

博士論文

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

松永 大典

目次

序論.....	5
第1章：KRAS 結合タンパク質の同定と新規 KRAS 結合タンパク質 IQGAP1 の解析 ...	13
緒言	13
材料および方法.....	14
結果.....	19
考察.....	22
第2章：新規 KRAS 結合タンパク質 AGK、PLCD3 の機能解析	32
緒言	32
材料および方法.....	33
結果.....	38
考察.....	41
第3章：膵臓がんにおける mTOR の役割.....	51
緒言	51
材料および方法.....	55
結果.....	58
考察.....	60
総括.....	69
論文目録.....	70
謝辞.....	71
参考文献一覧.....	72

略語一覽

4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
AGK	acylglycerol kinase
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
CDC42	cell division cycle 42
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EGFR	epidermal growth factor receptor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FTIs	Farnesyl Transferase Inhibitors
GAP	GTPase activating protein
GEF	guanine nucleotide exchange factor
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HRP	Horseradish peroxidase
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
MLLT4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, <i>Drosophila</i>); translocated to, 4
mTOR	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
S6K	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1
PBS	Phosphate buffered saline
PDE6D	phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod, delta
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PLCD3	phospholipase C, delta 3
PLCE1	phospholipase C, epsilon 1

CRAF	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
RALGDS	ral guanine nucleotide dissociation stimulator
RAGA	Ras-related GTP binding A
RHEB	Ras homolog enriched in brain
RIN1	Ras and Rab interactor 1
RTK	Receptor tyrosine kinase
SOS	son of sevenless homolog
TBST	Tris Buffered Saline with Tween-20
TSC1	tuberous sclerosis 1

序論

(1) *RAS* 遺伝子変異

がんは遺伝子変異が細胞に蓄積し、発生・進展すると考えられている。変異により活性化しがんを促進する遺伝子はがん原遺伝子(proto-oncogene)と呼ばれ、逆にがんの発生を抑制する機能をもつ遺伝子はがん抑制遺伝子(tumor suppressor gene)と呼ばれる。現在までに多くのがん原遺伝子、がん抑制遺伝子が発見されているが、その中でも最も初期に発見されたがん原遺伝子が *RAS* と総称される一群の遺伝子である。

RAS はもともとラットに肉腫を引き起こすウイルスの原因遺伝子の名称であり、発見者の名前から *v-Ha-ras* と *v-Ki-ras* と呼ばれる 2 種類の *ras* 遺伝子が最初に発見された。その後ヒト膀胱がん及び肺がんの細胞の DNA からそれぞれに相同な遺伝子が単離され、*HRAS* (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) と *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) と呼ばれている[1-4]。その後 *HRAS*、*KRAS* にホモロジーをもつ *NRAS* が形質転換能をもつ遺伝子として発見された[5, 6]。

がん細胞の DNA から単離された *HRAS* 遺伝子を正常細胞の *HRAS* と比較したところヌクレオチドが 1 個だけ変化し 12 番目のグリシンがバリンへと変化していることが報告された[7-9]。このような *RAS* 遺伝子の点突然変異はがんにおいて最も広く観察される変異の一つである[10]。がんにおいては、*RAS* の内、特に *KRAS* 遺伝子に変異が生じる例が多く、膵臓がんでは 60~90% 程度で *KRAS* 変異が生じており、大腸がんや肺がんなどでも高い割合で *KRAS* 変異が生じていることが見出されている。*NRAS* 遺伝子は悪性黒色腫で特徴的に変異が報告されており、他に大腸がん等でも高い割合で変異が生じている。*HRAS* は *KRAS*、*NRAS* に比較すると変異の頻度は低い、皮膚がんなどで変異が生じていることが報告されている。

RAS 変異を持つがんである膵臓がん、大腸がん、肺がん、悪性黒色腫などは患者数も多く、さらに難治性のがんである。中でも *KRAS* 変異頻度が 60~90% と非常に高い膵臓がんは治療方法が少なく、5 年生存率は 5% 以下となっている[11]。近年新規治療薬として EGFR キナーゼ阻害剤である *erlotinib* が承認され、使用されているが、その延命効果は 10 日程度と報告されており非常に限定的である[12]。大腸がんにおいては抗 EGFR 抗体による治療が実用化されており治療効果をあげているが、*RAS* 変異を持つ大腸がんは抗 EGFR 抗体による治療が全く効果を示さないことが報告されている[13]。また肺がんでは *erlotinib* など EGFR キナーゼ阻害剤が実用化されているが、*KRAS* 変異肺がんには効果を示さないと

報告されている[14]。このような難治性の *RAS* 変異がんの克服を目指すために *RAS* 遺伝子の機能の理解が重要である。

(2) *RAS* タンパク質の機能

ヒト *KRAS* 遺伝子はオルタネティブスプライシングにより *KRAS4A* 及び *KRAS4B* という 2 種類のタンパク質を産生する。*KRAS4A* よりも *KRAS4B* の mRNA が多く発現していると考えられている[15]。*HRAS*、*NRAS*、*KRAS4A*、*KRAS4B* タンパク質(以降まとめて *RAS* タンパク質と表記する)は 188 または 189 アミノ酸のタンパク質であるが、86 番目のアミノ酸までは完全に同一であり、164 番目のアミノ酸までは非常に高いホモロジーを有し、C 末端部分の 25 アミノ酸程度の領域のみ、各 *RAS* タンパク質固有の配列を有している(図 1)。

これら 4 種類の *RAS* タンパク質は C 末端側のシステインがファルネシル化などの脂質修飾を受け細胞膜内側に局在する低分子量 GTP 結合タンパク質(G タンパク質)である。EGF などの増殖因子のシグナルが入ると、SOS など *RAS* の GEF (Guanine nucleotide-exchange factor)タンパク質が活性化し、活性化した SOS は *RAS* を GDP 結合型から GTP 結合型に変化させ、活性化する。*RasGAP* (GTPase-activating protein)と呼ばれる一群の因子は *RAS* の持つ GTP 加水分解活性を促進することにより、GTP 結合型 *RAS* を GDP 結合型 *RAS* に変化させ不活性化する。このように、*RAS* は GTP 結合型と GDP 結合型をサイクルすることで制御されている[16]。がん細胞においては *RAS* タンパク質の特に 12、13、61 番目のアミノ酸部位に変異が入ることが多い[10, 17]。これらのアミノ酸は GTP と結合するポケットに位置しており、変異することにより、*RAS* の GTP 加水分解活性が低下し、*RasGAP* による不活性化にも非感受性となる。このようなメカニズムによって、変異 *RAS* タンパク質は、基本的に GTP に結合し活性化状態にあると考えられている[18]。GTP 結合型と GDP 結合型の *RAS* タンパク質は、特にスイッチ 1 領域(32-38 番目のアミノ酸)とスイッチ 2 領域(59-67 番目のアミノ酸)と呼ばれる 2 つの領域で大きく構造が異なる[19]。この構造上の違いにより、GTP 結合型の *RAS* タンパク質が特異的に *CRAF*、*BRAF* などの *RAF* タンパク質や、*PI3K*、*RALGDS* などのタンパク質と結合しこれらのタンパク質を活性化する。同様に活性型の *RAS* に結合するタンパク質として *RIN1*、*MLLT4(AF4)*、*PLCE1* なども知られており、これらの *RAS* 結合タンパク質はエフェクター分子と呼ばれている[10, 20] (図 2)。実際スイッチ 1 領域に人為的な変異を導入することによって各エフェクター分子との結合

が変化することが知られている[21, 22]。活性型の RAS はこのようなエフェクター分子との結合を通じて、増殖能、細胞死耐性、分化の抑制などに寄与すると考えられている。

(3) 抗腫瘍標的としての RAS の重要性

がんの発生や進展における RAS の重要性は発見時から認識されていたが、がんの維持に関しても変異 RAS が重要であることを示すデータが多く報告されている。まず RAS に対する抗体のマイクロインジェクションにより、RAS 変異による形態異常などが正常化することが報告された[23, 24]。また変異 RAS 遺伝子が特に足場非依存的ながん細胞の増殖や *in vivo* での増殖に必要であることが遺伝子破壊の実験から示された[25]。KRAS 変異によって誘導した肺がんや膵臓がんのマウスモデル、ならびに HRAS 変異を用いた黒色腫のモデルを用い、変異 KRAS や変異 HRAS の発現を遮断することにより、がんが縮小することも報告されている[26-28]。さらに siRNA や shRNA といった手法によって RAS をノックダウンし阻害することにより、変異 RAS 遺伝子を持ったヒトがん細胞が特異的に細胞死を起こすことが示されている[29-31]。従って、RAS タンパク質は特に RAS 変異がんにおいて非常に重要な治療標的であると認識されている。

そこで以下には、KRAS 変異がんにおいて KRAS 関連の治療標的候補と、阻害剤の実例、および現状を示す。

(4) RAS 直接結合阻害剤の現状

RAS 阻害剤取得の試みは古くからなされているが、現在に至るまで RAS を直接的に阻害する化合物でヒトにおいて十分な薬効を示したものはない。最近、Kobe0065[32]や RAS G12C 変異体選択的阻害剤[33]など興味深い阻害剤が報告されているが、RAS 変異細胞に対する活性はそれほど強くなく、臨床応用に耐えうるだけの活性があるかどうかについては未検討である。GTP の結合が RAS の活性に必須であることから、GTP 結合サイトを狙った低分子化合物探索も考えられる。しかし RAS と GTP/GDP との結合が非常に強固であること、さらに細胞内 GTP 濃度が高いため、GTP よりも優先して RAS に結合し阻害するような阻害剤の開発は難しいものと認識されるに至っている。最近になって GDP アナログで、G12C 変異体に特異的に作用する SML-8-73-1 などの興味深い化合物が報告されているが、現状では細胞増殖抑制活性も弱く、実用化まではさらなる改善が必要である[34, 35]。その他にも RAS 直接阻害剤の報告はあるが活性が弱いなどの問題点があり、実用化まで見通せ

ない状況である[36]。

(5) RAS の脂質修飾に関連するタンパク質の阻害剤

歴史的に、RAS 関連で臨床応用が最初に検討された阻害剤は、RAS の C 末端付近のシステインの脂質修飾を担うファルネシルトランスフェラーゼの酵素阻害剤(FTIs : Farnesyl Transferase Inhibitors)である。RAS タンパク質は脂質修飾され細胞膜に局在することがその機能にとって必須であり、FTIs は RAS の機能を阻害できると想定された。FTIs として tipifarnib など多くの化合物の臨床試験が実施されたが、現在までにがんでの明確な有効性は示されていない[37]。前臨床研究から、KRAS、NRAS タンパク質は FTIs によりファルネシル化が阻害された際、他の脂質修飾であるゲラニルゲラニル化されることが判明し、FTIs はこれらのタンパク質の活性を阻害できないと考えられるに至っている[38]。さらに、多くの他の低分子量 G タンパク質もファルネシル化されることが分かっており、FTIs には RAS 選択性はないものと考えられる[37, 39]。

近年、KRAS の脂質修飾を認識し、KRAS の細胞内局在を制御するタンパク質と考えられる PDE6D (phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod, delta)の阻害剤も報告されており、RAS 変異がんに対して活性を示している[40]。しかし PDE6D は HRAS や ARL2、ARL6、RHO6、RHEB などとも結合することが報告されており、RAS 選択的ではないことも考えると[41]、PDE6D 阻害剤がどれ程の安全性をもって KRAS 変異がん薬効を示すものか、今後の研究結果が待たれる。

(6) RAS の下流のタンパク質の阻害剤

現在 RAS シグナル伝達の下流タンパク質を標的とした化合物について精力的な解析がなされている。RAF 阻害剤、PI3K 阻害剤、さらには RAF の下流を標的とした MEK1/2 阻害剤、PI3K の下流を標的とした AKT 阻害剤、mTOR 阻害剤などが前臨床、臨床で検討されている。

前臨床研究においては PD0325901 や AZD6244、trametinib などの MEK1/2 阻害剤は RAS 変異がん細胞に阻害活性を示すことが報告されている[42, 43]。しかし PD0325901 は肺癌患者での第 2 相臨床試験において有効性を示さなかった[44]。AZD6244 も膵臓がん患者での第 2 相試験において有効性を示さなかった[45]。一方 AZD6244 の大腸がんの試験では対照薬とほぼ同等の効果を示した[46]。KRAS 変異がん患者のみを対象とした

AZD6244 の肺がんの第 2 相臨床試験では、docetaxel との併用で有効性を示したが、同時に有害事象も増加しており、現在進行中の第 3 相試験の結果が待たれる状況である[47]。また *BRAF* 変異悪性黒色腫で有効性を示し現在臨床で使用されている trametinib についても、膵臓がんの試験では有効性を示さなかった[48]。

RAF のキナーゼ阻害剤 PLX4720 や GDC-0879、sorafenib などは *BRAF* 変異がん細胞に対しては RAF 活性の阻害と増殖阻害効果を示すものの、*RAS* 変異がん細胞においては、むしろ MEK1/2 の活性を増加させ、増殖を促進することが判明した [49, 50]。RAF 阻害剤により、*BRAF*、*CRAF* 間のホモダイマー、もしくはヘテロダイマーの形成が促進され、結果的に RAF ダイマーの活性が促進されるものと考えられている。

PI3K、AKT、mTOR など他の因子を標的とした阻害剤に関しては、今までのところ *RAS* 変異がんに対し臨床で明確な薬効を示した化合物はないと思われる[10]。しかし、*RAS* と結合できない PI3K 変異体を用いた解析から、*RAS* 変異肺がんの発生に *RAS* と PI3K の結合が必須であるとの報告もあることから[51]、PI3K やその下流の AKT、mTOR に関しても *RAS* 変異がんにおいて一定の寄与は果たしているものと考えられている。

これらの下流の因子の検討の中で、シグナル経路間のクロストークやフィードバックについても知見が深まってきた。例えば ERK1/2 により *CRAF* がリン酸化され抑制されることや、ERK1/2 により EGFR や HER2 がリン酸化され抑制されることが報告されており MEK1/2 阻害剤処理時に、RAF の活性化や PI3K の活性化が生じることが報告されている [52, 53]。一方、AKT や下流である mTOR の阻害剤により、複数のレセプターチロシンキナーゼが活性化し、PI3K や ERK1/2 が活性化することも報告されている [54, 55]。このようなメカニズムにより、各因子の阻害剤が単独では十分に効果を示さないということも十分想定される。

そのため、近年 *RAS* 変異がんに対して MEK1/2 阻害剤と PI3K 阻害剤や AKT 阻害剤、BCL-2 阻害剤などの併用が検討されており前臨床モデルにおいては顕著な効果を示している [56-59]。しかし、複数の化合物の併用によって毒性の上昇も懸念されることから、今後の臨床試験結果が待たれる状況である。

また siRNA を使ったスクリーニングにより *RAS* 変異がんを特異的に傷害しうる標的も複数提案されているが、さらなる検証が必要な段階である [30, 31, 60-63]。

(7) 本研究の目的

以上述べてきたように、様々な標的や手法を通じて *RAS* 変異がんの治療薬の開発が試みられてきたものの、現在もなお具体的な治療法の開発に至っていない。従って、*RAS* 変異がんの治療法開発を目指すために、特に *RAS* タンパク質の制御や、*RAS* の下流に関与する因子をさらに深く理解することが重要である。そこで本研究においては、非常に難治性であり *KRAS* 変異率の非常に高い膵臓がんに着目した。膵臓がん細胞での *KRAS* の機能により深く迫ることを目指し、マスマスペクトロメトリーを用い、*KRAS* 結合タンパク質の網羅的な解析を行った。この解析から新規の *KRAS* 結合タンパク質として *IQGAP1* を見だし、解析した。*IQGAP1* の解析結果について第 1 章で報告する。同様に同定した *AGK*、*PLCD3* タンパク質については第 2 章で報告する。これらの検討に並行して *KRAS* 変異膵臓がん細胞の解析において *mTOR* タンパク質が重要な役割を果たしていることが判明した。そこで第 3 章では *KRAS* と *mTOR* の関係、及び *mTOR* 阻害剤の膵臓がん細胞に対する作用について報告する。

```

HRAS      MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG 60
NRAS      MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG 60
KRAS4B    MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG 60
KRAS4A    MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG 60
*****

HRAS      QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHQYREQIKRVKSDSDVPMVLVGNKCDL 120
NRAS      QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNSKSFADINLYREQIKRVKSDSDVPMVLVGNKCDL 120
KRAS4B    QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVKSDSDVPMVLVGNKCDL 120
KRAS4A    QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVKSDSDVPMVLVGNKCDL 120
*****:* ** : *****:*****

HRAS      AARTVESRQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVEDAFYTLVREIRQHKLRLKLNPPDESGPG 180
NRAS      PTRTVDTKQAHELAKSYGIPFIETSAKTRQGVEDAFYTLVREIRQYRMKKLNSDDGTQG 180
KRAS4B    PSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVREIRKHK-EKMSKDGKKKKK 179
KRAS4A    PSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVEDAFYTLVREIRQYRLKKSKEEKTGPG 180
.:***:.*:.*:*****:***** *:*****:.*: .

HRAS      CMSCKCVLS 189
NRAS      CMGLPCVVM 189
KRAS4B    KSKTKCVIM 188
KRAS4A    VKIKKCIIM 189
*::

```

図1 HRAS、NRAS、KRAS4B、KRAS4A のアミノ酸配列の比較

各タンパク質のアミノ酸配列を Uniprot から取得し、ClustalW を用いて配列を比較した。

*は完全同一アミノ酸、:は性質の似たアミノ酸を示している。

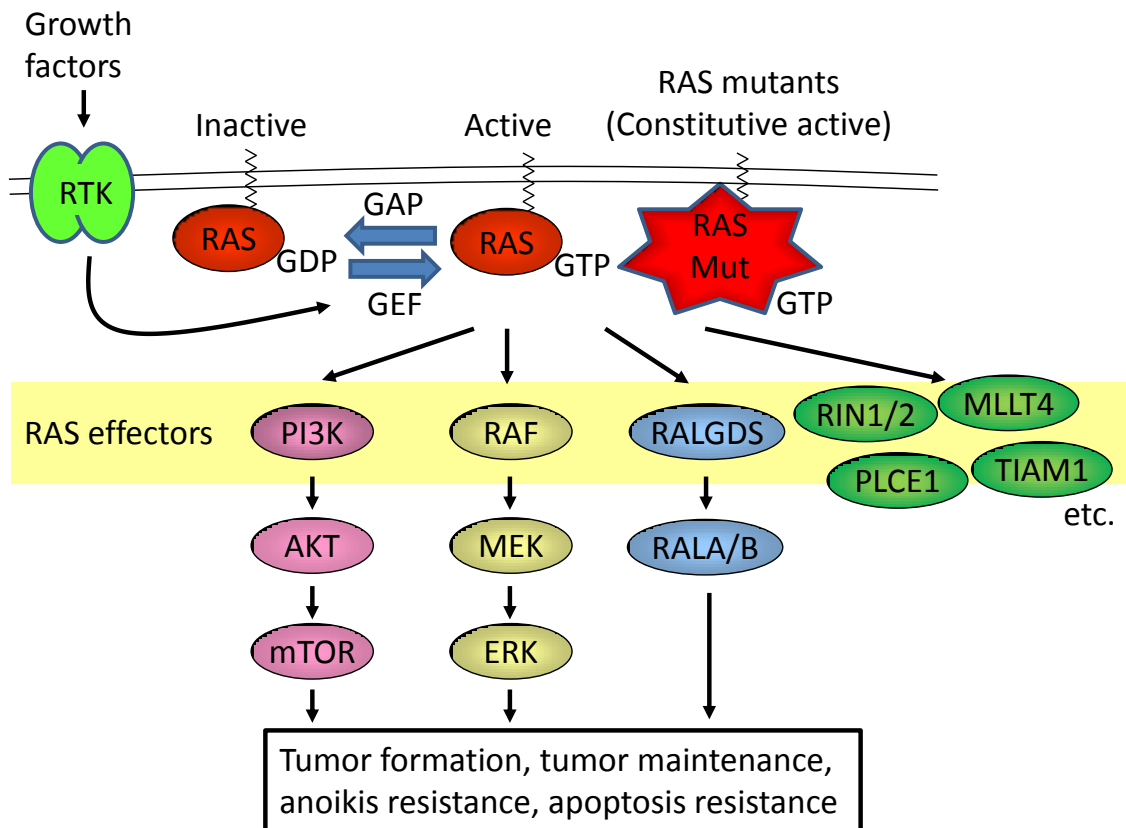


図2 RAS タンパク質の制御するシグナル伝達経路

Stephen らの報告を改変して示した[10]。

第 1 章 : KRAS 結合タンパク質の同定と新規 KRAS 結合タンパク質 IQGAP1 の解析

緒言

膵臓がんにおける KRAS の役割を解析するため、マスマスペクトロメトリーを用いた網羅的 KRAS 結合タンパク質の解析を行った。この中で、IQGAP1 (IQ motif containing GTPase activating Protein 1) タンパク質を新規の KRAS 結合タンパク質として同定した。IQGAP1 は 195 kDa 程度のタンパク質であり calponin homology ドメイン、WW ドメイン、IQ モチーフ、RasGAP related ドメインを持つ。IQ モチーフの領域で BRAF、MEK1/2 などと結合し、WW ドメインで ERK1/2 と結合し、RasGAP related ドメインにおいて RAC1、CDC42 と結合することが知られている[64]。特に BRAF、MEK1/2、ERK1/2 については RAS の下流の因子として知られており、IQGAP1 はこれらのタンパク質に結合することで、RAF-MEK1/2-ERK1/2 経路を活性化するものと考えられている[65-67]。今回の検討において、KRAS もまた IQGAP1 に結合することが分かったことから、IQGAP1 と KRAS の関連を解析し、膵臓がんにおける IQGAP1 の機能解析を行った。

材料および方法

(1) 細胞株

PANC-1 細胞株は American Type Culture Collection から購入した。293A 細胞株は Life Technologies から購入した。SUIT-2 細胞株はヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入した。

PANC-1、293A 細胞株は 10% FBS を含む DMEM 培地中、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。SUIT-2 細胞株は 10% FBS を含む RPMI1640 培地中、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

(2) プラスミドベクターの構築

哺乳類細胞発現用プラスミドとして pCIneo (Promega)を用いた。PCR を用いて各遺伝子を増幅し、制限酵素サイトに入れる方法、または Infusion 試薬(タカラバイオ)を用いた方法でプラスミドベクターに組み込んだ。本論文において、*KRAS* 遺伝子として *KRAS4B* 配列を用いた。変異導入は、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)に準じて行った。第 1 章中で使用したプラスミドベクターについて表 1 にまとめた。なお、KRAS(G12V)は野生型 KRAS の 12 番目のアミノ酸であるグリシン(G)をバリン(V)に変異したタンパク質を示し、KRAS(G12V, T35S)は 12 番目のグリシン (G) がバリン(V)に変わるとともに 35 番目のスレオニン(T)がセリン(S)に変異したタンパク質を示す。

表1: 第1章の実験で使用したプラスミドベクター

名称	Plasmid backbone	insert (transgene)	tags
RAS 関連ベクター			
FLAG-KRAS(G12V)	pCIneo	KRAS(G12V)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(WT)	pCIneo	KRAS(WT)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(S17N)	pCIneo	KRAS(S17N)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(G12V, T35S)	pCIneo	KRAS(G12V, T35S)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(G12V, E37G)	pCIneo	KRAS(G12V, E37G)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(G12V, Y40C)	pCIneo	KRAS(G12V, Y40C)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(G12V, C185S)	pCIneo	KRAS(G12V, C185S)	FLAG (N-term)
Myc-KRAS(WT)	pCIneo	KRAS(WT)	Myc (N-term)
FLAG-HRAS(WT)	pCIneo	HRAS(WT)	FLAG (N-term)
FLAG-NRAS(WT)	pCIneo	NRAS(WT)	FLAG (N-term)
IQGAP1 関連ベクター			
Myc-IQGAP1 Full	pCIneo	IQGAP1(full: 1-1657aa)	Myc (N-term)
Myc-IQGAP1 N1	pCIneo	IQGAP1(1-863aa)	Myc (N-term)
Myc-IQGAP1 C	pCIneo	IQGAP1(864-1657aa)	Myc (N-term)
Myc-IQGAP1 N2	pCIneo	IQGAP1(1-431aa)	Myc (N-term)
Myc-IQGAP1 N3	pCIneo	IQGAP1(432-863aa)	Myc (N-term)
Myc-IQGAP1 N4	pCIneo	IQGAP1(432-744aa)	Myc (N-term)
Myc-IQGAP1 N5	pCIneo	IQGAP1(713-863aa)	Myc (N-term)

