

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659608

研究課題名(和文) セツキシマブ抵抗性難治性大腸癌に対するMicroRNA治療

研究課題名(英文) Identification of microRNA that correctly inhibits KRAS-related downstream signal transduction in KRAS mutant colorectal cancer

研究代表者

山本 浩文 (Yamamoto, Hirofumi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30322184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：非癌細胞HEK293細胞とMRC細胞にKRAS変異を導入し、コントロールと比べ発現の低下する複数のmiRNAをmiRNA arrayによって抽出した。RASの下流のシグナル伝達系RAF-MEK-ERK-SRE、JNUK-AP1を抑えるmiRNA X、Yはいずれもシグナル抑制レベルに応じた抗腫瘍効果を示した。特にmiRNA Xの抗腫瘍効果は強力であり、マウス担瘤モデルでも全身投与による治療効果が確認された。そのメカニズムとしてKRAS下流シグナルのみならず、AKTのcoding配列に結合し、増殖抑制とアポトーシスの激しい更新とが相俟って癌細胞を著しく抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The antiEGFR monoclonal antibodies are effective in patients with metastatic CRC with KRAS wild type. However, KRAS mutant mCRC shows resistance to the antiEGFR antibodies. To identify miRNAs that inhibit KRAS mutant CRCs, we first introduced KRASG12V cDNA into HEK293 and MRC5. After miRNA microarray analyses we searched which candidate miRNAs would inhibit two major KRAS-associated signal transduction pathways using SRE and AP1 luciferase reporter assays. And we found 2 miRNAs. miR-4689 regulated not only RAF/MEK/ERK pathway but also PI3K/Akt pathway by directly binding to both 3'UTR of KRAS and the coding sequence of Akt1. Down-regulation of Akt1 led to sequential induction of pro-apoptotic factors and inhibition of anti-apoptotic molecules. Systemic administration of miR-4689 with super carbonate apatite nanoparticles in nude mice significantly inhibited the growth of pre-established DLD1 xenografts compared to miR-NC with a proof of down-regulation of KRAS and Akt1.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：KRAS colorectal cancer microRNA RAF/MEK/ERK pathway PI3K/Akt pathway carbonate apatite nanoparticle

### 1. 研究開始当初の背景

E G F R 抗体は大腸癌の治療に大きなインパクトを与えた。一世代前ならば終末期に入っていたであろう再発・進行大腸癌患者にさらなる命を与えていることも少なからず経験する。しかし、この治療も K-ras 遺伝子に変異のない大腸癌全体の半数の患者にしか恩恵を与えず、変異のある患者は遺伝子検査の結果を甘受するしかない。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、K-ras 遺伝子に変異のある大腸癌患者の細胞内シグナル伝達を microRNA を操作することで阻害し、E G F R 抗体を投与した場合と同等の抗腫瘍効果を与えることを目的とする。

(2) これまでに KRAS 遺伝子を標的とする microRNA の報告は僅かである。KRAS 下流の RAF-MEK-ERK-SRE を抑えることが KRAS 変異を有する大腸癌の治療に少なくとも必要と考えられている。しかし、MEK 阻害薬を用いると AKT が活性化されるなど、癌細胞を活性化させる feedback 機構が働くため、MEK 阻害だけでは十分といえず、他の分子標的も複合的に阻害する方法が必要である。しかしながら複合分子標的の臨床試験の多くは毒性が強かったり、効果不十分で中止となっている現状がある。

(3) 本研究では microRNA の特性である多分子制御も視野に入れより複合的な癌治療戦略を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト胎児由来腎臓細胞 HEK293、ヒト胎児線維芽細胞 MRC5 に変異型 K-ras 遺伝子を導入。関連シグナルの活性化と microRNA の変化を調べる。癌細胞では多数の遺伝的、エピゲネティックな変化が混在し、KRAS 遺伝子の活性化によって変化する microRNA の同定が複雑になる。そのため遺伝子変異がないかあ

っても少ない非癌細胞株に KRAS 遺伝子を導入することによって、より直接的に関連する microRNA を同定をめざす。シグナルの活性化を抑止するような microRNA を見出す。KRAS 遺伝子導入前と後の細胞株より RNA を抽出し、miR array によって差違の大きな microRNA を同定する。候補の中で Target Scan によって MEK や ERK を標的にする microRNA についても検索する。二つの細胞株で共通して変化している miR について上記の点を勘案し7つの miR を KRAS 変異大腸癌の治療的 miR の候補とした。

(2) 選別にあたっては KRAS 変異による MEK-ERK-SRE シグナル伝達系の活性化を、抑制できる miR を重視した。これは上記のようにこのシグナルを抑えることが KRAS 変異大腸癌治療の必要条件であるからである。また、同じく KRAS 下流の JNUK-AP1 シグナルについての活性抑制能も検索した。

(3) 得られた miR-X, Y について大腸癌細胞株、臨床検体での発現を検討する。

(4) MEK1、MEK2 阻害と比べて miR-X がより強い細胞増殖抑制能を有するかを検討する。

(5) 他の標的遺伝子がないか検討する。Stat 分子機構や PI3K/AKT パスウェイについて調べる。また AKT の下流のアポトーシス関連遺伝子群への影響について検討する。

