

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461181

研究課題名(和文) 肺腺癌におけるKRAS変異によるシグナル伝達系への制御機構の解明と治療応用

研究課題名(英文) Oncogenic KRAS-mediated signal transduction and regulatory mechanisms for developing therapeutic strategies against lung adenocarcinoma

研究代表者

砂長 則明 (Sunaga, Noriaki)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70400778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：KRAS変異陽性肺腺癌細胞の増殖能はMEK阻害薬により抑制され、この増殖抑制効果はp38阻害薬の同時併用や、RNA干渉によるp38 ノックダウンにより増強された。以上より、MEKとp38の同時阻害がKRAS変異陽性肺腺癌に対する有効な治療戦略となる可能性が考えられた。一方、複数のKRAS変異陽性肺腺癌細胞株においてPD-L1の高発現が認められ、RNA干渉による変異型KRASノックダウンや、MEKやERKの阻害薬により、PD-L1発現が低下することが示された。以上より、肺腺癌において、KRAS変異はMEK-ERKシグナル伝達経路を介してPD-L1発現を正に制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In KRAS-mutated lung adenocarcinoma cells, the MEK inhibitors inhibited in vitro cell growth in a dose-dependent manner, and the growth inhibitory effect was enhanced by combination with the p38 inhibitors or small interfering RNAs (siRNAs) targeting MAPK14 that encodes p38 MAPK. These results indicate that combined inhibition of MEK and p38 could effectively suppress tumor growth of KRAS-mutated lung adenocarcinoma. Meanwhile, it was found that programmed death receptor-ligand 1 (PD-L1), a ligand for the PD-1 receptor, is overexpressed in KRAS-mutated lung adenocarcinoma cell lines. In these cell lines, the PD-L1 expression was reduced either by siRNA-mediated knockdown of mutant KRAS or by inhibitors of MEK and ERK. These results indicate that oncogenic KRAS upregulates PD-L1 expression through the MEK-ERK pathway activation in lung adenocarcinoma cells. These findings provide rationales for developing therapeutic strategies against KRAS-mutated lung adenocarcinoma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：非小細胞肺癌 KRAS遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

肺癌は主に腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌に分類されるが、腺癌が最も高頻度であり、その数は近年増加傾向にある。癌における遺伝子変異のうち、癌の発生や進展に強く関与し、癌細胞の生存が依存しているものはがん化責任変異(ドライバー変異)と呼ばれる。KRAS 変異は、肺腺癌全体の 15~35% を占めるドライバー変異であり、その頻度は EGFR 変異に次いで 2 番目に多い。KRAS は低分子単量体型 GTP 結合蛋白であり、細胞内シグナル伝達系を制御することで、細胞の増殖や分化、生存などに関わる。KRAS に変異が生じると、GTP 結合した活性型の状態に留まるため、RAS 下流のシグナル伝達系の恒常的な活性化が生じて、癌の発生や進展に関わると考えられる。実臨床下では、EGFR 変異陽性肺腺癌に対する EGFR チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)による治療法が確立されている一方で、KRAS 変異陽性肺腺癌に対する治療法は未だ確立されていないのが現状である。さらに、KRAS 変異肺腺癌は予後不良であることから、肺癌の治療成績の向上には KRAS 変異肺腺癌に対する治療法の開発が急務である。

我々は KRAS 変異陽性肺腺癌に対する治療開発を目的とした過去の研究で、KRAS 変異陽性肺腺癌細胞株 4 株における short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターによる変異型 KRAS 特異的ノックダウンと、非癌ヒト気管支上皮細胞株 2 株へのレトロウイルスベクターによる変異型 KRAS 強制発現とで、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの比較解析を行った結果、複数の KRAS 変異関連遺伝子を同定した(1)。特に、KRAS 変異陽性肺腺癌細胞株 H358 と H441 において、変異型 KRAS 特異的ノックダウンにより、PD-L1 をコードする CD274 遺伝子の発現が低下することを見出した。PD-1 抗体薬は、PD-L1 高発現の非小細胞肺癌(NSCLC)に対して優れた治療効果を示すことが臨床試験で実証されており、KRAS 変異陽性肺腺癌に対する治療戦略として PD-1 抗体薬が有効である可能性が示唆される。

一方、我々の過去の研究結果から、変異型 KRAS ノックダウンを EGFR-TKI、抗 EGFR 抗体または p38 阻害剤と併用することにより、KRAS 変異肺腺癌細胞株の増殖が効果的に抑制されることが示された(1)。その他の過去の報告において、KRAS 変異を有する癌細胞株に対して MEK 阻害剤と EGFR-TKI の併用が増殖抑制効果を示すことや(2)、HRAS のノックダウンと EGFR-TKI の併用が増殖抑制に有効とされている(3)。

