



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16435
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95970
Type	doctoral thesis
File Information	YAMAMOTO_Gaku.pdf



学位論文

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)

2025 年 3 月

北海道大学

山本 岳

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
実験方法	11 頁
実験結果	20 頁
考察	57 頁
総括および結論	61 頁
謝辞	62 頁
利益相反	63 頁
引用文献	64 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の査読付国際学術誌に投稿中である。

Gaku Yamamoto, Kosuke Tanaka, Ryo Kamata, Hitoshi Saito, Tomoko Yamamori-Morita, Takehiro Nakao, Jie Liu, Shunta Mori, Shigehiro Yagishita, Akinobu Hamada, Yuki Shinno, Tatsuya Yoshida, Hidehito Horinouchi, Yuichiro Ohe, Shun-Ichi Watanabe, Yasushi Yatabe, Hidenori Kitai, Satoshi Konno, Susumu S Kobayashi, Akihiro Ohashi. WEE1 Confers Resistance to KRAS^{G12C} Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer.

雑誌名 : *Cancer Letters*.

本研究の一部は以下の学会において発表した。

1. **Yamamoto G**, Tanaka K, Kamata R, Takehiro N, Mori S, Liu J, Kobayashi SS, Ohashi A. WEE1 inhibition prevents and overcomes resistance to KRAS inhibitors in lung cancer by enhancing MCL1-mediated apoptosis. Poster session at AACR Annual meeting 2024 (San Diego, CA, USA)
2. **Yamamoto G**, Tanaka K, Kamata R, Mori S, Liu J, Yamauchi T, Sakae Y, Ohashi A. Kobayashi SS. Targeting WEE1 to improve the therapy of KRAS G12C mutant non-small cell lung cancer. Mini symposium at AACR Annual meeting 2023 (Orland, FL, USA)
3. **山本 岳**, 鎌田 諒, 大橋 紹宏, 小林 進. *KRAS*^{G12C} 変異陽性非小細胞肺癌において WEE1 阻害は sotorasib の効果を増強する. 第 27 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2023 年 6 月, 佐賀.
4. **山本 岳**, 田中 広祐, 鎌田 諒, 山内 豊大, 劉 潔, 大橋 紹宏, 小林 進. *KRAS* G12C 変異陽性非小細胞肺癌前臨床モデルにおいて WEE1 阻害は Sotorasib の効果を増強する. 第 81 回日本癌学会学術総会, 2022 年 9 月, 横浜

要旨

【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ェ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ェ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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

4EBP-1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosine Triphosphate
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related Protein Kinase
BAK	BCL2 Antagonist/Killer
BAX	BCL2 Associated X Protein
BCA	Bicinchoninic Acid
BCL2	B-cell Lymphoma 2
BCL-xL	B-cell Lymphoma-extra Large
BIM	BCL2 Interacting Mediator of Cell Death
CDK1	Cyclin-dependent Kinase 1
CDX	Cell line-Derived Xenograft
CCLE	Cancer Cell Line Encyclopedia
Chk1	Checkpoint Kinase 1
DEG	Differentially Expressed Genes
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-mesenchymal Transition
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
EV	Extracellular Vesicles
FBS	Fetal Bovine Serum
FC	Fold Change
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FLT3	FMS-like Tyrosine Kinase 3
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase
GDP	Guanosine Diphosphate
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GTP	Guanosine Triphosphate
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HPMC	Hydroxypropyl Methylcellulose

HSA	Highest Single Agent
KEAP1	Kelch-like ECH-associated Protein 1
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MCL-1	Myeloid Cell Leukemia 1
MEK	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase
MET	Mesenchymal-epithelial Transition Factor
MSigDB	Molecular Signatures Database
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NaF	Sodium Fluoride
NOXA	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog
NSCLC	Non-small Cell Lung Cancer
OE	Overexpression
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDX	Patient-derived Xenograft
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PROTAC	Proteolysis Targeting Chimera
PUMA	p53 upregulated Modulator of Apoptosis
PFS	Progression-free Survival
RNA	Ribonucleic Acid
RS	Replication Stress
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SHP2	Src Homology 2-containing Protein Tyrosine Phosphatase
SOS	Son of Sevenless
STK11	Serine/Threonine Kinase 11
TBST	Tris-buffered Saline with Tween 20
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEAD	TEA Domain Transcription Factor
TPM	Transcripts Per Million
UPR	Unfolded Protein Response
WCL	Whole Cell Lysate
WEE1	WEE1 G2 Checkpoint Kinase
YAP	Yes-associated Protein
ZIP	Zero Interaction Potency

