

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23909

研究課題名(和文) KRAS変異固形癌に対するSHP2阻害剤の臨床応用への基盤解明

研究課題名(英文) Molecular and clinical characterization of sensitivity to SHP2 inhibition in KRAS-mutant cancers

研究代表者

加納 嘉人 (Kano, Yoshihito)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：10633125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：KRAS遺伝子は肺癌や膵癌などの難治性癌においてその変異率が非常に高いものの、その立体構造等から特定の変異型以外では治療標的にはなり得ていない。近年申請者らは世界に先駆けて発癌性ホスファターゼであるSHP2がRASチロシンリン酸化を厳密に制御し、SHP2阻害がKRAS変異のある膵癌や肺癌で抗腫瘍効果を発揮することを示した。この結果を基盤とし、KRASQ61Hを有する肺癌や膵癌モデルにおいてSHP2阻害剤が抵抗性を示すことを明らかとした。Q61H変異ではチロシンリン酸化によりRAF結合・下流シグナルに与える影響は認めず、SHP2阻害剤を投与しても治療的効果が限定されると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SHP2は脱リン酸化酵素として初のがん遺伝子であり、機序は不明ながらKRASシグナルに深く関与する一方で、KRASと同様に長らくundruggable targetと考えられていた。しかし近年SHP2に対する低用量かつ経口投与可能な薬剤が開発されている。今回申請者はKRASとSHP2を直接関連づけるメカニズムとしてKRASリン酸化モデルを提唱した。さらに特定の変異型に対するSHP2阻害の感受性の違いを明らかとした。SHP2阻害剤は現在Phase I試験中であるがKRAS変異型による感受性の差を考慮した臨床試験のデザインが必要であり、今後への提言としたい。

研究成果の概要(英文)：KRAS mutations are found in some of the most aggressive and deadly cancers, including up to 25% of lung cancers to and over 90% of pancreatic cancers. A recent series of reports suggest that SHP2 inhibition (SHP2i) is effective to KRAS-mutated cancers including non-small cell lung and pancreatic cancers. Here, we report that lung and pancreatic cancer cells that harbor KRAS Q61H mutation are uniquely resistant to SHP2i. Our biochemical studies show that the Q61H mutation has negligible impact on binding to BRAF-RBD. Whereas phosphorylation of WT and G12 mutants impairs binding to BRAF-RBD, the uncompromised ability of phosphorylated KRAS Q61H to activate MAPK signaling is retained. The independence of KRAS Q61H from the stimulatory roles of SHP2 in reversing Src phosphorylation confers resistance to SHP2i. Together these insights provide an unprecedented mechanistic understanding of oncogenic KRAS mutants that can guide clinical trials of SHP2i for cancer patients bearing KRAS Q61H.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：KRAS SHP2阻害 Q61変異 クリニカルシーケンス

### 1. 研究開始当初の背景

KRAS 遺伝子はヒトがんの中で最も高頻度に変異しており年地がんにもその変異が多く見られることから最も重要ながん遺伝子と考えられている。しかし、立体構造等から KRAS そのものを標的とすることは非常に困難であった。申請者らは Src キナーゼが KRAS をチロシンリン酸化し、発癌性脱リン酸化酵素である SHP2 がリン酸化を解除することで KRAS を活性化させることを明らかとしている。さらには SHP2 阻害により KRAS 変異癌に対して抗腫瘍効果を確認しており今後の臨床応用が期待される。一方で KRAS の変異型による SHP2 阻害剤の感受性は明らかでなく、網羅的な解析が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では KRAS シグナルに関わる脱リン酸化酵素である SHP2 との直接的なメカニズムの探索または SHP2 を介する様々な変異型 KRAS への治療標的を探ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究ではヒトリコンビナント KRAS、SHP2、Src を用いることで *in vitro* における KRAS リン酸化の動向、さらには MEF 細胞を用いた内在性蛋白において KRAS/SHP2 の直接制御を示す。

一般的な変異型である KRASG12 を有する膵癌や肺癌細胞株、患者由来細胞では SHP2 阻害剤の有効性が示されているものの、他の Q61 などの変異に関して感受性、抵抗性を検討する。

### 4. 研究成果

① 我々は KRAS 野生型、G12 変異を持つ膵癌細胞株に対し SHP2 阻害剤 (11a-1, SHP099) のスクリーニングをおこなった。野生型、G12 変異では良好な感受性を示した。しかし一方で Q61H 変異を持つ細胞株では SHP2 阻害剤に対し治療抵抗性を示すことを明らかとした (図 1)。KRAS Q61H 変異は近年膵癌において 5-10% の頻度で変異していることが注目されている。さらに我々は HEK293 細胞へ KRAS Q61H を過剰発現させた安定細胞株を作成し、KRAS 野生型あるいは G12D/V 変異の過剰発現安定株と比較をおこなったところ、膵癌細胞株と同様に SHP2 阻害剤に対する感受性低下を示した。これらのことから、SHP2 阻害が KRAS の変異型により感受性が異なることを示され、さらには KRAS が SHP2 から受ける制御のメカニズムも異なることが示唆された。