以上より、肺腺癌において、PD-1 抗体治療の有効性に関連する PD-L1 発現が、KRAS 変異により正に制御されている可能性や、RAS 下流シグナル伝達分子である MEK の阻害とともに、EGFR や p38 の活性を同時に阻害することが KRAS 変異肺腺癌の治療に有効であ

る可能性が考えられることから、本研究を行った。

2. 研究の目的

(1) 肺腺癌細胞において、KRAS 変異により PD-L1 発現が正に制御されるか検証し、そのメカニズムを探索する。

(2) MEK と p38 の同時阻害、あるいは MEK と EGFR の同時阻害が、KRAS 変異陽性肺腺癌の細胞増殖を効果的に抑制するか検証し、そのメカニズムを探索する。

以上の研究により、KRAS 変異によるシグナル伝達制御機構を利用した肺腺癌の新たな治療戦略の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

細胞株と阻害薬: NSCLC 細胞株 40 株(H23、H157、H358、H441、H460、H661、H820、H838、H1264、H1299、H1373、H1395、H1437、H1648、H1650、H1666、H1755、H1792、H1819、H1975、H2009、H2030、H2087、H2122、H2126、H2347、H3255、HCC15、HCC44、HCC78、HCC95、HCC193、HCC515、HCC827、HCC2279、HCC2935、HCC4006、HCC4011、HCC4017、PC9)と非癌ヒト気道上皮細胞株 HBEC4 を実験に用いた。肺癌細胞株は 5% 牛血清添加 RPMI1640 培地で培養し、HBEC4 は牛下垂体抽出物 50 µg/ml と EGF 5 ng/ml 添加 K-SFM 培地により培養した。細胞株は培養後、80~90% コンフルエントの状態を回収し、genomic DNA を精製するとともに、total RNA を抽出し、cDNA を合成した。MEK 阻害薬は PD0325901 (Sigma 社)、selumetinib (Selleckchem 社)、U0126 (Promega 社)、ERK 阻害薬は FR180204 (Calbiochem 社)、p38 阻害薬は p38 MAP Kinase Inhibitor V (p38-V; Calbiochem 社)、LY2228820 (Selleckchem 社)、EGFR-TKI は erlotinib (Selleckchem 社)、afatinib (LC Laboratories 社)を使用した。

RT-PCR-制限酵素断片長多型(RFLP)法による変異型/野生型 KRAS ジェノタイプニング

: KRAS 変異陽性肺腺癌細胞株の cDNA を鋳型として RT-PCR を行い、PCR 産物を BstNI 制限酵素処理後に電気泳動し、変異型と野生型の KRAS アレルからの転写産物を識別することにより、変異型または野生型の KRAS 発現を評価した(1)。

遺伝子発現解析: Applied Biosystems 社より購入した設計済み Primer 及び Taqman probe により定量リアルタイム PT-PCR を行い、各遺伝子の mRNA 発現解析を行った。蛋白発現は PD-L1 抗体 (Cell Signaling 社)、K-Ras 抗体 (SANTA CRUZ 社)、Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) 抗体、Actin 抗体 (Sigma 社) を 1 次抗体として用い、Western Blot 法により解析した。

RNA 干渉法: KRAS G12C 変異、KRAS G12V 変異、野生型 KRAS、p38α をコードする MAPK14 を標的とした Small interfering RNA

(siRNA)は Dharmacon 社より購入した。*KRAS* 変異を標的とした siRNA は過去の研究(4)で設計した配列を基に作成し、その他は設計済みの siRNA(siGENOME; Dharmacon 社)を購入した。siRNA は Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen 社)により細胞内へ導入して、遺伝子ノックダウン実験を行った。**細胞増殖アッセイ及びコロニー形成アッセイ**:細胞増殖能は、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega 社)による細胞増殖アッセイや、コロニー形成アッセイ(4)により評価した。

4. 研究成果

NSCLC 細胞株における PD-L1 発現: NSCLC 細胞株 40 株において、PD-L1 をコードする *CD274* 遺伝子の mRNA 発現量を定量 RT-PCR 法により解析し、非癌ヒト気道上皮細胞株 HBEC4 と比較した。38%の NSCLC 細胞株が HBEC4 よりも高い *CD274* 発現量を示した。また、*EGFR*、*KRAS*、*BRAF* のドライバー変異の有無による比較では、*EGFR* 変異陽性群で 60%、*KRAS* 変異陽性群で 38%、*BRAF* 変異陽性群で 25%、*EGFR/KRAS/BRAF* 野生型群で 20%の細胞株が HBEC4 より高い *CD274* 発現量を示した。過去のマイクロアレイ解析において変異型 *KRAS* ノックダウンによる *CD274* 発現低下を認めた *KRAS* 変異陽性肺腺癌細胞株 H358、H441 においても、*CD274* が高発現していることが確認された。さらに、*KRAS* 変異陽性 NSCLC 細胞株 16 株における *CD274* 発現量と *KRAS* 発現量との相関解析を行ったところ、両遺伝子の発現量に有意な正の相関を認めた。

