

## 論文の内容の要旨

論文題目 **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  
氏名 松永 大典

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

従って、*KRAS* 変異がんの治療法開発を目指すために、特に *KRAS* タンパク質の制御や、*KRAS* 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、難治性であり *KRAS* 変異率が 60~90%と高い膵臓がんに着目し、膵臓がん細胞における *KRAS* の機能により深く迫ることを目指した。まず、膵臓がん細胞を用いて、*KRAS* 結合タンパク質の解析を、マスマスペクトロメトリーを用いて網羅的に実施した。この解析から新規の *KRAS* 結合タンパク質として *IQ motif containing GTPase activating protein 1* (*IQGAP1*)、*acylglycerol kinase* (*AGK*)、*phospholipase C, delta 3* (*PLCD3*)を見出した。

第1章においては、*IQGAP1* の機能解析を実施した。*IQGAP1* と *KRAS* の各々の変異体の結合解析から、*IQGAP1* が活性型 *KRAS* のみならず不活性型 *KRAS* にも結合すること、*IQGAP1* の *IQ* モチーフ部分が *KRAS* との結合に関与していることが判明した。*IQGAP1* は *KRAS* に結合するものの、他の *RAS* アイソフォームである *HRAS* や *NRAS* との結合は示さなかった。ヒト膵臓がんにおいて *IQGAP1* が過剰発現していることも判明した。そこで膵臓がん細胞において *IQGAP1* を過剰発現させたところ、*KRAS* と *BRAF* の結合が増強し、逆に *IQGAP1* のノックダウンにより *KRAS* と *BRAF* の結合が減弱することが判明した。従って、*IQGAP1* は膵臓がんにおいて過剰発現し、*KRAS* と *BRAF* の結合を促進することで *KRAS* の機能を修飾しているものと考えられた。

第2章においては、*AGK* および *PLCD3* の機能解析を実施した。*AGK* と *PLCD3* は活性型の *KRAS* に結合活性が高いものの、不活性型 *KRAS* にも結合活性を示した。さらに他の *KRAS* 変異体との結合解析結果からも、既知結合タンパク質とは異なった結合様式で *KRAS* と結合することが示唆された。*AGK* および *PLCD3* は *KRAS*、*NRAS* と結合するものの *HRAS* との結合は弱く、ユニークな性質を示すタンパク質であることが判明した。リコンビナント *AGK* タンパク質とリコンビナント *KRAS* タンパク質が結合したことから、*AGK* は直接的に *KRAS* に結合することが示唆された。*AGK* の過剰発現により、*KRAS* による

AKT のリン酸化が促進されること、逆に AGK のノックダウンにより KRAS に依存した AKT のリン酸化が低下することが判明した。KRAS は PI3K を活性化し AKT のリン酸化を促進すると考えられることから、KRAS による PI3K の制御に AGK が関与すると考えられた。さらに、AGK のノックダウンにより膵臓がん細胞株の増殖が顕著に阻害されたことから、AGK は膵臓がん細胞の増殖に必要であり、膵臓がんの治療標的となりうると考えられた。

第 3 章においては、*KRAS* 変異膵臓がん細胞において KRAS が制御するシグナル伝達因子の解析を目指した。KRAS のノックダウン実験を行ったところ、予想通り RAF-MEK1/2-ERK1/2 経路の活性の指標である ERK1/2 のリン酸化が、複数の *KRAS* 変異膵臓がん細胞で共通して減弱した。さらに mTOR の活性の指標である S6K のリン酸化も、KRAS のノックダウンにより複数の細胞株で共通して低下した。同様の現象は、*KRAS* 変異大腸がん細胞を使った実験においても観察されており、MEK1/2 経路の下流で mTOR が制御されていると考察されている。そこで PANC-1 細胞に MEK1/2 阻害剤を処理し観察したところ、MEK1/2 活性の指標である ERK1/2 のリン酸化は顕著に阻害されるものの、mTOR 活性の指標である S6K のリン酸化は全く阻害されなかった。これらの結果から、*KRAS* 変異膵臓がん細胞において、KRAS が新規のメカニズムで mTOR 活性を制御している可能性が考えられた。そこで KRAS と mTOR の結合の可能性を考え、検証したところ、KRAS が mTOR の 1362~2549 aa の領域と結合することが判明した。さらに MEK1/2 阻害剤、mTOR 阻害剤が膵臓がん細胞に及ぼす効果を検証したところ、どちらの化合物も、特に *KRAS* 変異膵臓がん細胞のコロニー形成活性を非常に低い濃度で阻害することが判明した。以上から *KRAS* 変異膵臓がん細胞においては、RAF-MEK1/2-ERK1/2 経路に加えて、mTOR が KRAS の下流の因子として重要な働きを果たしており、膵臓がんの治療標的としても有望であることが示唆された。

