

氏名	はしもと さゆり 橋本 小百合		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1968 号		
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 16 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 Cancer Spheroids With Mutated KRAS by Low-toxicity Compounds from Natural Products （新規低毒性抗腫瘍化合物の変異 KRAS 陽性癌スフェロイドに対する増殖抑制効果）		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	宮本 新吾
	（副査） 福岡大学	教授	安永 晋一郎
	福岡大学	講師	古賀 佳織

## 内容の要旨

### 【目的】

KRAS は人の癌において最も頻繁に変異がある遺伝子である。膵癌では約 86-96%、大腸癌では約 40-54%、肺腺癌では約 15-20%と高い確率でミスセンス変異がみられる。近年、KRAS の G12C 変異に対する分子標的薬として AMG510 (sotorasib) が開発されたが、G12C 変異にのみ効果があるため対象となる患者は限られており、かつ、薬剤耐性の問題が生じている。しかし、既存の抗癌剤は毒性が強く副作用の問題があるため、新しい低毒性抗腫瘍薬の開発が必要とされている。我々はこれまでに理研保有の天然物由来化合物を三次元浮遊 (3D floating: 3DF) 培養にてスクリーニングし、変異 (mt) KRAS を有する癌スフェロイドにのみ効果を示し、野生型 (wt) には効果を示さない低毒性抗腫瘍化合物を特定してきた。本研究ではその天然物由来化合物の中で NP910 をリード化合物とする 18 個の誘導体の抗腫瘍効果を検証した。

### 【対象と方法】

#### ■使用細胞

スクリーニングには、ヒト大腸癌 HCT116 細胞より片アリの G13D 変異を Neomycin 耐性遺伝子で置換した HKe3 細胞に wtKRAS と mtKRAS を強制発現させた細胞株 HKe3-wtKRAS (正常モデル) および HKe3-mtKRAS (癌モデル) を用いた。HCT116 細胞株およびその他の細胞株は ATCC より購入した。

## ■三次元培養

培地は 10%ウシ胎児血清 (FBS) および 1%ペニシリン/スプレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を使用し、超低接着型丸底 96 ウェルプレートに HKe3-wtKRAS 細胞を 2000 個/well、HKe3-mtKRAS 細胞を 500 個/well で播種し、同時に NP910 とその誘導体 18 個を添加し、5%CO<sub>2</sub>・37°C下でインキュベートした。

### 〔短期培養〕

Day3 と Day6 にスフェロイドの面積を IN Cell Analyzer 1000 と IN Cell Developer Toolbox を用いて計測し、Day3 を 1 として相対面積を計算した。

### 〔長期培養〕

27 日間 3 日ごとに薬剤を追加し、スフェロイドの面積を短期培養と同様の方法で 3 日ごとに計測した。

## ■マウス腫瘍原性アッセイ

HCT116 細胞をトリプシン処理し、リン酸緩衝生理食塩水とマトリゲルの 1:1 混合物に再懸濁し、HCT116 細胞  $1.5 \times 10^6$  個を含む容量 100  $\mu$ l を 4 週齢のメスの SH0 マウスの脇腹に皮下注射し、腫瘍長径が 5mm を超えた時点で薬剤を腹腔内に投与し、腫瘍体積は長径×短径×短径×1/2 の公式を用い、Day7 における 50%細胞増殖阻害濃度 (GI50) を算出した。