(3) siRNA

siRNA は Dharmacon 社から購入した。以下のカタログ番号のものを使用した。D-001810-01 (siControl)、J-005069-08 (siKRAS)、J-004694-06 (siIQGAP1#1)、J-004694-09 (siIQGAP1#2)。

(4) KRAS 結合タンパク質のマススペクトロメトリーによる解析

7.5×10^5 個の PANC-1 細胞、SUIT-2 細胞をそれぞれ 60 mm プレートに播種し、翌日 Lipofectamine LTX (Life Technologies) を用いて、pCIneo ベクター、または FLAG-KRAS(G12V)、FLAG-KRAS(S17N)発現ベクターを導入した。翌日 100 mm プレートに継代し、さらに 2 日後に各細胞を冷やした PBS で 2 回洗浄後、フォスファターゼ阻害剤カクテル(P2850、P5726 どちらも Sigma Aldrich)とプロテアーゼ阻害剤カクテル(Complete EDTA free, Roche)を加えた Lysis buffer M (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100)を 500 μ L 添加した。セルスクレーパーで細胞を回収し、氷上で 20 分放置後、14000 rpm、4°C で 20 分間遠心し、上清を回収することで細胞ライセートとした。各細胞ライセートのタンパク質量をそろえた上で、抗 FLAG M2 抗体アフィニティーゲル(Sigma Aldrich)を加え、4°C で 2 時間穏やかに振盪しながら混合した。ゲルを 500 μ L の buffer W1 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100)で 2 回洗浄し、さらに 500 μ L の buffer W2 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100)で 2 回洗浄した。回収したゲルに、100 μ L の溶出 buffer (100 ng/mL FLAG ペプチド(Sigma Aldrich)、50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100)を添加し、30 分振盪した。遠心して上清を回収し、マススペクトロメトリー解析に供した。マススペクトロメトリー解析は以下のように行った。

遠心上清より、メタノール/クロロホルム沈殿法により界面活性剤及び塩の除去を行った [68]。すなわち 50 μ L の上清に 200 μ L のメタノール、50 μ L のクロロホルム、150 μ L の蒸留水を順次加え、激しく攪拌した。溶液を遠心し 2 層に分離させ、水槽を除去後、クロロホルム層に 200 μ L のメタノールを加え、激しく攪拌した。沈殿した蛋白質を遠心により回収した後に、沈殿を遠心エバポレーターにより乾固した。沈殿は、12.5 μ L の 8 M urea、50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.005% n-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DM)溶液に溶解した後、1.25 μ L の 100 mM dithiothreitol, 100 mM NH_4HCO_3 , pH 8.0

溶液を加え、37° C、20 分間、穏やかに攪拌し、蛋白質を還元した。溶液は 25° C に冷却した後、1.25 μ L の 100 mM iodoacetamide、100 mM NH_4HCO_3 、pH 8.0 溶液を加え、25° C、20 分間、穏やかに攪拌し、蛋白質をアルキル化した。蛋白質溶液に 85 μ L の 50 mM Tris-Cl、pH 8.0、0.005% DM 溶液を添加し、urea 濃度を 1 M に下げた後に、10 μ L の 50 ng/ μ L trypsin (Modified trypsin, Promega)を含む 50 mM Tris-Cl、pH 8.0、0.005% DM 溶液を加え、37° C、12 時間処理し蛋白質を消化した。

蛋白質消化溶液は Stage Tips にて脱塩、濃縮した[69]。Empore Disk C18 (3M)を 0.9 mm 径で 2 片切り抜き、ピペットチップ(P200、Rainin)に挿入した。この Stage Tip をそれぞれ 20 μ L の Methanol で活性化、5% formic acid containing 50% acetonitrile でコンディショニング、5% formic acid で平衡化した。サンプルをロードした後、5% formic acid で洗浄し、40 μ L の 5% formic acid を含む 50%アセトニトリルにて脱塩ペプチドを溶出した。溶出したペプチドはバイアル中で遠心エバポレーターを用いて完全に乾固し、12 μ L の 5% formic acid に溶解した。

Flow splitter にて流速 200-300 nL/min に調整した Agilent 1100 液体クロマトグラフィシステムを LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific)または LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific)に接続し解析を行った。Inertsil ODS-3 C18 (3 μ m、GL Sciences)を充填し内製したエレクトロスプレーイオン化チップカラム(100 μ m internal diameter \times 150 mm length)を用い、100 分以上をかけ、5-28%のアセトニトリル濃度勾配を用いペプチドを溶出した。サンプル量は 4 μ L、すべての測定は duplicate で行った。タンデム質量分析データは、Mascot (Matrix Sciences)[70]を用い、IPI human database[71]を参照検索した。同定蛋白質は、target-decoy approach を用い蛋白質レベル 1% false discovery rate にて選定した[72]。蛋白質の定量は spectral count 法により行った。尚、peptide #は上記基準を満たした各蛋白質の同定ペプチド数であり、蛋白質の量を反映する[73]。また、score は Mascot score であり、蛋白質の同定の信頼度を反映する。

(5) ウェスタンブロッティング解析

細胞ライセートまたは免疫沈降したサンプルを SDS-PAGE で展開後に PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は 5% skim milk (Life Technologies)を加えた TBST でブロッキングした。一次抗体として以下のものを使用した。抗 IQGAP1 抗体は Millipore から購入した。抗 BRAF、KRAS 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。抗リン酸化 ERK

(T202/Y204)、ERK 抗体は Cell Signaling Technology から購入した。2 次抗体として HRP が結合した anti-rabbit IgG または anti-mouse IgG (どちらも GE healthcare)を使用した。HRP が結合した抗 FLAG M2 抗体(Sigma Aldrich)、HRP が結合した抗 Myc 抗体(医学生物学研究所)もあわせて使用した。Western Lightning ECL Pro (PerkinElmer)を用いて、HRP に由来する化学発光を検出した。

(6) FLAG-RAS タンパク質の免疫沈降

PANC-1 細胞を用いた免疫沈降実験においては、FLAG-KRAS(G12V)のプラスミドベクターを PANC-1 細胞に Lipofectamine LTX (Life Technologies)を用いて導入した。3 日後に、細胞を冷やした PBS で洗った後、buffer A (50 mM Tris HCl, pH 7.5、150 mM NaCl、10 mM MgCl₂、1 mM EGTA、1%-Triton X-100) にフォスファターゼ阻害剤カクテル (P5726、P0044 : 共に Sigma Aldrich)および Complete EDTA free を加えた溶液で溶解させた。遠心して上清のみを回収し、細胞ライセートを調製した。タンパク質濃度は Bio-Rad DC assay kit (Bio-Rad)を用いて測定した。各サンプルでタンパク質濃度をそろえた上で、抗 FLAG M2 抗体アフィニティーゲルを加え、4°C で 2 時間穏やかに振盪しながら混合した。ゲルは buffer A で 5 回洗浄した後、抗 FLAG M2 抗体アフィニティーゲルに結合したタンパク質を溶出 buffer S (114 mM Tris-HCl, pH 6.8、1.8 mM SDS、18 mM glycerol、100 mM dithiothreitol)で回収した。

図 6c においては、まず siRNA を Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies)を用いて導入し、翌日プラスミドベクターを Lipofectamine LTX を用いて導入した。その後は同様の作業を行った。

293A 細胞を用いた免疫沈降実験においては、プラスミドベクターを 293A 細胞に Lipofectamine LTX を用いて導入した。翌日、培地を DMEM + 0.5% FBS に置換し、さらに 24 時間培養した。その後 PANC-1 細胞と同様に細胞ライセートを作製し、同様の免疫沈降の作業を行った。

(7) エレクトロポレーションによるトランスフェクション

図 6b において、PANC-1 細胞に siRNA を Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入した。翌日、トリプシンを用いて細胞をプレートから剥離させた後、Neon トランスフェクションシステム(Life Technologies)を用いて Myc-IQGAP1 プラスミドを導入した。導入条件は、

1200 Volt、20 msec、2 pluse であった。エレクトロポレーションから 2 日後、細胞を冷やした PBS で洗った後、buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、50 mM NaF、1 mM sodium orthovanadate、5 mM sodium pyrophosphate、1% Triton X-100)にフォスファターゼ阻害剤カクテル(P5726、P0044)および Complete EDTA free を加えた溶液で溶解させ、遠心して上清を回収し細胞ライセートを調製した。細胞ライセートをウェスタンブロットティング解析した。

(8) 細胞増殖試験

IQGAP1 を十分にノックダウンするため、10 nM の siRNA を Day 0 と Day2 に 2 回、Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入した。Day 3 に PANC-1 細胞をトリプシンを用いて剥離させ、96 ウェルプレートに 2000 細胞ずつまいた。この際、細胞培養液として 10% FBS または 2% FBS を加えた DMEM 培地を使用した。Day 4 と Day 7 に ATPlite (PerkinElmer) を添加し発光の強度を検出することで、細胞内 ATP 量を測定した。細胞内 ATP 量は細胞数に比例すると考えられる。Day 4 と Day 7 の ATPlite 測定の比を取ることで、この期間の細胞増殖速度を算出した。

同様に 2 回の siRNA の導入をしたうえで、10% FBS を含む DMEM 培地で培養した PANC-1 細胞のライセートを Day 3 に回収し、ウェスタンブロット解析を行った。

(9) ヒト正常膵臓、膵臓がんにおける IQGAP1 の発現解析

Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いて、遺伝子発現量を取得し、集積している BioExpress システム(Ocimum Biosolutions)から IQGAP1 の発現量のデータを取得した。正常膵臓組織のデータ数は N = 28 であり、膵臓がん組織のデータ数は N = 44 であった。平均と標準偏差を計算し、図示した。

(10) 統計解析

p 値は、スチューデントの t 検定の手法を用い、等分散 2 標本の両側検定を行い計算した。

結果

(1) 膵臓がん細胞を用いた KRAS 結合タンパク質の網羅的解析

膵臓がん細胞株における KRAS の機能に迫るために、KRAS 結合タンパク質のプロテオームワイドな解析を膵臓がん細胞を使用して行うこととした。膵臓がん細胞株としては KRAS 変異体の膵臓がん細胞株である PANC-1 細胞、SUIT-2 細胞を使用することとした。本論文において KRAS プラスミドとして、メインのアイソフォームと考えられている KRAS4B を一貫して用いた。GTP を分解することが出来ず常に活性型になっていると考えられる KRAS(G12V)変異体、及び GDP と結合し不活性型になっていると考えられている KRAS(S17N)変異体をそれぞれ FLAG タグを付けた形で pCIneo ベクターに組み込み、それぞれのプラスミドを各細胞株に一過性に導入し発現させた。抗 FLAG 抗体を用い FLAG-KRAS タンパク質を免疫沈降し、マスマスペクトロメトリーで解析することにより KRAS 結合タンパク質を同定した。どちらの細胞株においても、ARAF、BRAF、CRAF、RIN1 といった既知のエフェクター分子が KRAS(G12V)特異的に検出された。KRAS の脂質修飾に關与するファルネシルトランスフェラーゼ(FNT A/B)や、RAP1GDS といった既知の RAS 修飾タンパク質は KRAS(G12V)、KRAS(S17N)に共通して検出された。従って本アッセイにより、期待通りに KRAS 結合タンパク質が検出できているものと判断した。(表 2、表 3)

新規 KRAS 結合因子として、特に KRAS(G12V)との結合が強いと考えられた IQGAP1、AGK、PLCD3 についてさらに解析をすることとした。本第 1 章においては IQGAP1 について結果を示す。

(2) IQGAP1 と変異 KRAS タンパク質の結合の解析

マスマスペクトロメトリーの結果から、IQGAP1 は特に PANC-1 細胞において KRAS(G12V)と強い結合をしていると考えられた。そこで PANC-1 細胞において、FLAG-KRAS(G12V)を発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降後に、結合タンパク質をウェスタンブロット法で確認した。既知の KRAS 結合タンパク質である BRAFに加えて、IQGAP1 が、FLAG-KRAS(G12V)によって共免疫沈降されることが確認された(図 3a)。

次に 293A 細胞を用いて、IQGAP1 と各種 KRAS 変異体タンパク質との結合を検出した(図 3b)。293A 細胞に各種 FLAG-KRAS 変異体タンパク質と Myc-IQGAP1 タンパク質を共発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行った。Myc-IQGAP1 は FLAG-KRAS(WT)及び

FLAG-KRAS(S17N)によって共免疫沈降されることが分かった。KRAS(G12V, C185S)変異体は、細胞膜への局在化に必要な脂質修飾を受ける 185 番目のシステインをセリンに変えた変異体である。KRAS(G12V, C185S)変異体は Myc-IQGAP1 との結合を確認出来なかった。

RAS タンパク質はスイッチ 1 領域と呼ばれる 32 ~ 38 番目付近のアミノ酸を介して各種エフェクター分子と結合していると考えられている。特に HRAS においてこの付近のアミノ酸の変異体と各種エフェクター分子との結合が解析されている。HRAS(G12V, T35S)は CRAF と結合するが他のエフェクター分子である PI3K, RALGDS との結合はしないこと、HRAS(G12V, E37G)は RALGDS とは結合するが CRAF、PI3K との結合はしないこと、さらに HRAS(G12V, Y40C)は PI3K とは結合するが CRAF、RALGDS との結合はしないことが報告されている[21, 22]。KRAS と HRAS はホモロジーが高いことから、同様の変異体を KRAS で作製し、IQGAP1 との結合を解析した。すると、KRAS(G12V, T35S)変異体、KRAS(G12V, E37G)変異体、KRAS(G12V, Y40C)変異体のどの変異体も Myc-IQGAP1 と結合することが判明した。HRAS(G12V, T35S)は CRAF との結合が示されていることから KRAS(G12V, T35S)の BRAF との結合を期待したが、KRAS(G12V, T35S)を含めてどの変異体も BRAF との結合を確認出来なかった(図 3b)。

(3) IQGAP1 のドメイン解析

IQGAP1 タンパク質のどの部分が KRAS タンパク質との結合に寄与するかを調べるため、IQGAP1 の部分ペプチドと KRAS(WT)との結合を検討することとした。図 4a に示すような IQGAP1 コンストラクトを作製し、FLAG-KRAS(WT)と共発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行ったところ、全長の IQGAP1 に加えて、N1 (1-863aa)、N3 (432-863aa)、N5 (713-863aa)のコンストラクトにおいて KRAS(WT)との結合が確認された。一方で C (864-1657aa)、N2 (1-431aa)、N4 (432-744aa)のコンストラクトにおいては KRAS(WT)との結合は検出されなかった(図 4b、c)。

(4) IQGAP1 と KRAS、HRAS、NRAS タンパク質の結合解析

既存の報告において、IQGAP1 タンパク質は リコンビナント HRAS タンパク質と結合しないことが示されている[74, 75]。そこで IQGAP1 タンパク質と各 RAS タンパク質 (KRAS、HRAS または NRAS)との結合を比較することとした。293A 細胞において

FLAG-RAS タンパク質と Myc-IQGAP1 タンパク質を共発現させ、抗 FLAG 抗体によって免疫沈降実験を行った。FLAG-KRAS(WT)は Myc-IQGAP1 と共免疫沈降することが観察されたが、FLAG-HRAS(WT)、FLAG-NRAS(WT)はどちらも Myc-IQGAP1 との結合が検出されなかった(図 5)。

(5) 膵臓がんにおける IQGAP1 の機能の解析

次に IQGAP1 の膵臓がん細胞での役割を検証することとした。PANC-1 細胞に Myc-IQGAP1 を過剰発現させることで、共発現させた FLAG-KRAS(G12V)に結合する BRAF タンパク質の量が増加することが観察された(図 6a)。また Myc-IQGAP1 を単独で PANC-1 細胞に過剰発現させたところ、ERK1/2 のリン酸化が上昇することが確認された。この IQGAP1 による ERK1/2 のリン酸化の上昇は KRAS のノックダウンによって阻害された(図 6b)。

内在性 IQGAP1 の KRAS と BRAF 間の結合に対する影響を確認するため、PANC-1 細胞において IQGAP1 をノックダウンしたうえで、FLAG-KRAS(G12V)と結合する BRAF 量を観察した。すると IQGAP1 ノックダウン時に KRAS(G12V)に結合する BRAF 量が低下することが判明した(図 6 c)。

一方で、PANC-1 細胞において IQGAP1 のノックダウン時に ERK1/2 のリン酸化は低下しなかったが、PANC-1 細胞の増殖は若干低下した(図 7)。

さらに BioExpress の発現解析を検索したところ、正常膵臓に比較して、膵臓がんでは有意な *IQGAP1* の発現量の上昇が確認された(図 8)。

考察

膵臓がん細胞を用いたプロテオーム解析と各種蛋白質結合試験によって、新規 KRAS 結合タンパク質として IQGAP1 タンパク質を同定した。KRAS の各種変異体との結合解析から、IQGAP1 は BRAF など既知のエフェクター分子とは独立に KRAS タンパク質に結合するユニークな結合様式を示すことが判明した。

IQGAP1 の過剰発現は KRAS と BRAF の結合を増強し、IQGAP1 のノックダウンによって KRAS と BRAF の結合は減弱した(図 6)。IQGAP1 タンパク質の部分ペプチドを用いた解析から、IQ モチーフ部分が KRAS タンパク質との結合に主要な役割を果たしていると考えられた(図 4)。この IQ モチーフは BRAF、MEK1/2 と結合することが先行研究において報告されている[65, 66]。IQGAP1 は多量体を形成することも示されており[76]、これらの結果から、多量体化した IQGAP1 が KRAS、BRAF と結合しこれらのタンパク質を空間的に近づけることにより、KRAS による BRAF の活性化を促進しているのではないかと推測している。

IQGAP1 は KRAS タンパク質とは結合したが、HRAS、NRAS タンパク質との結合は弱かった(図 5)。KRAS、HRAS、NRAS の違いは C 末端側のアミノ酸であり、従って IQGAP1 は RAS の C 末端側部分を通じて結合しているものと考えられた。

IQGAP1 は RAF-MEK1/2-ERK1/2 経路の各因子と結合し、この経路の活性を制御することが複数の論文で報告されている[65-67, 77]。今回の検討から、IQGAP1 は KRAS とも新たなメカニズムで結合し、KRAS、RAF-MEK1/2-ERK1/2 経路の活性を制御することが示唆された。

一方で KRAS と IQGAP1 の結合が直接的なのか間接的なのかについては、未検討であり今後の課題である。先行研究において Calmodulin タンパク質が KRAS タンパク質に結合し HRAS、NRAS とは結合しないこと[78]、Calmodulin は IQGAP1 の IQ モチーフ部分に結合することが示されており[74, 79]、Calmodulin が KRAS と IQGAP1 の結合を仲介している可能性は考えられた。一方、Calmodulin は GTP 結合型の KRAS タンパク質に選択的に結合すること、またこの結合はカルシウムイオン要求性であることが示されている[78]。他方で GDP 型の KRAS も IQGAP1 と結合すること、KRAS と IQGAP1 の結合試験には EGTA を添加しておりカルシウムイオンはキレートされていると考えられることから、IQGAP1 と KRAS の結合を Calmodulin が仲介する可能性は低いと考えている。

先行報告として、KRAS に良く似た低分子量 G タンパク質 RAP1 が IQGAP1 の IQ モチ

ーフに直接的に結合することが示されている[80]。また MRAS、RHOA、RHOC といった低分子量 G タンパク質が IQGAP1 に結合するとの報告もあり[81, 82]、これらの報告から、KRAS が IQGAP1 に直接的に結合する可能性があり、今後の検討課題である。

IQGAP1 が膵臓がんで高発現していることは今回の解析と共に、先行研究でも複数報告されている[83, 84]。また *IQGAP1* の発現ががん患者の予後と相関することが大腸がん[85]、肝臓がん[86]、子宮体がん[87]、神経膠腫[88]で報告されている。膵臓がんにおいて発現が亢進し、KRAS と BRAF の結合を増強することで、*IQGAP1* が膵臓がんに関与していると考えられる。

今回の検討においては、*IQGAP1* のノックダウンによって PANC-1 細胞の増殖は若干低下するものの ERK1/2 のリン酸化は低下せず、結合試験や *IQGAP1* の過剰発現の結果から想定された結果とはならなかった(図 7)。*IQGAP1* のホモログとして *IQGAP2* や *IQGAP3* が存在することから、これらのホモログが *IQGAP1* の機能を代償した可能性が考えられる[89]。また RAF-MEK1/2-ERK1/2 関連のフィードバック経路が関与する可能性も考えられる。例えば、ERK1/2 の活性により正に制御されている DUSP 脱リン酸化酵素群や SPRY1 は RAF-MEK1/2-ERK1/2 の活性を低下させる[90, 91]。さらには ERK が RAF をリン酸化し、RAF の活性を阻害する負のフィードバックメカニズムも知られている[52]。

IQGAP1 は TIAM1 や PLCE1 など RAF 以外の RAS エフェクター因子とも結合することが報告されている[92, 93]。従って、RAF 経路のみならず、TIAM1 や PLCE1 などの下流も含めた解析が今後の課題と思われる。また RAS 関連シグナルを変化させた際、例えば MEK1/2 阻害剤処理時や EGFR 阻害剤処理時、さらには PI3K 阻害剤処理時に *IQGAP1* がどのように機能しているかを解析することは興味深いと思われる。

本研究によって、*IQGAP1* と KRAS に新たな関係があることが判明した。近年 *IQGAP1* そのものを標的とした創薬も試みられており[77]、本知見が今後の創薬研究に役立つことを期待する。

表 2 PANC-1 細胞を用いて同定した KRAS(G12V)結合タンパク質の一部

Symbol	Description	Ctrl		K-Ras4B V12		K-Ras4B N17	
		Score	Peptide#	Score	Peptide#	Score	Peptide#
Bait							
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog			1064	202	1215	163
Known effectors							
ARAF	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog			616	20		
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1			251	10		
MLLT4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4			298	7		
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1			504	15		
RIN1	Ras and Rab interactor 1			558	17		
Known modulators							
FNTA	farnesyltransferase, CAAX box, alpha			832	28	785	27
FNTB	farnesyltransferase, CAAX box, beta			448	12	473	15
RAP1GDS1	RAP1, GTP-GDP dissociation stimulator 1			972	28	1655	70
Novel binding proteins							
AGK	acylglycerol kinase			196	7	112	4
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1			1232	35	312	11

表 3 SUIT-2 細胞を用いて同定した KRAS(G12V)結合タンパク質の一部

K-Ras binding proteins detected with mass spectrometry in SUIT2 cells transfected with FLAG-K-Ras4B

Symbol	Description	Ctrl		K-Ras4B V12		K-Ras4B N17	
		Score	Peptide#	Score	Peptide#	Score	Peptide#
Bait							
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog			1382	149	991	82
Known effectors							
ARAF	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog			307	9		
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1			159	4		
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1			159	4		
RIN1	Ras and Rab interactor 1			460	13		
Known modulators							
FNTA	farnesyltransferase, CAAX box, alpha			449	16	693	26
FNTB	farnesyltransferase, CAAX box, beta			271	9	396	16
RAP1GDS1	RAP1, GTP-GDP dissociation stimulator 1			712	22	1763	87
Novel binding proteins							
AGK	acylglycerol kinase			290	10	74	2
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1			76	2		
PLCD3	phospholipase C, delta 3			206	6		

