

氏名	らほう 羅 昊		
学位の種類	博士 (医学)		
報告番号	甲第 1756 号		
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 14 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (課程博士)		
学位論文題目	Growth Suppression of Human Colorectal Cancer Cells with Mutated KRAS by 3-Deaza-cytarabine in 3D Floating Culture (3-デアザ-シタラビンは三次元浮遊培養で変異 KRAS を有する大腸癌の増殖を抑制する)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	白澤 専二
	(副査) 福岡大学	教授	安永 晋一郎
	福岡大学	教授	植木 敏晴
	福岡大学	准教授	田中 俊裕

内容の要旨

【目的】

抗癌作用のあるヌクレオシドは、大きくピリミジンやプリン塩基を有する類縁体に分類され、ピリミジン類縁体はさらにシチジンやウリジン塩基を有する類縁体に分類される。これまでにいくつかのピリミジン類縁体が合成・評価され、1969年に急性白血病治療薬であるシチジン類似体のシトシン β -D-アラビノフラノシド塩酸塩 (シタラビン) が最初に米国食品医薬品局 (FDA) によって承認された。そして 1996年に別のシチジン類縁体である 2'-ジフルオロデオキシシチジン (ゲムシタビン) が承認された。ゲムシタビンは、シタラビンと比べて、高い溶解度と正常組織に対する低い毒性等の優れた薬物動態をインビトロおよびインビボで示すために、膵臓癌、肺癌および結腸直腸癌 (CRCs) を含む固形腫瘍患者の治療に使用されてきた。これらの腫瘍では、KRAS 遺伝子に関連するシグナリングパスウェイが大きく関与していることが判明し、さらに臨床研究では、変異型 (mt) KRAS を有する患者は、野生型 (wt) KRAS を有する患者よりもゲムシタビン療法に対する応答が悪いことが示されている。しかし、mtKRAS を選択的に標的とする薬剤は、いまだ臨床的に開発されていない。

最近、我々は、mtKRAS 関連シグナルを阻害する化合物をスクリーニングできる 3次元浮遊 (3DF) 培養システムを確立し、化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。その結果、正常組織モデルである HKe3-wtKRAS 細胞塊 (スフェロイド) には効果を示さず、癌モデルである HKe3-mtKRAS スフェロイドのみに効果を示す抗癌物質の一つとしてウリジン類縁体、5-ブロモウリジン (BrUrd) を同定した。

本研究では、BrUrd の派生物のうち、より強い抗腫瘍効果や正常に対する低い毒性を示すものを 3 次元浮遊培養にて同定することを目的とした。

【対象と方法】

実験にはヒト大腸癌細胞株 HKe3-wtKRAS と HKe3-mtKRAS を使用した。

細胞増殖解析には BrUrd の派生物である BrdU の類縁体 5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU) を使用した。細胞を 37°C の CO₂ インキュベーターで 3 日間培養した後、さらに 16 時間 EdU で処理した。EdU の取り込みは、EdU イメージングキット Alexa を用いて視覚化し、観察した。

核酸アナログの 5-ブロモウリジン (BrUrd) と計 11 個の派生物を細胞と共に、超低接着表面の 96 ウェルプレートを用いて、短期間 (7 日間) または長期間 (27 日) 間培養した。短期間培養では、培養 0 日目に投与し、3 日目と 7 日目のスフェロイド面積で相対成長速度を計算し、6 つの評価項目のスコアリングにより派生物間の抗腫瘍効果と毒性を比較した。長期間培養では 3 日に 1 回薬剤を投与し、3 日目のスフェロイド面積との相対成長速度を計算し、派生物の抗腫瘍効果と毒性を比較した。

【結果】

EdU は、2 次元培養および 3 次元浮遊培養における HKe3-wtKRAS と比較して、HKe3-mtKRAS 細胞からの新しく合成された DNA に強く取り込まれた。BrUrd とシチジン両方の特性を有する 3-デアザ-シタラビンは、HKe3-wtKRAS スフェロイドに対して最も毒性が低い上に HKe3-mtKRAS スフェロイドに最も有効な阻害剤であった。3-デアザ-シタラビンの増殖抑制は 2 次元培養ではシタラビンより強く、長期の 3 次元浮遊培養での毒性はゲムシタビンより低かった。

