

令和 1年 5月 20日

平成 30 年度独立行政法人日本学術振興会
藤田記念医学研究振興基金研究助成事業研究概要報告書

独立行政法人日本学術振興会理事長殿

研究者所属・職 京都大学消化管外科・客員研究員
氏 名 岩本 哲好

本助成事業による研究について、次のとおり報告します。

1. 研究課題名 大腸癌における KRAS 遺伝子変異に伴う代謝変化に着目した新規大腸癌治療の開発 (英文名) Novel strategy targeting the metabolic change of KRAS-mutant colorectal cancers
2. 研究実施期間 平成 30 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 3 1 日
3. 助成金額 1,000,000 円
4. 研究の目的 KRAS 遺伝子は大腸癌における抗 EGFR 抗体治療のさいのバイオマーカーであるが、KRAS 変異型大腸癌では抗 EGFR 抗体治療が無効であり治療方針の選択に苦慮する。近年では種々の癌において KRAS 遺伝子変異は糖代謝をはじめとしたエネルギー代謝経路に関与することが分子レベルで明らかとなってきており、KRAS 遺伝子変異を有する癌種にとってエネルギー代謝は治療ターゲットとして注目を集めている。大腸癌細胞を用いた研究により、我々は最近グルタミン・アスパラギン代謝が KRAS 遺伝子変異を有する大腸癌で大きく変化しており、具体的な治療ターゲットとして、1) ASNS (アスパラギン合成酵素)、2) ASCT2(グルタミン・トランスポーターの 1 つ)の 2 つを見出した (Toda K, Iwamoto M et al. Neoplasia. 2016;18:654-665; Toda K, Iwamoto M et al. Int J Mol Sci. 2017;18. pii:E1632)。 京都大学消化管外科では大腸癌患者の腫瘍組織から 1) 癌細胞の分離、初代培養法を最適化する in vitro スフェロイド培養法、2) 免疫不全マウス皮下に異種移植した PDX (Patient-derived xenograft) マウスモデル、により個別化医療実現と新しい治療法探索のためのプラットフォーム確立を目的とした研究を行なっている。スフェロイド培養法の利点としては、切除標本と比較して純粋な癌細胞集団である点、細胞株と比較して 3 次元構造を保っている点、個々の患者自身の癌から樹立されたものである点 (オーダーメイド) にある。 本研究では KRAS 遺伝子変異によるヒト大腸癌の代謝変化に着目し、治療への応用 (KRAS 遺伝子変異のある大腸癌に特異的な代謝経路をターゲットにした治療法の開発) の可能性について、大腸癌患者の腫瘍組織から樹立したスフェロイド細胞を用いて検証することを目的とする。

5. 研究概要報告

大腸癌患者 37 人から樹立したスフェロイド細胞をもちいて、KRAS 変異と ASNS 発現の関係について検討した。RAS 遺伝子が正常であった 15 例では ASNS 高発現は 5 例 (33.3%) であったのに対し、KRAS 遺伝子変異があった 22 例では ASNS 高発現は 11 例 (50%) であり、KRAS 遺伝子変異症例では ASNS 高発現群が多い傾向にあった。

次に ASNS の機能解析のため、ASNS を高発現しているスフェロイド細胞 2 株に対し、ASNS を knockdown させる shRNA ベクターを導入することで、ASNS ノックダウン細胞をそれぞれ 2 株ずつ樹立した (shASNS-1 および shASNS-2)。定量的 RT-PCR 法および Western blotting 法にて、mRNA レベルおよびタンパクレベルのいずれにおいても 90%以上発現を抑制していることを確認した。

まず *in vitro* 実験として、スフェロイド細胞の細胞増殖能について検討した。アスパラギンを添加した細胞培養液で増殖能を検討すると、コントロール株と ASNS ノックダウン細胞 (shASNS-1 および shASNS-2) の間に差は認められなかった。しかしながら、アスパラギンを除去した細胞培養液で増殖能を検討すると、ASNS ノックダウン細胞 (shASNS-1 および shASNS-2) はコントロール株に比ベ有意に細胞増殖が抑制された ($P < 0.01$)。

アスパラギンを分解する L-asparaginase は急性白血病及び悪性リンパ腫の治療薬として一般に臨床的に使用されている薬物である。次に、L-asparaginase を細胞培養液に添加した条件での検討もおこなったところ、コントロール株では細胞増殖の抑制は L-asparaginase を 1.0U/mL 添加する必要があったが、ASNS ノックダウン細胞 (shASNS-1 および shASNS-2) では L-asparaginase を 0.1U/mL 添加するだけで細胞増殖が抑制された ($P < 0.01$)。

次に *in vivo* 実験として、免疫不全マウス皮下に異種移植した PDX モデルでの検討を行った。コントロール株を移植した場合は、L-asparaginase を添加しても皮下腫瘍のサイズは特に変わらなかったが、ASNS ノックダウン細胞 (shASNS-1) を移植した場合は L-asparaginase を添加すると著しく皮下腫瘍は縮小することが確認された。

1) コントロール株+vehicle、2) コントロール株+ L-asparaginase、3) ASNS ノックダウン細胞 (shASNS-1) +vehicle、4) ASNS ノックダウン細胞 (shASNS-1) + L-asparaginase、の 4 群の接種 4 8 日目の皮下腫瘍のサイズ (中央値) は、450mm³、1200mm³、250mm³、10mm³であり、4) ではほとんど皮下腫瘍が形成されないという結果であった ($P < 0.01$)。

上記の結果から、臨床検体から樹立したスフェロイド細胞を用いた検討でも L-asparaginase と組み合わせることによって ASNS は KRAS 変異のある大腸癌に対する新規治療薬となり得る可能性を示すことができた。現在は ASNS 阻害薬の開発を企業との共同研究で進めている。

6. 研究成果の発表について

独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業の英文称：
「JSPS Fujita Memorial Fund for Medical Research」

研究者所属・職
氏 名

○論文発表 発表者名、テーマ名、発表誌名・巻号、発刊年月を記入してください。
また、別刷り2部を必ず添付してください。

なし

現在、論文作成中である。

○口頭発表 発表者名、テーマ名、会合名、発表年月日を記入してください。

なし

○著 書 著者名、出版社名、刊行年月日、共著または単著の別を明記してください

なし

注：

- (1) 研究成果を学会誌等で発表する場合には、独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業による助成を受けた旨を必ず明記して下さい。
また、その別刷り2部を「研究概要報告書」と共に必ず提出して下さい。
- (2) 本基金の助成に係る代表的な論文、口頭発表及び著書にはタイトルの前に○を付けて下さい。