

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07957

研究課題名(和文) KRAS変異に制御される遺伝子の機能解析と革新的治療薬の開発

研究課題名(英文) An anticancer strategy of genes driven by KRAS-activating mutations

研究代表者

大浪 俊平 (Ohnami, Shumpei)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・主任研究員

研究者番号：60291142

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)：大腸癌(CRC)ではKRASドライバー変異が高頻度に検出されるが、KRAS変異型を標的とした効果的な治療薬は無い。本研究では、KRAS野生型CRC (n=390)とKRAS codon12変異(KRAS G12) CRC (n=240)を対象として網羅的遺伝子発現解析を行い、治療標的候補遺伝子を選抜した。6種類のKRAS G12変異体(G12A, -C, -D, -R, -S, -V)を正常細胞および大腸癌細胞株に遺伝子導入することにより候補遺伝子のvalidationを行い、KRAS G12変異型の下流で発がん過程を促進するパートナー遺伝子としてBMP4、PHLDA1遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌では軽度異型粘膜の段階からKRASドライバー変異が認められる。従って、RAS経路はKRAS変異型大腸癌に対して魅力的な分子標的であるが、大腸癌に対するKRASシグナル伝達経路を標的とする明確な臨床治療薬は未だ存在しない。もし、大腸癌の約半数を占めるKRAS変異を阻害する分子標的薬が開発されれば、その恩恵を受ける患者さんは膨大な数に上る。報告者は遺伝的背景の異なる癌患者の新鮮凍結組織を用いた解析から、「KRAS変異によって制御されている遺伝子が癌形質獲得や悪性度の高い癌の鍵を握っている」という信念で、真の創薬ターゲットを同定し、革新的な治療薬開発の基盤を構築し、国際誌に発表した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified potential effector molecules, based on differences in gene expression between CRC patients carrying wild-type KRAS (n=390) and those carrying KRAS mutations in codon 12 (n=240). CRC patients with wild-type KRAS harboring mutations in HRAS, NRAS, PIK3CA, PIK3CD, PIK3CG, RALGDS, BRAF, or ARAF were excluded from the analysis. At least 11 promising candidate molecules showed greater than two-fold change between the KRAS G12 mutant and wild-type and had a Benjamini-Hochberg-adjusted P value of less than 1E-08, evidence of significantly differential expression between these two groups. Among these 11 genes examined in cell lines transfected with KRAS G12 mutants, BMP4, PHLDA1, and GJB5 showed significantly higher expression level in KRAS G12A, G12D, and G12V transfected cells than in the wild-type transfected cells. We expect that this study will lead to the development of novel treatments that target signaling molecules functioning with KRAS G12-driven CRC.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：KRAS BMP4 PHLDA1 Colon cancer

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

KRAS 遺伝子は細胞の増殖、分化、代謝そして細胞死に至るまで様々な過程に関わる極めて重要な遺伝子である。KRAS 遺伝子は、癌ドライバー遺伝子として多くの癌組織に見つかっている。従って KRAS 阻害剤が開発されれば、その恩恵を受ける患者さんは膨大な数に上る。大腸癌では抗 EGFR 抗体薬が分子標的薬として承認されているが、KRAS 野生型症例という条件が付く。従って、大腸癌患者の約半数を占める KRAS 変異症例には利益(延命効果や縮小効果)が得られない。KRAS の活性化型である KRAS-GTP は、BRAF, PI3K, RALGDS などのエフェクター蛋白質と結合し、下流のシグナルを活性化し発癌過程に関与する。これまで KRAS を直接標的とする阻害剤の開発が行われてきたが、KRAS は GTP との結合が極めて強固であることに加え、阻害剤が入り込むポケットが見つからないという分子構造を持ち、KRAS 阻害剤の開発は極めて困難であるとされている。最近 KRAS コドン 12 の G12C 変異を対象にし、薬剤を変異したシステインに共有結合させて KRAS 機能を抑制する戦略が報告されたが、インビトロで分子機能を阻害するという段階である。KRAS 遺伝子は、ほとんど全ての正常細胞で発現しているハウスキーピング遺伝子であり、KRAS を直接標的とする戦略は、逆に癌細胞の増殖に有利な環境を獲得する可能性も指摘されている。一方、KRAS の下流で働く分子や、KRAS により新たに生まれる癌の弱点に対する治療法も数多く報告されているが、実験結果に矛盾が認められる事も指摘されている。また、その多くは細胞株レベルでの成果であり、インビボにおける下流遺伝子の選択のメカニズムと、その結果として生じる細胞運命の決定機構は十分に明らかにされていない。すなわち、ヒトにおける多くの癌種についての KRAS 遺伝子経路の遺伝子変異や遺伝子発現の異常を同時に解析したシスマティックな研究が不足している。

