

研究報告書

令和2年度：A課題

2022年 4月 5日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 国立がん研究センター

住 所 東京都中央区築地5-1-1

研究者氏名 山本 雄介

(研究課題)

小胞体ストレス誘導による Kras 変異型肺がんの新規治療方法の開発

令和3年 1月 19日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究目的】

がんの多くは遺伝子の異常が原因になり発生するため、活性型変異を有するがんドライバー遺伝子は治療の標的として古くから注目されてきた。ただし、活性型 Ras 遺伝子のような低分子 GTP 結合タンパク質を阻害する分子標的型の抗がん剤の開発は遅れているのが現状であり、活性型 Ras を対象にした薬剤の開発が強く望まれている。申請者は、ドラッグリポジショニングを目的とし既存薬ライブラリーを用いて Ras タンパク質に対する合成致死を引き起こす化合物のスクリーニングを実施した。これまでに、Hippo 経路を阻害する可能性がある化合物ベルテポルフィンと同定し、Kras 変異を有する肺がん細胞に対して選択的に小胞体ストレスを誘導することで細胞傷害性を呈することを見出している。本課題の目的は、候補化合物ベルテポルフィンの抗腫瘍効果に対する詳細な分子解析を実施することである。

【研究方法】

先行研究からはベルテポルフィンが Yap1 阻害剤として働くことで抗腫瘍効果を発揮することは報告されているが、本研究ではこれまでにベルテポルフィンの Kras 変異選択的な殺細胞性は Yap1 を主とした Hippo 経路とは独立していることを結論付けている。さらに、RNA-seq の結果から、ベルテポルフィンで処理した細胞において小胞体ストレスが顕著に誘導されることを見出した。そこで、ベルテポルフィンによる抗腫瘍活性が小胞体ストレスによって誘導されているかを検証した。小胞体ストレスを検証するために、以下の3つの実験を

実施した。1) IRE1によって誘導される XBP1 遺伝子のスプライシングの定量的 PCR 法による検証、2) PERK タンパク質のリン酸化による ATF4 のタンパク質量のウェスタンブロットによる検証、3) 小胞体ストレスによってプロセシングされるタンパク質 ATF6 のウェスタンブロットによる検証である。

さらに、小胞体ストレス阻害剤である Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) 処理によって、小胞体ストレスによって誘導される細胞死が阻害されるかを検証した。

【結果】

XBP1 遺伝子のスプライシングの割合を定量的 PCR で検証したところ、Kras 変異を有する肺がん細胞株 A549 と H23 においては、スプライシングされた XBP1 遺伝子の割合がベルテポルフィンの濃度依存的に上昇することが確認された。Kras 変異を持たない肺がん細胞株 H1650 と H2228 においては、Kras 変異を有する肺がん細胞株ほどのスプライシングされた XBP1 遺伝子は確認されなかった。

PERK タンパク質のリン酸化はウェスタンブロット法によって、明確な結果を得ることはできなかったものの、その下流の eIF2 α のリン酸化はウェスタンブロット法によって確認されたため、ATF4 経路が活性化していると示唆された。ATF6 タンパク質のプロセシングに関しては検出することが出来なかった。

TUDCA 処理による小胞体ストレスの緩和実験を実施したところ、ベルテポルフィン処理を行った細胞のアポトーシスを部分的に抑制することが示された。それは、ベルテポルフィン誘導性のアポトーシスが少なくとも一部は小胞体ストレスによって誘導されたものであることを示す結果である。

【考察】

Kras 変異を有する肺がん細胞株において、ベルテポルフィンが選択的に細胞死を誘導するメカニズムを解析した。RNA-seq 解析から小胞体ストレス関連遺伝子が検出されたため、3つの小胞体ストレスセンサーの活性化を検証した。その結果、IRE1によって誘導される XBP1 遺伝子のスプライシングが誘導されていることが明らかになった。少なくとも部分的には Kras 変異を有する肺がん細胞でのベルテポルフィン誘導性の細胞死の原因の1つであると示唆される結果を得た。これらの成果は JCI Insight 誌に4月8日付でオンラインに掲載された。

【本助成金関連の査読付き論文】

1. Shimomura I, Watanabe N, Yamamoto T, Kumazaki M, Tada Y, Tatsumi K, Ochiya T, Yamamoto Y. Selective targeting of KRAS-driven lung tumorigenesis via unresolved ER stress. *JCI Insight*. 6 (7):137876, 2021.

【本研究関連の代表的学会発表】

1. 下村 巖, 熊崎 実南, 多田 裕司, 巽 浩一郎, 落谷 孝広, 山本 雄介. 分子標的治療薬の新展開 KRAS 変異肺がんにおける小胞体ストレス誘導を介した新規治療開発 日本癌学会総会記事 79回 S16-6 2020年10月
2. 山本雄介 乳がん:Late recurrence の基礎と臨床 dormancy と再発の dynamics. 日本癌学会総会記事 80回 [SST4-5] 2021年9月