肺腺癌細胞における *KRAS* 変異による PD-L1 発現制御: *CD274* 高発現の *KRAS* 変異陽性肺腺癌細胞株 H358(G12C 変異)、H1373(G12C 変異)、H441(G12V 変異)を用いて、siRNA による変異型 *KRAS* 特異的ノックダウンにより PD-L1 発現が抑制されるか検証した。変異型 *KRAS* または野生型 *KRAS* を標的とした siRNA を細胞内に導入 48 時間後に細胞を回収し、定量 RT-PCR 法と Western Blot 法により、*CD274* mRNA 発現と PD-L1 蛋白発現を解析した。その結果、これらの細胞株において、変異型 *KRAS* ノックダウンにより *CD274* mRNA 発現及び PD-L1 蛋白発現の有意な低下が認められた。一方で、野生型 *KRAS* ノックダウンでは PD-L1 発現の有意な低下は認められなかった。また、*KRAS* 変異陽性 NSCLC 細胞株のうちで最も *CD274* 発現量の低い 2 つの肺腺癌細胞株 H23(G12C 変異)と H1792(G12C 変異)での変異型 *KRAS* ノックダウンによる *CD274* mRNA 発現への影響を調べたところ、これらの細胞株においても変異型 *KRAS* ノックダウンによる *CD274* mRNA 発現の有意な低下が認められた。以上より、PD-L1 は、その発現量に関わらず *KRAS* 変異により正に制御され、*KRAS* 発現量が上昇するほど PD-L1 発現量も上昇することが示唆された。

***KRAS* 変異陽性肺腺癌細胞における MEK-ERK シグナル伝達経路の活性化を介した PD-L1 発現制御メカニズム**:肺腺癌における *KRAS* 変異による PD-L1 発現制御メカニズムを探るため、*KRAS* 変異陽性肺腺癌細胞において、MEK や ERK の阻害が PD-L1 発現を抑制するか調べた。*CD274* 高発現の *KRAS* 変異陽性肺腺癌細胞株 H358 と H441 を、MEK 阻害薬 (U0126、selumetinib)、ERK 阻害薬 (FR180204) で処理した後に細胞を回収し、定量 RT-PCR 法と Western Blot 法により *CD274* mRNA 発現と PD-L1 蛋白発現を解析した。その結果、いずれの細胞株においても、MEK 阻害薬や ERK 阻害薬により、リン酸化 ERK 発現低下とともに、*CD274* mRNA 発現及び PD-L1 蛋白発現の有意な低下が認められた。以上の結果から、MEK-ERK シグナル伝達経路の活性化が、*KRAS* 変異陽性肺腺癌における PD-L1 過剰発現のメカニズムの一つと考えられた。

***KRAS* 変異陽性肺腺癌における MEK 阻害薬と p38 阻害薬の併用による細胞増殖抑制効果**:過去の研究において、p38 阻害薬が変異型 *KRAS* ノックダウンによる肺腺癌細胞の増殖抑制効果を増強させることを報告した(1)。本研究では、変異型 *KRAS* ノックダウンの代わりに RAS 下流分子である MEK の阻害薬を用いて、p38 阻害薬と MEK 阻害薬の併用により同様の効果が認められるか検証した。*KRAS* 変異陽性肺腺癌細胞株 H1792 を、MEK 阻害薬 PD0325901(10 μ M)、p38 阻害薬 p38-V(10 μ M)により 48 時間処理し、細胞増殖アッセイを行った。コントロール処理 (DMSO 単独) と比較して、PD0325901 処理による細胞生存率の有意な低下が認められたが、p38-V 処理では細胞生存率の有意な低下は認められなかった。さらに、コントロール処理や PD0325901 処理と比較して、PD0325901 と p38-V の同時併用処理により細胞生存率の有意な低下が認められた。

次に、MEK と p38 の同時阻害による細胞増殖抑制の増強効果が、他の MEK 阻害薬や p38 阻害薬でも同様に認められるか検証した。H1792 細胞株を、異なる濃度の MEK 阻害薬 selumetinib (10 pM、100 pM、1 nM、10 nM、100 nM、1 μ M、10 μ M) や、p38 阻害薬 LY2228820 (1 μ M) との併用で 48 時間処理し、細胞増殖アッセイを行った。H1792 細胞の増殖は、selumetinib により濃度依存性に抑制されることが確認された。また、100 nM ~ 10 μ M の各濃度での selumetinib と LY2228820 (1 μ M) の併用処理は、LY2228820 (1 μ M) 単独処理と比較して、細胞生存率を有意に低下させることが示された。