### 2. 研究の目的

本研究は、多症例の新鮮癌組織について、KRAS シグナル経路に関する遺伝子異常の全体像を明らかにし、特に大腸癌の全エクソーム解析(WES)、全遺伝子発現解析(GEP)から遺伝子異常プロファイルや患者の背景因子等の情報に基づいて、KRAS-G12 変異活性化シグナルによって誘導される新規の KRAS 活性化パートナー遺伝子を同定し、大腸癌発症に繋がる分子機構の解明並びに分子標的予防開発、創薬標的分子としての新たな治療法の開発を行う。

### 3. 研究の方法

大腸癌における腫瘍特異的な遺伝子異常を同定するために腫瘍組織および対応する末梢血の DNA サンプルについて WES とがん遺伝子パネル解析(CCP)を行った。同時に腫瘍組織および腫瘍隣接正常組織について GEP を行った。標的領域の WES と CCP の平均リード深部は、それぞれ 115 と 1027 であった。

### 4. 研究成果

大腸癌 906 例における KRAS 変異は 41% (372/906) に検出された。KRAS 変異の WES と CCP の一致率は、91.4% (340/372) であった。KRAS 変異を示した大腸癌の間で、KRAS G12 変異は 64.5% (240/372)、G13 変異は 20.2% (75/372)、次いで A146 変異 8.1% (30/372)、Q61 変異 2.7% (10/372)、K117 変異 2.7% (10/372)、Q22 変異 0.5% (2/372)、A59 変異 0.5%、A14 変異 0.3% (1/372)、G77 変異 0.3%、Y64 変異 0.3% であった。KRAS G12 変異の内訳は、G12D が 47.9% (115/240) で、次いで G12V 26.3% (63/240)、G12A 9.2% (22/240)、G12C 8.8% (21/240)、G12S 5.8% (14/240)、G12R 2.1% (5/240) であった。KRAS 変異大腸癌では、PIK3CA 変異は 23.1% (86/372) と最も頻度が高く、KRAS 変異大腸癌と比較して、KRAS 野生型大腸癌では、PIK3CA に加えて、BRAF、PIK3CG、PIK3CD、NRAS の頻度が高かった。特記すべきは、RALGDS は、KRAS 野生型大腸癌のみに検出された。全体的に RAS 関連遺伝子の変異は、野生型 KRAS 症例で頻度が高かった。KRAS 経路における既知の下流遺伝子のうち、KRAS 変異大腸癌では CCND1、DUSP2、DUSP4、ETS2、JUN、RAC2、RAC3、SPRY4、ELK1、RALGDS と RASAL1 の発現が上昇していた。一方、CCND1、DUSP2、ETS2、JUN、RALGDS の発現は、別途解析した KRAS 変異肺腺癌 (n=55) や KRAS 変異膵腺癌 (n=20) では発現が逆に減少していた。このことは、既に理解されている RAS 蛋白質の下流シグナルカスケードの RAF/MAPK/ERK、PI3K/AKT と RALGDS/RAL シグナルは、腫瘍タイプにより異なると考えられた。特記すべきは、KRAS 変異大腸癌では転写因子の ETS2、JUN、ELK1 が上方制御されており、これらの転写因子が治療標的になりうる可能性が示された (図 1)。次に、KRAS G12 変異に対する新しい治療標的を探索するために、KRAS G12 変異大腸癌 240 例と KRAS 野生型大腸癌 389 例の GEP を比較した。KRAS 野生型については、HRAS、NRAS、PIK3CA、PIK3CD、PIK3CG、RALGDS、RGL1-3、BRAF、ARAF、RAF1 に変異を有する症例を解析から除外した。なぜならこれらの遺伝子の変異は、KRAS 介在のシグナルに影響するからである。KRAS G12 変異大腸癌と KRAS 野生型大腸癌の APC の変異は、それぞれ 79.6% (191/240) および 75.1% (292/389) で、両者の間に有意差は認めなかった ( $P=0.21$ )。両者の間で KRAS G12 変異大腸癌において発現の上昇している遺伝子を 11 遺伝子同定した (Benjamini-Hochberg adjusted  $p$ -value <  $1E-08$  かつ発現差が 2 倍以上)。