緒言

1) *KRAS* 変異肺癌の疫学と治療開発

肺癌のうち約 80%を非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）が占め、その多くが診断時には進行癌である。*Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog* (*KRAS*) 変異は、NSCLC のうち白人では約 30%、アジア人では約 10%と高頻度で認められるドライバー遺伝子変異である (Skoulidis and Heymach, 2019; Tamiya *et al.*, 2023)。*KRAS* は癌の増殖シグナル経路 (Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) 経路、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 経路) の中流に存在する重要なタンパク質であり、活性型である Guanosine Triphosphate (GTP) 結合型と不活性型である Guanosine Diphosphate (GDP) 結合型とが切り替わることでシグナル伝達を仲介している。*KRAS* にはコドン 12 番目、13 番目、61 番目に変異のホットスポットが存在し、*KRAS* 変異 NSCLC のうち、約 30%が *G12C* 変異 (12 番目アミノ酸のグリシンがシステインに変化) である。その他に *G12C*、*G12D*、*G13D*、*Q61H* 変異などが報告されている (Tamiya *et al.*, 2023)。

KRAS 変異は古くから知られるがんドライバー遺伝子変異でありながら、近年まで *KRAS* を直接阻害する薬剤は存在しなかった。その要因として RAS タンパク質には薬剤開発の標的となるポケット構造が乏しいことや、活性型 RAS が GTP と非常に高い親和性で結合しているなどの理由から、競合阻害が技術的に難しいと考えられてきた (Ostrem *et al.*, 2013)。近年、創薬技術の進歩により、*KRAS* にも薬剤のはまり込むポケット構造が存在することが明らかになった。続いて、*KRAS*^{*G12C*} 変異タンパク質のシステイン残基に共有結合し、変異 *KRAS* を不活性型 (GDP 結合型) に固定することで RAS シグナルを遮断する薬剤が開発された (Ostrem *et al.*, 2013)。その後 2022 年には *KRAS* 阻害剤として世界で初めて sotorasib が NSCLC の二次治療として臨床応用された (De Langen *et al.*, 2023)。

2) *KRAS* 阻害薬の課題

一方、*KRAS* 阻害薬単剤治療の効果は限定的であり、臨床における有効性の向上が課題である。*KRAS*^{*G12C*} 変異陽性 NSCLC 患者既治療例を対象とした sotorasib の第 III 相試験 (CodeBreak 200 試験) では、sotorasib 群の無増悪生存期間 (Progression-Free Survival, PFS) 中央値が 5.6 ヶ月、奏率が 28.1%と報告されている (De Langen *et al.*, 2023)。sotorasib と同時期に開発された *KRAS*^{*G12C*} 阻害剤である adagrasib も PFS 中央値が 5.49 ヶ月、奏率が 31.9%と sotorasib と同程度の有効性を示した (Mok *et al.*, 2024)。一方で、*Epidermal Growth*

Factor Receptor (EGFR) 変異陽性例に対する osimertinib の初回治療 (PFS 中央値 18.9 ヶ月、奏効率 80%) や、*ALK* 融合遺伝子陽性例に対する alectinib の初回治療 (PFS 中央値 34.1 ヶ月、奏効率 92%) などの結果と比較すると、KRAS 阻害薬単剤治療の効果は限定的である (Ramalingam *et al.*, 2020; Solomon *et al.*, 2024)。