【結論】

3-デアザ-シタラビンは BrUrd とその派生物の中でも特に、抗腫瘍効果が高く、毒性が低いことから、mtKRAS を有する大腸癌患者に対して将来有効な治療薬になる可能性があることが示唆された。

審査の結果の要旨

本論文は、独自のスクリーニング方法を用いて、変異型 KRAS を有する細胞にのみ効果を示す低毒性抗腫瘍化合物の取得に成功した最初の報告である。KRAS 遺伝子の変異は全癌の 30% 近くに認められ、膵臓癌で 95%、大腸癌で 45%、肺癌で 35% にも上る変異率を示す。

しかしながら、固形腫瘍において最も高頻度に存在する変異 KRAS そのものを標的とする分子標的薬はいまだ開発されておらず、さらに、臨床的に肺癌に効果の高い EGFR 阻害剤が KRAS 変異を持つ癌には効果がないことが示されている。そのような背景において、KRAS が制御する下流分子を創薬標的とすることは臨床的視点において重要な意義を持つ。本申請論文ではまず、野生型 KRAS と変異型 KRAS を過剰発現させた細胞株を 3 次元浮遊培養し、それぞれを正常モデル、癌モデルとした。このモデルにおいて天然物由来化合物ライブラリーをスクリーニングし、癌モデルに特異的に効果を示し、正常モデルに影響のない化合物として核酸アナログである 5-BrUrd を取得した。さらに類似係数を用いて取得した 11 個の派生物の抗腫瘍効果、薬剤効果持続性、毒性を評価した結果、3-deaza-cytarabine を取得した。この化合物は既存の核酸アナログであるシタラビンより高い抗腫瘍効果を示し、ゲムシタビンより低い毒性を示した。また、3-deaza-cytarabine の抗腫瘍効果が高い要因は、ピリミジン塩基の 3 位が窒素ではなく炭素であり、新たな低毒性核酸アナログとして、変異 KRAS を有する癌に有効であることが示唆された。従って、本申請論文で確立したスクリーニング方法を利用することにより、今後の抗腫瘍化合物の探索及び開発に更なる進展をもたらす事が期待される。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭性は以下のとおりである。

1. 斬新さ

他の遺伝子バックグラウンドは均一で、変異 KRAS の有無だけが異なる二つの細胞株、ヒト大腸癌細胞株 HKe3-wtKRAS と HKe3-mtKRAS を用いて、変異 KRAS シグナルに特化した解析が可能であった。また、3 次元浮遊培養では生体内に類似した環境で育成するので、それぞれが正常モデル、癌モデルとみなすことができる。通常の抗腫瘍効果のみを指標としたスクリーニング法と違い、癌モデルに特異的に効果を示し、正常モデルに影響のない化合物をスクリーニングしたので、5-BrUrd とその派生物である 3-deaza-cytarabine は副作用の少ない核酸アナログであることが示唆された。

2. 重要性

変異 KRAS を有する癌には既存の分子標的療法がなく、古典的な核酸アナログによる癌治療では副作用が問題になる。本申請論文で取得された核酸アナログはシタラビンより強い抗腫瘍効果を示し、ゲムシタビンより低い毒性を示した。今後はこのような低毒性の抗腫瘍化合物が治療の選択肢として重要な位置を占める可能性がある。

3. 実験方法の正確性

実験データ結果は、いずれも最低 3 回同様の実験を行い、再現性を確認している。EdU を用いた実験では、2 次元培養でも 3 次元培養でも、増殖速度の速い変異 KRAS を有する細胞により多く取り込まれることが確認できた。5-BrUrd とその派生物の抗腫瘍効果は HKe3-

mtKRAS(癌モデル)に対する抗腫瘍効果と持続性、そして HKe3-wtKRAS(正常モデル)に対する毒性の三方面から評価し客観的なデータにより評価した。3-deaza-cytarabine に対しては類似構造を持つ既存の抗がん剤と 2次元培養、3次元培養両方で比較し、臨床応用における可能性を示した。