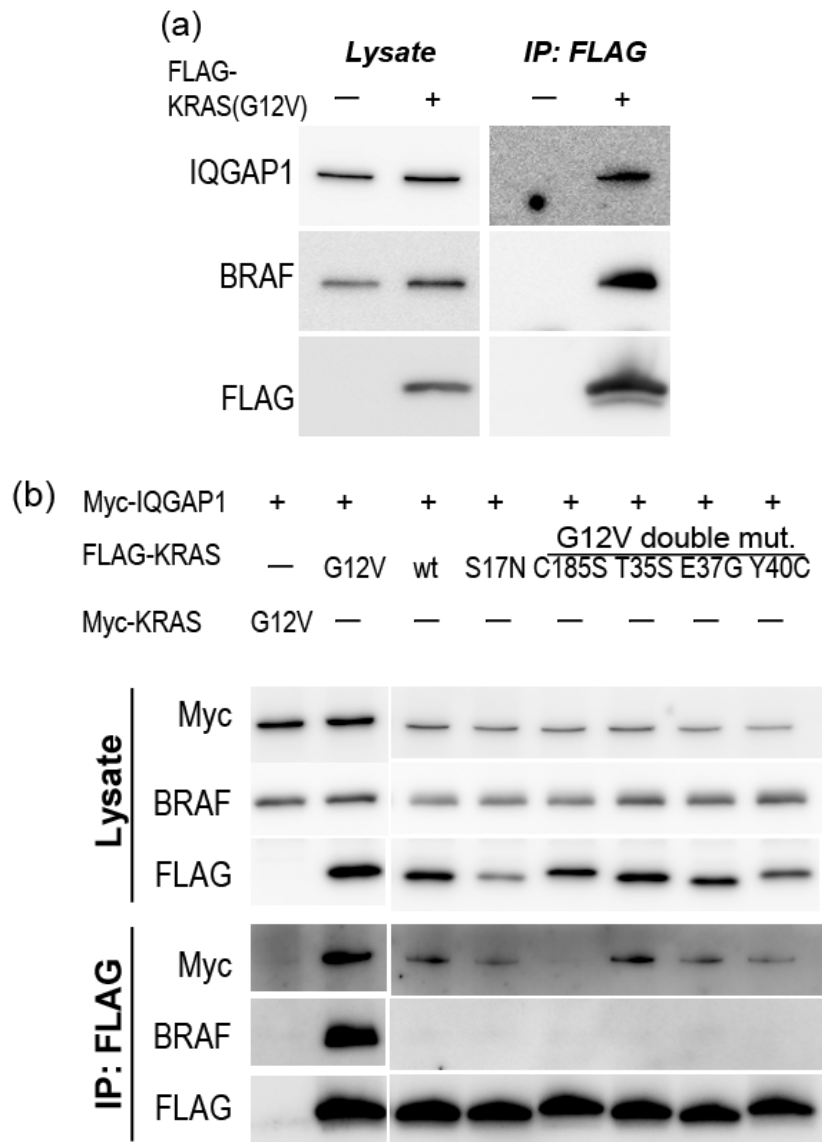


図3 IQGAP1 と KRAS の結合の解析

(a) FLAG-KRAS(G12V)を PANC-1 細胞に発現させ、3 日後に細胞ライセートを作製後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。抗 IQGAP1、BRAF、FLAG 抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

(b) FLAG-KRAS(G12V)及び各種変異体 KRAS コンストラクトを 293A 細胞に発現させ、翌日培地を DMEM + 0.5% FBS に置換し、さらに 24 時間培養した。細胞ライセートを作製し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。抗 Myc、BRAF、FLAG 抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

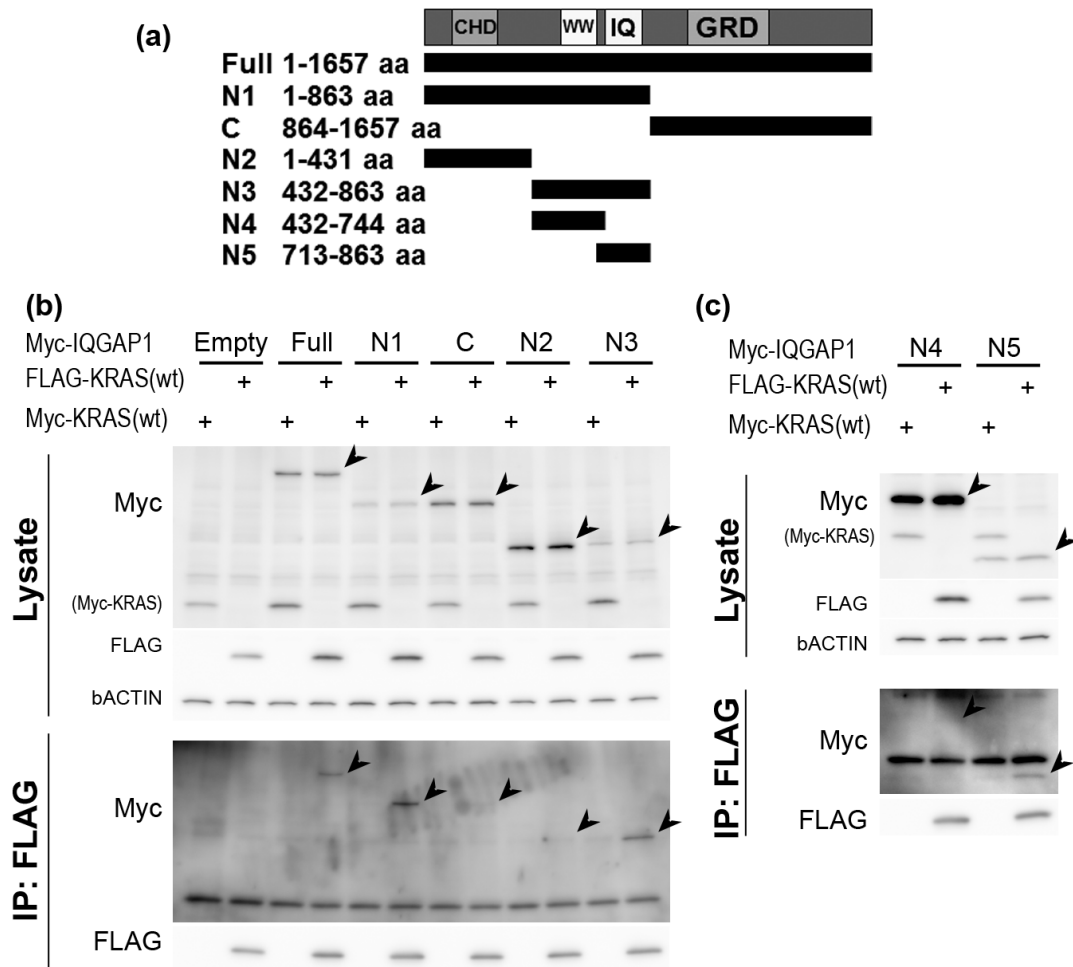


図4 KRAS と結合する IQGAP1 のドメインの解析

(a) 使用した各 Myc-IQGAP1 コンストラクト。

(b, c) 293A 細胞に FLAG-KRAS または Myc-KRAS と各 Myc-IQGAP1 コンストラクトを導入した。トランスフェクションの翌日培地を DMEM + 0.5% FBS に置換し、24 時間後に細胞ライセートを作製し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。抗 Myc、FLAG、 β ACTIN 抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

矢頭は、各 Myc-IQGAP1 タンパク質の期待されるバンド位置を示している。

各ドメインの名称としては以下の略語を使用した。CHD、calponin homology domain; WW、polyproline-binding domain; IQ、IQ-motif; GRD、RasGAP related domain。

Myc-IQGAP1	-	+	+	+	+
FLAG-RAS	-	-	K	H	N
Myc-RAS	-	K	-	-	-

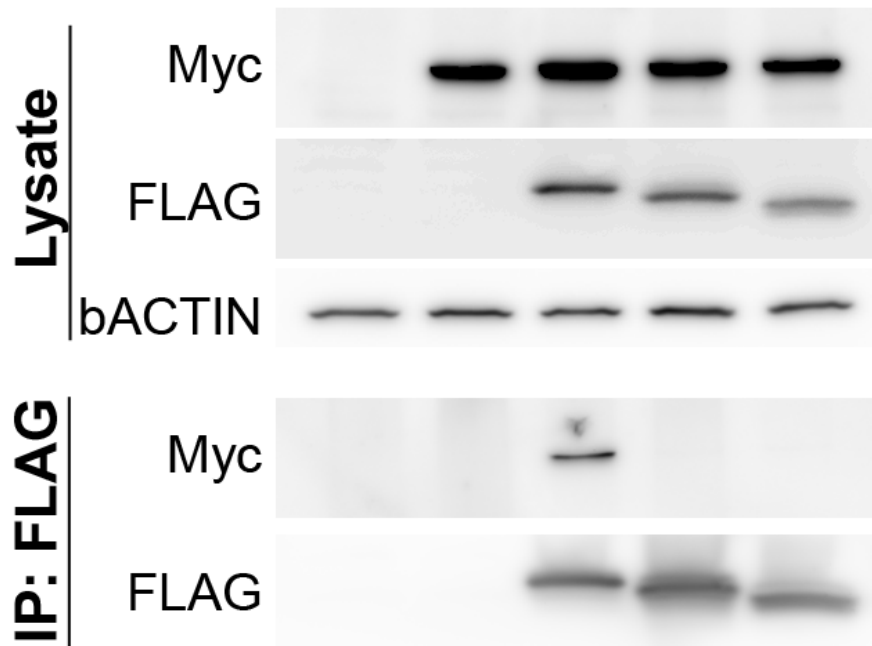


図5 IQGAP1 と KRAS、HRAS、NRAS の結合の比較

293A 細胞に FLAG-KRAS、HRAS、NRAS または Myc-KRAS コンストラクトを導入した。

トランスフェクションの翌日培地を DMEM + 0.5% FBS に置換し、24 時間後に細胞ライセートを作製し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。抗 Myc、FLAG、 β ACTIN 抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

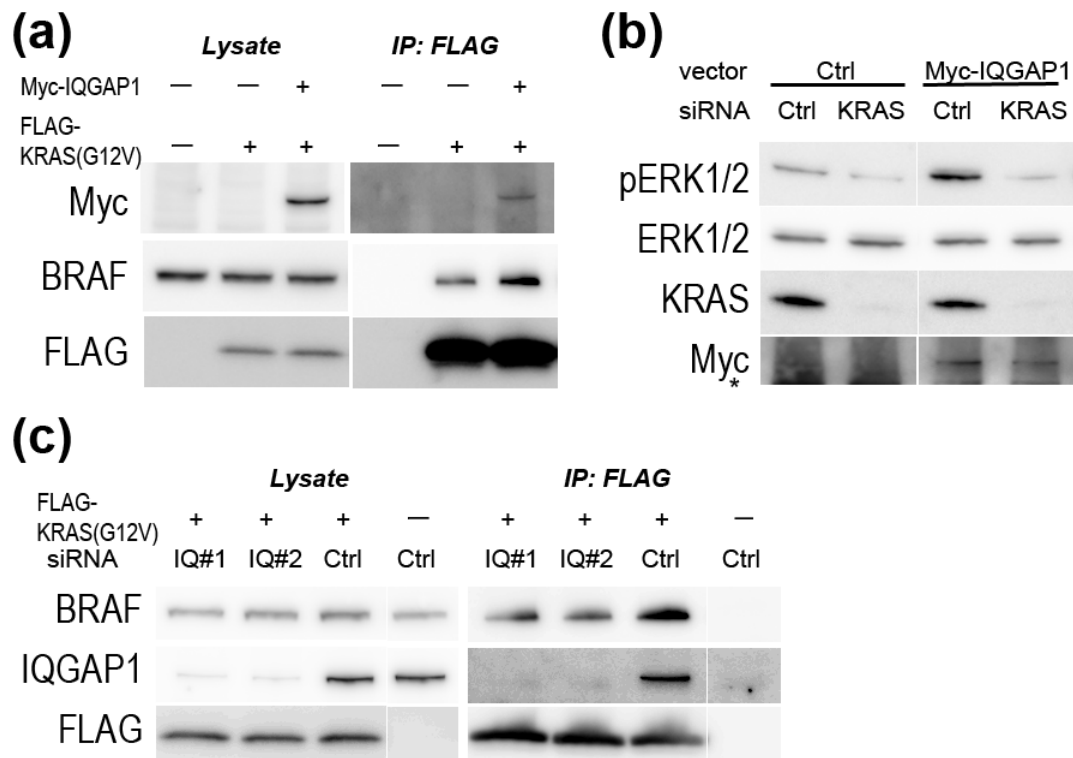


図6 IQGAP1によるKRASとBRAFの結合の促進

(a) PANC-1細胞にFLAG-KRAS(G12V)、Myc-IQGAP1をトランスフェクトし、3日後に細胞ライセートを作製した。抗FLAG抗体を用いてFLAG-KRAS(G12V)を免疫沈降し、抗Myc、BRAF、FLAG抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

(b) PANC-1細胞にKRASを標的としたsiRNAまたはコントロールsiRNAをトランスフェクトし、翌日Myc-IQGAP1発現プラスミドをトランスフェクトした。プラスミドのトランスフェクションから2日後に、細胞ライセートを作製し、抗リン酸化ERK1/2、ERK1/2、KRAS、Myc抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

(c) PANC-1細胞にIQGAP1の2種類のsiRNA(IQ#1及びIQ#2)、またはコントロールのsiRNAをトランスフェクトし、翌日FLAG-KRAS(G12V)プラスミドをトランスフェクトした。プラスミドのトランスフェクションから3日後に細胞ライセートを作製し、抗FLAG抗体を用いてFLAG-KRAS(G12V)を免疫沈降し、抗BRAF、IQGAP1、FLAG抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

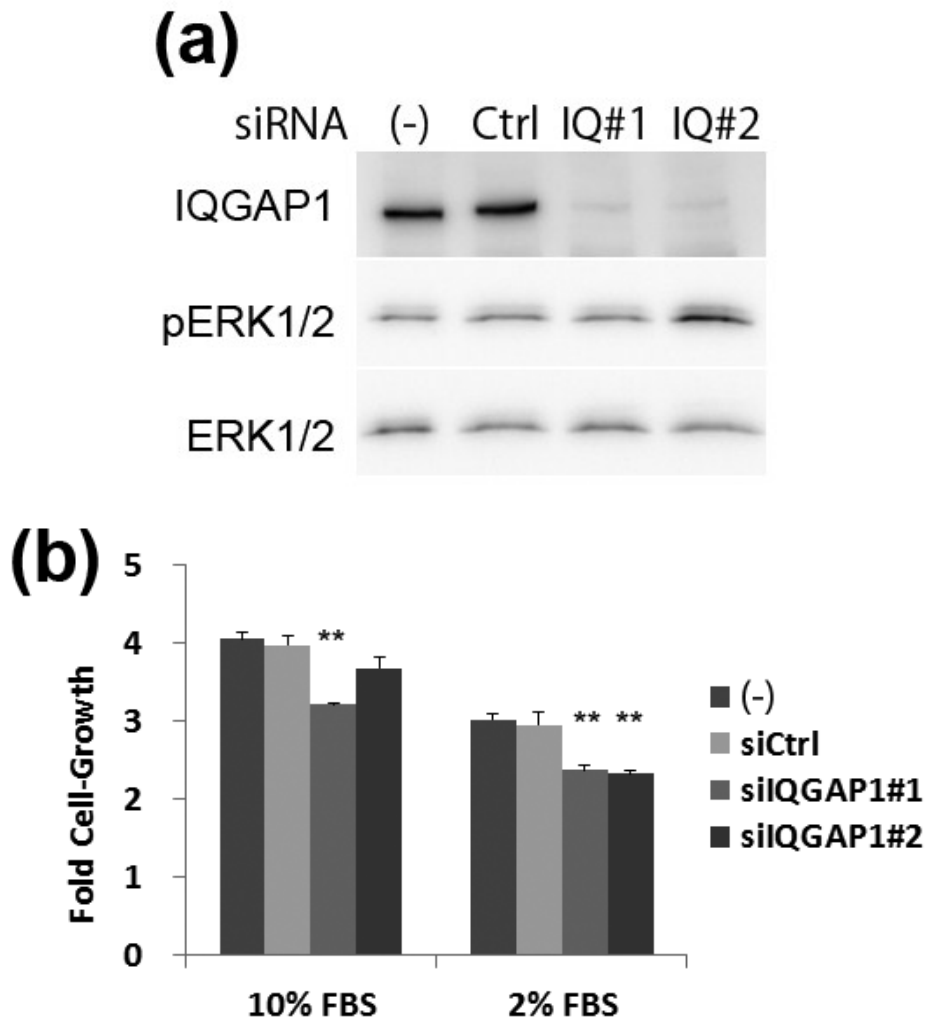


図7 PANC-1細胞に与えるIQGAP1のノックダウンの影響

(a) PANC-1細胞に10 nMのsiRNAをトランスフェクトし、Day 2にもう一度同じsiRNAをトランスフェクトした。翌日(Day 3)継代し、Day 4に細胞ライセートを回収し、抗IQGAP1、リン酸化ERK1/2、及びERK1/2抗体を用いて解析した。

(b) 同様に処理した細胞をDay 3に2000細胞ずつ96ウェルプレートに播種し、培地をDMEM + 10% FBSまたはDMEM + 2% FBSとし、増殖試験を行った。Day 4とDay 7にATPliteを処理し得られた値の比率を計算することで増殖速度を求めた。平均と標準偏差を示した。**: $p < 0.01$ 。

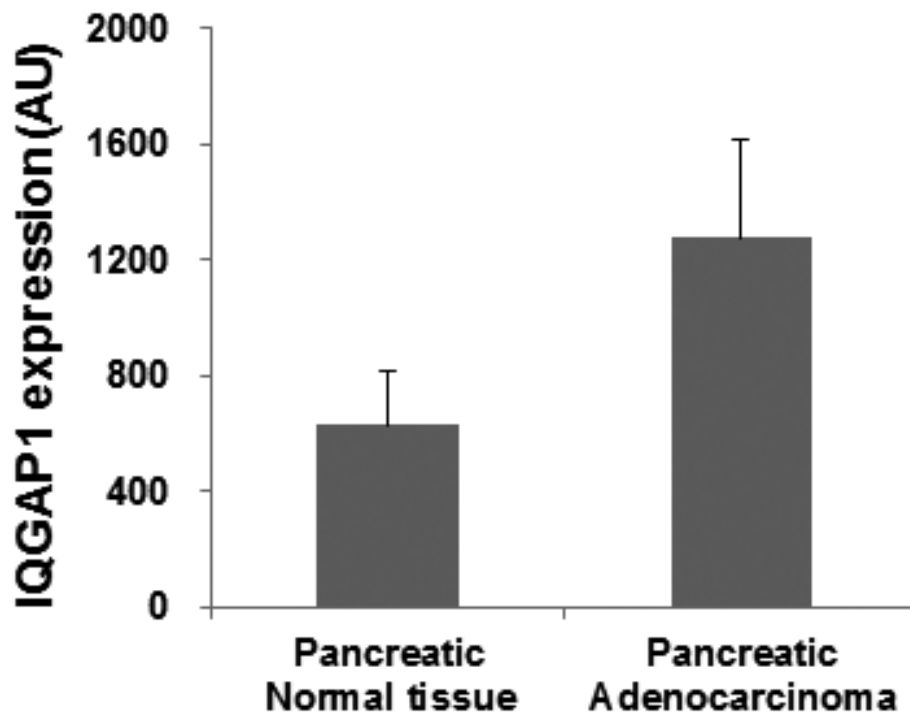


図 8 膵臓がんにおける IQGAP1 の発現解析

正常膵臓、及び膵臓がん部での *IQGAP1* の発現を比較した。データは Ocimum Biosolutions の BioExpress システムから取得した。正常膵臓のサンプル数は 28、膵臓がん部のサンプル数は 44 であり、平均値と標準偏差を計算した上でグラフとした。

第 2 章：新規 KRAS 結合タンパク質 AGK、PLCD3 の機能解析

緒言

膵臓がんにおける KRAS の役割を解析するため、KRAS 結合タンパク質の解析を行った。新規の KRAS 結合タンパク質として AGK (Acylglycerol kinase)、および PLCD3 (phospholipase C、delta 3)を見出したため、KRAS との結合能の解析と、機能解析を行った。

AGK は脂質のリン酸化酵素であり、モノアシルグリセロール及びジアシルグリセロールをリン酸化することで、リゾフォスファチジン酸やフォスファチジン酸を産生する[94, 95]。また AGK は前立腺がん、食道がん、肝臓がん、乳がんで過剰発現し、ERK のリン酸化や JAK-STAT3 シグナル、NF- κ B シグナルの上昇、AKT の活性化と FOXO シグナルの低下、に関与すると報告されている[94, 96-98]。しかし、RAS との関連についての報告はなかった。

Phospholipase C は phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate を加水分解し、ジアシルグリセロール(DAG)とイノシトール 3 リン酸(IP3)に変換する酵素である[99]。DAG は PKC の活性化を担い、IP3 は細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節する。Phospholipase C は β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η の 6 つのクラスに分けられる。Phospholipase C 酵素の中で唯一、 ϵ のタイプである PLCE1 は RAS と結合する報告がある。PLCE1 は他の phospholipase C と異なり、C 末端側に 2 個の RA(Ras association)ドメインを持ち、活性型 RAS が RA ドメインに結合することによって PLCE1 が活性化されると報告されている[100-103]。一方 δ タイプの Phospholipase C には 3 つの酵素(PLCD1、PLCD3、PLCD4)が分類されている。PLCD3 は RHOA の活性を低下させることで、神経突起伸張を制御するとの報告[104]があるが、がんとの関連や RAS との関連については報告がなかった。

今回私の検討から KRAS が AGK、PLCD3 と結合すること、特に AGK とは直接的な相互作用をしていることが示唆され、さらに膵臓がん細胞の増殖に AGK の発現が必須であることが分かったので報告する。

材料および方法

(1) 細胞株

BxPC-3、CFPAC-1、Hs766T、MIAPaCa-2、PANC-1 細胞株は American Type Culture Collection から購入した。PSN-1 細胞株は European Collection of Cell Cultures から購入した。293A 細胞株は Life Technologies から購入した。SUIT-2 細胞株はヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入した。

Hs766T、MIAPaCa-2、PANC-1、293A 細胞株は 10% FBS を含む DMEM 培地中、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。BxPC-3、CFPAC-1、PSN-1、SUIT-2 細胞株は 10% FBS を含む RPMI1640 培地中、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

(2) プラスミドベクターの構築

哺乳類細胞発現用プラスミドとして pCIneo (Promega)、pcDNA-DEST40 (Life Technologies)、p3×FLAG-CMV14 (Sigma Aldrich)を用いた。大腸菌発現用プラスミドとしては pET28a (Novagen)を用いた。PCR を用いて各遺伝子を増幅し、制限酵素サイトに入れる方法、または Infusion 試薬(タカラバイオ)を用いた方法でプラスミドベクターに組み込んだ。*KRAS* 遺伝子として *KRAS4B* 配列を用いた。変異導入は、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)に準じて行った。なお FLAG-HRAS(G12V)、FLAG-NRAS(G12V)、FLAG-KH (G12V)、FLAG-HK (G12V)は GeneArt Strings DNA Fragments (Life Technologies) を利用し作製した人工遺伝子を Infusion 試薬を用いて pCIneo ベクターに組み込むことで作製した。表 4 に本章で使用したプラスミドベクターの一覧を記載する。

表4: 第2章の実験で使用したプラスミドベクター

名称	Plasmid backbone	insert (transgene)	tags
RAS 関連ベクター			
FLAG-KRAS(G12V)	pCneo	KRAS(G12V)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(WT)	pCneo	KRAS(WT)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(S17N)	pCneo	KRAS(S17N)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(G12V, T35S)	pCneo	KRAS(G12V, T35S)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(G12V, E37G)	pCneo	KRAS(G12V, E37G)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(G12V, Y40C)	pCneo	KRAS(G12V, Y40C)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(G12V, C185S)	pCneo	KRAS(G12V, C185S)	FLAG (N-term)
FLAG-HRAS(G12V)	pCneo	HRAS(G12V)	FLAG (N-term)
FLAG-NRAS(G12V)	pCneo	NRAS(G12V)	FLAG (N-term)
FLAG-KH(G12V)	pCneo	KRAS(1-164aa, G12V) / HRAS (165-189aa)	FLAG (N-term)
FLAG-HK(G12V)	pCneo	HRAS(1-164aa, G12V) / KRAS (165-188aa)	FLAG (N-term)
AGK・PLCD3 関連ベクター			
AGK-V5	pcDNA-DEST40	AGK	V5 (C-term)
AGK(G126E)-V5	pcDNA-DEST40	AGK(G126E)	V5 (C-term)
AGK-FLAG	p3×FLAG-CMV14	AGK	FLAG (C-term)
PLCD3-V5	pcDNA-DEST40	PLCD3	V5 (C-term)
リコンビナントタンパク質生産関連			
His-AGK	pET28a	AGK	6×His (N-term)
His-PLCD3	pET28a	PLCD3	6×His (N-term)
His-FLAG-KRAS(G12V)	pET28a	KRAS(G12V)	6×His-FLAG (N-term)

