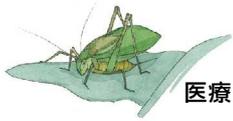


KRAS 変異型大腸癌に対する 治療的マイクロRNA の開発



医療と技術

山本浩文*

Novel microRNA that is effective against KRAS mutant colorectal cancer

Key Words : KRAS, microRNA, AKT1, colorectal cancer

はじめに

KRAS 野生型大腸癌にはセツキシマブ等の抗EGFR抗体が有効であるが、大腸癌の約4割を占めるKRAS変異型の患者さんはその恩恵を受けることができない。そこで、KRAS下流分子であるMEK阻害剤を用いた臨床試験が行われているが、単独では効果が限られ、2剤併用だと副作用の問題が大きいことが問題となっている。マイクロRNAはヒトに内在する18-25塩基長の小さなnon-coding RNAであり、もともと生体に内在する物質であるので副作用は比較的少ないと考えられている。今回、KRAS変異遺伝子の導入によって発現の変化するマイクロRNAを抽出し、その中からKRAS変異型大腸癌に強い治療効果を示すマイクロRNAを同定した。腫瘍に核酸を効率よく送達するスーパーアパタイトナノキャリアーもあわせて開発中であり、今後の臨床応用が期待される。

(研究の背景)

癌における各種の細胞内シグナル伝達系の研究が進む中、転移性大腸癌に対しても新しい分子標的治療薬の開発が行われてきた。OPUS study (phase II) やCRYSTAL study (phase III) のretrospective解析から、FOLFOX-4やFOLFIRIを用いた化学療法一次治療への抗上皮成長因子受容体(epidermal

growth factor receptor; EGFR) 抗体の上乗せ効果が、KRAS野生型大腸癌患者の予後を延長したが、KRAS変異型大腸癌患者ではその効果がなかったというものである⁽¹⁾⁽²⁾。従って、大腸癌の6割の患者さんは新薬の恩恵に預かり次のステップに進む事が許されたが、逆に残り4割を占めるRAS変異型患者(KRAS変異34.6%, NRAS変異3.7%, HRAS変異0.2% (COSMICデータベース)) に対しては、現在有効な治療の手だてがないのが現状である。

一方、近年マイクロRNA(miRNA, miR)と呼ばれる18~25ヌクレオチドからなる内在性の小さなnon-coding RNAが、様々な遺伝子の発現を調節することがわかってきた⁽³⁾。miRNAがRNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれるリボ核酸とArgonoute蛋白の複合体に取りこまれることでmiRNA-RISC複合体を形成し、主にmRNAの3'末端非翻訳領域と相補的に結合することで遺伝子発現を抑制する(図1)。miRNAとmRNAの結合は不完全であるため標的遺伝子は1つとは限らず、複数の遺伝子を標的として制御することが可能であるということが重要な特徴である。

私たちは、KRAS変異により活性化される細胞内のシグナル伝達を癌細胞の内側から阻害すべく、



* Hirofumi YAMAMOTO

1963年5月生
 大阪大学医学部医学科卒業(1988年)
 現在、大阪大学医学部保健学科機能診断
 科学分子病理教室 教授 医学博士
 分子病理学 消化器外科学
 TEL: 06-6879-2595
 FAX: 06-6879-2595
 E-mail: hyamamoto@sahs.med.osaka-u.ac.jp

