

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	小山 誠
論文審査担当者	主 査 伊藤 研一 副 査 小泉 知展・平塚 佐千枝
論文題目	
Low-dose trametinib and Bcl-xL antagonist have a specific antitumor effect in KRAS-mutated colorectal cancer cells 低濃度トラメチニブと BCL-XL 阻害剤は、KRAS 変異型大腸癌細胞に対して特異的な抗腫瘍効果を示す	
(論文の内容の要旨)	
<p>【背景と目的】KRAS 遺伝子変異は大腸癌全体の約 40%に認められる。抗 EGFR 抗体薬 (Cetuximab, Panitumumab) は KRAS 野生型大腸癌の予後を延長させたが、KRAS 変異型大腸癌には効果は認めず、予後不良である。本研究は、KRAS 変異型大腸癌に対する特異的な治療法の開発を目的とし、in vitro, in vivo における KRAS 遺伝子変異導入細胞株を用いた実験系を確立し、遂行した。</p> <p>【方法】KRAS 野生型大腸癌細胞株、CACO-2, SW48 を用いて実験を行った。これらの細胞に対して、PMX-IRES-GFP ベクター、pDON-5-Neo ベクター (レトロウイルス)を用いて、KRAS 野生型、変異型 (G12D, G12V, G13D) の遺伝子導入を行った。これら遺伝子導入細胞において、増殖能を細胞カウント、CCK-8 アッセイにて検討した。また KRAS の下流であるリン酸化 ERK のタンパク発現を評価した。また PMX-IRES-GFP ベクターにて遺伝子導入を行った細胞を用いて、我々が提唱するミックスカルチャーアッセイ法により、抗癌剤、分子標的薬のスクリーニングを行った。その結果、MEK 阻害剤 (Trametinib) と抗アポトーシスタンパク Bcl-xL 阻害剤 (ABT263) の併用療法に着目した。Bcl-xL の mRNA、タンパクの発現を RT-qPCR、Western blotting にて評価した。MEK 阻害剤 (Trametinib) と Bcl-xL 阻害剤 (ABT263) 併用による細胞死誘導効果を、Annexin-7AAD アッセイ及び、Western blotting にて Caspase 3 発現を評価し検討を行った。in vivo において、ヌードマウスに対して KRAS 野生型、変異型 (G12V) 細胞の皮下移植を行い、Xenograft model を作成した。KRAS 野生型、変異型の増殖能を評価し、Bcl-xL の発現を RT-qPCR、免疫染色にて評価した。さらに KRAS 変異型 (G12V) Xenograft model に対して Trametinib、ABT263 を投与し、併用療法による抗腫瘍効果を、腫瘍の大きさを測定し評価した。また、腫瘍組織の TUNEL 染色を行いアポトーシスの評価を行った。</p> <p>【結果】KRAS 変異型は野生型に比べ高い増殖能を示し、リン酸化 ERK タンパクの発現亢進を認めた。ミックスカルチャーアッセイ法を用いた薬剤感受性スクリーニングでは、KRAS 変異型は Trametinib に対する感受性を認め、その効果は ABT263 との併用により増強した。そこで Bcl-xL mRNA、タンパクの発現を評価したところ、KRAS 変異型では野生型に比べ、発現が亢進していた。さらに低濃度の Trametinib(1,5,10nM)を投与した際には、濃度依存性に Bcl-xL タンパク発現が亢進するという現象を確認した。そこで低濃度の Trametinib(10nM)と ABT263(10 μ M)を投与したところ、KRAS 変異型において Cleaved Caspase3 の発現上昇を認め、より効果的にアポトーシスを誘導した。in vivo Xenograft model でも、KRAS 変異型は高い増殖能と Bcl-xL の発現亢進を認めた。そして KRAS 変異型 (G12V) に対しては、Trametinib と ABT263 の併用により、単剤投与に比べ高い抗腫瘍効果を示した。</p> <p>【結論】本実験では KRAS 遺伝子変異により亢進した、リン酸化 ERK と抗アポトーシスタンパク Bcl-xL を標的とする、Trametinib+ABT263 併用療法が、KRAS 変異型大腸癌細胞に対し特異的な抗腫瘍効果を示すことを示した。またミックスカルチャーアッセイ法は、KRAS 変異に対して選択的に Trametinib+ABT263 併用療法が有効であることを示し、更なる in vitro, in vivo の検討で同効果が証明され、有用なスクリーニングアッセイであった。Trametinib+ABT263 併用療法は、KRAS 変異型大腸癌に対する新規治療法となる可能性が示唆された。</p>	