4. 表現の明瞭性

まず、KRAS の変異が多くの癌に関連し、未だ変異 KRAS をターゲットとした分子標的薬は開発されていない事を提示することで、臨床における変異 KRAS の重要性を示した。また、変異 KRAS の下流の分子を標的とすることで、変異 KRAS を有する癌にも有効な化合物の探索が可能である事を、順序だてて説明した。使用した細胞株と細胞培養方法なども説明した上で、化合物における抗腫瘍効果の評価方法を細かく説明した。その上で抗腫瘍効果が優れている 3-deaza-cytarabine を得た事を説明した。また、3-deaza-cytarabine を既存の抗がん剤と比較し、低毒性抗腫瘍化合物としての有効性を解説した。

5. 主な質疑応答

学位申請論文の内容の発表の後、以下の質疑応答が審査員から申請者に対し行われた。

Q1:

変異 KRAS 細胞株を使用しているがどの塩基が変異している？

A1:

最も高頻度で変異を認められている、G13D 変異です。

Q2:

派生物の取得方法は？

A2:

谷本係数(分子類似性)を元に、distance が 0.7 以下(分子類似性が 0.3 以上、distance=1-分子類似性)の化合物を、天然物ライブラリーから取得し、派生物としています。

Q3:

3次元培養に使用されている超低接着性プレート、具体的にはどのようなプレートなのか？

A3:

ES 細胞培養でも用いる丸底の低接着性 96 ウェルプレートです。細胞を浮遊状態とし、細胞塊の形成を可能にします。

Q4:

3-deaza-cytarabine が核酸に取り込まれる事はわかりましたが、DNA と RNA のどっちに取り込まれる？

A4:

両方だと思います。Cytarabine は DNA と RNA の両方に取り込まれると知られています、そして 3-deaza-cytarabine の化学構造の糖は cytarabine と同じです。よって、3-deaza-cytarabine も DNA と RNA 両方に取り込まれると思います。

Q5:

HKe3-wtKRAS 細胞株を正常モデルと考えていますが、その理由は？

A5:

HKe3-wtKRAS は大腸癌の細胞株です、そして HKe3-wtKRAS を 3 次元培養すると、極性のある正常の大腸陰窩と類似した構造になります。これに対し、HKe3-mtKRAS を 3 次元培養した場合は、極性が失われた癌化した大腸陰窩構造になります。よって、3次元培養した HKe3-wtKRAS を正常モデル、HKe3-mtKRAS を癌モデルとして考えました。

Q6:

すべての実験は全部 HKe3-wtKRAS 細胞株を正常モデルと考え、実験を行っていますが、HKe3-wtKRAS を正常細胞の代表と考えて大丈夫でしょうか？

A6:

HKe3-wtKRAS はあくまでも大腸の細胞です、大腸の正常細胞と考えるのは問題ないと思いますが、すべての正常細胞の代表と考えることはできないと思います。

Q7:

3-deaza-cytarabine と cytarabine の化学構造の違いは 1 元素しかないが、なぜ抗腫瘍効果がここまで高くなった？

A7:

3-deaza-uridine も抗腫瘍効果が有ると報告されているため、ピリミジン塩基の 3 位が炭素であると抗腫瘍効果が高くなると考えましたが、原因はまだ不明です。

Q8:

膵臓癌をゲムシタビンで治療した場合、効果が無い症例がありますが、その原因は KRAS の変異による物ですか？

A8:

違うと思います。膵臓癌の KRAS の変異頻度は 95%です、ゲムシタビンが膵臓癌に無効の症例数は 95%ほど高くありませんので、他の原因も考えられると思います。

Q9:

2 次元培養と 3 次元培養で抗腫瘍効果が違う原因は？

A9:

2次元培養と3次元培養では培養法が異なります、3次元培養では周囲細胞との接着の仕方や薬剤の取り込み方など、2次元培養よりも、より生体内に近く、細胞にとってはよりストレスのかからない培養法であると考えられ、結果が異なるのも当然だと思います。

以上のように、審査員との間で様々な質疑応答がなされたが、申請者は適切に応答していた。

本論文の内容の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭性、及び質疑応答の結果を踏まえ、審査員で協議した結果、申請者は学位授与に値すると評価された。