

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	本藤 奈緒
論文審査担当者	主 査 伊藤 研一教授 副 査 梅村 武司教授 ・ 平塚 佐千枝教授 ・ 肥田 重明教授
論文題目 MEK inhibitor and anti-EGFR antibody overcome sotorasib resistance signals and enhance its antitumor effect in colorectal cancer cells (MEK 阻害薬と抗 EGFR 抗体薬はソトラシブの大腸がん細胞に対する耐性シグナルを克服し抗腫瘍効果を増強させる)	
(論文の内容の要旨) 【背景と目的】 KRAS は最も頻度の高い癌原遺伝子の一つだが、変異型 KRAS を標的とした治療薬の開発は難渋し、30 年以上もの間、「undruggable gene」とされてきた。近年、KRAS G12C 変異を標的とする新規阻害剤が開発され、臨床応用されているが、臨床試験では非小細胞肺癌に比して大腸癌では効果が乏しい。大腸癌では以前から単剤の分子標的治療に対して再活性化シグナルによる耐性が指摘されている。今回、我々は再活性化シグナルを標的とした併用療法が、大腸癌における KRAS G12C 阻害薬への耐性を克服できると仮説を立て実験を行った。 【方法】 まず始めに KRAS 野生型と種々の KRAS 変異の大腸癌細胞株、非小細胞肺癌細胞株に KRAS G12C 阻害薬ソトラシブを投与して細胞増殖能と MAPK 経路、AKT 経路のタンパク発現と活性化をウエスタンブロッティングで評価した。続いて、KRAS 野生型大腸癌細胞株に KRAS 遺伝子を導入し、KRAS 導入細胞株を作成し、同様に MAPK 経路、AKT 経路を評価した。 続いて先行研究で我々が考案したミックスカルチャーアッセイでソトラシブと併用効果のある薬剤のスクリーニングを行った。ミックスカルチャーアッセイの概要を以下に示す。KRAS 野生型大腸癌細胞株に GFP+KRAS 遺伝子を導入した。親細胞 (GFP 陰性) と遺伝子導入細胞 (KRAS 遺伝子+GFP 陽性) を 1 : 1 の比率で混合し、薬剤を投与する。初日と 12 日目に、フローサイトメーターを用いて GFP 陽性率を測定し、相対増殖率 (RPR) を以下の式で算出した。 $RPR=B(100-A)/A(100-B)$ 、A : 初日の GFP 陽性率、B : 12 日目の GFP 陽性率。RPR 低値は感受性が高く、RPR 高値は耐性であることを示す。 さらに、本スクリーニング法で効果ありと判断された薬剤を KRAS 導入細胞株に投与して増殖抑制効果を評価した。また、同薬剤投与時の MAPK 経路のタンパク発現と活性化をウエスタンブロッティングで評価した。 最後にヌードマウスへの皮下移植モデルを用いて併用療法の効果を評価した。KRAS 導入細胞株を皮下に移植し、各薬剤を投与して腫瘍径を計測した。また安全性は体重の変化で評価した。 【結果】 ソトラシブは、KRAS G12C 変異細胞株の増殖を特異的に抑制したが、高濃度では大腸癌細胞株で増殖抑制効果が減弱していた。また、ウエスタンブロッティングの結果、ソトラシブ投与後 4 時間では非小細胞肺癌、大腸癌双方で pERK、pAKT が抑制されていたが、24 時間後では大腸癌細胞株で pERK の発現上昇を認めた。KRAS G12C を導入した細胞でも同様にソトラシブ投与 4 時間で MAPK 経路が抑制され、24 時間後に再活性化を認めた。 ミックスカルチャーアッセイの結果、ソトラシブは G12C 変異でのみ RPR を有意に低下させ、MEK 阻害剤との併用でさらなる RPR の低下を示した。抗 EGFR 抗体は、単剤では KRAS 変異細胞で用量依存的に RPR が高くなり、抵抗性を示したが、ソトラシブとの併用で RPR は上昇せず、抗 EGFR 抗体への耐性を改善した。これらの結果に基づき、ソトラシブ、MEK 阻	

害剤、抗 EGFR 抗体の併用療法の有効性を検討した。

KRAS G12C 導入細胞に、ソトラシブ、トラメチニブ (MEK 阻害剤)、セツキシマブ (抗 EGFR 抗体) を投与して EGFR および MAPK 経路のタンパク発現を評価した。ウエスタンブロットティングの結果、ソトラシブ単剤では pERK の発現再上昇を示したが、トラメチニブの併用で pERK は抑制され、pEGFR の発現が上昇した。セツキシマブを加えると、EGFR の再活性化は抑制された。細胞増殖能について、ソトラシブ単独とソトラシブ+トラメチニブ、ソトラシブ+セツキシマブの比較では、2 剤併用でより増殖が抑制されたが、有意差はなかった。一方、3 剤併用ではソトラシブ単独と比較して有意な増殖抑制効果が認められた。

最後に、in vivo でソトラシブの有効性および併用療法を評価した。ソトラシブの単剤使用は、KRASG12C 変異腫瘍に選択的な抗腫瘍効果を示した。ソトラシブ+トラメチニブおよびソトラシブ+セツキシマブの 2 剤併用療法は、ソトラシブ単独療法と比較して有意な腫瘍形成の抑制効果を示し、3 剤併用療法はこれらの 2 剤併用療法と比較して更なる腫瘍形成の抑制効果を示した。また、3 剤併用療法を含めてマウスの体重変動はすべて 10%以内であった。

【結語】

我々は、KRAS G12C 大腸癌細胞株において、ソトラシブの耐性化に MAPK 経路と EGFR の再活性化シグナルが重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、MEK 阻害剤と抗 EGFR 抗体はこの耐性を克服し、大腸癌細胞におけるソトラシブの抗腫瘍効果を増強することを証明した。この 3 剤併用療法は、KRAS G12C 変異大腸癌患者に対する有望な治療戦略となり得ることが示唆された。