

論文の内容の要旨

論文題目 卵巣癌腹腔内播種進展における、活性型 KRAS 遺伝子変異による MEK 経路を介した癌細胞集塊（スフェロイド）形成についての研究

氏名 荻島 樹里

[序論]

卵巣癌に対するプラチナ製剤を含む化学療法は高い奏効率を示しているが、腹膜播種を伴う進行卵巣癌に対する有効率は低く、新たな治療戦略が求められている。卵巣癌は発生起源に基づいて type I と type II に分類され、type I は前癌病変を有し進展速度が遅いのに対して、type II は前癌病変を持たず高分化で進展が速いという特徴がある。Type II は予後不良とされているが、type I の中でも早期発見困難な組織型は必ずしも予後がいいとはされておらず、いずれの type も新規治療検討の余地がある。

Type ごとの遺伝子変異に着目すると、type I 卵巣癌の約 40%が KRAS 変異を有する。一方、type II 卵巣癌における KRAS 変異陽性率は少ないが、RAS 変異や RAS 関連遺伝子の変異を有する場合は予後不良であることが明らかになっており、KRAS 変異を標的とした治療法の開発は今後の卵巣癌治療に有用である可能性がある。

また、卵巣癌腹膜播種の過程において、腹腔内で足場非依存性に増殖する癌細胞集塊、すなわちスフェロイドを形成することが知られており、この足場非依存性の癌細胞増殖が KRAS 変異によって促進されるという報告に基づき、本研究では、KRAS 活性型変異が卵巣癌の進展に与える影響について明らかにすることを目的とした。

また、MEK 経路阻害薬トラメチニブは、KRAS の下流経路の一部である MEK1 および MEK2 活性を特異的に阻害する阻害薬であり、KRAS 活性型変異を有する卵巣癌細胞株において、トラメチニブ投与によって足場非依存性増殖が抑制されるかどうかについて検討した。

本研究の目的は、

1. ID8 細胞と KRAS 活性型変異導入株である ID8-KRAS 細胞の、培養方法による増殖能の違いを評価する
 2. 腹腔内における癌細胞増殖能が、KRAS 活性型変異導入により増強するかを明らかにする
 3. KRAS 活性型変異導入により、足場非依存性の細胞増殖能が増強する要因を明らかにする
 4. MEK 経路の阻害によって、KRAS 活性型変異導入株のスフェロイド形成が阻害され、足場非依存性の細胞増殖能が抑制されるか、*in vitro* および *in vivo* においてそれぞれ明らかにする
- である。

[方法]

1. マウス卵巣癌細胞株 ID8-GFP とヒトの *KRAS* G12V 活性型変異を ID8 に導入した ID8-KRAS-GFP を用い、2D 培養（接着細胞）とヒトの腹腔内環境を模倣した 3D 培養（浮遊細胞）をそれぞれ行い、細胞形態の変化と生存細胞数、細胞増殖能、アポトーシス率を比較した。細胞増殖能は GFP 陽性細胞における EdU の取り込み率を、アポトーシス率は Annexin-V 染色を用いてフローサイトメトリーで評価した。
2. *KRAS* 活性型変異により腹腔内の癌細胞増殖が亢進するかを評価するため、マウス腹腔内へ ID8-GFP と ID8-KRAS-GFP をそれぞれ投与し、腹腔内洗浄液中の細胞増殖能とアポトーシス率をフローサイトメトリーで評価した。
3. *KRAS* 活性型変異による足場非依存性細胞増殖能亢進の要因を追求するため、ID8 と ID8-KRAS をそれぞれ 2D および 3D 培養し、各細胞から抽出した RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析およびパスウェイ解析を行った。
4. MEK 経路の阻害により、*KRAS* 活性型変異に伴うスフェロイド形成や細胞増殖が抑制されるかを検討した。*In vitro* で、MEK 阻害薬トラメチニブを ID8-KRAS-GFP 培養時に添加し、2D 培養および 3D 培養を行った。鏡検によりスフェロイド形成を確認し、細胞増殖能はフローサイトメトリーで評価した。*In vivo* では、マウス腹腔内へ ID8-KRAS-GFP とトラメチニブを投与し、対照群とトラメチニブ投与群で、腹水産生量と生存率を比較した。また、腹腔内洗浄液中のスフェロイド形成を鏡検で評価した。

[結果]

ID8 と ID8-KRAS を、それぞれ 2D および 3D 培養した結果、2D 培養では両細胞株の細胞形態や生存細胞数、細胞増殖能に変化がみられなかったが、3D 培養では ID8-KRAS のスフェロイド形成が ID8 に比べて増加しており、また、生存細胞数と細胞増殖能は ID8 より有意に増加した。アポトーシス率は 2D 培養と 3D 培養で変化を認めなかった。

次に、マウス腹腔内における ID8 と ID8-KRAS の細胞増殖能を評価した結果、ID8-KRAS で ID8 よりも有意に亢進を認めた。アポトーシス率は、ID8 と ID8-KRAS で差は認められなかった。

DNA マイクロアレイ解析を行った結果、ID8 と ID8-KRAS の 2D 培養同士の比較では遺伝子発現パターンに著明な変化は認められなかったが、3D 培養同士の比較では、*KRAS* 活性型変異導入により遺伝子発現パターンが大きく変化した。また、パスウェイ解析の結果より、細胞増殖や細胞周期に関連する遺伝子が、ID8 よりも ID8-KRAS で有意に発現上昇していた。

