

## KRAS結合タンパク質の機能解析を通じた膵臓がんの 治療を目指した研究

著者	松永 大典
学位授与年月日	2015-09-04
URL	<a href="http://doi.org/10.15083/00073382">http://doi.org/10.15083/00073382</a>

# 論文審査の結果の要旨

氏名 松永 大典

**KRAS** 遺伝子は、膵臓がんをはじめヒトの多くのがんで高頻度に活性化変異が生じるがん遺伝子である。がんにおける変異 **KRAS** タンパク質は常に活性化状態にあると考えられており、**RAF**、**PI3K**、**RALGDS** などのエフェクター分子と結合し活性化することで機能している。変異 **KRAS** タンパク質はがん細胞の増殖に必須であり、抗がん剤の重要な標的である。しかし、**KRAS** とエフェクター分子の結合を阻害するようなタンパク質間相互作用の阻害剤の取得は一般的に難しく、ヒトにおいて薬効を示した **KRAS** 直接阻害剤は知られていない。また、**KRAS** の脂質修飾や下流を標的とした阻害剤についても、効果は限定的である。

従って、**KRAS** 変異がんの治療法開発には、**KRAS** タンパク質の制御や、下流に関与する因子の詳細な理解が必須である。そこで本論文の筆者は、難治性であり **KRAS** 変異率が 60~90% と高い膵臓がんに着目し、膵臓がん細胞における **KRAS** の機能に着目して解析した。膵臓がん細胞を用いた **KRAS** 結合タンパク質を、マススペクトロメトリーを用いて網羅的に解析し、新規 **KRAS** 結合タンパク質として IQ motif containing GTPase activating protein 1 (**IQGAP1**)、acylglycerol kinase (**AGK**)、phospholipase C, delta 3 (**PLCD3**) を同定した。

まず **IQGAP1** の機能解析を実施し、このタンパク質が活性型 **KRAS** のみならず不活性型 **KRAS** にも結合すること、その IQ モチーフ部分が **KRAS** との結合に関与することを示した。**IQGAP1** は **KRAS** に特異的に結合し、他の **RAS** ファミリーに結合しなかった。ヒト膵臓がん組織での **IQGAP1** の過剰発現を確認し、*in vitro* での膵臓がん細胞での **IQGAP1** 過剰発現が **KRAS** と **BRAF** の結合を増強、**IQGAP1** のノックダウンによりその結合が減弱したことから、**IQGAP1** の膵臓がんにおける過剰発現は、**KRAS** と **BRAF** の結合を促進することで **KRAS** の機能を修飾していることが推測された。

次に、活性型の **KRAS** に結合活性が高い **AGK** および **PLCD3** の機能解析を実施した。**AGK** と **PLCD3** は、不活性型およびその他の変異型 **KRAS** にも弱いながらも結合すること等から、既知結合タンパク質とは異なる独自の結合様式で **KRAS** と結合することが示唆された。リコンビナントを用いた *in vitro* の結合解析から **AGK** は直接的に **KRAS** に結合することが示唆された。**AGK** の過剰発現により、**KRAS** による **AKT** のリン酸化が促進され、逆にノックダウンにより **KRAS** 依存性 **AKT** リン酸化の低下が認められた。これらの結果から **KRAS** による **PI3K** の制御に **AGK** が関与することが示唆された。さらに、**AGK** のノックダウン実験では、膵臓がん細胞株の増殖抑制が顕著に認められたことから、**AGK** が膵臓がんの治療標的となりうると考えられた。

次に、**KRAS** 変異膵臓がん細胞における **KRAS** が制御するシグナル伝達因子の解析を目指した。**KRAS** のノックダウン実験では、予想通り **RAF-MEK1/2-ERK1/2** 経路の活性

の指標である ERK1/2 のリン酸化が、複数の *KRAS* 変異膵臓がん細胞で共通して減弱した。さらに mTOR の活性の指標である S6K のリン酸化も、複数の細胞株で共通して低下した。MEK1/2 経路の下流で mTOR が制御されていることは、*KRAS* 変異大腸がん細胞を使った実験から推察されている。筆者は、PANC-1 細胞を用いて MEK1/2 阻害剤を使用して解析し、ERK1/2 リン酸化の顕著な阻害にもかかわらず、S6K のリン酸化は全く阻害されなかった。従って、*KRAS* 変異膵臓がん細胞において、*KRAS* が新規のメカニズムで mTOR 活性を制御していることが示唆された。そこで *KRAS* と mTOR の結合を検証し、*KRAS* が mTOR の 1362~2549 aa の領域と結合することを明らかにした。さらに MEK1/2 阻害剤、mTOR 阻害剤が膵臓がん細胞に対する効果を検証し、いずれも、非常に低い濃度でコロニー形成活性を阻害することを明らかにした。以上から *KRAS* 変異膵臓がん細胞においては、RAF-MEK1/2-ERK1/2 経路に加えて、mTOR が *KRAS* の下流の因子として同定され治療標的としても有望であることが示唆された。

なお、本論文は、企業の研究所において実施された共同研究であるが、本論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分大きいものであると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1930 字