この要因として、sotorasib や adagrasib は KRAS 阻害剤として First-in-class の薬剤であり、薬剤自体が未だ発展途上にある点が挙げられる。例えば、GDP 結合型 KRAS^{G12C} 阻害薬である divarasib は、*in vitro* での活性や選択性が sotorasib や adagrasib の 50 倍以上に高められ、臨床効果の改善が期待されている (PFS 中央値 13.1 ヶ月、奏効率 53.4%)。さらには活性型 (GTP 結合型) RAS を直接標的とした RAS (ON) 阻害剤や、KRAS 変異型によらない pan-RAS 阻害剤、ユビキチンプロテアソーム系を利用したタンパク質分解技術である Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) による創薬など、新たな治療モダリティが続々と開発され、臨床応用が試みられている (Punekar *et al.*, 2022)。

3) KRAS 阻害薬に対する耐性メカニズムとその克服

KRAS を標的とする薬剤開発が進む一方で、KRAS 変異肺癌の持つ腫瘍側の特性 (耐性因子) が、KRAS 阻害薬単剤治療の有効性を阻む大きな要因となっていることも明らかとなってきた。

KRAS や EGFR などのがんドライバー遺伝子を標的とした分子標的治療薬に対する抵抗性メカニズムは、初期耐性と獲得耐性の二つに大別される。初期耐性とは、がん細胞が治療を受ける前から分子標的薬に対して耐性を示す状態である。例えば KRAS 変異 NSCLC では、*Serine/Threonine Kinase 11 (STK11)*、*Kelch-like ECH-associated Protein 1 (KEAP1)* などの共存する変異プロファイルと初期耐性との関連が指摘されている。特に KEAP1 の共遺伝子変異は KRAS G12C 単剤治療の予後不良因子であると報告されている (Negrao *et al.*, 2023)。

一方、治療初期には薬剤感受性を示す腫瘍でも、治療の経過中に耐性を獲得することは避けられない (獲得耐性)。臨床で sotorasib や adagrasib に耐性となった患者腫瘍検体を用いた解析では、KRAS^{G12C} 以外の KRAS 二次変異、*Mesenchymal-epithelial Transition Factor (MET)* 増幅、*Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog (NRAS)* や *B-type RAF (BRAF)* の活性化変異の出現が報告されている (Awad *et al.*, 2021; N. Tanaka *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2021)。さらには、複数の前臨床研究で、上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition、EMT) や Yes-associated Protein (YAP) / TEA Domain Transcription Factor (TEAD) 転写再プログラミングなど、非遺伝的变化による KRAS 阻害薬への耐性獲得機序も報告されている (Adachi *et al.*, 2023; Edwards *et al.*, 2023)。

これらの課題を克服するため、耐性に関連する分子やシグナル伝達経路を明らかにし、それらを同時に阻害する分子標的薬併用療法が有望な耐性克服戦略として積極的に検討されている。例えば、KRAS の上流または下流の因子（受容体型チロシンキナーゼ、Mitogen-activated Protein Kinase Kinase (MEK)、Son of Sevenless (SOS)、Src Homology 2-containing Protein Tyrosine Phosphatase (SHP2) など）を同時に阻害することで MAPK 経路の再活性化を抑制し、治療効果を向上させることが期待されている (Gandara *et al.*, 2021; Punekar *et al.*, 2022)。現在、多くの KRAS^{G12C} 阻害剤との併用療法が臨床試験で検討されているが、最適な組み合わせはまだ特定されていない。

4) 本研究に関わる分子生物学的背景

- 細胞周期チェックポイントについて

細胞が増殖する過程で、1 回の分裂を完了して 2 つの娘細胞を形成するサイクルが細胞周期である。細胞周期は間期と分裂期 (M 期) に大別され、間期は G1 期、S 期、G2 期から成る。細胞周期が正しく進行し、Deoxyribonucleic Acid (DNA) 損傷などの異常に応じて細胞周期を停止させる役割を担うのが細胞周期チェックポイントである。本研究で着目した WEE1 は下流のサイクリン依存性キナーゼ 1 (Cyclin-Dependent Kinase 1、CDK1) の 15 番目チロシン残基をリン酸化することでその機能を抑制するキナーゼタンパク質であり、特に G2/M チェックポイントで重要な役割を果たす。adavosertib などの WEE1 阻害剤はこの G2/M チェックポイント機構を阻害することにより細胞が損傷 DNA を抱えたまま強制的に M 期へ移行することで細胞死を誘導すると考えられている (Caiola *et al.*, 2018; Takashima *et al.*, 2020)。

