同時に、腫瘍内においてERKのリン酸化阻害を示したことから、Ras阻害

物質による腫瘍増殖抑制は Ras/Raf/MEK/ERK シグナル伝達阻害を介することを ex-vivo で確認することができた (Fig. 6&7)。

本研究により、Ras は TNBC の骨転移や腫瘍増殖を制御する中心的な役割を担うこと、そして



Ras 阻害物質である Kobe0065 はこれまで治療不能と考えられていた TNBC の骨転移抑制や転移巣での腫瘍増殖抑制作用を示す新規抗がん剤としての可能性が示唆されるに至った。本研究の成果は、抗がん剤開発に新局面を開拓するだけでなく、世界初の革新的な Ras 分子標的がん治療薬の開発につながると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoko Yoshikawa
2. 発表標題 Ras inhibitors: Potential agents having both anti-proliferative and anti-metastatic properties
3. 学会等名 Asia Pacific Society for Biology and Medical Sciences Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoko Yoshikawa
2. 発表標題 Role of Ras in triple-negative breast cancer
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 RasRaf結合阻害化合物	発明者 吉川 陽子、等	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-125013	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------