(3) ウェスタンブロッティング解析

細胞ライセートまたは免疫沈降したサンプルは SDS-PAGE で展開後に PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は 5% skim milk (Life Technologies)を加えた TBST でブロッキングした。一次抗体として使用した抗体の由来は以下の通りである。抗 AGK、PLCD3 抗体は Sigma Aldrich から購入した。抗リン酸化 AKT (S473)、AKT、リン酸化 ERK1/2 (T202/Y204)、ERK1/2、PARP 抗体は Cell Signaling Technology から購入した。抗 BRAF 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。抗 CRAF 抗体は BD Biosciences から購入した。2次抗体としては HRP が結合した anti-rabbit IgG または anti-mouse IgG (どちらも GE healthcare)を使用した。HRP が結合した抗 FLAG M2 抗体(Sigma Aldrich)、HRP が結合した抗 V5 抗体(Life Technologies)もあわせて使用した。Western Lightning ECL Pro(PerkinElmer)または Super Signal West Femto (Thermo Fisher Scientific)を用いて、HRP に由来する化学発光を検出した。

(4) FLAG 融合タンパク質の免疫沈降

PANC-1 細胞を用いた免疫沈降実験においては、まずプラスミドベクターを PANC-1 細

胞に Lipofectamine LTX (Life Technologies)を用いて導入した。2 日後に、培地を DMEM + 0.5% FBS に置換した。さらに 24 時間培養後、細胞を冷やした PBS で洗い、buffer A (50 mM Tris HCl、pH 7.5、150 mM NaCl、10 mM MgCl₂、1 mM EGTA、1%-Triton X-100)に Complete EDTA free (Roche)を加えた溶液で溶解させた。遠心して上清のみを回収し、細胞ライセートを調製した。タンパク質濃度は Bio-Rad DC assay kit (Bio-Rad)を用いて測定した。各サンプルでタンパク質濃度をそろえた上で、抗 FLAG M2 抗体アフィニティーゲル(Sigma Aldrich)を加え、4°Cで 2 時間穏やかに振盪しながら混合した。ゲルを buffer A で 5 回洗浄した後、抗 FLAG M2 抗体アフィニティーゲルに結合したタンパク質を溶出 buffer S (114 mM Tris-HCl、pH 6.8、1.8 mM SDS、18 mM glycerol、100 mM dithiothreitol)で回収した。

293A 細胞を用いた免疫沈降実験においては、プラスミドベクターを 293A 細胞に Lipofectamine LTX を用いて導入した。翌日、培地を DMEM + 0.5% FBS に置換し、さらに 24 時間培養した。その後 PANC-1 細胞と同様に細胞ライセートを作製し、同様の免疫沈降の作業を行った。

(5) リコンビナント AGK、KRAS の調製と結合試験

AGK 遺伝子を pET28a ベクター(Novagen)に組み込み、N 末端に 6×His タグを融合したコンストラクトを作製した。タンパク質生産のホストとしては大腸菌 Rosetta2 (DE3)株 (Novagen)を使用した。カナマイシン(50 μ g/mL)とクロラムフェニコール(28 μ g/mL)を加えた 1 L の LB 培地を用い、37°Cで OD600 = 0.6~0.8 程度まで培養した後、IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)を 0.4 mM となるように加えた。18°Cで 20 時間培養し、遠心して大腸菌を回収した。回収した大腸菌は Bugbuster Master Mix (Millipore)を加え室温で 20 分間混合し溶解させた。8000 rpm、4°Cで 15 分間遠心し、上清を回収しさらにもう一度同じ作業をし上清を回収した。こうして得られた大腸菌破碎液に対し、ベッドボリューム 0.5 mL の Ni-NTA アガロース(Life Technologies)を添加し、1 時間 4°Cで混合した。遠心してアガロースを回収し、カラムにつめたのち、25 mL の洗浄 buffer (20 mM Tris-HCl、pH 8.0、0.5 M NaCl、15% Glycerol、10 mM Imidazole)で洗浄した。溶出 Buffer (20 mM Tris-HCl、pH 8.0、0.5 M NaCl、15% Glycerol、0.5 M Imidazole)を添加し、15 分間 4°Cで混合した後、アガロースビーズと分離し上清を回収し AGK タンパク質とした。

FLAG-KRAS(G12V)を pET28a ベクターに組み込み、6xHis-thrombin-FLAG-KRAS(G12V)を発現するベクターを作製した。本ベクターを大腸菌 ArcticExpress(DE3)RIL で発現させた。TB 培地で大腸菌を OD600= 2.4 まで培養し、IPTG を最終濃度 0.1 mM 添加し 10°C で 21 時間培養した。菌体を遠心して回収し、Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.4、400 mM NaCl、20 mM Imidazole、5% Glycerol、0.5 mM TCEP) に懸濁して超音波破碎し、HisTrap FF (GE Healthcare)で Ni-affinity chromatography、続いてゲルろ過カラムである Superdex75 1660 (GE Healthcare)で精製を行い、6× His-FLAG-KRAS(G12V)タンパク質を得た。

結合試験は以下のように実施した。3%の BSA を添加した buffer A に対し、等量の 6× His-AGK を添加し、6× His-FLAG-KRAS(G12V)を添加したサンプルと非添加サンプルを用意した。室温で 80 分放置後、抗 FLAG M2 抗体アフィニティーゲルを加え、4°C で 90 分間穏やかに振盪しながら混合した。ゲルを buffer A で 5 回洗浄した後、抗 FLAG M2 抗体アフィニティーゲルに結合したタンパク質を溶出 buffer S で回収した。

(6) AGK のノックダウン実験

AGK のノックダウンには Life Technologies の Stealth RNAi を使用した。カタログ番号は siAGK#1 (HSS124949)、siAGK#2 (HSS124948)である。コントロールとしては Negative Control Medium GC Duplex (#462001)を使用した。

293A 細胞でのノックダウン実験においては Day 0 に RNAiMax (Life Technologies)を用いて、最終濃度 20 nM となるように siRNA を添加し、導入した。翌日(Day 1)、FLAG-KRAS(G12V)のプラスミドベクターを Lipofectamine LTX を用いてトランスフェクトした。翌日(Day 2)培地を DMEM + 0.5% FBS に置換した。Day 3 に、冷やした PBS で細胞を洗浄後、フォスファターゼ阻害剤カクテル(P5726、P0044: 共に Sigma Aldrich)とプロテアーゼ阻害剤 Complete EDTA free を加えた buffer A を用いて細胞ライセートを作製し、ウェスタンブロット解析を行った。

各種臓器がん細胞株の AGK ノックダウン実験においては、RNAiMax 試薬を用いて、siRNA を最終濃度 2 nM としてトランスフェクションした(Day 0)。2 日後(Day 2)に細胞を播種し、再度最終濃度 2 nM となるように siRNA をトランスフェクトした。Day 3 に冷やした PBS で洗浄後、フォスファターゼ阻害剤カクテル(P5726、P0044)とプロテアーゼ阻害

剤 Complete EDTA free を加えた buffer A を用いて、細胞ライセートを作製し、ウェスタンブロット解析を行った。

細胞増殖速度の測定は以下のように行った。RNAiMax 試薬を用いて、siRNA を最終濃度 2 nM としてトランスフェクションした(Day 0)。Day 2 に細胞を 1000 cells/well として 96 ウェルプレートに播種し、再度最終濃度 2 nM となるように siRNA をトランスフェクトした。2 度目のトランスフェクト直後(Day 2)と、その 4 日後(Day 6)に ATPlite 試薬を用いて細胞内 ATP 量を測定し、Day 6 と Day 2 の ATP 量の比を計算することで細胞増殖の指標とした。PANC-1 細胞を用いた、PD0325901 (Axon Medchem)との併用試験においては、Day 0 に siRNA をトランスフェクトし、Day 2 に PANC-1 細胞を 96 well プレートに 1000 cells/well として播種し、2 回目の siRNA トランスフェクトを行った。6 時間後に培地に PD0325901 を添加し同様の ATPlite を用いた測定を行った。

(7) 統計解析

p 値は、スチューデントの t 検定の手法を用い、等分散 2 標本の両側検定を行い計算した。

結果

(1) AGK、PLCD3 の各種 KRAS 変異体との結合の解析

第1章において、膵臓がん細胞株を用いた KRAS 結合タンパク質のマスマスペクトロメトリ解析から、新規結合タンパク質として AGK、PLCD3 を見いだした。そこで AGK、PLCD3 の機能の解析を試みた。

PANC-1 細胞に FLAG-KRAS(G12V)、KRAS(WT)または KRAS(S17N)を導入した。同程度の FLAG-KRAS タンパク質が発現するように導入プラスミド量を変えてトランスフェクトした。抗 FLAG 抗体で免疫沈降したところ AGK、PLCD3 とともに、どの KRAS 変異体の免疫沈降画分にも検出されたが、特に KRAS(G12V)でシグナルが強いことが判明した。一方で BRAF タンパク質は、KRAS(G12V)とは強い相互作用を示したが、KRAS(WT)、KRAS(S17N)との相互作用は検出されなかった(図 9a)。

293A 細胞においても同様に AGK、PLCD3 が FLAG-KRAS(G12V)と共免疫沈降したことから 293A 細胞を使ってさらなる解析を実施した。KRAS(G12V, T35S)、KRAS(G12V, E37G)、KRAS(G12V, Y40C)のいずれの KRAS 変異体も、多少の強度の違いはあるが AGK、PLCD3 と共免疫沈降することが判明した。一方で KRAS(G12V, C185S)変異体は AGK、PLCD3 との結合を示さなかった(図 9b)。

(2) KRAS、HRAS、NRAS と AGK・PLCD3 の結合の解析

各 RAS アイソフォームと AGK、PLCD3 との結合を検討するために、FLAG-KRAS(G12V)、FLAG-HRAS(G12V)、FLAG-NRAS(G12V)を発現させ FLAG タグによる免疫沈降実験を行った(図 10a)。KRAS(G12V)、NRAS(G12V)の免疫沈降画分において AGK、PLCD3 は容易に検出されたが、HRAS(G12V)の免疫沈降画分においては AGK、PLCD3 のシグナルは弱かった。KRAS と HRAS の間の結合活性の違いをさらに解析するため、KRAS(G12V)と HRAS(G12V)のキメラタンパク質の検討を行った。KH コンストラクトは 1-164 番目のアミノ酸部分まで KRAS(G12V)の配列であり、165 番目以降は HRAS の配列のコンストラクトである。一方 HK コンストラクトは、1-164 番目のアミノ酸部分まで HRAS(G12V)の配列であり、165 番目以降は KRAS の配列としたコンストラクトである(図 10b)。HK コンストラクトを使用した場合に AGK、PLCD3 が顕著に検出され、KH コンストラクトを使用した場合には殆ど検出されなかった。既知のエフェクター分子として BRAF、CRAF を検出した。BRAF はどのコンストラクトにおいてもシグナルを検出した

が、特に KRAS(G12V)、NRAS(G12V)、HK(G12V)において強いシグナルを検出した。CRAF ほどのコンストラクトでも大きな差は示さなかった。

(3) AGK と PLCD3 の結合の解析と AGK の多量体形成の解析

ここまでの結合試験において AGK、PLCD3 は似た RAS 結合活性を示した。AGK、PLCD3 タンパク質同士が結合している可能性を考え、293A 細胞に FLAG タグを付けた AGK-FLAG と V5 タグを付けた PLCD3-V5 を共発現し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降したところ、PLCD3-V5 が共免疫沈降することが判明した(図 11a)。さらに AGK 同士の相互作用の可能性を検証するため AGK-V5 と AGK-FLAG を共発現させ同様の実験を行ったところ、AGK-V5 タンパク質が AGK-FLAG タンパク質によって共免疫沈降することも判明した(図 11b)。

(4) リコンビナント KRAS とリコンビナント AGK の結合の解析

次に His-FLAG-KRAS(G12V)タンパク質と His-AGK タンパク質をそれぞれ大腸菌で発現・精製し、結合試験を実施した。抗 FLAG 抗体で His-FLAG-KRAS(G12V)を免疫沈降したところ、His-AGK タンパク質が共沈降することが判明した(図 12)。

(5) 293A 細胞を用いた AGK の KRAS 経路に果たす役割の解析

特に AGK に着目し、さらに機能解析を行った。293A 細胞に KRAS(G12V)を発現させると、AKT のリン酸化が上昇した。AGK 単独の発現では AKT のリン酸化に変化は見られなかったが、KRAS(G12V)と AGK を同時に発現させると、KRAS(G12V)単独発現時に比較して AKT のリン酸化がさらに上昇した(図 13 a)。

AGK は脂質のリン酸化酵素であり、リゾフォスファチジン酸、フォスファチジン酸を産生するとの報告がある。そこで AKT のリン酸化促進の現象に AGK のキナーゼ活性が関与するか否かを検証するため、キナーゼ活性が無いと報告されている AGK(G126E)変異体 [94]を使用し同様の実験を行った。AGK(G126E)変異体によっても野生型 AGK と同様に AKT のリン酸化が上昇することが観察された(図 13a)。

次に内在性の AGK が同様に AKT のリン酸化に関与するか否かを調べるため、siRNA を用いたノックダウン実験を行った。293A 細胞に AGK の siRNA を導入したうえで KRAS(G12V)を導入したところ、KRAS(G12V)によって上昇するリン酸化 AKT 量が AGK

のノックダウンによって減弱した(図 13b)。

(6) 膵臓がんにおける AGK の役割の解析

膵臓がん細胞での AGK の働きを調べるために、PSN-1 細胞、MIAPaCa-2 細胞、PANC-1 細胞を用いて AGK のノックダウンを行った。どの細胞においても、AGK のノックダウン効率は siAGK#1 で強く siAGK#2 で弱かった。AGK のノックダウンによってどの細胞株においても AKT のリン酸化が低下した。(図 14a-c)。特に MIAPaCa-2 細胞においては PARP の切断も明瞭に観察された(図 14b)。

細胞増殖への影響を検討したところ、どの細胞株においても siAGK#1 により顕著な増殖の阻害が観察された。siAGK#2 により、PSN-1 細胞で増殖が阻害されたが、siAGK#1 よりも効果は弱かった。同様の傾向が MIAPaCa-2 でも観察され、PANC-1 においては siAGK#2 による増殖阻害は観察されなかった。(図 14d-f)。

さらに複数の膵臓がん細胞株を足した上で AGK のノックダウンの検討を行った。BxPC-3 細胞株は *RAS* 遺伝子野生型であり、それ以外の細胞は全て *KRAS* 遺伝子変異を有する細胞である。検討した細胞株はどれも AGK のノックダウンにより増殖が顕著に阻害された。この中で *RAS* 遺伝子が野生型である BxPC-3 細胞株は AGK のノックダウンによる増殖阻害が弱めであった(図 14g)。

PANC-1 細胞および MIAPaCa-2 細胞での細胞内シグナルを検討した結果から、AKT のリン酸化が低下する一方で ERK1/2 のリン酸化の若干の上昇が観察されていた(図 14b, c)。そこで、MEK1/2 阻害剤との併用の効果を検討した。PD0325901 は MEK1/2 阻害剤であり、複数の BRAF 変異がん細胞の増殖に対して 10 nM 以下という非常に低い濃度で 50% の増殖阻害 (GI₅₀) を示し、また *KRAS* 変異がん細胞である MIAPaCa-2 や HCT-116 など複数の *RAS* 変異がん細胞の増殖も 50 nM 以下の濃度で 50% の増殖阻害を示すことが報告されている [105, 106]。一方で PANC-1 細胞は PD0325901 に対して低感受性と報告されており [107]、本検討においても 1 μ M の PD0325901 処理により 12% しか増殖が阻害されなかった。そこで AGK のノックダウンと共に 1 μ M の PD0325901 を処理したところ、それぞれ単独の場合よりも顕著な増殖阻害が確認された(図 14h)。

考察

新規 KRAS 結合タンパク質として AGK、PLCD3 の解析を行った。リコンビナントタンパク質同士が結合したことから、AGK、KRAS の結合は直接的であると示唆された(図 12)。一方で作製したリコンビナント PLCD3 タンパク質は抗 FLAG 抗体の結合したビーズそのものにも結合してしまい、明確な結論に至らなかった(データは示さない)。293A 細胞での検討(図 11)から、PLCD3 は AGK と結合する可能性が高く、AGK と PLCD3 は複合体として KRAS に結合しているのではないかと考えられる。

KRAS の既知エフェクター分子との結合はスイッチ 1 領域(32-38 番目のアミノ酸)を介していると考えられている[20]が、この領域の変異体はいずれも AGK、PLCD3 と結合した(図 9)。一方で、C 末端側の脂質修飾部位の変異体である KRAS(G12V, C185S)は AGK、PLCD3 と結合しなかったことから、膜への局在は結合に必要であると推察された。面白いことに AGK、PLCD3 は KRAS との結合は強いが HRAS との結合は弱い。N 末端側は HRAS の配列を持ち C 末端側 24 アミノ酸部分を KRAS の配列としたキメラタンパク質の検討から、KRAS、HRAS の AGK との結合活性の違いは RAS タンパク質の C 末端側に由来していると考えられた(図 10)。1 つ目の可能性として KRAS の C 末端側配列を AGK が認識することが考えられる。一方で AGK は NRAS とも結合し、HRAS とのみ結合活性が低いことから、HRAS の C 末端側配列が AGK との結合を阻害している可能性も考えられる。いずれにしても、KRAS、NRAS に選択的に結合するというユニークな挙動を示す結合タンパク質であると言える。がんにおいては KRAS、NRAS 遺伝子の変異が多く、HRAS の変異は少ないことが知られている。AGK や PLCD3 といった結合タンパク質の解析が各 RAS タンパク質の役割の違いの理解に貢献すると思われる。

面白いことに、第 1 章で報告した IQGAP1 と KRAS の結合様式が、AGK、PLCD3 と KRAS の結合様式と、完全ではないものの類似している。AGK、PLCD3、IQGAP1 という 3 種のタンパク質間の関係については本報告以上の検討はしていないが、何かしらの関係がある可能性も考えられ、今後の検討課題であると考えられる。

本研究から、AGK は KRAS の下流の一つである AKT のリン酸化の制御に関与していると推測された。先行研究においても AGK が AKT のリン酸化に関与するとの報告があったがそのメカニズムは明らかではなかった[98]。今回の検討において AGK が KRAS、NRAS と結合すること、AGK 単独の発現では AKT のリン酸化は殆ど上昇せず KRAS(G12V)との共発現時に AKT のリン酸化の促進効果が見られること、キナーゼ活性の無い AGK(G126E)

変異体によっても同様の現象が見られることが分かった。これらの結果から、AGKはRASとの結合を介してAKTのリン酸化に寄与しているものと推察される。RASはPI3Kを活性化し、PI3Kの活性化によりAKTのリン酸化が促進されることを考えると、AGKがRASに結合することで、RASによるPI3Kの活性化が増強する可能性が考えられる。

AGKのノックダウンによってAKTシグナルの減弱とともに膵臓がん細胞株の増殖が大きく阻害されることが分かった(図14)。MIAPaCa-2細胞ではPARPの切断も検出されたことから、増殖阻害のメカニズムの一端としてアポトーシスが惹起されていると考えられる。AGKのノックダウンにより、試験した全ての膵臓がん細胞において増殖阻害が観察された。面白いことにRAS遺伝子が野生型であるBxPC-3細胞においてはAGKノックダウンによる増殖阻害が比較的弱く、その他のKRAS変異膵臓がん細胞には強い効果を示していることから、AGKは膵臓がん細胞の中でもKRAS変異体の細胞で強く必要とされている可能性が示唆された。しかしRASが野生型である膵臓がん細胞はBxPC-3しか検討出来ておらず、KRASジェノタイプとAGKノックダウンに対する感受性の関連についてはさらなる検討が必要である。

PANC-1細胞を用いた検討において、AGKのノックダウンによってERK1/2のリン酸化が上昇し、さらにAGKのノックダウンとMEK1/2阻害剤の同時処理が相乗的な増殖阻害を示した(図14)。AGKとRAF-MEK1/2-ERK1/2経路についてこれ以上の検討はしていないが、AKTや下流であるmTORの阻害により、レセプターチロシンキナーゼが活性化する例が知られており、このようなフィードバックによってRAF-MEK1/2経路が活性化した可能性が考えられる[54, 55]。また別の可能性としてRASに結合したAGKが減少することによりRAS-RAF結合が増加し、ERKのリン酸化につながった可能性もあると考えられる。MEK1/2阻害剤はRAS変異がんの有効であるとの前臨床報告があるが、MEK1/2阻害剤は膵臓がんの臨床試験においては限定的な薬効しか示していない[44, 45, 48]。今回の結果は、AGKとMEK1/2の同時阻害によりRAS変異がんさらに効果的な薬効を示す可能性があることを示唆する。

以上の結果から、AGKがKRAS変異膵臓がんの治療標的として適している可能性が考えられた。しかし、AKTリン酸化制御や増殖の制御は、AGKのリン酸化活性と関与しない可能性が高いことから、AGKのリン酸化活性でなく、RASとAGKの結合を標的とする必要があると予想される。

AGKがJAK2と結合しJAK2-STAT3シグナルを増強することも知られている[96]。こ

の際、野生型の AGK のみならず AGK(G126E)変異体も JAK2 を活性化したことから、AGK はそのキナーゼ活性ではなく、JAK2 とのタンパク質間相互作用を通じて機能していると想定されている。AGK の機能に関する報告は多くはないが、キナーゼとしての機能だけでなく、タンパク質間相互作用によって果たす機能もさらに解析する必要があると考えられる。また AGK を標的とした創薬は、AKT 活性のみならず STAT3 活性も同時に阻害出来る可能性がある。がんの治療標的としての AGK の可能性を検討するためにも、AGK、PLCD3 の果たす役割のさらなる理解が必要である。

近年、AGK の欠損がミトコンドリア病の一種である Sengers 症候群 (MIM 212350) において見つかっており、原因遺伝子であると提唱されている [108-110]。Sengers 症候群の患者は、ミトコンドリア活性の低下を示し、白内障や心筋症、筋肉障害を発症する。Bektas らの報告によると AGK のメインの細胞内局在はミトコンドリアであり、小胞体やゴルジ体、細胞膜にも少量存在すると考えられる [94]。一方で先に述べたように、AGK が JAK2 と結合し活性化するとの報告もあることから、AGK は細胞膜上のタンパク質にも作用し、機能しうると考えられる。RAS の局在は主には細胞膜であると考えられているが、ミトコンドリアにも BCL2 と共に局在するとの報告があり [111]、腎臓の組織切片の電子顕微鏡解析からもミトコンドリアでの局在が報告されている [112]。RAS と AGK が細胞内のどの場所で結合しているかは、今後の課題と考えられるが、それとともに、KRAS と AGK の結合が、AGK の機能やミトコンドリアの機能に与える影響や、BCL2 との関連性についても、今後の重要な検討課題と考えられる。