(6) ノードマウスを用いた KRAS 変異大腸癌細胞株を用いた皮下腫瘍モデルで miR-X を尾注して抗腫瘍効果を調べる。また腫瘍内の分子制御について検討する。

### 4. 研究成果

(1) 非癌細胞 HEK293 細胞と MRC 細胞に KRAS 変異を導入し、コントロールと比べ発現の変化する複数の miRNA を miRNA array によって抽出した。その多くは発現低下する miR であり、そのうち二つの細胞株で共通して発現量が大きく低下している miR, Target Scan で

MEK, ERKなどを標的とするmiRを候補とした。  
 (2) HEK293にKRAS遺伝子を導入することで、RAF-MEK-ERKの下流のSREに対するluciferase活性が上昇することを確認した。候補miRがこの活性化シグナルをどれほど抑制するかを調べ、miR-X, Yの二つを有望な候補とした。miR-XはKRAS変異を有するDLD1, SW480, HCT116のRAF-MEK-ERKシグナル活性を有意に減少させ、細胞増殖も抑制した。miR-YはSW480以外の細胞株には有効であったが、SW480ではRAF-MEK-ERKシグナル活性を抑制できず細胞増殖抑制効果もSW480ではみられなかった。

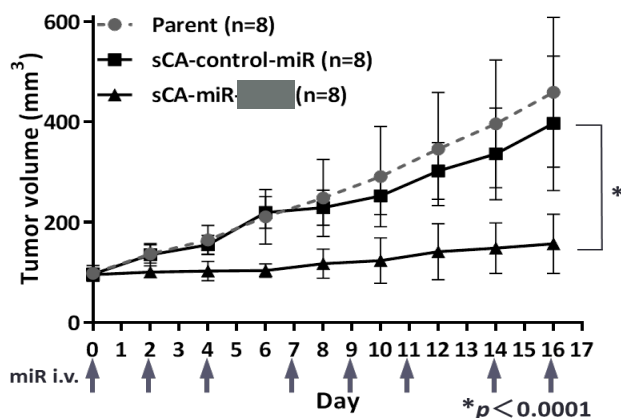
(3) miR-XはKRAS変異あるいはBRAF変異のある細胞株ではのきなみ発現が抑制されていた。KRAS/BRAF野生型の細胞株では発現の上昇がみられた。miR-Yは遺伝子変異の有無によらずその発現は様々であった。ヒトの大腸癌組織ではmiR-Xは正常粘膜よりも発現低下を示し、さらにKRAS変異群では一層の発現低下を認めた。これらの所見は、KRAS変異のある大腸癌細胞ではmiR-Xの抑制を通じて下流のシグナルを亢進させていることが示唆される。

(4) miR-XのKRAS変異大腸癌の細胞増殖抑制能をsiMEK1, siMEK2のそれと比較したところ同じようなERKのリン酸化を抑制する核酸量でmiR-Xのほうがより強い細胞抑制効果を示した。このことから、miR-XはKRAS下流シグナルのみならず他の分子も併せて抑制する可能性が示唆された。

(5) KRAS下流シグナルのwestern blotではMEK、リン酸化MEK, ERK, リン酸化ERKなどが軒並みmiR-Xによって抑制されていた。Target ScanではみつからなかつたものにKRASの3'-UTR領域に結合部位が見つかり、luciferaseによる結合試験、RT-PCR, westernによってmiR-XはKRAS遺伝子そのものを制御することが明らかとなった。

Stat系は変化しなかつたが、AKTとリン酸化AKTはmiR-Xによって明らかに減少した。AKTの3'-UTR領域には結合部位がなかつたが、AKT coding regionに結合部位が見つかり、実際その結合によってAKT分子発現を負に制御することが明らかとなった。Western blotにてAKT下流のアポトーシス関連遺伝子群(BAX, BCL2, BCL-XL, チトクロームC)はアポトーシスを促進する方向に動いた。

(6) 炭酸アパタイト法を用いて、miR-Xをヌードマウス尾静脈より投与し、KRAS変異DLD1大腸癌の皮下腫瘍治療モデル実験を行った。コントロールに比べてmiR-X投与群では腫瘍増殖の著しい低下を認めた。切除腫瘍の検討では、KRASの減少、AKTのノックアウトが確認された。



以上よりmiR-XはKRAS下流シグナルのみならず、AKTのcoding配列に結合し、RAF-MAPキナーゼ系とPI3K/AKT経路を同時に阻害することで癌細胞を著しく抑制できることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 1 件)

名称：大腸癌の治療剤  
発明者：山本浩文、森正樹、土岐祐一郎、西村潤一  
権利者：山本浩文、森正樹、土岐祐一郎、西村潤一  
種類：特許・特願  
番号：2014-041768  
出願年月日：2014年3月4日  
国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本浩文 (Yamamoto Hirofumi)  
大阪大学医学部消化器外科・准教授  
研究者番号：30322184

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：