- アポトーシスについて

アポトーシスは制御された細胞死であり、DNA 損傷、酸化ストレスなどのストレスや損傷に応答して開始される。B-cell Lymphoma 2 (BCL2) ファミリーはアポトーシスを調節する重要なタンパク質ファミリーであり、アポトーシス促進タンパク質 (BCL2 Interacting Mediator of Cell Death (BIM)、p53 upregulated Modulator of Apoptosis (PUMA)、Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (NOXA) など) と抗アポトーシスタンパク質 (BCL2、Myeloid Cell Leukemia 1 (MCL-1)、B-cell Lymphoma-extra Large (BCL-xL) など) からなる (Hata, Engelman and Faber, 2015)。抗アポトーシスタンパク質はミトコンドリアの外膜上に存在し、BCL2 Associated X Protein (BAX) や BCL2 Antagonist/Killer (BAK) に結合することでミト

ミトコンドリア外膜上のポア形成を抑制することでカスパーゼの活性化を抑制している。一方でアポトーシス促進タンパク質は抗アポトーシスタンパク質に結合し、その機能を抑制することでアポトーシス促進的に働く。BCL2ファミリーは、がん遺伝子を標的とした分子標的薬剤の治療効果や耐性に重要な役割を果たしている (Hata *et al.*, 2014)。たとえば、EGFR 変異肺癌に対する EGFR 阻害剤や Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) 増幅乳癌に対する HER2 阻害剤投与時には、MAPK 経路の阻害により BIM が脱リン酸化し、安定化することでアポトーシスが促進される (Bean *et al.*, 2013; K. Tanaka *et al.*, 2021)。一方で、MCL-1 および BCL-xL といった抗アポトーシスタンパク質は、標的療法に対してアポトーシスを回避する役割を担い、耐性メカニズムに関わっているとされる (Song *et al.*, 2018)。

5) 本研究の着想に至る経緯と目的

本研究は sotorasib の腫瘍増殖抑制効果を高める新規併用化合物候補を探索することを目的とし、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ライブラリーを用いて網羅的併用スクリーニングを実施した。異なる二つの細胞株で共通してヒットした 11 薬剤の中からさらなる絞り込みを行い、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新規に発見した。さらに、WEE1 と同様に G2/M 期を制御する一連のキナーゼタンパク質 (Aurora, ATR, Chk1 等) の阻害剤も上位薬剤に含まれており、これらのシグナル分子が KRAS 阻害薬への耐性に関与しているのではないかと考えた。以上から、sotorasib と WEE1 阻害剤の新規併用戦略を、前臨床モデルを用いて多角的に検証して臨床応用への可能性を示すこと、作用メカニズムの探索を通じて KRAS 阻害薬への耐性メカニズムの理解を深めることが本研究の目的である。

実験方法

細胞株と薬剤

ヒト由来 *KRAS*^{G12C} 変異陽性非小細胞肺癌細胞株として NCI-H23、H358、H2122、H1373、H1792、H2030、LU65、LU99、IA-LM を American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) および理化学研究所バイオリソース研究センター (Tsukuba, Ibaraki, Japan) から購入した。細胞はローズウェルパーク記念研究所培地 (Roswell Park Memorial Institute medium, RPMI) を使用した。RPMI には 10% の非動化牛胎仔血清 (Fetal bovine serum, FBS) (Thermo Fisher Scientific) と 1% のペニシリン・ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific) を添加し、5%CO₂ 下の 37°C 湿潤環境で培養した。