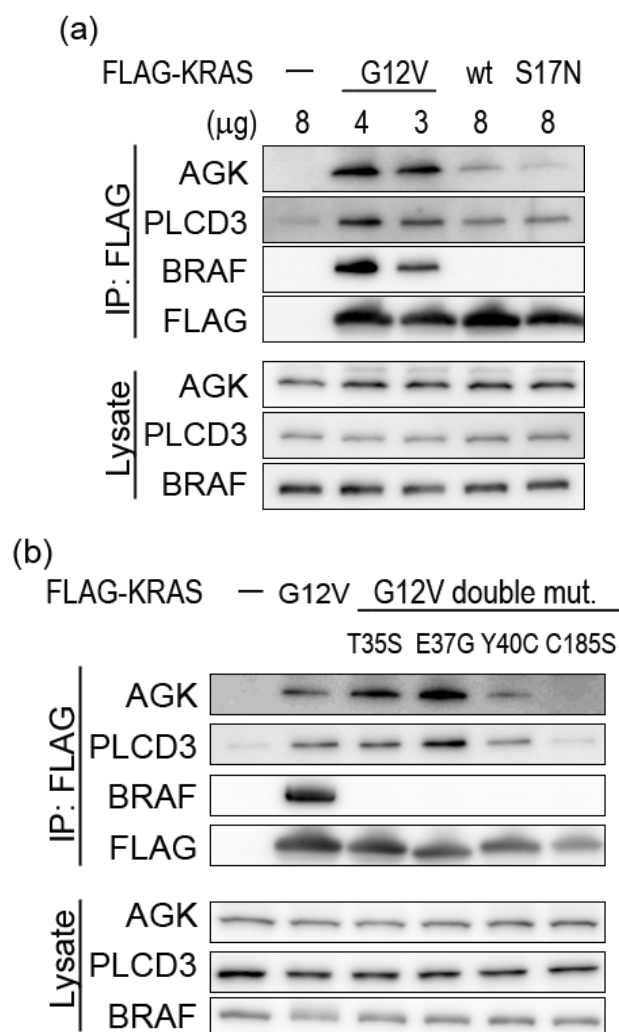


図9 AGK、PLCD3 と各種 KRAS 変異体との結合の解析

(a) FLAG-KRAS(G12V)、FLAG-KRAS(WT)、FLAG-KRAS(S17N)を PANC-1 細胞に発現させ、2 日後に培養液を DMEM + 0.5% FBS に置換した。さらに 24 時間培養後、細胞ライセートを作製し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。抗 AGK、PLCD3、BRAF、FLAG 抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

(b) FLAG-KRAS(G12V)及び各種変異体 KRAS コンストラクトを 293A 細胞に発現させ、翌日培地を DMEM + 0.5% FBS に置換した。さらに 24 時間培養後、細胞ライセートを作製し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。抗 AGK、PLCD3、BRAF、FLAG 抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

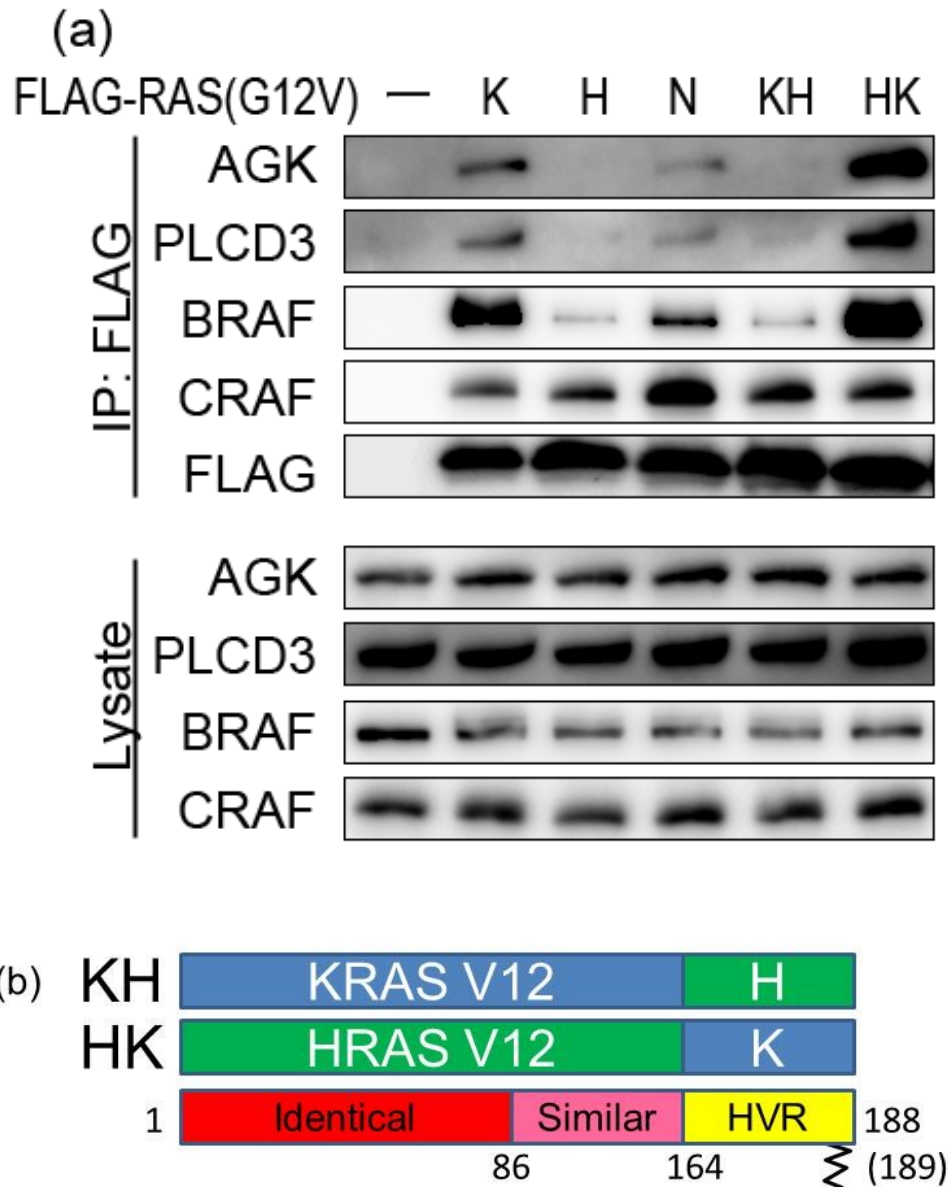


図 10 KRAS、HRAS、NRAS と AGK、PLCD3 の結合の比較

(a) 293A 細胞に FLAG タグを付けた KRAS(G12V)、HRAS(G12V)、NRAS(G12V)、KH(G12V)、HK(G12V)のプラスミドを導入し、翌日培地を DMEM + 0.5% FBS に置換した。さらに 1 日培養後、細胞ライセートを作製し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。抗 AGK、PLCD3、BRAF、CRAF、FLAG 抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

(b) 使用した KH(G12V)、HK(G12V)コンストラクトの概略。HVR: hyper variable region.

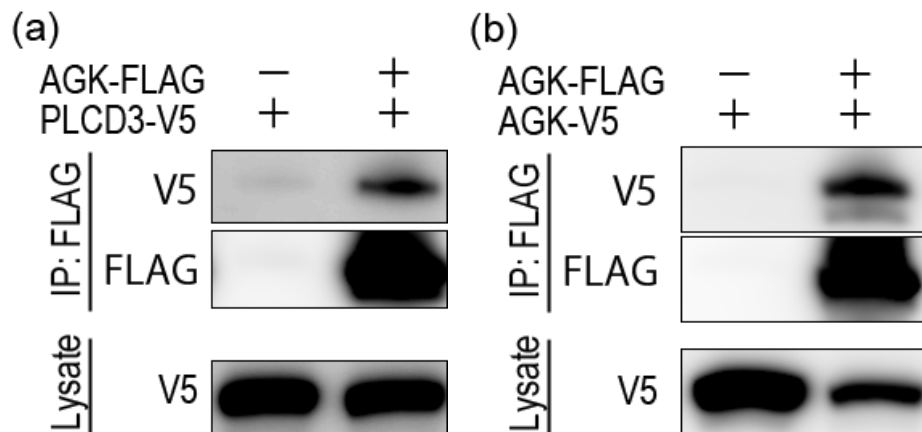


図 11 AGK と PLCD3 の結合の解析と AGK の多量体化の解析

(a) 293A 細胞に AGK-FLAG 及び、PLCD3-V5 のプラスミドを導入し、翌日培地を DMEM + 0.5% FBS に置換した。さらに 1 日培養後、細胞ライセートを作製し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。抗 V5、FLAG 抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

(b) 293A 細胞に AGK-FLAG 及び、AGK-V5 のプラスミドを導入し、同様の実験を行った。

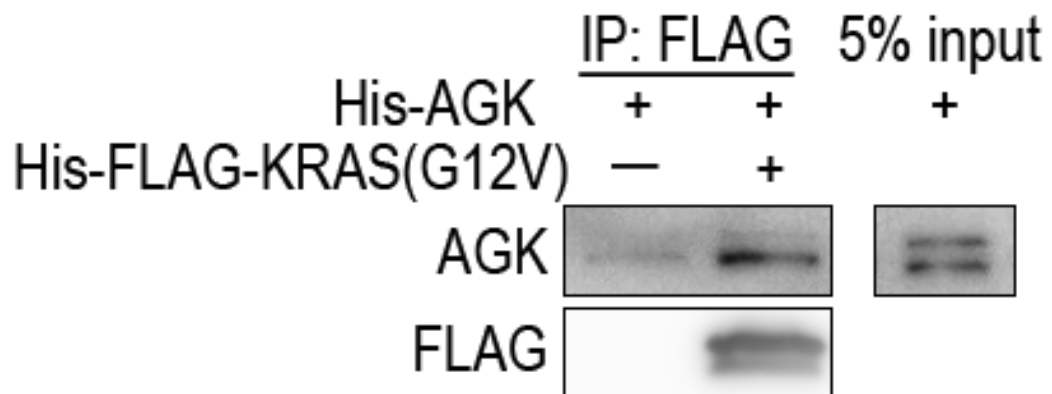


図 12 リコンビナント His-AGK とリコンビナント His-FLAG-KRAS(G12V)の結合の解析
 大腸菌で作製した 6×His-AGK と、大腸菌で作製した 6×His-FLAG-KRAS(G12V)を混合
 し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降後に、抗 AGK、FLAG 抗体で検出した。

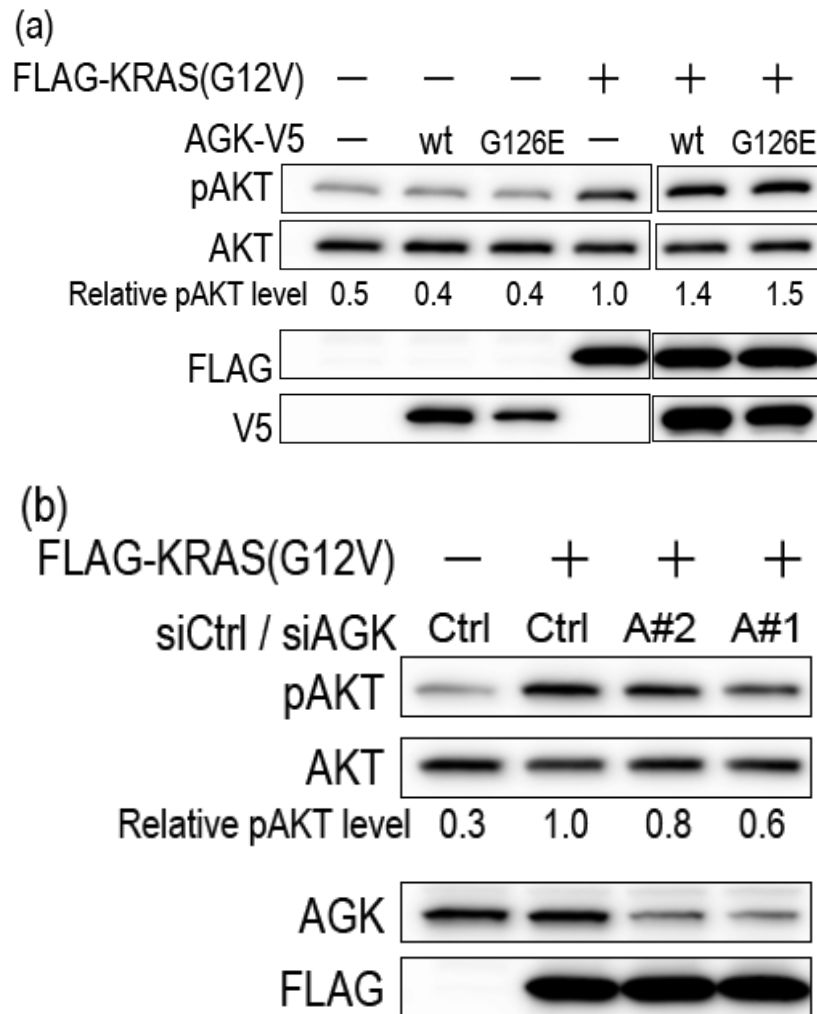


図 13 KRAS により誘導される AKT のリン酸化に与える AGK の寄与

(a) 293A 細胞に FLAG-KRAS(G12V) 及び AGK-V5 または AGK(G126E)-V5 を同時に導入し、翌日培地を DMEM + 0.5% FBS に置換した。さらに 24 時間培養後、細胞ライセートを作製した。抗リン酸化 AKT (S473)、AKT、FLAG、V5 抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。相対的なリン酸化 AKT のレベルも示した。

(b) Day 0 に、293A 細胞に AGK を標的とした 2 種類の siRNA (A#1、A#2) を導入した。Day 1 に FLAG-KRAS(G12V) のプラスミドをトランスフェクトし、翌日 (Day 2) 培地を DMEM + 0.5% FBS に置換した。さらに 24 時間培養後、細胞ライセートを作製した。抗リン酸化 AKT (S473)、AKT、AGK、FLAG 抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。相対的なリン酸化 AKT のレベルも示した。

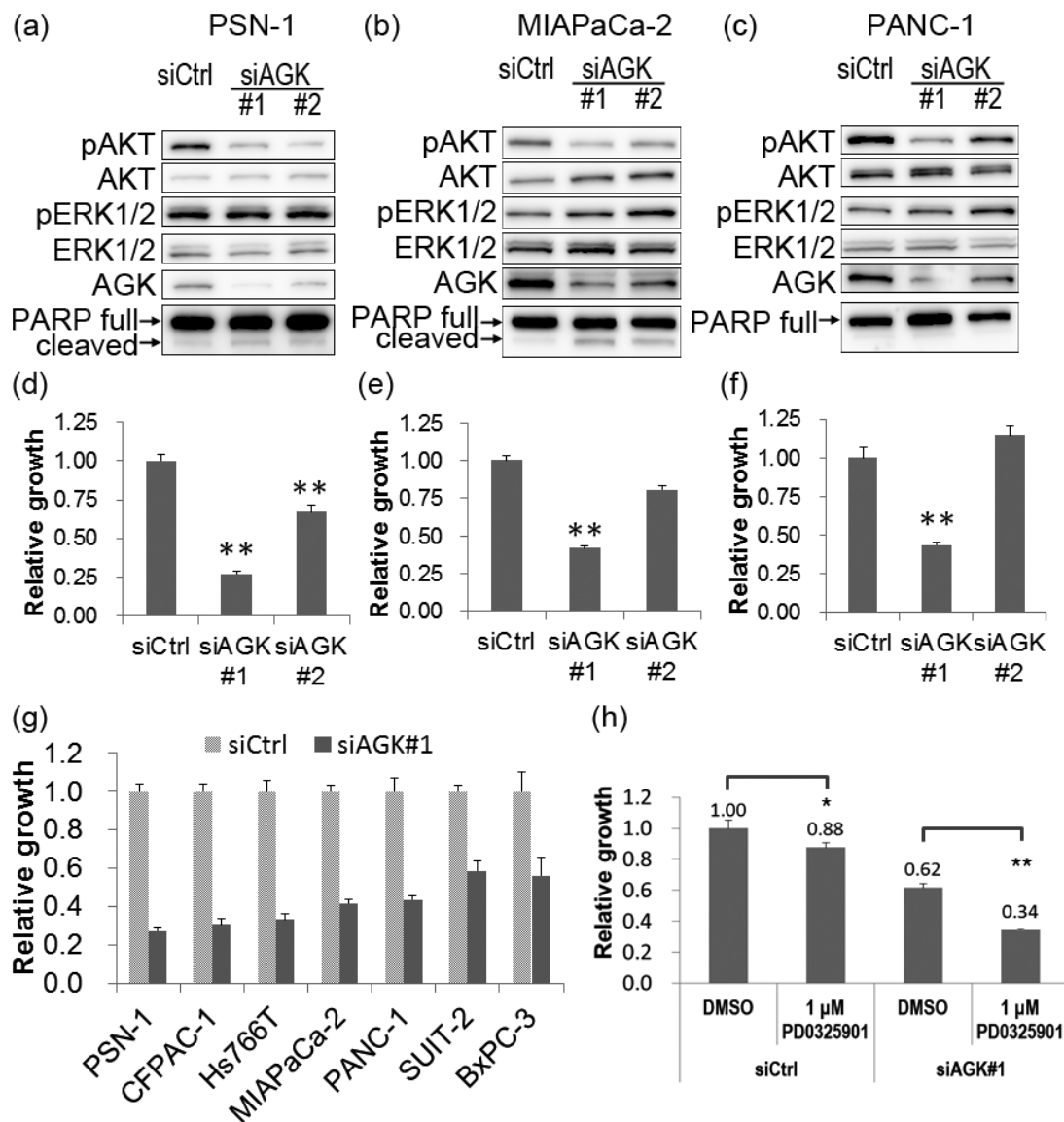


図 14 膵臓がん細胞株での AGK のノックダウンの影響

各種膵臓がん細胞株に 2 nM の siRNA をトランスフェクションし、2 日後(Day 2)にもう一度 2 nM の siRNA をトランスフェクトし細胞をまき直した。Day 3 に細胞ライセートを作製し、抗リン酸化 AKT (S473)、AKT、リン酸化 ERK1/2 (T202/Y204)、ERK1/2、AGK、PARP の抗体を用いてウェスタンブロット法にて解析した。PSN-1 細胞 (a)、MIAPaCa-2 細胞 (b)、PANC-1 細胞 (c)。

2 度目のトランスフェクト時(Day 2)と、その 4 日後(Day 6)に ATPlite 試薬を用いて細胞内 ATP 量を測定し、Day 6 と Day 2 の ATP 量の比を計算することで細胞増殖の指標とした。PSN-1 細胞 (d)、MIAPaCa-2 細胞 (e)、PANC-1 細胞 (f)、各種細胞株 (g)。

(h) PANC-1 細胞において 2 nM の siRNA をトランスフェクションし、2 日後(Day 2)にもう一度 2 nM の siRNA をトランスフェクトし細胞をまき直した。この際、さらに PD0325901 を添加した。Day 2 と Day 6 に ATPlite を用いて細胞内 ATP 量を測定し、その比を取ることで、細胞増殖の指標とした。

(d)-(f)では siCtrl との比較について t 検定を行った。(h)では記載の組み合わせでの t 検定を行った。グラフには平均と標準偏差を示した。*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 。

第3章：膵臓がんにおける mTOR の役割

緒言

第3章では、KRAS の下流として特に mTOR に焦点をあて解析を行ったので以下に報告する。

mTOR (mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase))は細胞の増大や増殖、アミノ酸応答に中心的な役割を果たすセリン・スレオニンキナーゼである。mTOR は mTORC1 (mTOR complex 1)及び mTORC2 (mTOR complex 2)と呼ばれる2つの複合体を作り機能していると考えられている。どちらの複合体も酵素活性は mTOR に由来し、mLST8、DEPTOR を共通して含む。mTORC1 にはさらに特異的な結合タンパク質として RAPTOR、PRAS40 が含まれ、mTORC2 には RICTOR、mSIN1、PROTOR1/2 が含まれる[113]。

mTORC1 は増殖因子やストレス、アミノ酸などに応答し、活性が制御される。mTOR の上流で中心的な役割を果たす因子として、TSC1/2 (tuberous sclerosis)複合体と RHEB (Ras homolog enriched in brain)タンパク質が知られている。RHEB タンパク質は低分子量 G タンパク質であり、GTP 結合型の RHEB は mTORC1 の活性を促進する[114]。一方 TSC1/2 複合体は RHEB タンパク質を GTP 結合型から GDP 結合型に変化させる RHEB の抑制因子である[115, 116]。TSC1/2 は複数のシグナルによって制御されているが、増殖因子のシグナルが入ることで、特に AKT、ERK1/2、RSK1 によって直接的にリン酸化され活性が抑制されることが分かっている[117-119]。一方で、アミノ酸のロイシンとアルギニンにより、低分子量 G タンパク質である RAG ファミリータンパク質(RAGA, RAGB, RAGC, RAGD)の活性が変化し、mTORC1 が制御されることも報告されている[120]。活性化した mTORC1 は S6K や 4EBP1 をリン酸化することで、タンパク合成を制御し[119]、ULK1/ATG13/FIP200 をリン酸化することでオートファジーを制御することが知られており[121-123]、他にも脂質合成や低酸素応答等にも働くことが報告されている[113]。

mTORC2 の制御メカニズムは不明な点が多いが、増殖因子の刺激により、PI3K の下流で制御されることが分かっている。mTORC2 は AKT や PKC α をリン酸化し、細胞増殖や細胞内骨格の制御に関与すると考えられている[124, 125]。

Rapamycin は放線菌 *Streptomyces Hygroscopicus* が生産する化合物であり、mTORC1 の阻害剤である。Rapamycin の誘導体(rapalogs)の temsirolimus や everolimus が腎臓がん、乳がん、膵内分泌腫瘍等で抗腫瘍活性を示すことが示されており、現在臨床で使用さ

れている[126-129]。しかしその効果は限定的であることも報告されている[113]。Rapamycin はまず FKBP12 と複合体を形成し、この複合体が mTOR の FRB ドメインに結合すると考えられており、この 3 者複合体の共結晶も報告されている[130-132]。おそらくはこの作用機序に起因して、rapamycin による mTOR の阻害活性は基質によって異なっている。Rapamycin は mTORC1 による S6K のリン酸化を阻害する。一方で mTORC1 による 4EBP1 のリン酸化を rapamycin は部分的にしか阻害せず、mTORC2 の活性を rapamycin は阻害しないことが報告されている[133, 134]。Rapalogs も同様の部分的な mTORC1 阻害剤と考えられ、臨床で抗腫瘍活性が限定的であることの理由の 1 つには、この部分的抑制というメカニズムに起因するものと考察されている。一方で mTOR の ATP 結合ポケットにはまるキナーゼ活性の阻害剤は mTOR の基質のリン酸化を幅広く阻害し、rapalogs よりも強い増殖阻害を示すことが報告されている。これらの報告の中で、特に 4EBP1 のリン酸化の阻害活性が重要であると報告されている[133-135]。現在 mTOR のキナーゼ阻害剤としては AZD8055、AZD2014、INK128、DS-3078a などが報告されており、臨床試験が行われている[136-139]。

RAS は PI3K-AKT 経路、及び RAF-MEK1/2-ERK1/2 経路を制御するため mTOR の活性も制御すると考えられる。*KRAS* の変異が非常に多い膵臓がんに着目してみると、PI3K/AKT 経路が変化し、mTOR も活性化されていることが示唆されている[140-142]。一方、mTOR キナーゼ阻害剤の感受性の検討においては、*KRAS* 遺伝子変異を持つ細胞は比較的 mTOR 阻害剤に抵抗性を示すことから、*KRAS* 変異がんの mTOR 依存性は高くはないとも想定されている[143]。

Rapamycin や rapalogs、また mTOR キナーゼ阻害剤は多くのがんのモデルで抗腫瘍活性を示しているが膵臓がんに関する報告は比較的少ない。最近 Matsubara らは、膵臓がんのがん幹細胞様活性を rapamycin が阻害することを報告している。この報告では、複数の膵臓がん細胞株において、がん幹細胞様活性であるコロニー形成能を rapamycin が阻害することが報告されている。しかしコロニー阻害活性は細胞株によって異なり、PANC-1 細胞では 50%程度しか阻害しないことも同時に示されている[144]。

今回、膵臓がんにおける *KRAS* の機能解析を行う中で、*KRAS* 変異膵臓がん細胞において、特に RAF-MEK1/2-ERK1/2 経路と mTOR の活性が *KRAS* によって制御されていると考えられた。mTOR 制御のメカニズムの一端として、*KRAS* が mTOR と複合体を作ることとも判明した。さらに、*KRAS* 変異膵臓がん細胞において、mTOR 及び MEK1/2 がコロニー