## 【結果】

HKe3-wtKRAS (正常モデル) および HKe3-mtKRAS (癌モデル) 細胞に NP910 とその誘導体 18 個を濃度 16.6  $\mu$ M および 50.0  $\mu$ M で 3DF 培養液に添加し、細胞増殖に対する効果を調べ、正常モデルでの毒性と、低用量または高用量での癌モデルでの成長抑制の有効性をスコアリングした。その結果 NP882 (STAR3) がさらなる解析の良い候補であることが示唆された。次に長期培養における STAR3 の効果を調べるために 3DF 長期培養を施行した。正常モデルに対して毒性を示さず、癌モデルでは腫瘍抑制効果を示し、GI50 は 6  $\mu$ M であり、この期間において明らかな薬剤抵抗性は示さなかった。最後に In vivo での STAR3 の効果を見るために、ヌードマウスアッセイにて検証したところ、STAR3 は in vivo においても腫瘍の成長を阻害し、マウスにおける GI50 は 30.75mg/kg であった。他の細胞株に対する STAR3 の有効性の検証のため、STAR3 濃度 2、6、18、54 $\mu$ M、および 162 $\mu$ M (高濃度) を用いて 3DF 培養を行った結果、STAR3 が細胞増殖を抑制した細胞株は 9 株 (50%) であった。STAR3 により増殖が抑制された mtKRAS 細胞株は 6 株 (60%)、wtKRAS 細胞株は 3 株 (37.5%) であった。フィッシャーの片側確率検定では、mtKRAS 細胞株と wtKRAS 細胞株の間に有意差は見られなかった。

## 【結論】

これらの結果、STAR3 は必ずしも mtKRAS を直接標的としていないと示唆されるが、変異 KRAS 陽性の癌モデルで効果を示すことにより、変異 KRAS の下流分子に作用していること

が考えられる。現在、癌モデルにおいて特異的な抗腫瘍効果を示し、多くの癌細胞株においての高い抗腫瘍効果を認める化合物（STAR2）の開発を進めている。

## 審査の結果の要旨

本論文は変異 KRAS を有する癌モデルでのみ効果を示す低毒性化合物として STAR3 を同定した。In vitro の解析として 3 次元浮遊培養を短期および長期間にて行い、その腫瘍効果、薬剤耐性化などを検証し、In vivo における変異 KRAS 陽性 (G13D) 腫瘍であるヒト大腸癌細胞株 HCT116 に対する効果を調べた。さらに、BRAF や TP53 等の他の様々なドライバー遺伝子の変異を有する細胞株に対する 3 次元浮遊培養における STAR3 の効果も検証した。

### 1. 斬新さ

KRAS 変異陽性癌モデルに作用し、正常モデルに影響のない天然由来化合物を網羅的なスクリーニングによって同定した。また、生体内類似環境である三次元浮遊培養を用いて、新規低毒性抗腫瘍化合物を検証し、その化合物がこれまでにない変異 KRAS 制御分子を標的としている可能性を示した。

### 2. 重要性

近年、変異 KRAS を直接阻害する分子標的薬である、ソトラシブが開発されたが、KRAS・G12C に変異がある場合にしか使用できない。これは変異 KRAS 全体の約 10% であり、残る 90% の変異 KRAS を直接標的とする治療薬は存在しない。また、薬剤耐性や副作用の問題もあり、KRAS 変異陽性癌に対する新規低毒性抗腫瘍薬の開発は重要である。しかし、本申請論文で検証された NP882 (STAR3) は mtKRAS の有無にかかわらず、すべての癌細胞株で効果的ではないため、直接的に KRAS 関連のドライバー遺伝子を標的のではなく、他の遺伝子を介して作用する、これまでにない変異 KRAS 制御分子が標的である可能性を示した。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、再現性を確認後、統計的な検証を行っている。STAR3 は短期培養、および長期培養においても正常細胞への毒性が低く、癌モデルにのみ効果を示すことを示し、マウス実験においても、副作用なく変異 KRAS 陽性 (G13D) ヒト大腸癌 HCT116 細胞の増殖を抑制した。

### 4. 表現の明確性

変異 KRAS 陽性癌が難治性癌であることと、既存の KRAS 変異を標的とする分子標的薬の問題点を列挙し、新規低毒性抗腫瘍化合物の重要性を示した。使用した KRAS 変異の有無

だけが異なる細胞株と3次元浮遊培養の細胞培養方法なども説明した上で、天然由来化合物のスクリーニングによって抗腫瘍効果が優れている STAR3 の評価方法を細かく説明した。

## 5. 主な質疑応答

Q:1 次スクリーニングで見つかったコアドラッグの派生物が18個だったということだが、この派生物の個数は妥当な数か？何か選定基準があるのか？

A: コアドラッグによって異なるが、今回は理研保有の天然物ライブラリーから谷本係数(分子類似性)を元に、distance が0.4以下の化合物に絞って取得したので、その派生物の数が18個でした。

