



Title	KRAS変異肺がんの治療抵抗性克服を目指した新規分子標的併用療法の開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	山本, 岳
Description	配架番号 : 2927
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16435号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95570
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	YAMAMOTO_Gaku_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 山本 岳

学 位 論 文 題 名

*KRAS*変異肺がんの治療抵抗性克服を目指した新規分子標的併用療法の開発
(Targeting WEE1 to improve the therapy of *KRAS*^{G12C} mutant non-small cell lung cancer)

【背景と目的】 *KRAS*変異は非小細胞肺癌の約 30%と高頻度に認めるドライバー遺伝子変異だが、*KRAS* を直接阻害する有効な分子標的薬は最近まで存在しなかった。近年、 *KRAS*変異の一部を占める *KRAS*^{G12C}変異を特異的に阻害する薬剤（sotorasib）が開発され、2022 年に *KRAS* 阻害剤として世界で初めて非小細胞肺癌に臨床応用された。現在では複数の新規 *KRAS*^{G12C} 阻害剤に加えて *G12D*変異や全 *KRAS*変異を標的とした薬剤が臨床試験段階にあり、*KRAS* を標的とした治療開発は今後ますます進展していくと予想される。

一方で、*KRAS* 阻害薬単剤治療の効果を阻む様々な腫瘍耐性因子の存在も明らかとなってきた。この課題を克服するためには、*KRAS* 阻害薬に対する耐性メカニズムを解明し、関連するシグナル分子を同時に阻害する分子標的併用療法を確立することが有望な治療戦略である。

本研究の目的は sotorasib の薬効を最大化する新規併用化合物候補を探索し、その作用機序を明らかにすることである。さらにはその薬剤の標的分子が sotorasib 耐性に果たす役割について検討し、*KRAS*変異肺癌の薬剤耐性機構への理解を深めることを目指す。

【材料と方法】 化合物スクリーニングには国立がん研究センターが保有する 1,395 種のキナーゼ阻害剤からなる化合物ライブラリーを用いた。細胞株は NCI-H23、H358、H2122、H1373、H1792、H2030、LU65、LU99、IA-LM を使用した。細胞生存率の評価には、ATP 法、クリスタルバイオレット法によるコロニー形成アッセイを用いた。薬剤間相互作用（相乗効果の有無）の判定は、*in vitro* 増殖抑制試験の結果から Chou-Talalay 法によるコンビネーションインデックス及び、Bliss 法/Loewe 法/ZIP 法/HSA 法によるシナジースコアを算出して行った。アポトーシスの評価にはカスパーゼ-3/7 活性の測定およびアネキシン V とプロピジウムヨウ化物（Propidium Iodide; PI）の二重染色を用いたフローサイトメトリー解析を用いた。薬剤添加後の細胞内遺伝子発現の変化をトランスクリプトーム解析により網羅的に評価した。関連シグナル分子のタンパク質発現およびそのリン酸化状態は、WEE1、MCL-1、phospho-MCL-1、BCL2、BCL-xL、BIM、PUMA、NOXA、ERK、phospho-ERK、 γ H2AX、4EBP-1、phospho-4EBP-1 に対する一次抗体を用いてウエスタンブロット法により評価した。薬剤処理後の細胞周期解析には PI 染色とフローサイトメトリー解析を用いて評価した。新規タンパク質合成は、メチオニンアナログ取り込みを利用した Click-iT HPG アッセイと Puromycin 取り込みアッセイにより評価した。ユビキチンプロテアソーム系による MCL-1 分解制御を評価するため、FLAG タグ付き MCL-1 とユビキチンを共発現させた細胞に薬剤処理を行ったのち、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し抗ユビキチン化抗体を用いたウエスタンブロット法を実施した。*in vivo* における併用抗腫瘍効果を評価するため、マウス異種移植デル（H358 皮下腫瘍モデルおよび Patient-Derived Xenograft (PDX) モデル）を用いた薬効薬理実験を実施した。PDX は国立がん研究センターPDX ライブラリー（J-PDX）から提供を受けた。また、PDX から摘出した腫瘍標本を用いて免疫組織化学染色を行い

MCL-1 の細胞内発現量を評価した。

【結果】当研究室が保有する約 1,395 種のキナーゼ阻害剤ライブラリーを用いた併用スクリーニングにより、G2/M チェックポイント関連キナーゼタンパク質 WEE1 の阻害剤 (adavosertib) が sotorasib の増殖抑制効果を相乗的に高めることを見出した。sotorasib と adavosertib の併用は背景の異なる 9 種の非小細胞肺癌細胞株において広く相乗的な増殖抑制効果を示し、この効果は他の WEE1 阻害剤 (Zn-c3) でも再現された。トランスクリプトーム解析では、sotorasib と adavosertib の併用が増殖シグナル経路および DNA 損傷応答経路に関連する遺伝子発現を抑制することが確認された。相乗作用のメカニズム解析では sotorasib と adavosertib の併用が、抗アポトーシス分子である MCL-1 の発現を抑制することで癌細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした。MCL-1 抑制の機序として 1. ERK 遮断を介したタンパク質分解亢進、2. 新規タンパク質合成能抑制、という複合的なメカニズムが関与していると考えられた。具体的には、sotorasib 処理により KRAS 及び下流の ERK シグナルが遮断され、MCL-1 の 165 番スレオニン残基が脱リン酸化されることで、MCL-1 タンパク質の分解が亢進する経路が関与していた。また、adavosertib の併用により新規タンパク質合成が抑制され、タンパク質半減期が短い MCL-1 の発現が結果的に抑制される機序が明らかとなった。次に、WEE1 が sotorasib 耐性に果たす役割を検討するため、WEE1 を安定発現させた細胞株を作製した。WEE1 の過剰発現細胞では MCL-1 の発現が上昇しており、sotorasib に対して耐性を示すことが確認された。また、sotorasib 長期暴露により作製した耐性細胞株でも同様に MCL-1 の発現が上昇していた。さらに、adavosertib や MCL-1 阻害剤を併用することで、WEE1 過剰発現細胞株および sotorasib 耐性細胞株の sotorasib への感受性が回復した。*in vivo* 薬効試験では複数の CDX、PDX モデルにおいて、sotorasib 単剤および adavosertib 単剤と比較して併用治療が有意に強く腫瘍増殖を抑制した。

【考察】MCL-1 は半減期が極めて短く、その発現はリボソームでのタンパク質合成とユビキチンプロテアソーム系による分解のバランスにより精密に調整されている。WEE1 阻害による翻訳抑制メカニズムは明確ではないが、WEE1 がタンパク質合成に関わる mTOR シグナルとのクロストークしている可能性や、sotorasib と adavosertib の併用により誘導される強い DNA 損傷や複製ストレスが、リボソーム RNA の合成阻害を引き起こし、翻訳開始が抑制されるなどの可能性が考えられた。また、本研究により WEE1 が sotorasib 耐性に寄与することが新規に示され、WEE1 を阻害することで sotorasib 耐性を克服できる可能性が示唆された。WEE1 が sotorasib への耐性を誘導する詳細なメカニズムについては今後さらなる検討が必要である。

【結論】本研究では、*KRAS*^{G12C} 変異非小細胞肺癌において sotorasib と WEE1 阻害剤 adavosertib の併用が有効であり、MCL-1 抑制がその抗腫瘍効果の重要な要因であることを明らかにした。さらに、WEE1 が sotorasib 耐性の責任遺伝子の一つであることを明らかにした。本研究により、adavosertib の併用が sotorasib による抗腫瘍効果の向上および耐性克服に有効な新規治療戦略となる可能性が示された。