形成に必須の役割を果たしていることを示す結果が得られたため、以下に報告する。

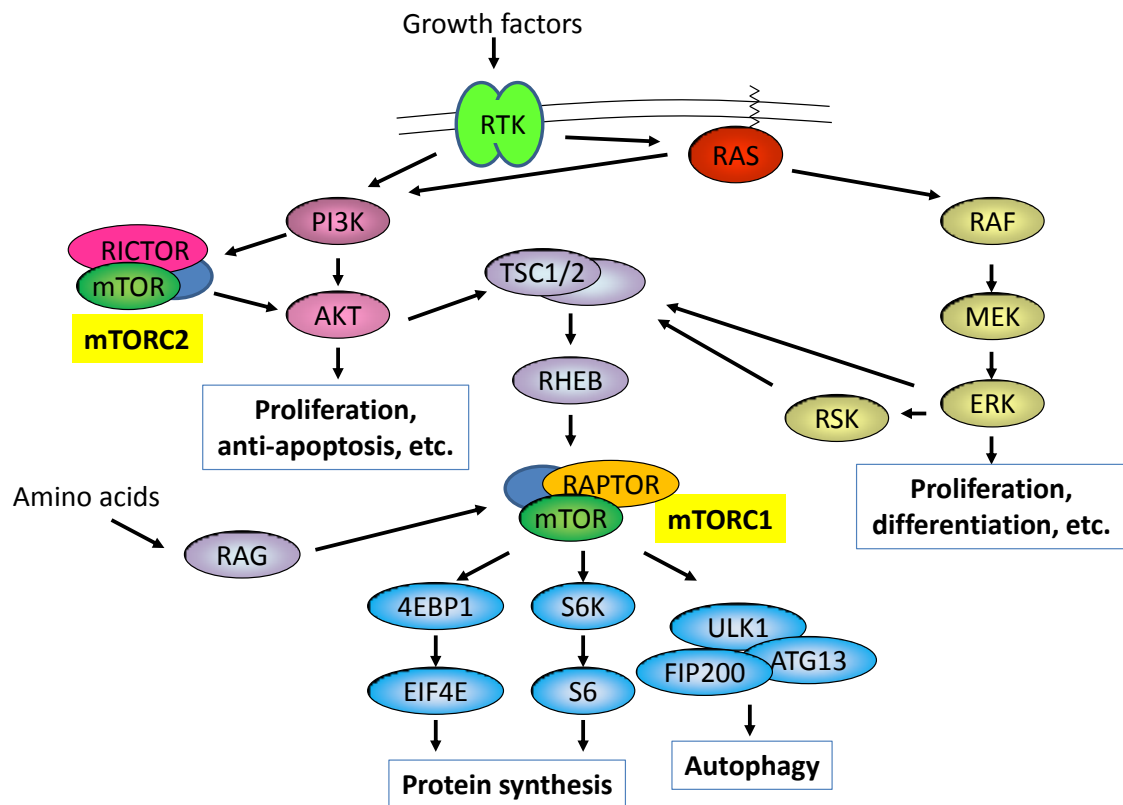


図 15 mTOR のシグナル伝達経路と RAS の関係

Laplante らの報告[113]を改変し示した。

材料および方法

(1) 細胞株

BxPC-3、CFPAC-1、MIAPaCa-2、PANC-1 細胞株は American Type Culture Collection から購入した。PSN-1 細胞株は European Collection of Cell Cultures から購入した。293A 細胞株は Life Technologies から購入した。SUIT-2 細胞株はヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入した。

MIAPaCa-2、PANC-1、293A 細胞株は 10% FBS を含む DMEM 培地中、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。実験に応じて血清飢餓条件にする際は、0.5% FBS を含む DMEM に置換し 24 時間培養をおこなった。BxPC-3、CFPAC-1、PSN-1、SUIT-2 細胞株は 10% FBS を含む RPMI1640 培地中、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。実験に応じて血清飢餓条件にする際は、0.5% FBS を含む RPMI1640 培地に置換し 24 時間培養をおこなった。

(2) 化合物

Temsirolimus は LC laboratories から購入した。PD0325901 は Axon Medchem から購入した。AZD8055 [136]、GDC-0941 [145]は第一三共社内で合成した。どの化合物も DMSO に 10 mM となるようにストック溶液を作製し、適宜 DMSO で希釈して使用した。

(3) KRAS のノックダウン実験

ノックダウン実験に用いた siRNA は Dhamarcon から購入した。Control siRNA (D-001810-02)、KRAS siRNA (J-005069-08)。

各種がん細胞株を 2×10^5 個ずつ 6 ウェルプレートに播種し、同時に RNAiMax (Life Technologies)を用いて、最終濃度 5 nM となるように siRNA をトランスフェクトした。翌日培養液を 0.5% FBS を含む DMEM または RPMI1640 培地と交換し、さらに 24 時間培養を行った。細胞を冷やした PBS で洗浄後、buffer A (50 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1%-Triton X-100)にフォスファターゼ阻害剤カクテル(P5726、P0044: 共に Sigma Aldrich)とプロテアーゼ阻害剤(Complete EDTA free、Roche)を加えた溶液を用いて、細胞ライセートを作製し、ウェスタンブロット法にて解析した。

(4) ウェスタンブロットティング解析

細胞ライセートまたは免疫沈降したサンプルは SDS-PAGE で展開後に PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は 5% skim milk (Life Technologies)を加えた TBST でブロッキングした。一次抗体として使用した抗体の由来は以下の通り。抗 KRAS 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。抗リン酸化 S6K (T389)、S6K、リン酸化 S6 (S240/S244)、S6、リン酸化 4EBP1 (T37/T46)、4EBP1、リン酸化 ERK1/2 (T202/Y204)、ERK1/2、リン酸化 AKT (S473)、リン酸化 AKT (T308)、AKT 抗体は Cell Signaling Technology から購入した。2 次抗体としては HRP が結合した anti-rabbit IgG または anti-mouse IgG (どちらも GE healthcare)を使用した。HRP が結合した抗 FLAG M2 抗体(Sigma Aldrich)もあわせて使用した。Western Lightning ECL Pro (PerkinElmer)または Super Signal West Femto (Thermo Fisher Scientific)を用いて、HRP に由来する化学発光を検出した。

(5) 接着条件での増殖試験

接着条件での増殖試験は以下のように実施した。各細胞株を 1000 細胞ずつ 96 ウェルプレートに播種し、翌日化合物を添加した。化合物添加から 3 日間さらに培養を行った。化合物添加時 (Day 1)と、3 日間の化合物処理後 (Day 4)に、ATPlite (PerkinElmer)を添加し、10 分間混合後、発光強度を測定した。Day 4 と Day 1 の ATPlite シグナルの比を取ることで細胞増殖速度を計算し、細胞増殖を 50%阻害する濃度を GI₅₀ 値として算出した。

(6) コロニー形成試験

コロニー形成試験は以下のように行った。各細胞をトリプシン処理で剥離させ、培地に懸濁したうえで細胞数を全自動セルカウンターTC10 (Bio-rad)を用いて測定した。10% FBS を添加した DMEM 培地または RPMI1640 培地に対して、さらに最終濃度 0.9 %となるようにメソカルト H4100 溶液(Stemcell Technologies)、最終濃度 2 mM のグルタミン溶液(Life Technologies)、最終濃度 100 units/mL のペニシリン及びストレプトマイシン溶液(Life Technologies)を添加したうえで、細胞を必要数添加し、メソカルト培地懸濁細胞を準備した。コロニー数測定のためには、24 Well Ultra Low Attachment Plate(Corning)に 125 個の各細胞を含むメソカルト培地を 500 μ L 播種した。適宜顕微鏡観察し、6 日~17 日にかけてコロニー数を測定した。30 細胞以上の塊を 1 コロニーとした。

コロニー形成条件での増殖阻害試験においては、96 Well Ultra Low Attachment Plate (Corning)を用い、試験化合物と 250 個の各細胞を添加したメソカルト培地を 100 μ L 添加

した。細胞に応じて、6日～13日間培養した。細胞数の測定のために Alamar blue 溶液(Life technologies)を 10 μ L 添加し、37°Cインキュベーターで 2~6 時間培養後に、蛍光(励起光 560 nm、蛍光 590 nm)を測定した。細胞非添加ウェルのシグナルをバックグラウンドとし、DMSO 添加ウェル(コントロール)のシグナルを基準として各阻害剤添加時の相対的な細胞量を求めた。さらに細胞増殖を 50%阻害する GI₅₀ を算出した。

(7) プラスミドベクターの構築

哺乳類細胞発現用プラスミドとして pCIneo (Promega)、pcDNA4/HisMax (Life Technologies)を用いた。PCR を用いて各遺伝子を増幅し、制限酵素サイトに入れる方法でプラスミドベクターに組み込んだ。*KRAS* 遺伝子として *KRAS4B* 配列を用いた。変異導入は、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)に準じて行った。

表 5 に第 3 章で使用したプラスミドベクターの一覧を記載する。

表5: 第3章の実験で使用したプラスミドベクター

名称	Plasmid backbone	insert (transgene)	tags
RAS 関連ベクター			
FLAG-KRAS(G12V)	pCIneo	KRAS(G12V)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(WT)	pCIneo	KRAS(WT)	FLAG (N-term)
FLAG-KRAS(S17N)	pCIneo	KRAS(S17N)	FLAG (N-term)
mTOR 関連ベクター			
His-mTOR(1362-2549aa)	pcDNA4/HisMax	mTOR(1362-2549aa)	6×His (N-term)

(8) FLAG 融合タンパク質の免疫沈降

プラスミドベクターを 293A 細胞に Lipofectamine LTX (Life Technologies)を用いて導入した。翌日、培地を DMEM + 0.5% FBS に置換し、さらに 24 時間培養した。細胞を冷やした PBS で洗い、buffer A に Complete EDTA free (Roche)を加えた溶液で溶解させた。遠心して上清を回収し、細胞ライセートを調製した。タンパク質濃度は Bio-Rad DC assay kit (Bio-Rad)を用いて測定した。各サンプルでタンパク質濃度をそろえた上で、抗 FLAG M2 抗体アフィニティーゲル(Sigma Aldrich)を加え、4°Cで 2 時間穏やかに振盪しながら混合した。ゲルを buffer A で 5 回洗浄した後、抗 FLAG M2 抗体アフィニティーゲルに結合したタンパク質を溶出 buffer S (114 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1.8 mM SDS, 18 mM glycerol, 100 mM dithiothreitol)で回収した。

結果

(1) KRAS 変異がんにおける KRAS シグナルの解析

KRAS はエフェクター分子である RAF、PI3K などと結合し複数のシグナルを制御すると考えられているが、膵臓がん細胞でどのシグナルが KRAS の制御下にあるかについては詳しく分かっていない。そこで膵臓がん細胞株を用いた KRAS のノックダウン実験を行った(図 16)。KRAS 変異膵臓がん細胞である PSN-1、PANC-1、MIAPaCa-2 細胞で共通して、RAF-MEK1/2-ERK1/2 経路の活性の指標である ERK1/2 のリン酸化が低下した。PI3K の活性化の指標であるリン酸化 AKT (S473)、及びリン酸化 AKT (T308)は PSN-1、PANC-1 では低下傾向はあるものの余り明確ではなかった。MIAPaCa-2 細胞においては KRAS の siRNA 処理により、AKT の 2 箇所のリン酸が共に上昇した。一方で、mTOR の活性の指標である、S6K のリン酸化や S6 のリン酸化はどの細胞株でも共通して顕著に低下した。さらに PSN-1、MIAPaCa-2 細胞においては 4EBP1 のリン酸化も低下した。RAS 野生型の BxPC-3 細胞においては、KRAS のノックダウンにより S6K 及び ERK1/2 のリン酸化が減少したが、その度合いは KRAS 変異がん細胞に比較すると小さいものだった(図 16)。

Ebi らは大腸がん細胞を使った実験において、KRAS のノックダウンにより S6 のリン酸化や ERK1/2 のリン酸化が低下する一方で、AKT のリン酸化は殆ど変化しないことを報告している。さらに MEK1/2 阻害剤を処理した場合に S6 のリン酸化が低下することから、MEK1/2 の下流で mTOR の活性が制御され、S6 のリン酸化が制御されるものと考察している[146]。膵臓がん細胞で同様のメカニズムで S6K や S6 のリン酸化が制御されているかどうかを解析するために、MEK1/2 阻害剤である PD0325901 を 6 時間処理し、細胞内シグナルを解析した(図 17)。ERK1/2 のリン酸化は PANC-1 細胞、MIAPaCa-2 細胞で共通して 10-1000 nM の PD0325901 でほぼ完全に抑制された。S6K、S6 のリン酸化は PANC-1 細胞では 1000 nM の PD0325901 処理でも全く変化せず、MIAPaCa-2 細胞では最小濃度である 10 nM の PD0325901 処理においても顕著な阻害が確認された。

(2) mTOR 阻害剤、MEK1/2 阻害剤、PI3K 阻害剤を用いた検討

膵臓がん細胞の増殖がどのシグナルに依存しているかを検討するため、mTOR、MEK1/2、PI3K の阻害剤が増殖に与える影響を検討した。まず通常の培養法である接着条件での検討を行った(図 18)。mTOR キナーゼ阻害剤 AZD8055 の増殖阻害効果は細胞間で差が見られ、CFPAC-1 や MIAPaCa-2、BxPC-3 は感受性が高かったが PANC-1 は感受性が低かった。

Rapalog である temsirolimus は 1 nM 前後から増殖阻害効果を発揮したが、その増殖阻害効果は 100 nM 程度で頭打ちになった。CFPAC-1 は temsirolimus に対する感受性が高かったが、最高濃度でも部分的な細胞増殖抑制にとどまった。MEK1/2 阻害剤である PD0325901 の増殖阻害効果は、細胞間で非常に差があった。PSN-1、SUIT-2、MIAPaCa-2 は感受性が高く 10 nM 程度の GI₅₀ を示した。*RAS* 野生型である BxPC-3 も 111 nM の GI₅₀ を示した。一方で CFPAC-1、PANC-1 は PD0325901 に対する感受性が低く、特に PANC-1 細胞はほとんど増殖が阻害されなかった。PI3K 阻害剤である GDC-0941 は *RAS* 野生型である BxPC-3 に対して最も強い増殖阻害活性を示した。*KRAS* 変異膵臓がん細胞である他の細胞に対しては比較的弱い効果を示し、PANC-1 細胞は最も低感受性であった(図 18)。

次にコロニー形成条件での検討を行った。*RAS* 野生型の膵臓がん細胞株である BxPC-3 細胞は、コロニーを全く形成しなかった。それに対して、*KRAS* 変異膵臓がん細胞である PSN-1、MIAPaCa-2、CFPAC-1、PANC-1 細胞はコロニーを形成した(図 19)。次に *KRAS* 変異膵臓がん細胞を用いて、コロニー形成条件での阻害剤の効果を検討した。AZD8055 はどの細胞株でもほぼ完全に増殖を抑制し、10-20 nM の濃度で GI₅₀ を示した。Temsirolims はどの細胞株でも同様の阻害活性を示したが、最高濃度である 10 μM でも増殖を阻害しきらなかった。PD0325901 はほぼ完全に増殖を抑制し、CFPAC-1、PSN-1、PANC-1、MIAPaCa-2 に対しては 1.2 nM 以下の GI₅₀ を示し、SUIT-2 に対しても 7.3 nM の GI₅₀ を示した。GDC-0941 は SUIT-2、PANC-1 細胞に対して 200 nM 程度の GI₅₀ を示した。一方 CFPAC-1 は接着条件での結果と異なり、コロニー形成条件では感受性が低下した(図 20)。

(3) KRAS は mTOR と結合する

ここまでのアッセイから、mTOR の活性が KRAS により制御されていると考えられた。そのメカニズムに迫るため、KRAS と mTOR の結合する可能性を考え検討を行った。293A 細胞に FLAG-KRAS(G12V)、KRAS(WT)、KRAS(S17N)を発現させ、抗 FLAG 抗体により免疫沈降を行ったところ、mTOR がどの KRAS 変異体とも共免疫沈降することが判明した(図 21a)。さらに mTOR の 1362aa-2549aa の部分タンパク質も KRAS(S17N)との結合活性を示した(図 21b)。

考察

KRAS は様々な経路を制御することが報告されているが、膵臓がん細胞においてどの経路が特に KRAS 活性に依存しているのかについての報告は少ない。本検討において、KRAS のノックダウンにより、KRAS 変異膵臓がん細胞で共通してリン酸化 ERK1/2 量が低下したことから、RAF-MEK1/2-ERK1/2 の活性は確かに KRAS に依存していることが示唆された。KRAS のノックダウンは、AKT のリン酸化に対して PSN-1 や PANC-1 細胞ではそれほど大きな影響を与えず、MIAPaCa-2 細胞においては、KRAS のノックダウンによりむしろ AKT のリン酸化が上昇した。これは予想に反する結果であったが、似た結果も報告されており [107]、また大腸がん細胞 [146] や急性骨髄性白血病細胞 [31] においても観察されている。またこの結果に関してはフィードバック経路の影響も考える必要がある。RAF-MEK1/2-ERK1/2 の活性が低下することによりレセプターチロシンキナーゼが活性化し、PI3K が活性化されるとの報告もあることから [53]、特に MIAPaCa-2 細胞において同様のメカニズムにより AKT のリン酸化が上昇した可能性が考えられる。

一方で KRAS のノックダウンにより mTOR の下流である S6K、S6、4EBP1 のリン酸化が低下したことから、KRAS の活性により mTOR 活性が制御されていると考えられた(図 16)。Ebi らは大腸がん細胞を使った検討において、KRAS のノックダウンによって、同様に mTOR の活性が低下することを報告している。そのメカニズムとして、MEK1/2 の活性によって mTOR が制御されているものと報告している [146]。しかし私の検討では、MIAPaCa-2 細胞においては MEK1/2 の阻害により S6K のリン酸化が低下するものの、PANC-1 細胞においては MEK1/2 の阻害は S6K のリン酸化に影響を与えなかった(図 17)。これらの結果は、MEK1/2 の活性や AKT の活性に依存しない、KRAS による mTOR 制御機構があることを示唆する。

mTOR の制御には、RHEB、RAG といった低分子量 G タンパク質が関与することは良く知られている。特に RAS と非常に似たタンパク質である RHEB タンパク質 [147] に関しては、GTP 型 RHEB のみならず GDP 結合型 RHEB も mTOR と結合を示すこと、mTOR の 2148~2191 番目のアミノ酸付近に結合することが報告されている [114]。今回の検討において、KRAS(G12V)、KRAS(S17N) がともに mTOR に結合することが分かった(図 21a)。さらに mTOR の 1362 番目~2549 番目の部分タンパク質も KRAS に結合することが判明した(図 21b)。KRAS と mTOR の結合は、一般的なエフェクター分子とは異なる結合様式を示してはいるが、RHEB と mTOR の結合試験と似た結果であり、RHEB と同様に KRAS

が mTOR を制御している可能性が考えられる。局在の観点からは、mTOR はリソソームにおいて RHEB や RAG と結合するとされており[113]、細胞膜に局在すると考えられている KRAS との結合は奇異にも思われる。しかし膵臓がんにおいては KRAS が過剰発現していることが知られており[148]、過剰発現した KRAS が細胞膜以外にも局在することは十分に考えられる。一方で、KRAS の結合が、mTOR の活性に影響を与えるか否かについては検証実験を行えておらず、今後の課題といえる。

膵臓がん細胞において KRAS が RAF-MEK1/2-ERK1/2 や mTOR を制御することから、MEK1/2 阻害剤 PD0325901 や mTOR キナーゼ阻害剤 AZD8055 が KRAS 変異がんに対して効果を示すことを期待し、増殖試験を行った。通常の接着培養においては、細胞により様々な感受性を示した(図 18)。従って、通常の接着条件での増殖については、MEK1/2 や mTOR への依存度は、KRAS 変異以外の要素により変化するものと想定され、これまでの試験報告にも沿った結果であると考えられる[143]。

RAS 変異により、細胞には様々な変化が生じることが知られているが、その中でもがんとの関連で特に重要と考えられる活性がコロニー形成活性である。例えば、KRAS 遺伝子変異を持つ大腸がん細胞 HCT-116 と DLD-1 株での検討において、KRAS 変異の遺伝子破壊株は通常の培養でも増殖は阻害されるものの、コロニー形成実験においてさらに顕著な増殖阻害が観察されている[25]。同じ報告の中で *in vivo* での増殖活性も KRAS 変異の遺伝子破壊により効率よく阻害されている。同様の報告は他にも複数報告されている[45, 149]。今回の検討においても、RAS が野生型である BxPC-3 細胞はコロニー形成活性を示さなかったが、KRAS 変異細胞株である MIAPaCa-2、PSN-1、CFPAC-1、PANC-1、SUIT-2 細胞はコロニー形成を示した(図 19)。この結果は膵臓がん細胞においても KRAS 変異によりコロニー形成活性が付与されていることを示唆する。阻害剤のコロニー形成に対する影響を確認したところ、どの細胞株においても mTOR キナーゼ阻害剤である AZD8055 はほぼ完全な増殖阻害を示し、低濃度で効果を発揮することが判明した(図 20)。また MEK1/2 阻害剤である PD0325901 も同様に、非常に低い濃度で増殖阻害を示した。この結果から、KRAS によって付与されると考えられるコロニー形成活性において、特に RAF-MEK1/2-ERK1/2 経路や mTOR の活性が重要であることが示唆される。コロニー形成活性は *in vivo* での造腫瘍性と相関することが期待されるため、*in vivo* での薬効について今後の検討が期待される。面白いことに rapalog である temsirolimus は接着培養時、及びコロニー形成試験どちらにおいても不完全な増殖阻害を示した。Temsiroliumus 処理時に

4EBP1 のリン酸化が部分的にしか阻害されないことなどから、temsirolimus は限定的な mTORC1 阻害活性を示すと報告されており、同様の増殖阻害活性が複数報告されている [133-135]。一方で、temsirolimus とほぼ同様の活性を持つと考えられる rapamycin が *KRAS* 変異膵臓がん株である Capan1-M9 の *in vivo* 増殖をほぼ完全に抑制したとの報告がある [144] ことから、rapamycin 以上の増殖抑制活性を持つ AZD8055 など mTOR キナーゼ阻害剤も同程度以上の *in vivo* 増殖抑制活性を示すのではないかと期待される。PI3K 阻害剤 GDC-0941 については、AZD8055 や PD0325901 と比較すると、それほどはっきりとした傾向を示さなかった。また感受性細胞である IGROV1 は GDC-0941 に対して 70 nM の GI₅₀ を示すことが報告されており [145]、今回の検討で得られた *KRAS* 変異膵臓がん細胞の GI₅₀ 値は相対的に大きい値であった。*KRAS* のノックダウン実験の結果も合わせて考えると、*KRAS* 変異膵臓がん細胞は PI3K 活性への依存度が高くはないものと考えられる。

以上のように、本研究において、膵臓がん細胞において mTOR が *KRAS* によって確かに制御されていること、mTOR が特にコロニー形成活性に重要であることを示した。これらの結果から、mTOR のキナーゼ阻害剤が膵臓がんにおいて効果的に増殖阻害を示すことが期待される。一方で MEK1/2 阻害剤も同様の活性を示しているものの、膵臓がんの臨床試験においては薬効を示せていない [45, 48]。したがって mTOR や MEK1/2 のみの阻害では不十分である可能性も高い。今後は mTOR や MEK1/2 阻害と他の標的阻害剤の併用検討が必要になると考えられる。膵臓がんは非常に難治性のがんであり、新規の治療法の開発が待たれている。本検討結果が膵臓がんの治療につながるものとなることを期待する。