本研究で見出された KRAS 結合タンパク質である、IQGAP1、AGK、PLCD3、mTOR の KRAS シグナルにおける役割を模式的に図 1 として示す。本研究から、*KRAS* 変異膵臓がんのさらなる理解につながる結果が得られたと考えられる。加えて、これらの検討の中で、IQGAP1、AGK、PLCD3 は RAS アイソフォーム間で異なる結合活性を示しており、これらの新規 KRAS 結合タンパク質の解析は、RAS アイソフォーム間の違いの理解にも寄与する可能性がある。重要な事として、本研究から AGK や mTOR が膵臓がんの治療標的となる可能性が示された。難治性である *KRAS* 変異膵臓がんの治療に寄与しうる知見が得られたものと考え、今回ここに報告する。

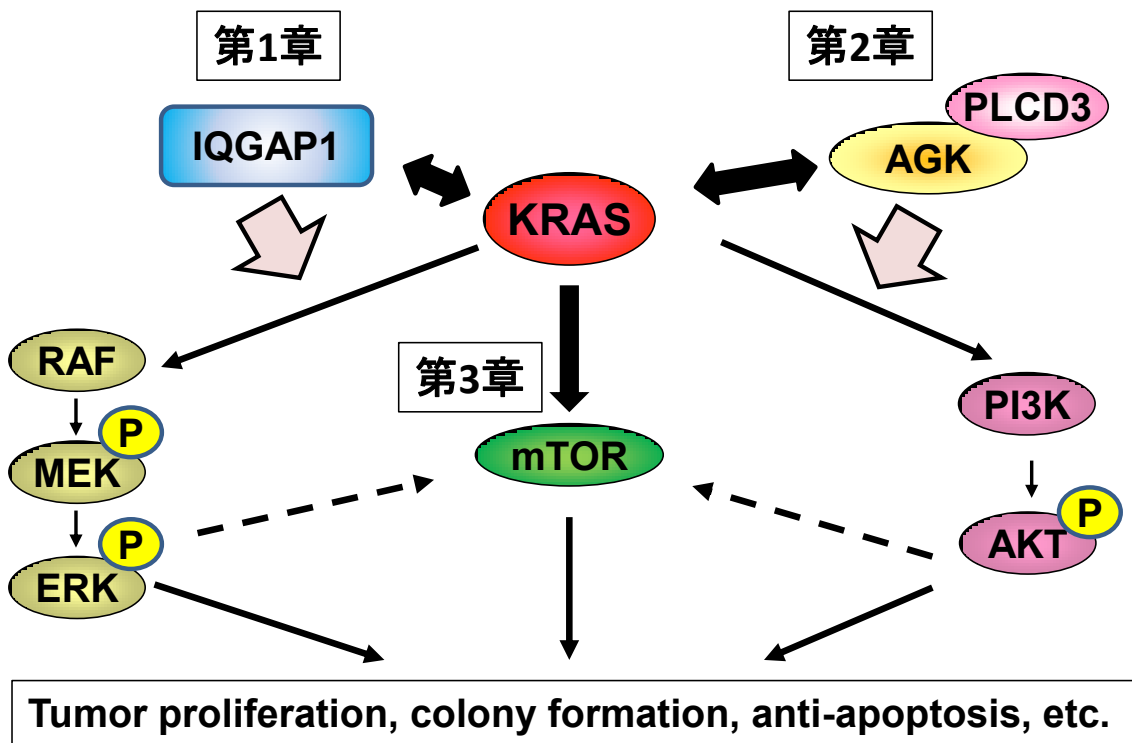


図1 本研究で見出された KRAS 結合タンパク質 IQGAP1、AGK、PLCD3、mTOR の KRAS シグナルにおける役割