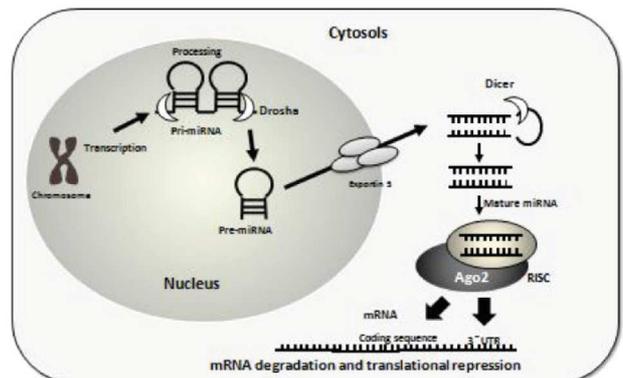


図1 microRNA (miR) の働き

KRAS 変異によって変化を来たすマイクロ RNA を同定し、治療応用することを目的として研究を行った。

1. KRAS 変異型大腸癌に対する治療概念

上皮成長因子受容体 (EGFR) は 170kDa の膜貫通型糖蛋白受容体チロシンキナーゼであり、ほとんどの大腸癌にその発現が認められる。上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF) などのリガンドが EGFR に結合すると、細胞内ドメインに位置するチロシンキナーゼのリン酸化が起こり、このレセプターの活性化が、MAPK/ERK 経路、MAPK/JNK 経路、PI3K/AKT 経路、JAK/STAT3 経路などを含む下流シグナル伝達経路の活性化を誘導し⁽⁴⁾、癌細胞の増殖、浸潤、抗アポトーシス、生存などに関わる。腫瘍の KRAS 遺伝子変異が抗 EGFR 抗体薬の負の効果予測因子となる機序は、KRAS 遺伝子に変異が起こるとこれら下流経路が恒常的に活性化する結果、細胞表面の EGF 刺激に関わらず癌細胞が浸潤・増殖を続けるためである⁽⁵⁾⁽⁶⁾ (図2)。

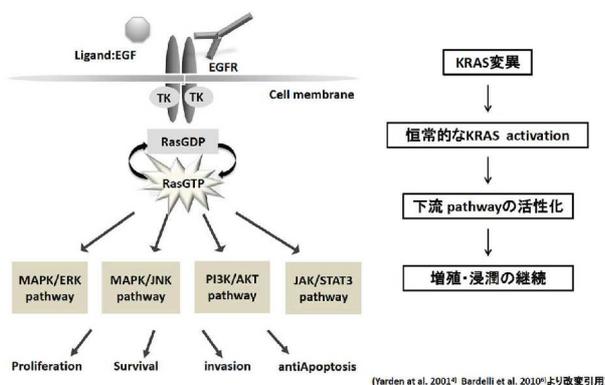


図2 EGFR シグナル経路における KRAS 変異

Migliardi⁽⁷⁾らは、MEK inhibitor と PI3K/mTOR inhibitor を併用することにより、KRAS 変異型大腸癌に対して抗腫瘍効果を認めたと報告しており、Misale⁽⁸⁾らは、MEK inhibitor と抗 EGFR 抗体の併用が、cetuximab 耐性大腸癌細胞株の感受性を回復させたことを示している。つまり、KRAS 変異型大腸癌に対する治療戦略としては、上記経路の中で MAPK/ERK 経路を抑えることが必要条件であり、さらに他の経路も制御することが肝要であることが示唆される。

現在、固形腫瘍における EGFR 下流の分子を標

的とした様々な低分子阻害剤の臨床試験が行われているが、その副作用は無視できない。進行癌患者に対する MEK1/2 inhibitor (PD0325901) を用いた Phase I-II 試験では、視力、急性神経障害などの副作用のため、Phase II を継続できず中止となった⁽⁹⁾。

また、非切除肝細胞癌に対する一次治療としての sorafenib と MEK inhibitor (BAY 86-9766) を併用した Phase II 試験においては、Grade 5 の肝不全などの副作用が出現し、多くの患者に薬剤の減量措置がとられた⁽¹⁰⁾。

マイクロ RNA の中で、正常粘膜に比べ癌組織でその発現が低下しているものは、癌細胞に対して癌抑制的に働くことが多い (Anti-oncomiR)。もともと正常細胞では多く発現している miR を癌細胞に補充することにより癌治療に応用する方法は、一マイクロ RNA Replacement therapy (補充療法) 一として、相対的に副作用が少ないとされており⁽¹¹⁾、マイクロ RNA を用いた新規核酸治療に注目した。

2. KRAS 変異により制御されるマイクロ RNA

KRAS 変異により変化するマイクロ RNA を同定するために、正常のヒト胎児腎細胞 HEK293 とヒト肺繊維芽細胞 MRC5 に KRAS^{G12V} 遺伝子を導入し、miR の発現プロファイルの変化を miR array で解析した。KRAS 野生型の大腸癌細胞株ではなく正常細胞に KRAS 遺伝子を導入する手法によって、癌細胞における様々な genetic および epigenetic な変化によって引き起こされるマイクロ RNA の変化を排除することができ、KRAS 変異のみによって誘導されるマイクロ RNA に焦点を当てるのが容易となる。miR array の結果、KRAS 変異を過剰発現させると発現レベルが低下するマイクロ RNA を両細胞に多く認めた。そのうち、両細胞で Fold change > 8 で発現が低下した 6 つのマイクロ RNA についてさらに解析を進めた (図3)。