また、2D 培養対 3D 培養の比較を行った結果、3D 培養下の ID8-KRAS だけで発現上昇していた上位 5 つの遺伝子は、*Tesc*、*Ifitm1*、*Sprr2a2*、*Gas6*、*Dusp5* であった。そのうち *Tesc*、*Ifitm1*、*Gas6* は、RAS-RAF-MEK-ERK 経路における ERK 経路の活性化に関わる遺伝子であり、また癌進展に関連する遺伝子であった。

MEK 阻害薬トラメチニブ投与により、2D 培養では細胞増殖能に変化は認められなかったが、3D 培養ではトラメチニブ高濃度下でスフェロイド形成が抑制され、また濃度依存性に細胞増殖能が低下した。*In vivo* では、腹水産生量は対照群と比較してトラメチニブ群で有意に減少し、生存率も有意に改善した。腹腔内洗浄液中のスフェロイドは、対照群と比べてトラメチニブ群で著明に抑制されていた。

[考察]

KRAS 活性型変異は卵巣癌において予後に関わる重要な因子であり、また足場非依存性の細胞増殖亢進に関与し、腫瘍形成を促進することが既存の報告より示唆されていることから、本研究では、*KRAS* 活性型変異が卵巣癌腹膜播種に与える影響について評価し、新たな治療方法の可能性について検討した。

まず、ID8 と ID8-*KRAS* を 2D 培養すると生存細胞数・細胞増殖能ともに変化が認められなかったが、3D 培養では *KRAS* 活性型変異に伴い生存細胞数の増加と細胞増殖能の亢進を認めたことから、足場非依存の状態において *KRAS* 活性型変異が導入されると、癌細胞増殖が亢進することが示唆された。スフェロイド形成能に関しては定量的な評価は行っていないが、鏡検評価結果から、*KRAS* 活性型変異の導入によってスフェロイドの形成そのものが促進された可能性が示唆され、足場非依存性の癌細胞増殖能亢進に寄与している可能性が考えられた。

マウス腹腔内の細胞増殖能評価でも、ID8-*KRAS* で ID8 よりも有意に癌細胞増殖能の亢進を認め、*KRAS* 活性型変異の導入によって足場非依存性の癌細胞増殖能が亢進することが示唆された。

上記の要因を追求するため、DNA マイクロアレイ解析を行った結果、3D 培養同士を比較した場合に発現遺伝子の変化が大きかったことから、癌細胞が足場非依存性に増殖する際に遺伝子発現の変化が生じると考えられた。また、パスウェイ解析の結果より、細胞増殖や細胞周期関連の遺伝子群が 3D 培養下の ID8-*KRAS* で上昇していたことから、足場非依存性増殖においては、*KRAS* 活性型変異が導入されると細胞増殖が亢進することが、発現上昇した遺伝子からも明らかになり、細胞増殖能評価の結果と一致する結果が得られた。

2D 培養対 3D 培養の発現遺伝子の比較結果からは、3D 培養下の ID8-*KRAS* だけで発現上昇していた遺伝子が、癌進展に関連することが明らかになった。このうち、*Tesc*、*Ifitm1*、*Gas6* は ERK 経路活性化に関与する遺伝子であることから、*KRAS* 活性型変異に伴う足場非依存性細胞増殖能亢進の要因として、ERK 経路の活性化が関わる可能性が示唆された。ERK の上流には RAF-MEK があることから、RAS 活性化により、その下流の RAF-MEK-ERK 経路が活性化し、足場非依存性細胞増殖に寄与していると考えられた。

最後に、MEK 阻害薬投与実験の結果より、*in vitro* においてトラメチニブは用量依存性に 3D

培養下の ID8-KRAS の細胞増殖を抑制し、*in vivo* では ID8-KRAS 投与マウスの腹水産生を抑制し、生存率を改善させた。本研究で用いたトラメチニブの投与量は、実際に臨床でヒトへ使用されている量よりも多いため、さらに少ない投与量で検討する余地があり、また、トラメチニブ投与後の RAS 下流蛋白の発現が低下したことは確認できていないが、有害事象のない範囲で癌細胞の足場非依存性増殖抑制効果が認められた。

また、定量的な評価は行っていないが、鏡検でトラメチニブ投与によるスフェロイド形成の減少を認めたことから、スフェロイド形成が抑制され、腹水産生抑制と生存率の向上に寄与している可能性が示唆された。

以上より、*KRAS* 活性型変異によって、足場非依存性の癌細胞増殖が亢進し、卵巣癌の腹膜播種形成を促進する可能性が示唆された。また、足場非依存性の癌細胞増殖をもたらす一因として、MEK 経路活性が関与することが明らかになった。*KRAS* 活性型変異を有する卵巣癌腹膜播種に対する治療のひとつとして、MEK 阻害薬が有用である可能性が示唆された。さらに、*KRAS* 活性型変異に伴う足場非依存性の癌細胞増殖には、スフェロイド形成の亢進も関与している可能性があり、スフェロイド形成を抑制することも腹膜播種に対する治療標的として考慮される。