Q:2 Table2 のスコアリング表で、NP882以外にもスコアが同点8の化合物があるが、NP882に絞った理由は何か？

A: 最終的には化合物の溶解度や合成のしやすさで選んだ。また、低濃度の16.6 $\mu$ Mで2点と最も強い抗腫瘍効果を示したのはNP882だけであったためです。

Q:3 Table3 で様々な細胞株で STAR3 の濃度を細かく設定し検証しているが、どの細胞がどの濃度で効果があったのか？また、濃度と KRAS 変異陽性癌との何か関連はあったのか？

A: high conc と記載のあるものは162 $\mu$ Mでのみ効果があったもので、162 $\mu$ Mでも効果がないものは Negative としています。低濃度で効果があるものが理想であるため、低濃度でも試しましたが、濃度と KRAS 変異との関係も見られず、効果にバラ付きがあり、変異 KRAS に特異的に作用するものでなかったため、Table では示していません。

Q:4 考察で、抗腫瘍効果はセルコンテキストで変わるので、STAR3 が KRAS 変異と関連がないとは言い切れないのではないか？

A: 細胞の種類によって、遺伝子バックグラウンドに違いがあるため、KRAS 変異によって制御されるシグナルを抑制していても、他の遺伝子パターンによって打ち消されてしまったりする可能性はある。変異 KRAS を直接制御していないが、その下流の何を制御しているのか、直接のターゲットはわかっていません。

Q:5 考察で、これまでにない変異 KRAS 制御分子が標的の可能性と言及しているが、これは KRAS の上流を抑えているのか、下流を抑えているのか、どちらだと考えるか？

A: 下流であると考えています。

Q:6 Natural Compound とは何か？

A: 天然由来化合物です。

Q:7 天然由来化合物とは人工的に作ったものではないのか？

A: 人工的に合成されたものではなく、天然物から抽出されたものです。

Q:8 三次元培養を用いて実験をする意味は何か？

A: 二次元培養の場合、パッセージをする必要があります。3次元浮遊培養は長期間正確に薬剤の効果を評価するには利点があります。また3次元培養の方が生体内類似環境でもあるので、適切であると考えました。

Q:9 三次元浮遊培養で用いた、超低接着型丸底 96 ウェルプレートとはどこの会社のものか？

A: コーニング社です。

Q:10 長期培養で 50  $\mu$ M を使用すると細胞が死滅するのか？

A: はい。長期培養で高濃度を使用すると細胞が死滅してしまうので、低い濃度で長期間検証しました。

Q:11 マウス実験で、STAR3 を腹腔内投与したのはなぜか？天然由来化合物であれば、経口投与は検討しなかったのか？

A: 腹腔内投与の方が的確に投与出来る事と、アニマルセンターに提出したマウスの実験計画書では最初は腹腔内投与し、次に効果があれば静脈、経口など段階的に検証すると申請しているため、今回は腹腔内投与となりました。

Q:12 STAR3 が KRAS 変異陽性癌に効果を示したが、実際はどのような pathway を想像しているのか？

A: PASS 解析(化合物の構造からその作用を推測するプログラム)では 910 系に共通して Polarization stimulant とあり、正常細胞の分化を促す薬剤である可能性があります。

Q:13 ソトラシブとの比較をしたことはあるか？

A: ありません。今後検討したいと思います。

Q:14 Pass 解析で細胞の分化を促すというのはどういうことか？分化を阻害するのであれば理解出来るが、Polarization stimulant についてどのような見解を持っているのか？

A: 正常細胞の分化を促すということは、癌細胞を正常に戻していく作用があり、その結果腫瘍の増殖が抑制されるのでないかと考えています。

Q:15 STAR3 がどの分子に結合するかなどの、シミュレーションはしたのか？

A: In silico では行っておりません。今後検討したいとおもいます。

以上の発表、討議の結果を踏まえ、審査員で協議した結果、本論文は学位論文に値し、学位申請者についても学位授与に値すると評価された。