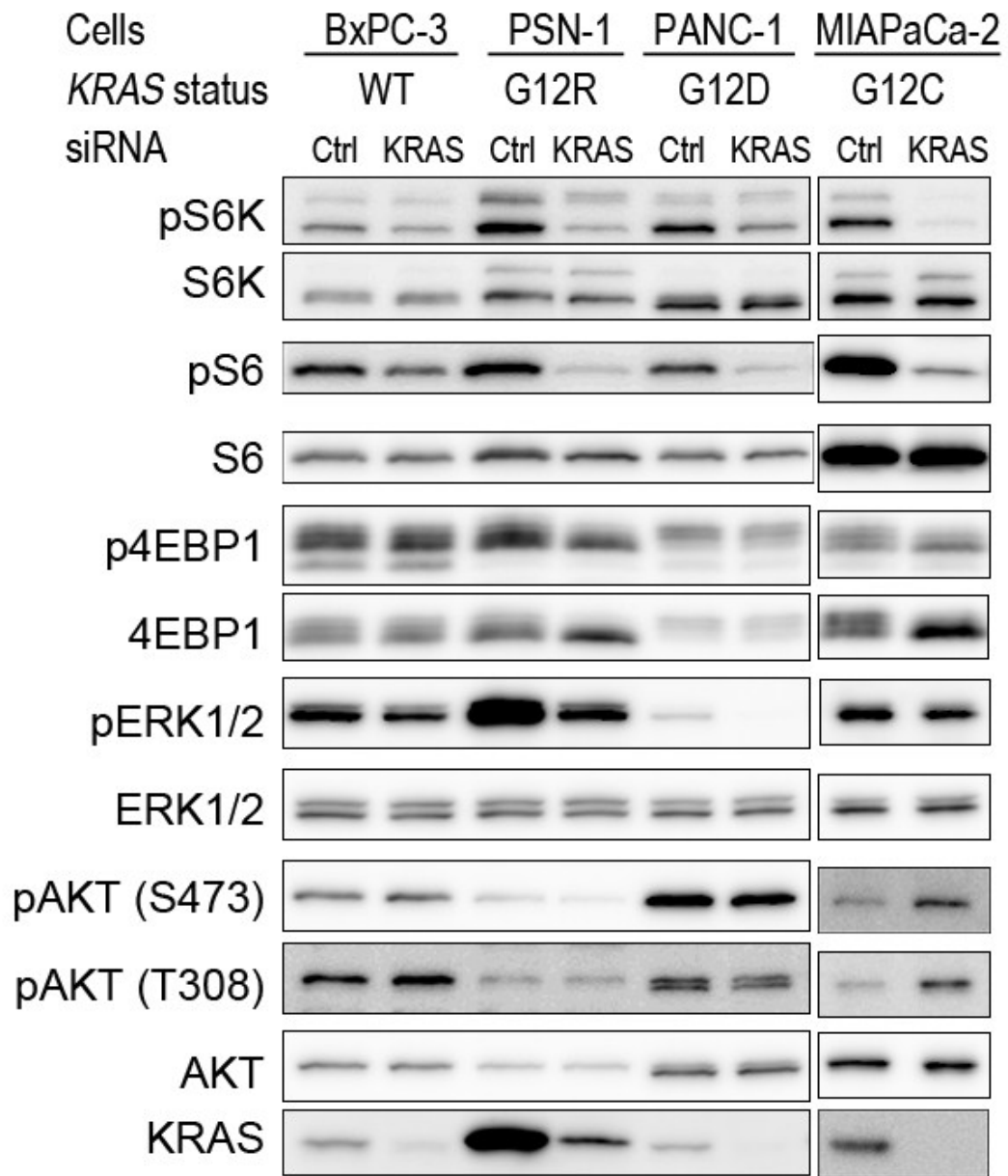


図 16 膵臓がん細胞株における KRAS ノックダウン時の細胞内シグナル

BxPC-3、PSN-1、PANC-1、MIAPaCa-2 細胞において、KRAS または Ctrl の siRNA を 5 nM で導入した。翌日、培養液を 0.5% FBS 添加した RPMI1640 または DMEM に置換し血清飢餓条件とした。さらに 24 時間後、細胞ライセートを回収した。各種タンパク質、及びリン酸化タンパク質をウェスタンブロット法を用いて解析した。

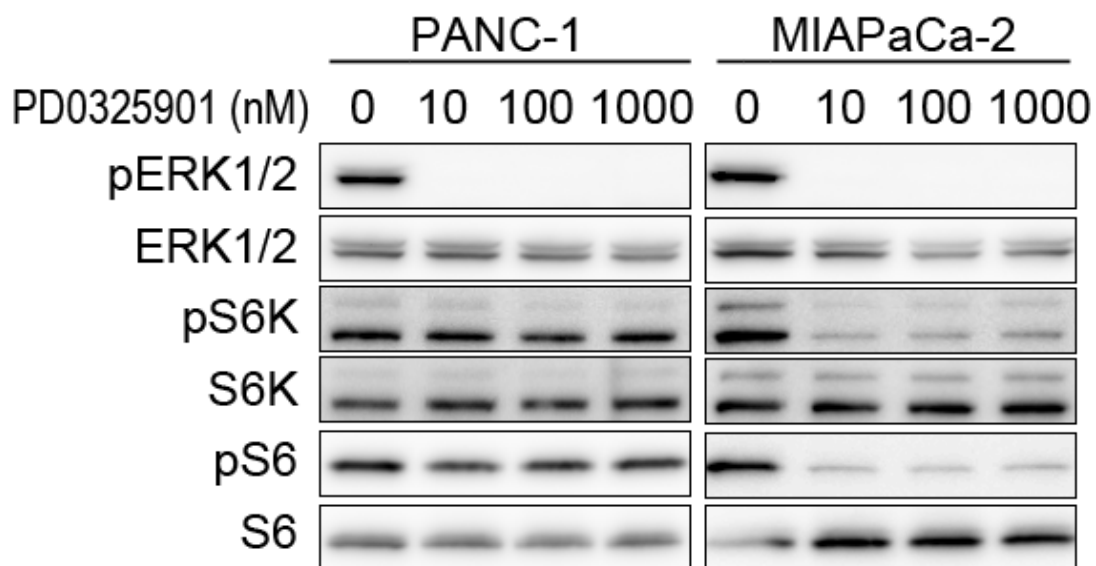
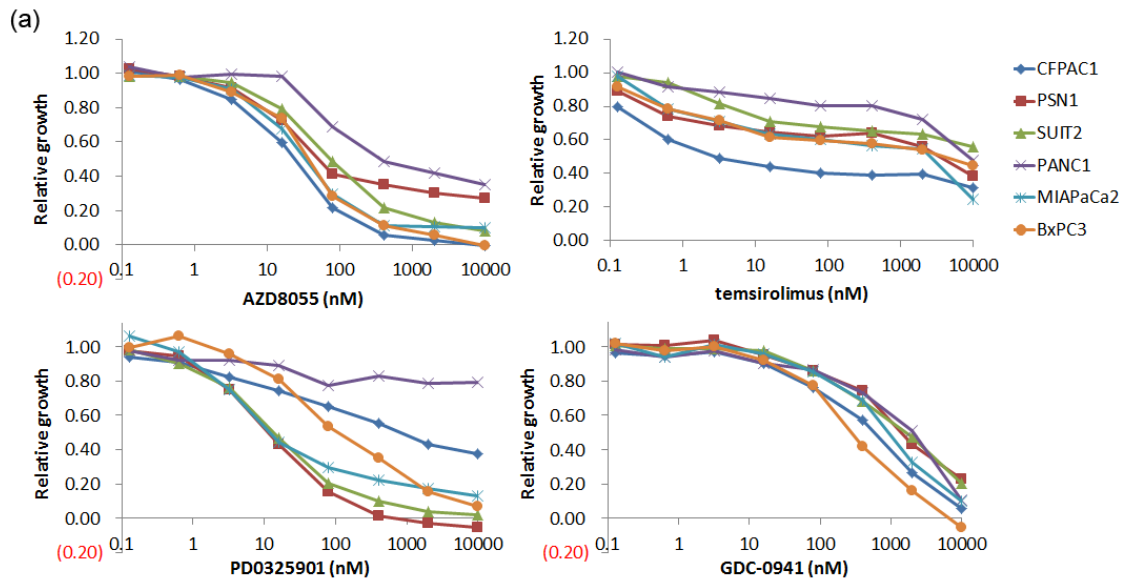


図 17 PANC-1、MIAPaCa-2 細胞における MEK1/2 阻害剤の効果

PANC-1 細胞、MIAPaCa-2 細胞を DMEM + 0.5% FBS の血清飢餓条件とし 18 時間培養後、PD0325901 を最終濃度 10 - 1000 nM 添加し 6 時間培養後に細胞ライセートを調製した。細胞内シグナルについて、抗リン酸化 ERK1/2、ERK1/2、リン酸化 S6K、S6K、リン酸化 S6、S6 抗体を用いてウェスタンブロット法によって解析を行った。



(b)

	CFPAC-1	PSN-1	SUIT-2	PANC-1	MIAPaCa-2	BxPC-3
	<i>KRAS(G12V)</i>	<i>KRAS(G12R)</i>	<i>KRAS(G12D)</i>	<i>KRAS(G12D)</i>	<i>KRAS(G12C)</i>	<i>RAS WT</i>
	GI ₅₀ (nM)	GI ₅₀ (nM)	GI ₅₀ (nM)	GI ₅₀ (nM)	GI ₅₀ (nM)	GI ₅₀ (nM)
AZD8055	24	51	75	364	34	37
temsirolimus	3	3482	>10000	8540	2560	3945
PD0325901	815	11	13	>10000	12	111
GDC-0941	579	1392	1627	2072	936	279

図 18 mTOR、MEK1/2、PI3K 阻害剤の膵臓がん細胞株の接着条件での増殖に与える効果
各細胞を 96 well プレートに播種し、接着させた後、各化合物を添加し 3 日間培養した。細胞量を ATPlite 試薬を用いて測定し、3 日間の細胞増殖の程度を計算した。

(a) 各化合物による増殖阻害のグラフ。

(b) AZD8055、temsirolimus、PD0325901、GDC-0941 について増殖を 50% 阻害する濃度を計算しまとめた。

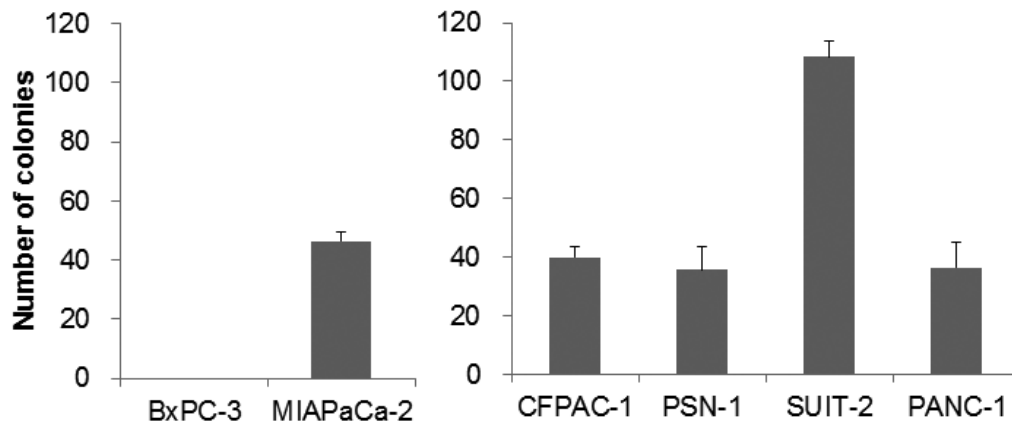
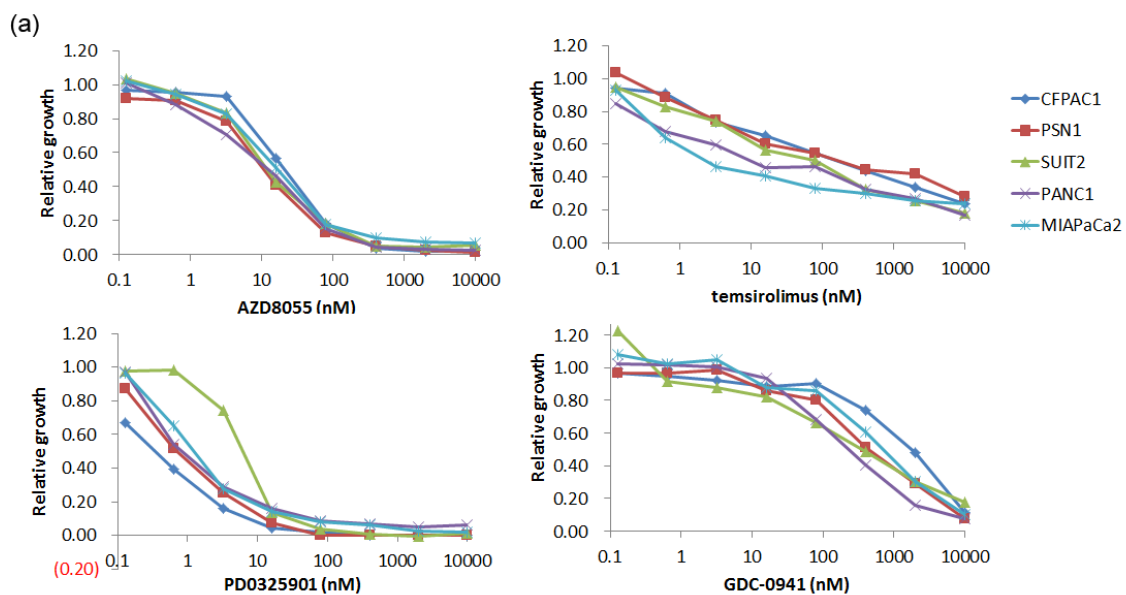


図 19 膵臓がん細胞株のコロニー形成活性

BxPC-3、MIAPaCa-2、CFPAC-1、PSN-1、SUIT-2、PANC-1 細胞をメソカルト H4100 を含む培地に 125 細胞ずつ懸濁し、培養した。12-15 日培養後に、コロニー数を計測した。コロニー数の平均と標準偏差を示した。



(b)

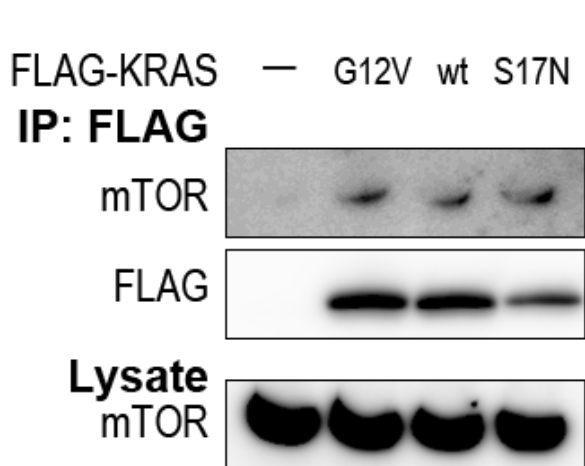
	CFPAC-1	PSN-1	SUIT-2	PANC-1	MIAPaCa-2
	<i>KRAS(G12V)</i>	<i>KRAS(G12R)</i>	<i>KRAS(G12D)</i>	<i>KRAS(G12D)</i>	<i>KRAS(G12C)</i>
	GI ₅₀ (nM)	GI ₅₀ (nM)	GI ₅₀ (nM)	GI ₅₀ (nM)	GI ₅₀ (nM)
AZD8055	21	11	14	12	17
temsirolimus	164	174	17	10	2
PD0325901	0.3	0.7	7.3	0.8	1.2
GDC-0941	1780	440	201	229	706

図 20 mTOR、MEK1/2、PI3K 阻害剤の膵臓がん細胞株のコロニー形成活性に与える効果
各細胞を化合物を添加したメソカルト含有培地において 6~13 日間培養し、alamar blue 試薬を用いて、細胞増殖の程度を計算した。

(a) 各化合物による増殖阻害のグラフ。

(b) AZD8055、temsirolimus、PD0325901、GDC-0941 について増殖を 50%阻害する濃度を計算しまとめた。

(a)



(b)

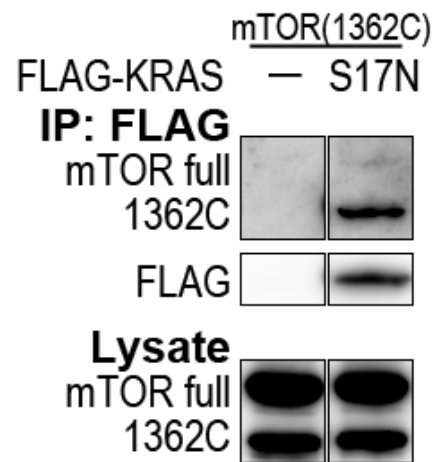


図 21 mTOR と KRAS の結合の解析

(a) 293A 細胞に FLAG-KRAS の各変異体をトランスフェクトし、翌日培地を DMEM + 0.5% FBS に置換した。24 時間培養後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。抗 mTOR、FLAG 抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

(b) 293A 細胞に mTOR (1362-2549aa: 1362C)プラスミドと共に、Ctrl ベクターまたは FLAG-KRAS(S17N)をトランスフェクトした。翌日培地を DMEM + 0.5% FBS に置換した。24 時間培養後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。抗 mTOR、FLAG 抗体を用いてウエスタンブロット法によって解析した。

総括

今回の検討から、新規の KRAS 結合因子として、IQGAP1、AGK、PLCD3 そして mTOR が得られた。本検討から、KRAS の新たな制御や下流の一端を見いだすことが出来た。面白いことに今回得られた新規の結合タンパク質は GTP 型 KRAS のみならず GDP 型 KRAS にも結合することが判明した。がんにおける変異 KRAS タンパク質は常時 GTP 型であると考えられており、多くの研究は GTP 型 KRAS に特異的に結合するタンパク質に着目する一方で、GDP 型 KRAS にも結合するタンパク質の解析が後回しにされてきた可能性がある。KRAS、HRAS、NRAS の比較において、IQGAP1 は KRAS とのみ結合し、AGK、PLCD3 は KRAS と NRAS に結合することが判明した。このような RAS アイソフォーム間で選択性を有する結合タンパク質の報告は少ない。がんにおいては KRAS、NRAS の変異が多く、HRAS の変異は少なく、何らかの違いがあることが想定される。IQGAP1、AGK、PLCD3 といった結合タンパク質の解析が各 RAS アイソフォームの役割の違いの理解に貢献すると思われる。

一方で mTOR に関しては、もともと KRAS の下流として認識されてはいたものの、KRAS 変異膵臓がん細胞はむしろ mTOR 活性への依存度が低いとも認識されてきた。しかし今回の検討から、mTOR は KRAS の下流で機能していること、特に KRAS に付与されると考えられるコロニー形成に必須の役割を果たすことが分かった。KRAS と mTOR が結合することも判明し、この結合が KRAS による mTOR の制御メカニズムの 1 つの可能性と考えられた。

今回の一連の検討から、KRAS 変異がんの抗腫瘍標的として AGK、mTOR が特に有効である可能性が考えられた。中でも mTOR の阻害剤は現在臨床開発研究が進んでいる状況である。歴史的に、mTOR 阻害剤は乳がんや腎臓がんでの薬効が最初に見出された。一方で、感受性が低いと考えられていた膵臓がんへの適応は余り議論されていない。しかし、本検討結果からは、膵臓がんにも薬効を示す可能性が示唆されており、今後の臨床応用を特に期待したい。

一方で、現在までほとんどの分子標的薬は、膵臓がんの臨床試験において効果が得られておらず、単独の標的の阻害では膵臓がんの治療は困難であるとも想像される。分子標的薬の併用検討が今後の課題としてあげられるが、その中においても今回の検討結果が応用されることを期待したい。

論文目録

原著論文

Matsunaga H, Kubota K, Inoue T, Isono F, and Ando O (2014).

IQGAP1 selectively interacts with K-Ras but not with H-Ras and modulates K-Ras function.

Biochem Biophys Res Commun 444, 360-364.

謝辞

東京大学大学院新領域創成科学研究科、渡邊俊樹教授に、的確な指摘・指導をして頂いたおかげで、本報告を完成させる事が出来ました。心より感謝致します。

本検討の大部分は第一三共株式会社、および第一三共 RD ノバーレ株式会社において遂行されました。第一三共株式会社探索第二研究所において、磯野藤男様と議論を重ねた上で開始し、安東治様の長年にわたるサポートを得ることで遂行出来ました。癌研究所に異動になってからは、赤羽浩一様、青沼正志様、荒木一司様の支援を得ることで完成させる事が出来ました。特に直接の上司であった安東治様と荒木一司様には、これ以上望めない支援をして頂きました。深く感謝致します。

マススペクトロメトリーの解析において、久保田一石様、井上竜也様のご協力を頂きました。本論文を開始するにあたって特に重要な解析でした。ノックダウンの実験などにおいて、二口(土田)亜樹子様(現ワシントン大学)、長澤孝行様(現ペプチドリーム株式会社)、石井純子様、相川友弥様のご協力を得て行いました。また KRAS リコンビナントタンパク質の調製について、寺山浩司様と飯野郁江様のご協力を頂きました。3章の検討に関しては、特に脇田賢一様、木我真基様、大塚雅己様にご協力を頂きました。深く感謝致します。

多くの面で第一三共社内の多くの方々にご協力を頂きました。特に論理展開や英語論文の作成にあたっては玉井馨子様の多大なるご協力を得ました。山本昌司様には日々の実験の相談やプレゼンテーションの構成についてなど多岐にわたる相談をさせていただきました。村上亮様、佐藤(藤田)沙織様、安達宣明様、山近伸一郎様、関剛彦様、龍田融様、丹澤文恵様を始め、特に第一三共株式会社癌研究所の安東グループ・荒木グループにおいてご相談に乗っていただいた方々、お世話になった方々に感謝致します。

最後に、特に家族の理解と協力がなければ、本論文に至ることは出来ませんでした。長年にわたり心配をかけてしまいましたが、両親の松永利視と松永ちわに感謝します。そして長期に渡り、会社の業務と博士論文の研究の両立に理解をし、協力をしつづけてくれた妻の松永澄子に特に感謝致します。

参考文献一覽

1. Der CJ, Krontiris TG, and Cooper GM (1982). Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3637-3640.
2. Parada LF, Tabin CJ, Shih C, and Weinberg RA (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297, 474-478.
3. Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, Pulciani S, and Barbacid M (1982). T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 298, 343-347.
4. Malumbres M, and Barbacid M (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3, 459-465.
5. Shimizu K, Goldfarb M, Perucho M, and Wigler M (1983). Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 383-387.
6. Hall A, Marshall CJ, Spurr NK, and Weiss RA (1983). Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature* 303, 396-400.
7. Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, and Barbacid M (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300, 149-152.
8. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, Dhar R, Lowy DR, and Chang EH (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300, 143-149.
9. Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, Shimizu K, Goldfarb M, and Wigler M (1982). Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 300, 762-765.
10. Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, and McCormick F (2014). Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell* 25, 272-281.

11. Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, and Hruban RH (2013). Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin* *63*, 318-348.
12. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, et al. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* *25*, 1960-1966.
13. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, et al. (2008). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* *359*, 1757-1765.
14. Riely GJ, and Ladanyi M (2008). KRAS mutations: an old oncogene becomes a new predictive biomarker. *J Mol Diagn* *10*, 493-495.
15. Plowman SJ, Berry RL, Bader SA, Luo F, Arends MJ, Harrison DJ, Hooper ML, and Patek CE (2006). K-ras 4A and 4B are co-expressed widely in human tissues, and their ratio is altered in sporadic colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* *25*, 259-267.
16. Bos JL, Rehmann H, and Wittinghofer A (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* *129*, 865-877.
17. Stolze B, Reinhart S, Bullinger L, Frohling S, and Scholl C (2015). Comparative analysis of KRAS codon 12, 13, 18, 61, and 117 mutations using human MCF10A isogenic cell lines. *Sci Rep* *5*, 8535.
18. Schubbert S, Shannon K, and Bollag G (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* *7*, 295-308.
19. Vetter IR, and Wittinghofer A (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* *294*, 1299-1304.
20. Karnoub AE, and Weinberg RA (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 517-531.
21. Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A, and Weinberg RA (2004). Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* *6*, 171-183.