***KRAS* 変異陽性肺腺癌における MEK 阻害薬と p38 ノックダウンの併用による細胞増殖抑制効果**: MEK 阻害薬による *KRAS* 変異陽性肺腺癌の細胞増殖抑制が p38 阻害により増強されることをさらに検証するため、siRNA による p38 ノックダウンと MEK 阻害薬 U0126

の併用が H1792 細胞の増殖に与える影響を調べた。p38 をコードする *MAPK14* を標的とした 2 つの配列の異なる siRNAs (siMAPK14-1, siMAPK14-2) を H1792 細胞内に導入 48 時間後に細胞を回収し、定量 RT-PCR 法により、*MAPK14* mRNA 発現を解析した。siMAPK14-1 と siMAPK14-2 は、標的遺伝子のないコントロール siRNA と比較して、*MAPK14* 発現を著明に抑制することが確認された。次に、MEK 阻害薬 U0126 (1 μM) 処理や、siRNA による p38 ノックダウンと U0126 との併用が、H1792 細胞株のコロニー形成能に与える影響を調べた。H1792 細胞のコロニー形成能は、U0126 (1 μM) 処理により有意に抑制されることが確認された。さらに、U0126 (1 μM) と p38 ノックダウンの併用処理は、U0126 (1 μM) 単独処理と比較して、コロニー形成能を有意に抑制することが示された。以上より、MEK 阻害薬による *KRAS* 変異陽性肺腺癌細胞の増殖抑制は、p38 ノックダウンにより増強されることが示唆された。

***KRAS* 変異陽性肺腺癌における MEK 阻害薬と EGFR-TKIs の併用による細胞増殖抑制：**

過去の研究において、変異型 *KRAS* ノックダウンと EGFR-TKI である gefitinib の併用が、肺腺癌細胞の増殖抑制に有効であることを報告したが (1)、本研究では MEK 阻害薬 selumetinib と、gefitinib 以外の EGFR-TKI である erlotinib や afatinib との併用が、肺腺癌細胞の増殖を効果的に抑制するか検証した。H1792 を、MEK 阻害薬 selumetinib (10 pM、100 pM、1 nM、10 nM、100 nM、1 μM、10 μM) と、erlotinib (1 μM) あるいは afatinib (1 μM) との併用で 48 時間処理し、これらの処理が細胞生存率に与える影響を調べた。erlotinib (1 μM) と 100 nM~10 μM の各濃度での selumetinib との併用処理は、erlotinib (1 μM) 単独処理と比較して、細胞生存率を有意に低下させた。Afatinib (1 μM) と 100 nM~10 μM の各濃度での selumetinib 併用処理でも、afatinib (1 μM) 単独処理と比べて、erlotinib と同様に細胞増殖を効果的に抑制することが示された。以上より、MEK 阻害薬による *KRAS* 変異陽性肺腺癌細胞の増殖抑制効果は、EGFR-TKIs の併用により、さらに増強されることが示唆された。

以上の結果から、*KRAS* 変異は MEK-ERK シグナル伝達経路の活性化を介して PD-L1 発現を誘導することが示唆された。また、*KRAS* 変異肺腺癌において、*KRAS* 発現量と *CD274* 発現量が正の相関関係にあることから、*KRAS* 発現量の高い *KRAS* 変異陽性肺腺癌に対しては PD-1 抗体療法が有効である可能性が考えられた。さらに、*KRAS* 変異肺腺癌に対する新たな治療戦略として、MEK 阻害薬に加えて、p38 阻害薬や EGFR-TKI を同時併用する治療法が有効である可能性が考えられた。

文献：

1. Sunaga N, et al. Mol Cancer Ther. 10:336-346, 2011.
2. Yoon YK, et al. Mol Carcinog. 49:353-362, 2010.
3. Young A, et al. Cancer Discov. 3:112-123, 2013.
4. Sunaga N, et al. Oncogene. 32:4034-4042, 2013.

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)

[学会発表](計2件)

三浦 陽介、砂長 則明、他、非小細胞肺癌細胞において *KRAS* 遺伝子変異による MAPK/ERK 経路を介した PD-L1 発現誘導、第57回日本肺癌学会総会、2016年12月19日、福岡

Yosuke Miura, Noriaki Sunaga, et al. Oncogenic *KRAS* mutations induce PD-L1 overexpression through MAPK pathway activation in non-small cell lung cancer cells. AACR 107th Annual Meeting 2016; April 19, 2016; New Orleans, LA, U.S.A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂長 則明 (SUNAGA NORIAKI)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号： 70400778

(2) 研究協力者

三浦 陽介 (MIURA YOSUKE)