使用した薬剤のうち、adagrasib、divarasib、barasertib、alisertib、osimertinib、afatinib、Zn-c3、palbociclib、BMS-265246、S63845、ABT-737、VE-822、MK-8776、MG132 は Selleck Chemicals (Houston, TX, USA) から購入した。sotorasib と adavosertib は、Selleck Chemicals および TargetMol (Boston, MA, USA) から購入した。Puromycin は InvivoGen (San Diego, CA, USA) から購入した。各化合物は濃度が 10 mM となるように Dimethyl Sulfoxide (DMSO) へ溶解し、-20°C で保存した。

化合物スクリーニングとヒット化合物の選択

sotorasib の増殖抑制効果を高める併用パートナーを探索するために、国立がん研究センターが保有する 1,395 種類のキナーゼ阻害剤化合物ライブラリーを用いてハイスループットスクリーニングを実施した。ライブラリーは Selleck Chemicals より購入し、既報で報告されたものを使用した (Du *et al.*, 2022)。H23 および H358 細胞を 96 ウェルプレートの各ウェルに 3,000 個播種し、一晚培養した。翌日、DMSO または sotorasib (最終濃度が H23 に対して 1 μ M、H358 に対して 10 nM) と各ライブラリー化合物 (最終濃度 1 μ M) を各ウェルに添加した。薬剤添加 48 時間経過後に ATP 法 (次項で詳細説明) により生存細胞数を評価した。sotorasib の細胞増殖抑制率 (%) の値を最も向上させた化合物を評価するため、sotorasib による細胞増殖抑制率 (%) の値を、併用化合物の存在下と非存在下で比較し、その比が高い順に全化合物を順位付けした。全体の上位 5% に該当する 75 種類の化合物をヒット化合物として定義した。

細胞生存アッセイ

化合物の増殖抑制効果を評価するため、ATP 法及びクリスタルバイオレット法 (コロニー形成アッセイ) を用いた細胞生存アッセイを実施した。

ATP 法：各細胞株を 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 3000 個の密度で播種し一晩培養後、濃度勾配をつけた各化合物を添加した。化合物添加から 72 時間後に、CellTiter-Glo 2.0 試薬 (Promega, Madison, WI, USA) を各ウェルに 50 μ L 添加し、10 分間遮光下で室温インキュベートした。その後、SpectraMax Paradigm プレートリーダー (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いて発光量を測定した。

クリスタルバイオレット法 (コロニー形成アッセイ)：6 ウェルプレートの各ウェルに細胞を 3000 個播種し、一晩培養した。翌日、目的の化合物を添加し、培養を継続した。培地及び添加した化合物は 3 日毎に新しいものに交換した。薬剤添加から 12 日後、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間室温にて固定した。固定後、細胞を 0.5%クリスタルバイオレット溶液で 30 分間染色した。染色後、クリスタルバイオレットによる染色面積を National Institutes of Health ImageJ ソフトウェア (Ver1.52, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて定量した。

RNA 抽出

RNeasy キット (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を使用して Ribonucleic Acid (RNA) 抽出を行なった。H23 および H358 細胞を約 50%のコンフルエンスとなるように 10 cm ディッシュに播種し、一晩培養した。翌日、各細胞に DMSO、sotorasib、adavosertib、sotorasib + adavosertib を添加し、24 時間培養した。培養後、細胞に RLT バッファー (細胞溶解バッファー) を 500 μ L 加えて細胞を完全に溶解した。得られたライセートを QIAshredder スピンカラムに移し、15,000 rpm で 2 分間遠心した。その後、得られた溶液に 70%エタノールを同量加え、十分に混和した。この混合物を RNeasy ミニスピンカラムに移し、15,000 rpm で 15 秒間遠心して、フロースルーを除去した。

精製ステップとして、350 μ L の RW1 バッファーをカラムに加え、10,000 rpm で 15 秒間遠心し、これを 2 回繰り返した。その後、DNA の除去のために DNase I 処理を行った。具体的には、RDD バッファー70 μ L に DNase I 10 μ L を混合し、スピンカラムのメンブレンに滴下して、室温で約 15 分間インキュベートした。その後、再度 RW1 バッファーを使用して洗浄した。