22. Camonis JH, and White MA (2005). Ral GTPases: corrupting the exocyst in cancer cells. *Trends Cell Biol* *15*, 327-332.
23. Feramisco JR, Clark R, Wong G, Arnheim N, Milley R, and McCormick F (1985). Transient reversion of ras oncogene-induced cell transformation by antibodies specific for amino acid 12 of ras protein. *Nature* *314*, 639-642.
24. Kung HF, Smith MR, Bekesi E, Manne V, and Stacey DW (1986). Reversal of transformed phenotype by monoclonal antibodies against Ha-ras p21 proteins. *Exp Cell Res* *162*, 363-371.
25. Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N, and Sasazuki T (1993). Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science* *260*, 85-88.
26. Fisher GH, Wellen SL, Klimstra D, Lenczowski JM, Tichelaar JW, Lizak MJ, Whitsett JA, Koretsky A, and Varmus HE (2001). Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes Dev* *15*, 3249-3262.
27. Collins MA, Bednar F, Zhang Y, Brisset JC, Galban S, Galban CJ, Rakshit S, Flannagan KS, Adsay NV, and Pasca di Magliano M (2012). Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J Clin Invest* *122*, 639-653.
28. Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, Shen Q, O'Hagan R, Pantginis J, Zhou H, et al. (1999). Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* *400*, 468-472.
29. Brummelkamp TR, Bernards R, and Agami R (2002). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* *2*, 243-247.
30. Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, Schinzel AC, Sandy P, Meylan E, Scholl C, et al. (2009). Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* *462*, 108-112.
31. Scholl C, Frohling S, Dunn IF, Schinzel AC, Barbie DA, Kim SY, Silver SJ, Tamayo P, Wadlow RC, Ramaswamy S, et al. (2009). Synthetic lethal interaction between oncogenic KRAS dependency and STK33 suppression in human cancer cells. *Cell* *137*, 821-834.

32. Shima F, Yoshikawa Y, Ye M, Araki M, Matsumoto S, Liao J, Hu L, Sugimoto T, Ijiri Y, Takeda A, et al. (2013). In silico discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 8182-8187.
33. Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, and Shokat KM (2013). K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* *503*, 548-551.
34. Lim SM, Westover KD, Ficarro SB, Harrison RA, Choi HG, Pacold ME, Carrasco M, Hunter J, Kim ND, Xie T, et al. (2014). Therapeutic targeting of oncogenic K-Ras by a covalent catalytic site inhibitor. *Angew Chem Int Ed Engl* *53*, 199-204.
35. Rudolph J, and Stokoe D (2014). Selective inhibition of mutant Ras protein through covalent binding. *Angew Chem Int Ed Engl* *53*, 3777-3779.
36. Wang W, Fang G, and Rudolph J (2012). Ras inhibition via direct Ras binding--is there a path forward? *Bioorg Med Chem Lett* *22*, 5766-5776.
37. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, and Papavassiliou AG (2007). Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov* *6*, 541-555.
38. Whyte DB, Kirschmeier P, Hockenberry TN, Nunez-Oliva I, James L, Catino JJ, Bishop WR, and Pai JK (1997). K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem* *272*, 14459-14464.
39. End DW, Smets G, Todd AV, Applegate TL, Fuery CJ, Angibaud P, Venet M, Sanz G, Pognet H, Skrzat S, et al. (2001). Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro. *Cancer Res* *61*, 131-137.
40. Zimmermann G, Papke B, Ismail S, Vartak N, Chandra A, Hoffmann M, Hahn SA, Triola G, Wittinghofer A, Bastiaens PI, et al. (2013). Small molecule inhibition of the KRAS-PDEdelta interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* *497*, 638-642.
41. Hanzal-Bayer M, Renault L, Roversi P, Wittinghofer A, and Hillig RC (2002). The complex of Arl2-GTP and PDE delta: from structure to function. *EMBO J* *21*,

- 2095-2106.
42. Dry JR, Pavey S, Pratilas CA, Harbron C, Runswick S, Hodgson D, Chresta C, McCormack R, Byrne N, Cockerill M, et al. (2010). Transcriptional pathway signatures predict MEK addiction and response to selumetinib (AZD6244). *Cancer Res* *70*, 2264-2273.
 43. Hatzivassiliou G, Haling JR, Chen H, Song K, Price S, Heald R, Hewitt JF, Zak M, Peck A, Orr C, et al. (2013). Mechanism of MEK inhibition determines efficacy in mutant KRAS- versus BRAF-driven cancers. *Nature* *501*, 232-236.
 44. Haura EB, Ricart AD, Larson TG, Stella PJ, Bazhenova L, Miller VA, Cohen RB, Eisenberg PD, Selaru P, Wilner KD, et al. (2010). A phase II study of PD-0325901, an oral MEK inhibitor, in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* *16*, 2450-2457.
 45. Bodoky G, Timcheva C, Spigel DR, La Stella PJ, Ciuleanu TE, Pover G, and Tebbutt NC (2012). A phase II open-label randomized study to assess the efficacy and safety of selumetinib (AZD6244 [ARRY-142886]) versus capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer who have failed first-line gemcitabine therapy. *Invest New Drugs* *30*, 1216-1223.
 46. Bennouna J, Lang I, Valladares-Ayerbes M, Boer K, Adenis A, Escudero P, Kim TY, Pover GM, Morris CD, and Douillard JY (2011). A Phase II, open-label, randomised study to assess the efficacy and safety of the MEK1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) versus capecitabine monotherapy in patients with colorectal cancer who have failed one or two prior chemotherapeutic regimens. *Invest New Drugs* *29*, 1021-1028.
 47. Janne PA, Shaw AT, Pereira JR, Jeannin G, Vansteenkiste J, Barrios C, Franke FA, Grinsted L, Zazulina V, Smith P, et al. (2013). Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol* *14*, 38-47.
 48. Infante JR, Somer BG, Park JO, Li CP, Scheulen ME, Kasubhai SM, Oh DY, Liu Y, Redhu S, Steplewski K, et al. (2014). A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of trametinib, an oral MEK inhibitor, in combination with gemcitabine for

- patients with untreated metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer* *50*, 2072-2081.
49. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJ, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, et al. (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* *464*, 431-435.
 50. Poulidakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, and Rosen N (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* *464*, 427-430.
 51. Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P, Wang Y, Warne PH, Nicke B, Nye E, Stamp G, Alitalo K, and Downward J (2007). Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell* *129*, 957-968.
 52. Dougherty MK, Muller J, Ritt DA, Zhou M, Zhou XZ, Copeland TD, Conrads TP, Veenstra TD, Lu KP, and Morrison DK (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* *17*, 215-224.
 53. Turke AB, Song Y, Costa C, Cook R, Arteaga CL, Asara JM, and Engelman JA (2012). MEK inhibition leads to PI3K/AKT activation by relieving a negative feedback on ERBB receptors. *Cancer Res* *72*, 3228-3237.
 54. Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Rodrik-Outmezguine V, Grbovic-Huezo O, Serra V, Majumder PK, Baselga J, and Rosen N (2011). AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell* *19*, 58-71.
 55. Rodrik-Outmezguine VS, Chandarlapaty S, Pagano NC, Poulidakos PI, Scaltriti M, Moskatel E, Baselga J, Guichard S, and Rosen N (2011). mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. *Cancer Discov* *1*, 248-259.
 56. Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, Maira M, McNamara K, Perera SA, Song Y, et al. (2008). Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* *14*, 1351-1356.
 57. Corcoran RB, Cheng KA, Hata AN, Faber AC, Ebi H, Coffee EM, Greninger P, Brown

- RD, Godfrey JT, Cohoon TJ, et al. (2013). Synthetic lethal interaction of combined BCL-XL and MEK inhibition promotes tumor regressions in KRAS mutant cancer models. *Cancer Cell* *23*, 121-128.
58. She QB, Halilovic E, Ye Q, Zhen W, Shirasawa S, Sasazuki T, Solit DB, and Rosen N (2010). 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer Cell* *18*, 39-51.
59. Meng J, Dai B, Fang B, Bekele BN, Bornmann WG, Sun D, Peng Z, Herbst RS, Papadimitrakopoulou V, Minna JD, et al. (2010). Combination treatment with MEK and AKT inhibitors is more effective than each drug alone in human non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *PLoS One* *5*, e14124.
60. Luo J, Emanuele MJ, Li D, Creighton CJ, Schlabach MR, Westbrook TF, Wong KK, and Elledge SJ (2009). A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell* *137*, 835-848.
61. Babij C, Zhang Y, Kurzeja RJ, Munzli A, Shehabeldin A, Fernando M, Quon K, Kassner PD, Ruefli-Brasse AA, Watson VJ, et al. (2011). STK33 kinase activity is nonessential in KRAS-dependent cancer cells. *Cancer Res* *71*, 5818-5826.
62. Luo T, Masson K, Jaffe JD, Silkworth W, Ross NT, Scherer CA, Scholl C, Frohling S, Carr SA, Stern AM, et al. (2012). STK33 kinase inhibitor BRD-8899 has no effect on KRAS-dependent cancer cell viability. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 2860-2865.
63. Ledford H (2015). Cancer: The Ras renaissance. *Nature* *520*, 278-280.
64. White CD, Erdemir HH, and Sacks DB (2012). IQGAP1 and its binding proteins control diverse biological functions. *Cell Signal* *24*, 826-834.
65. Ren JG, Li Z, and Sacks DB (2007). IQGAP1 modulates activation of B-Raf. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 10465-10469.
66. Roy M, Li Z, and Sacks DB (2005). IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol Cell Biol* *25*, 7940-7952.
67. Roy M, Li Z, and Sacks DB (2004). IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity. *J Biol Chem* *279*, 17329-17337.
68. Wessel D, and Flugge UI (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* *138*, 141-143.

69. Rappsilber J, Mann M, and Ishihama Y (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* *2*, 1896-1906.
70. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, and Cottrell JS (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* *20*, 3551-3567.
71. Kersey PJ, Duarte J, Williams A, Karavidopoulou Y, Birney E, and Apweiler R (2004). The International Protein Index: an integrated database for proteomics experiments. *Proteomics* *4*, 1985-1988.
72. Elias JE, and Gygi SP (2007). Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* *4*, 207-214.
73. Liu H, Sadygov RG, and Yates JR, 3rd (2004). A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem* *76*, 4193-4201.
74. Hart MJ, Callow MG, Souza B, and Polakis P (1996). IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *EMBO J* *15*, 2997-3005.
75. McCallum SJ, Wu WJ, and Cerione RA (1996). Identification of a putative effector for Cdc42Hs with high sequence similarity to the RasGAP-related protein IQGAP1 and a Cdc42Hs binding partner with similarity to IQGAP2. *J Biol Chem* *271*, 21732-21737.
76. Ren JG, Li Z, Crimmins DL, and Sacks DB (2005). Self-association of IQGAP1: characterization and functional sequelae. *J Biol Chem* *280*, 34548-34557.
77. Jameson KL, Mazur PK, Zehnder AM, Zhang J, Zarnegar B, Sage J, and Khavari PA (2013). IQGAP1 scaffold-kinase interaction blockade selectively targets RAS-MAP kinase-driven tumors. *Nat Med* *19*, 626-630.
78. Villalonga P, Lopez-Alcala C, Bosch M, Chiloeches A, Rocamora N, Gil J, Marais R, Marshall CJ, Bachs O, and Agell N (2001). Calmodulin binds to K-Ras, but not to H- or N-Ras, and modulates its downstream signaling. *Mol Cell Biol* *21*, 7345-7354.
79. Joyal JL, Annan RS, Ho YD, Huddleston ME, Carr SA, Hart MJ, and Sacks DB

- (1997). Calmodulin modulates the interaction between IQGAP1 and Cdc42. Identification of IQGAP1 by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *J Biol Chem* *272*, 15419-15425.
80. Jeong HW, Li Z, Brown MD, and Sacks DB (2007). IQGAP1 binds Rap1 and modulates its activity. *J Biol Chem* *282*, 20752-20762.
81. Vasilescu J, Guo X, and Kast J (2004). Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics* *4*, 3845-3854.
82. Casteel DE, Turner S, Schwappacher R, Rangaswami H, Su-Yuo J, Zhuang S, Boss GR, and Pilz RB (2012). Rho isoform-specific interaction with IQGAP1 promotes breast cancer cell proliferation and migration. *J Biol Chem* *287*, 38367-38378.
83. Lu Z, Hu L, Evers S, Chen J, and Shen Y (2004). Differential expression profiling of human pancreatic adenocarcinoma and healthy pancreatic tissue. *Proteomics* *4*, 3975-3988.
84. Wang XX, Li XZ, Zhai LQ, Liu ZR, Chen XJ, and Pei Y (2013). Overexpression of IQGAP1 in human pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* *12*, 540-545.
85. Hayashi H, Nabeshima K, Aoki M, Hamasaki M, Enatsu S, Yamauchi Y, Yamashita Y, and Iwasaki H (2010). Overexpression of IQGAP1 in advanced colorectal cancer correlates with poor prognosis-critical role in tumor invasion. *Int J Cancer* *126*, 2563-2574.
86. White CD, Khurana H, Gnatenko DV, Li Z, Odze RD, Sacks DB, and Schmidt VA (2010). IQGAP1 and IQGAP2 are reciprocally altered in hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol* *10*, 125.
87. Dong P, Nabeshima K, Nishimura N, Kawakami T, Hachisuga T, Kawarabayashi T, and Iwasaki H (2006). Overexpression and diffuse expression pattern of IQGAP1 at invasion fronts are independent prognostic parameters in ovarian carcinomas. *Cancer Lett* *243*, 120-127.
88. McDonald KL, O'Sullivan MG, Parkinson JF, Shaw JM, Payne CA, Brewer JM, Young L, Reader DJ, Wheeler HT, Cook RJ, et al. (2007). IQGAP1 and IGF1BP2: valuable biomarkers for determining prognosis in glioma patients. *J Neuropathol Exp Neurol* *66*, 405-417.

89. White CD, Brown MD, and Sacks DB (2009). IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS Lett* *583*, 1817-1824.
90. Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, and Mackay CR (2007). Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov* *6*, 391-403.
91. Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q, Viale A, Sander C, Solit DB, and Rosen N (2009). (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 4519-4524.
92. Usatyuk PV, Gorshkova IA, He D, Zhao Y, Kalari SK, Garcia JG, and Natarajan V (2009). Phospholipase D-mediated activation of IQGAP1 through Rac1 regulates hyperoxia-induced p47phox translocation and reactive oxygen species generation in lung endothelial cells. *J Biol Chem* *284*, 15339-15352.
93. Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, Vlangos CN, Seelow D, Nurnberg G, Garg P, Verma R, Chaib H, Hoskins BE, et al. (2006). Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet* *38*, 1397-1405.
94. Bektas M, Payne SG, Liu H, Goparaju S, Milstien S, and Spiegel S (2005). A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells. *J Cell Biol* *169*, 801-811.
95. Waggoner DW, Johnson LB, Mann PC, Morris V, Guastella J, and Bajjalieh SM (2004). MuLK, a eukaryotic multi-substrate lipid kinase. *J Biol Chem* *279*, 38228-38235.
96. Chen X, Ying Z, Lin X, Lin H, Wu J, Li M, and Song L (2013). Acylglycerol kinase augments JAK2/STAT3 signaling in esophageal squamous cells. *J Clin Invest* *123*, 2576-2589.
97. Cui Y, Lin C, Wu Z, Liu A, Zhang X, Zhu J, Wu G, Wu J, Li M, Li J, et al. (2014). AGK enhances angiogenesis and inhibits apoptosis via activation of the NF-kappaB signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* *5*, 12057-12069.
98. Wang X, Lin C, Zhao X, Liu A, Zhu J, Li X, and Song L (2014). Acylglycerol kinase

- promotes cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer via suppression of the FOXO1 transcription factor. *Mol Cancer* *13*, 106.
99. Gresset A, Sondek J, and Harden TK (2012). The phospholipase C isozymes and their regulation. *Subcell Biochem* *58*, 61-94.
 100. Kelley GG, Reks SE, Ondrako JM, and Smrcka AV (2001). Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector. *EMBO J* *20*, 743-754.
 101. Shibatohe M, Kariya K, Liao Y, Hu CD, Watari Y, Goshima M, Shima F, and Kataoka T (1998). Identification of PLC210, a *Caenorhabditis elegans* phospholipase C, as a putative effector of Ras. *J Biol Chem* *273*, 6218-6222.
 102. Lopez I, Mak EC, Ding J, Hamm HE, and Lomasney JW (2001). A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* *276*, 2758-2765.
 103. Song C, Hu CD, Masago M, Kariyai K, Yamawaki-Kataoka Y, Shibatohe M, Wu D, Satoh T, and Kataoka T (2001). Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras. *J Biol Chem* *276*, 2752-2757.
 104. Kouchi Z, Igarashi T, Shibayama N, Inanobe S, Sakurai K, Yamaguchi H, Fukuda T, Yanagi S, Nakamura Y, and Fukami K (2011). Phospholipase Cdelta3 regulates RhoA/Rho kinase signaling and neurite outgrowth. *J Biol Chem* *286*, 8459-8471.
 105. Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, Ye Q, Lobo JM, She Y, Osman I, et al. (2006). BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* *439*, 358-362.
 106. Wada M, Horinaka M, Yamazaki T, Katoh N, and Sakai T (2014). The dual RAF/MEK inhibitor CH5126766/RO5126766 may be a potential therapy for RAS-mutated tumor cells. *PLoS One* *9*, e113217.
 107. Hofmann I, Weiss A, Elain G, Schwaederle M, Sterker D, Romanet V, Schmelzle T, Lai A, Brachmann SM, Bentires-Alj M, et al. (2012). K-RAS mutant pancreatic tumors show higher sensitivity to MEK than to PI3K inhibition in vivo. *PLoS One* *7*, e44146.
 108. Calvo SE, Compton AG, Hershman SG, Lim SC, Lieber DS, Tucker EJ, Laskowski A, Garone C, Liu S, Jaffe DB, et al. (2012). Molecular diagnosis of infantile

- mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci Transl Med* 4, 118ra110.
109. Mayr JA, Haack TB, Graf E, Zimmermann FA, Wieland T, Haberberger B, Superti-Furga A, Kirschner J, Steinmann B, Baumgartner MR, et al. (2012). Lack of the mitochondrial protein acylglycerol kinase causes Sengers syndrome. *Am J Hum Genet* 90, 314-320.
 110. Aldahmesh MA, Khan AO, Mohamed JY, Alghamdi MH, and Alkuraya FS (2012). Identification of a truncation mutation of acylglycerol kinase (AGK) gene in a novel autosomal recessive cataract locus. *Hum Mutat* 33, 960-962.
 111. Rebollo A, Perez-Sala D, and Martinez AC (1999). Bcl-2 differentially targets K-, N-, and H-Ras to mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells: implications in prevention of apoptosis. *Oncogene* 18, 4930-4939.
 112. Kocher HM, Senkus R, Al-Nawab M, and Hendry BM (2005). Subcellular distribution of Ras GTPase isoforms in normal human kidney. *Nephrol Dial Transplant* 20, 886-891.
 113. Laplante M, and Sabatini DM (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.
 114. Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, and Avruch J (2005). Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* 15, 702-713.
 115. Inoki K, Li Y, Xu T, and Guan KL (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 17, 1829-1834.
 116. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, and Blenis J (2003). Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol* 13, 1259-1268.
 117. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, and Guan KL (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4, 648-657.
 118. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, and Pandolfi PP (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121, 179-193.
 119. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, and Cantley LC (2002). Identification

- of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* *10*, 151-162.
120. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, and Sabatini DM (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* *320*, 1496-1501.
 121. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, and Jiang X (2009). ULK1-ATG13-FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* *284*, 12297-12305.
 122. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* *20*, 1981-1991.
 123. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, and Kim DH (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* *20*, 1992-2003.
 124. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, and Sabatini DM (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* *307*, 1098-1101.
 125. Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, Lowry C, Newton AC, Mao Y, Miao RQ, et al. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J* *27*, 1932-1943.
 126. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, et al. (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* *356*, 2271-2281.
 127. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grunwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, et al. (2008). Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* *372*, 449-456.
 128. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, Gnani M, Pritchard KI, Lebrun F, et al. (2012). Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* *366*, 520-529.

129. Pavel ME, Hainsworth JD, Baudin E, Peeters M, Horsch D, Winkler RE, Klimovsky J, Lebowitz D, Jehl V, Wolin EM, et al. (2011). Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* *378*, 2005-2012.
130. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, and Snyder SH (1994). RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* *78*, 35-43.
131. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, and Schreiber SL (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* *369*, 756-758.
132. Choi J, Chen J, Schreiber SL, and Clardy J (1996). Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* *273*, 239-242.
133. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, and Gray NS (2009). An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* *284*, 8023-8032.
134. Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, and Shokat KM (2009). Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* *7*, e38.
135. Hsieh AC, Costa M, Zollo O, Davis C, Feldman ME, Testa JR, Meyuhas O, Shokat KM, and Ruggero D (2010). Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell* *17*, 249-261.
136. Chresta CM, Davies BR, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow SE, Vincent JP, Ellston R, Jones D, Sini P, et al. (2010). AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res* *70*, 288-298.
137. Pike KG, Malagu K, Hummerson MG, Menear KA, Duggan HM, Gomez S, Martin

- NM, Ruston L, Pass SL, and Pass M (2013). Optimization of potent and selective dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors: the discovery of AZD8055 and AZD2014. *Bioorg Med Chem Lett* *23*, 1212-1216.
138. Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, Ingolia NT, Janes MR, Sher A, Shi EY, Stumpf CR, Christensen C, Bonham MJ, et al. (2012). The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* *485*, 55-61.
139. Rodon J, Dienstmann R, Serra V, and Tabernero J (2013). Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* *10*, 143-153.
140. Semba S, Moriya T, Kimura W, and Yamakawa M (2003). Phosphorylated Akt/PKB controls cell growth and apoptosis in intraductal papillary-mucinous tumor and invasive ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Pancreas* *26*, 250-257.
141. Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, and Reddy SA (2004). The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene* *23*, 8571-8580.
142. Michl P, and Downward J (2005). Mechanisms of disease: PI3K/AKT signaling in gastrointestinal cancers. *Z Gastroenterol* *43*, 1133-1139.
143. Ducker GS, Atreya CE, Simko JP, Hom YK, Matli MR, Benes CH, Hann B, Nakakura EK, Bergsland EK, Donner DB, et al. (2014). Incomplete inhibition of phosphorylation of 4E-BP1 as a mechanism of primary resistance to ATP-competitive mTOR inhibitors. *Oncogene* *33*, 1590-1600.
144. Matsubara S, Ding Q, Miyazaki Y, Kuwahata T, Tsukasa K, and Takao S (2013). mTOR plays critical roles in pancreatic cancer stem cells through specific and stemness-related functions. *Sci Rep* *3*, 3230.
145. Raynaud FI, Eccles SA, Patel S, Alix S, Box G, Chuckowree I, Folkes A, Gowan S, De Haven Brandon A, Di Stefano F, et al. (2009). Biological properties of potent inhibitors of class I phosphatidylinositide 3-kinases: from PI-103 through PI-540, PI-620 to the oral agent GDC-0941. *Mol Cancer Ther* *8*, 1725-1738.
146. Ebi H, Corcoran RB, Singh A, Chen Z, Song Y, Lifshits E, Ryan DP, Meyerhardt JA, Benes C, Settleman J, et al. (2011). Receptor tyrosine kinases exert dominant control

- over PI3K signaling in human KRAS mutant colorectal cancers. *J Clin Invest* *121*, 4311-4321.
147. Clark GJ, Kinch MS, Rogers-Graham K, Sebt SM, Hamilton AD, and Der CJ (1997). The Ras-related protein Rheb is farnesylated and antagonizes Ras signaling and transformation. *J Biol Chem* *272*, 10608-10615.
148. Heidenblad M, Jonson T, Mahlamaki EH, Gorunova L, Karhu R, Johansson B, and Hoglund M (2002). Detailed genomic mapping and expression analyses of 12p amplifications in pancreatic carcinomas reveal a 3.5-Mb target region for amplification. *Genes Chromosomes Cancer* *34*, 211-223.
149. Hamad NM, Elconin JH, Karnoub AE, Bai W, Rich JN, Abraham RT, Der CJ, and Counter CM (2002). Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev* *16*, 2045-2057.