② 我々は KRAS 野生型ならびに G12 変異型では Src キナーゼによりチロシンリン酸化を受けることでエフェクターである RAF との結合能は低下し、下流 MAPK の活性化を低下させることを示した。今回初めて KRASQ61H が同様にリン酸化を受けるか解析を行なった。Nuclear magnetic resonance (核磁気共鳴) や Mass spectrometry (質量分析法) を用いることで Q61H が Src により特異的に Y32/64 にてリン酸化を受け、立体構造が劇的に変化することを示した。一方で野生型や G12 変異と異なり、Q61H 変異では GTP サイクルが不変であることに加え、チロシンリン酸化を受けても RAF 結合・下流シグナルに与える影響は認めなかった。そのため RAS リン酸化を調節する SHP2 阻害剤を投与しても治療的効果が限定されたと考えられた (図 2)。さらに KRAS 変異型による SHP2 阻害剤の有効性の違いは膵癌細胞株だけではなく、肺癌細胞株においても同様であり、KRAS 変異がドライバー遺伝子として働いている癌に対し臓器横断的に認められる現象であることが示された。

③細胞株レベルで SHP2 阻害剤の有効性を示してきたが、スフェロイド培養や腫瘍オルガノイド培養を用いることでより生体内での環境に近い状態で解析を行った。KRASQ61H 変異を持つ膵癌オルガノイドにおいても SHP2 阻害剤に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。

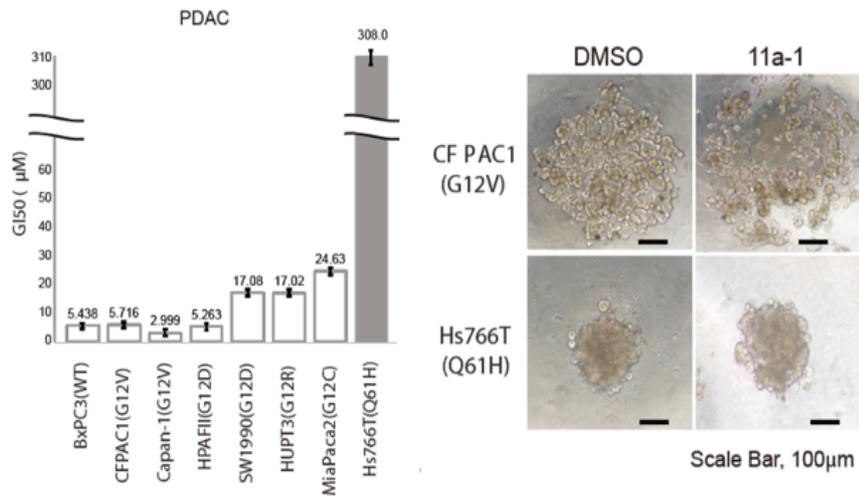


図1. 膵癌細胞株に対するSHP2阻害剤の効果. KRASQ61H変異は抵抗性を示す. (左図) 通常培養. (右図) スフェロイド培養.