次に、RPE バッファー500 μ L を加え、10,000 rpm で 15 秒間遠心し、これを 2 回繰り返してカラムを洗浄した。最終洗浄後、空のコレクションチューブで追加遠心を行い、残存するエタノールを除去した。最後に、RNeasy カラムを新しい 1.5 mL チューブに移し、Nuclease Free Water を加えて RNA を溶出した。

トランスクリプトーム解析

前項で抽出した RNA を RHELIXA (Tokyo, Japan) に送付し、ライブラリ調製と Illumina プラットフォームによるシーケンス解析を委託した。返却された FASTQ 形式の生データは、まず FastQC ソフトウェアを使用して品質管理チェックを行った。アダプタ配列の除去およびリードのトリミングを実施した後、リファレンスゲノムへのマッピングを行い、RNA リードを各遺伝子に正確にアライメントした。

遺伝子ごとにマッピングされたリード数は、featureCounts を使用して定量化し、得られたカウントデータは R を用いて処理し、Transcripts Per Million (TPM) 値に正規化した。差次的遺伝子発現解析は、R の TCC ライブラリを使用して行い、統計的手法に基づいて有意な発現変動遺伝子 (Differentially Expressed Genes、DEGs) を同定した。さらに、正規化された発現データおよび DEGs に対して、パスウェイエンリッチメント解析および Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行い、関連する生物学的経路や機能を包括的に評価した。

定量的 PCR 法

細胞から抽出した RNA サンプルから SuperScript™ VILO™ Master Mix (Thermo Fisher Scientific) により逆転写反応を行い、相補的 DNA (cDNA) を合成した。具体的には、目的の RNA サンプル 2.5 µg と SuperScript™ VILO™ Master Mix 4 µL、RNase フリー水を加え、最終容量を 20 µL に調製した。反応条件は 25°C で 10 分間、42°C で 60 分間、85°C で 5 分間とした。得られた cDNA は -20°C で保存した。

定量的 Polymerase Chain Reaction (PCR) には TaqMan プローブと Quant Studio 1 RealTime PCR システム (Thermo Fisher Scientific) を用いた。各 PCR 反応は、TaqMan Fast Advanced Master mix (2×) 10 µL、TaqMan probe (20×) 1 µL、cDNA Template、RNase フリー水を加え、最終容量を 20 µL に調製し、96 ウェルプレートで実施した。PCR 条件は 95°C で 20 秒間の初期変性後、95°C で 1 秒間、60°C で 20 秒間のサイクルを 40 回繰り返した。Threshold cycle (Ct) 値は Quant Studio 1 RealTime PCR システム内に内蔵されたプログラムにより自動的に測定された。Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) を内因性コントロールとし、各サンプルにおける各遺伝子の相対的な発現量を ΔC_t 法で算出し、コントロール群と各薬剤投与群の遺伝子発現量の比較は $\Delta\Delta C_t$ 法で実施した。使用した TaqMan プローブは、ヒト GAPDH (Hs99999905_m1、Thermo Fisher Scientific) およびヒト MCL-1 (Hs06626047_g1、Thermo Fisher Scientific) である。

ウェスタンブロット法

各種タンパク質の発現はウェスタンブロット法を用いて解析した。ウェスタンブロット法は過去に報告された方法に準じて実施した (Fujimoto *et al.*, 2020)。細胞は、Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (022-15371、Wako、Osaka、Japan) およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (P8340、Sigma) を含む Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer (RIPA) バッファー (#9806、Cell Signaling Technology、Danvers、MA、USA) で溶解した。溶解した細胞ライセートは、超音波処理 (ソニケーション) を行い、その後 10 分間氷上で静置した。続いて、15,000 rpm で 10 分間遠心し、不溶画分を除いた上清を回収した。

得られたライセートを Pierce BCA Protein キットを用いて Bicinchoninic Acid Assay (BCA) アッセイを行いタンパク質の濃度を測定した。濃度測定後、タンパク質濃度を 0.5 – 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整した。SDS を添加して 95°C で 5 分間ボイルし、タンパク質を変性させた後、濃度を均一にしたサンプルを Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ゲルにロードした。SDS-PAGE は 200V で 30 分間行った。電気泳動後、50V で 2 時間かけてタンパク質をメンブレンに転写した。