3. KRAS 変異型大腸癌に対する抗腫瘍効果を認めるマイクロ RNA の同定

KRAS 変異過剰発現 HEK293、KRAS 変異型大腸癌細胞株 (DLD1, SW480, HCT116) を用いて、EGFR 下流の主な経路である MAPK/ERK pathway を制御する miR の抽出を目的とし luciferase assay を行った。MAPK/ERK pathway の下流で働く転写

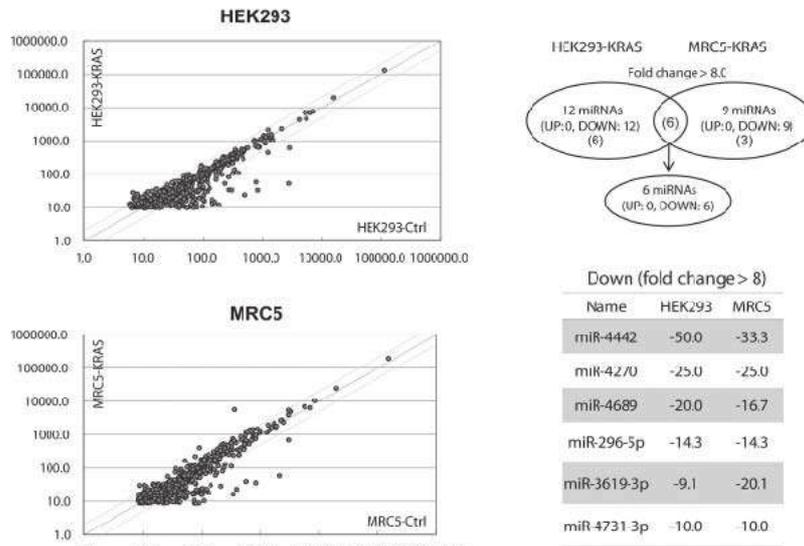


図3 miR Arrayの結果から候補となるmiRの抽出

因子として Elk-1/SRF を想定し、Elk-1/SRF が結合する SRE element を含む reporter plasmid を用い、luciferase assay により KRAS 下流シグナルを抑制する miR を検索した。先ほどの6つの miR のうち、KRAS 変異過剰発現 HEK293、3つの KRAS 変異型大腸癌細胞株のすべてで、MAPK/ERK pathway のシグナル活性を抑制した miR-4689 を同定することに成功した。実際、KRAS 変異型大腸癌に対する効果を検討したところ、*in vitro* と *in vivo* において強い抗腫瘍効果とアポトーシスの誘導を認めた。

さらなる研究結果から、この miR-4689 は、KRAS 遺伝子の 3' 非翻訳領域と AKT1 のコーディング領域に直接的に結合することが明らかとなった。マイクロ RNA は、主に標的遺伝子の 3' 非翻訳領域に結合し遺伝子の発現を制御することが知られているが、最近の研究によれば、コーディング領域や 5' 非翻訳領域内にも膨大な miRNA の binding site を含んでおり、その領域への miR の結合により標的 mRNA の活性化や抑制を誘導することが報告されている⁽¹²⁻¹⁴⁾。今回同定された miR4689 は、KRAS と AKT1 に結合することにより、MAPK/ERK 経路と PI3K/AKT 経路の両シグナル伝達を抑え、KRAS 変異型大腸癌細胞に対する強い抗腫瘍効果につながったと考えられる⁽¹⁵⁾。

臨床検体におけるこの miR の発現に関して検討したところ、正常粘膜に比較して癌組織でその発現は低く、KRAS 野生型大腸癌よりも KRAS 変異型大

腸癌組織でさらに低いことが示された。このことから示唆されることは、癌細胞にとって毒性のあるこの miR を低く抑えることではじめて、KRAS は活性化することができ、下流経路の活性化を誘導しているということである (図4)。