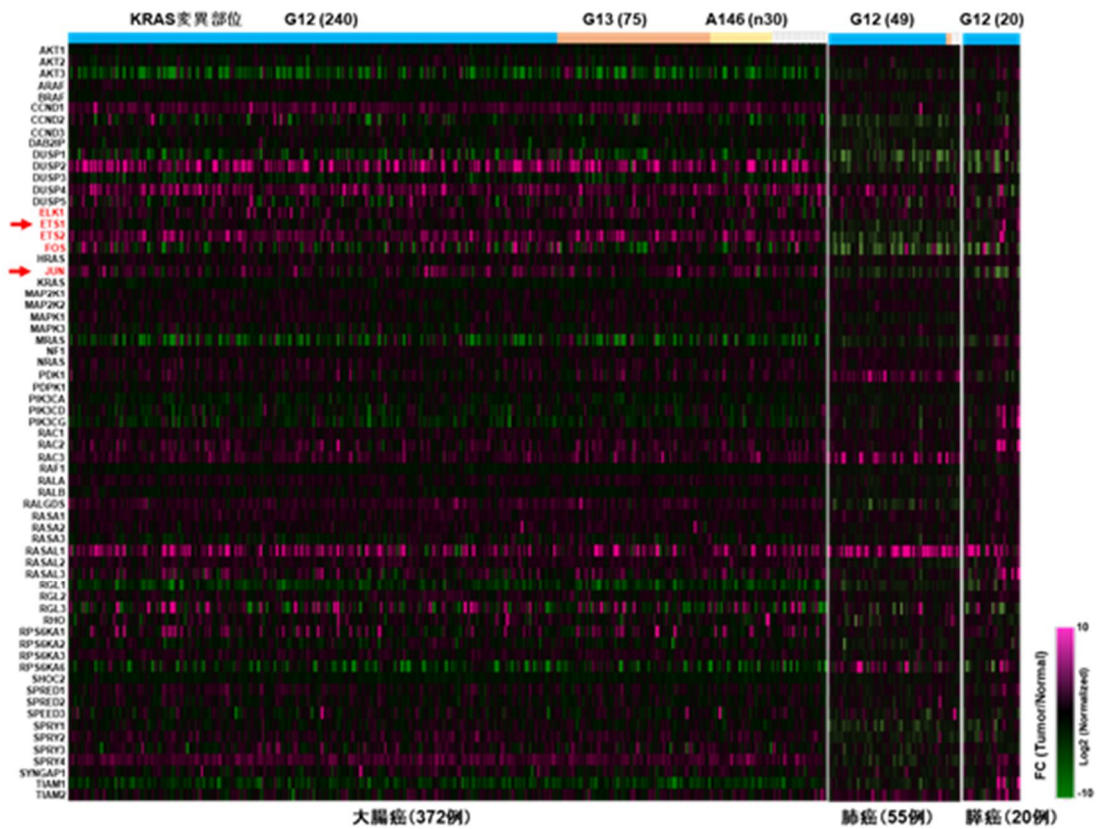


図1 KRAS 変異大腸癌(n=372)、KRAS 変異肺癌(n=55)、KRAS 変異膵癌(n=20)のRAS 関連分子(NCI)の遺伝子発現。たとえば赤で示した転写因子、ELK1, ETS1/2, FOS, JUNは大腸癌では発現が高いが、肺癌、膵癌では低い

KRAS G12 変異大腸癌における候補遺伝子のKRAS G12 発現誘導を評価するために、KRAS G12 バリエーションプラスミド、pKRAS-wt (野生型)、pKRAS-A (G12A)、pKRAS-C (G12C)、pKRAS-D (G12D)、pKRAS-R (G12R)、pKRAS-S (G12S)、pKRAS-V (G12V)を作成し、これらを293正常腎細胞株に遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞株における各バリエーションベクターの発現レベルは、定量的RT-PCRを用いて分析した。11候補遺伝子の発現誘導レベルは、KRAS変異型の種類によって変動を認められたが、G12A、G12D、G12Vの変異体で特に発現誘導を認めた。11遺伝子の中で、BMP4、PHLDA1、GJB5の3遺伝子は、これらのKRAS変異体によって有意に発現誘導された(図2)。次にこれら3遺伝子についてKRAS、PIK3CAおよびBRAF野生型をもつ大腸癌細胞株、Caco-2細胞株に遺伝子導入して再バリエーションを行った。これら3遺伝子については正常腎細胞と同様にG12A、G12D、G12Vにおいて発現誘導された。