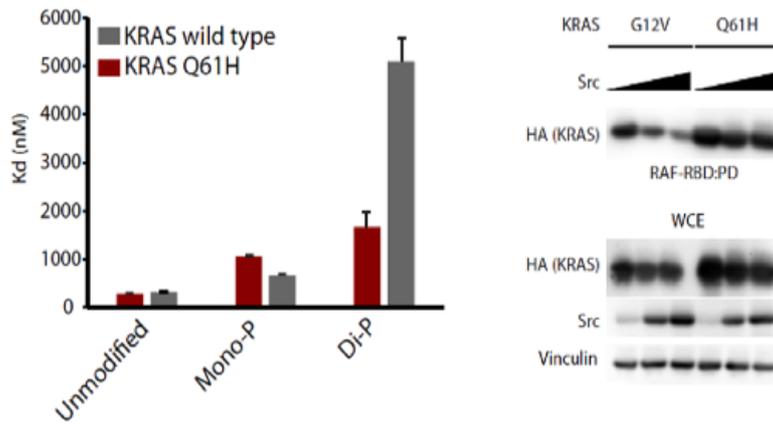


図 2. KRASQ61Hリン酸化はRAF結合に影響を与えない

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Gebregiworgis Teklab, Kano Yoshihito, St-Germain Jonathan, et. al.	4. 巻 12
2. 論文標題 The Q61H mutation decouples KRAS from upstream regulation and renders cancer cells resistant to SHP2 inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-26526-y	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aoyagi Yasuko, Kano Yoshihito, Tohyama Kohki, et.al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Clinical utility of comprehensive genomic profiling in Japan: Result of PROFILE-F study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0266112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0266112	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsudera Shotaro, Kano Yoshihito, Ikeda Sadakatsu	4. 巻 -
2. 論文標題 ASO Author Reflections: Impact of Liquid Biopsy Using Plasma Cell-Free DNA in Solid Tumors in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-021-09858-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsudera Shotaro, Kano Yoshihito, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 A Pilot Study Analyzing the Clinical Utility of Comprehensive Genomic Profiling Using Plasma Cell-Free DNA for Solid Tumor Patients in Japan (PROFILE Study)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-021-09856-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liotti Federica, Kumar Narender, Prevete Nella, Marotta Maria, Sorriento Daniela, Ieran? Caterina, Ronchi Andrea, Marino Federica Zito, Moretti Sonia, Colella Renato, Puxeddu Efiso, Paladino Simona, Kano Yoshihito, Ohh Michael, Scala Stefania, Melillo Rosa Marina	4. 巻 40
2. 論文標題 PD-1 blockade delays tumor growth by inhibiting an intrinsic SHP2/Ras/MAPK signalling in thyroid cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-020-01818-1	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 Katsukura Nobuhiro, Watanabe Sho, Shirasaki Tomoaki, Hibiya Shuji, Kano Yoshihito, Akahoshi Keiichi, Tanabe Minoru, Kirimura Susumu, Akashi Takumi, Kitagawa Masanobu, Okamoto Ryuichi, Watanabe Mamoru, Tsuchiya Kiichiro	4. 巻 112
2. 論文標題 Intestinal phenotype is maintained by Atoh1 in the cancer region of intraductal papillary mucinous neoplasm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 932 ~ 944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14755	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 Valencia-Sama Ivette, Ladumor Yagnesh, Kee Lynn, Adderley Teresa, Christopher Gabriella, Robinson Claire M., Kano Yoshihito, Ohh Michael, Irwin Meredith S.	4. 巻 80
2. 論文標題 NRAS Status Determines Sensitivity to SHP2 Inhibitor Combination Therapies Targeting the RAS-MAPK Pathway in Neuroblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3413 ~ 3423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-3822	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

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 YOSHIHITO KANO, Teklab Gebregiworgis, Christopher Marshall, Mitsuhiko Ikura, Satoshi Miyake, Michael Ohh.
2. 発表標題 KRAS Q61H mutation evades the regulation of tyrosyl phosphorylation and renders cancer cells resistant to SHP2 inhibitor.
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 加納嘉人、野地理夏、山下大和、工藤亮、大西威一郎、谷本幸介、宮冬樹、中川剛士、石川敏昭、植竹宏之、絹笠祐介、田邊稔、朝蔭孝宏、原田浩之、岡本隆一、三宅智、池田貞勝
2. 発表標題 Detection of RAS mutation in solid cancers using NGS-based genome profiling tests.
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 加納 嘉人,野地 理夏, 山下 大和, 工藤 亮, 田崎 彰久, 大野 十央, 有泉 陽介, 平井 秀明, 富岡 寛文, 島本 裕彰, 道 泰之, 三浦 雅彦, 吉村 亮一, 朝蔭 孝宏, 原田 浩之, 岡本 隆一, 三宅 智, 池田 貞勝
2. 発表標題 Clinical utility of tumor-profiling multiplex gene panel testing in advanced head and neck cancer at TMDU.
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 加納嘉人、北畑富貴子、村川美也子、柿沼晴、東正新、中川美奈、井津井康浩、新田沙由梨、三好正人、青柳康子、松寺翔太郎、遠山皓基、田邊稔、三宅智、池田貞勝、朝比奈靖浩。
2. 発表標題 進行肝細胞癌に対するがんゲノム診療における網羅的遺伝子パネル検査の有用性とバイオマーカー探索。
3. 学会等名 第56回日本肝癌研究会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Yoshihito Kano, Teklab Gebregiworgis, Christopher B. Marshall, Mitsuhiko Ikura, Michael Ohh.
2. 発表標題 Evasion of KRASQ61H regulation by tyrosine phosphorylation renders cancer cells resistant to SHP2 inhibitor.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Yoshihito Kano, Teklab Gebregiworgis, Christopher Marshall, Mitsuhiro Ikura, Michael Ohh
2. 発表標題 Inhibition of SHP2 promotes the tyrosyl phosphorylation of KRAS and suppresses the pancreatic cancer growth.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 加納嘉人, Teklab Gebregiworgis, Christopher Marshall, 伊倉 光彦, Michael Ohh.
2. 発表標題 KRASチロシンリン酸化モデルに基づく膵癌新規分子機構と治療戦略
3. 学会等名 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 加納嘉人
2. 発表標題 チロシンリン酸化モデルに基づくKRAS制御機構の解明と治療応用の可能性.
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー「がん研究の新機軸」(招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 加納嘉人
2. 発表標題 Drugging the Undruggable ~新規分子標的治療による難治癌克服への挑戦~.
3. 学会等名 第25回東京西部消化器先端医療勉強会(招待講演)
4. 発表年 2019年～2020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		
カナダ	University of Toronto	University Health Network	