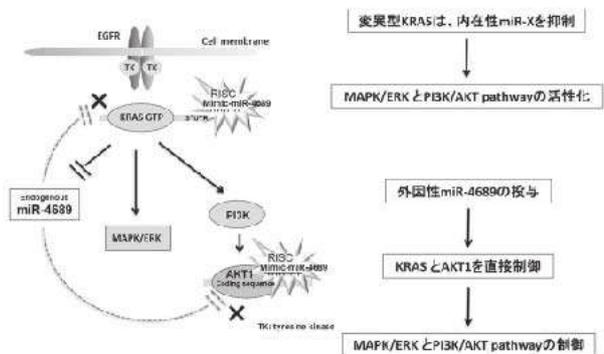


図4 miR-XによるEGFR pathwayの制御

癌に対する suppressor miR の補充療法が比較的 安全であるとすれば⁽¹¹⁾、この miR-4689 の全身投与は、KRAS 変異型大腸癌に対する新規の治療戦略になることが期待される。

おわりに

KRAS 変異型大腸癌に対する治療的マイクロ RNA について概略した。外因性 miR-4689 の投与は、MAPK/ERK 経路と PI3K/AKT 経路を共に制御するため、KRAS 変異型大腸癌に対する新規核酸治療薬になる可能性が示唆された。

当教室では臨床応用に向け、静注で効率よく核酸を固形腫瘍に到達させる炭酸アパタイト法を開発しており⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾、この Drug Delivery System (DDS) を用いた新規マイクロ RNA 複合体による KRAS 変異型大腸癌の治療開発が期待される。

文献

- 1) Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A *et al* : Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27(5):663-71, 2009
- 2) Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E *et al* : Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360(14):1408-17, 2009
- 3) Calin GA, Croce CM : MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6(11):857-66, 2006
- 4) Yarden Y, Sliwkowski MX : Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2):127-37, 2001
- 5) Lievre A, Bachet JB, Le Corre D *et al* : KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer res* 66(8):3992-5, 2006
- 6) Bardelli A, Siena S : Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 28(7):1254-61, 2010
- 7) Migliardi G, Sassi F, Torti D *et al* : Inhibition of MEK and PI3K/mTOR suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in patient-derived xenografts of RAS-mutant colorectal carcinomas. *Clin cancer res* 18(9):2515-25, 2012
- 8) Misale S, Yaeger R, Hobor S *et al* : Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 486(7404):532-6, 2012
- 9) P. Lorusso, S. Krishnamurthi, J.R. Rinehart *et al* : A phase 1 – 2 clinical study of a second generation oral MEK inhibitor, PD 0325901 in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 23:3011, 2005
- 10) Ho Yeong Lim, Chia-Jui Yen, Won-Young Tak *et al* : A phase II trial of MEK inhibitor BAY 86-9766 in combination with sorafenib as first-line systemic treatment for patients with unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol* ;30, 2012
- 11) Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K *et al* : Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer res* 70(14):5923-30, 2010
- 12) Ling H, Fabbri M, Calin GA : MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 12(11):847-65, 2013
- 13) Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA *et al* : Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 11(3):145-56, 2014
- 14) Farazi TA, Ten Hoeve JJ, Brown M *et al* : Identification of distinct miRNA target regulation between breast cancer molecular subtypes using AGO2-PAR-CLIP and patient datasets. *Genome Biol* 15(1):R9, 2014
- 15) Hiraki M, Nishimura J, Takahashi H *et al* : Concurrent Targeting of KRAS and AKT by MiR-4689 Is a Novel Treatment Against Mutant KRAS Colorectal Cancer. *Molecular Therapy—Nucleic Acids* 4: e231, 2015
- 16) Chowdhury EH, Maruyama A, Kano A *et al* : pH-sensing nano-crystals of carbonate apatite: effects on intracellular delivery and release of DNA for efficient expression into mammalian cells. *Gene* 376(1):87-94, 2006
- 17) Wu X, Yamamoto H, Nakanishi H *et al* : Innovative Delivery of siRNA to Solid Tumors by Super Carbonate Apatite. *PLoS ONE* 10(3): e0116022, 2015