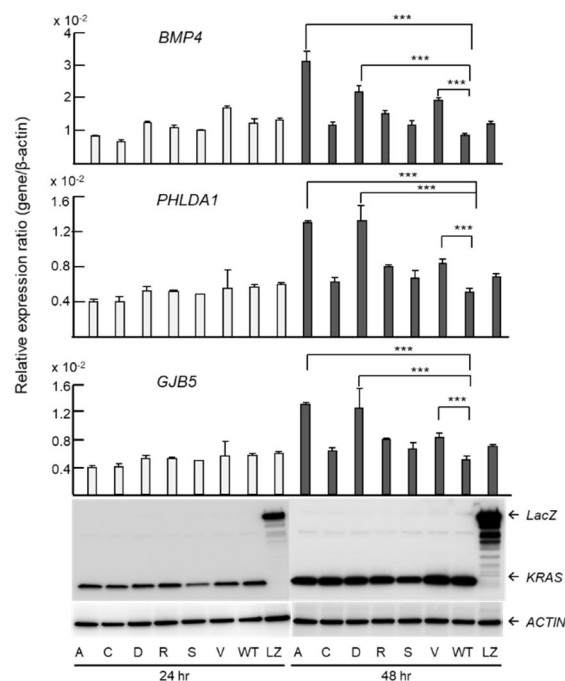


図2 KRAS 野生型正常細胞株へのKRAS G12 変異体導入による発現誘導 (\*\*\*)P値<0.001) 上段は最終的に絞り込んだ治療薬候補のmRNA発現、下段は蛋白質発現を示す。

以上の結果を基に、(1)RAF や MEK 阻害剤などの MAPK 垂直経路阻害剤と今回同定したパートナー遺伝子との阻害剤を同時併用する共経路阻害に的を絞ったインビトロでの検証 (2) 本パートナー遺伝子の cDNA 発現ベクターによる増殖や細胞死、接着性、浸潤・運動能の解析 (3) 大腸癌で G12 変異の 85%を占める KRAS G12D、G12V および G12A を有するヒト大腸癌細胞のゼノグラフトモデルにおけるインビボでの検証、等を行い、KRAS G12 変異を有するヒト大腸癌に対する効果的な創薬標的分子としての開発を順次進め興味ある結果を得ているが、今後科研費取得の目途が立った時点で再開する予定である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shumpei Ohnami, Kouji Maruyama, Kai Chen, Yu Takahashi, Keiichi Hatakeyama, Keiichi Ohshima, Yuji Shimoda, Ai Sakai, Fukumi Kamada, Sou Nakatani, Akane Naruoka, Sumiko Ohnami, Masatoshi Kusuhara, Yasuto Akiyama, Hiroyasu Kagawa, Akio Shiomi, Takeshi Nagashima, Kenichi Urakami, Ken Yamaguchi	4. 巻 476
2. 論文標題 BMP4 and PHLDA1 are plausible drug-targetable candidate genes for KRAS G12A-, G12D-, and G12V-driven colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-021-04172-8	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 Takeshi Nagashima, Ken Yamaguchi, Kenichi Urakami, Yuji Shimoda, Sumiko Ohnami, Keiichi Ohshima, Tomoe Tanabe, Akane Naruoka, Fukumi Kamada, Masakuni Serizawa, Keiichi Hatakeyama, Kenya Matsumura, Shumpei Ohnami, et. al	4. 巻 111
2. 論文標題 Japanese version of The Cancer Genome Atlas, JCGA, established using fresh frozen tumors obtained from 5143 cancer patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 687-699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14290	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大浪俊平
2. 発表標題 KRAS G12変異大腸がんにおける治療標的遺伝子の同定
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大浪俊平
2. 発表標題 大腸がんにおいてKRAS G12変異により発現誘導される遺伝子の同定
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------