転写後、ブロッキング液として Blocking One (Nacalai Tesque、Kyoto、Japan) を使用し 60 分間室温でブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体 (各抗体 1:1000 の希釈) を含むブロッキング液に浸し一晩 4°C で振とうしながらインキュベートした。翌日、Tween20 含有トリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline with Tween 20、TBST) で 5 分×3 回洗浄した後、二次抗体 (1:2000 希釈) を添加し、室温で 60 分間インキュベートした。再度 TBST で 5 分間×3 回洗浄し、タンパク質発現を検出した。検出には ECL TM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare、Chicago、IL、USA) を用い、発光画像は ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) で撮影した。一次抗体としては、WEE1 (#4936、Cell Signaling Technology)、MCL-1 (#5453)、p-MCL-1 (T163, #14765)、BCL-xL (#2764)、BIM (#2819)、PUMA (#4976)、NOXA (#14766)、Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) (#9102)、p-ERK (#9106)、 β -actin (#4970)、p-CDC2 (#9111)、Ubiquitin (#20326)、BCL2 (sc-7382, SantaCruz)、FLAG (F7425, SIGMA-ALDRICH)、Puromycin (MABE343) を使用した。バンド強度の定量には National Institutes of Health ImageJ ソフトウェア (Ver1.52、National Institute of Health) を用いたデンストメトリー解析を行い、タンパク質発現の相対定量は同じブロット上の β -アクチンを内部標準として行なった。

免疫沈降

MCL-1 タンパク質のユビキチン化状態を評価するために、免疫沈降実験を行

なった。免疫沈降は過去に報告された方法に準じて実施した (Tsuchiya *et al.*, 2011)。H23 細胞に HA-ユビキチンおよび FLAG-MCL-1 発現プラスミドを共発現させるため、Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific) を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクション後 48 時間が経過した時点で、DMSO、sotorasib、adavosertib、sotorasib + adavosertib 併用を添加し、同時にプロテアソーム阻害剤 MG132 (10 μ M) を加えて 8 時間培養した。培養後、細胞を溶解バッファー (50 mM トリス塩酸緩衝液 [pH 8.0]、10%グリセロール、100 mM フッ化ナトリウム (Sodium Fluoride、NaF)、50 mM NaCl、2 mM エチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediaminetetraacetic Acid、EDTA)、2 mM ナトリウムオルトバナデート、10 mM ナトリウムピロリン酸、10 mM グリセロールリン酸、0.1% NP-40、プロテアーゼ阻害剤カクテル (P8340, Sigma)) で処理して、全細胞抽出物を調製した。得られた細胞抽出物を抗 Flag M2 アフィニティゲル (Sigma) と共に 4°C で一晩回転混和し、免疫沈降を行った。アフィニティゲルを洗浄バッファー (50 mM トリス塩酸緩衝液 [pH 7.4]、150 mM 塩化ナトリウム、0.1% NP-40) で 3 回洗浄後、SDS サンプルバッファー (50 mM トリス塩酸緩衝液 [pH 6.8]、10%グリセロール、1% SDS) で煮沸して免疫複合体を溶出し、ウエスタンブロットに供した。

発現コンストラクト

FLAG-MCL-1 (ベクターID: VB221008-1244 nmq) および WEE1 (VB221008-1258zvg) の発現ベクターは VectorBuilder (Chicago, IL, USA) で構築したものを購入して使用した。HA-ユビキチン発現ベクター (#18712) は Addgene から購入した。トランスフェクションには、Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。WEE1 安定発現細胞株の作製には、トランスフェクション後に Puromycin (1.5 μ g/mL) を用いて細胞を選択し、安定的に WEE1 を過剰発現する細胞株を樹立した。

新規タンパク質合成の検出

新規合成タンパク質は、Click-iT HPG Alexa Fluor Protein Synthesis Assay Kit (C10428; Thermo Fisher Scientific) を用いて検出した。1 ウェルあたり 30,000 個の H23 細胞及び H358 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、16 時間培養した。次に、DMSO、sotorasib、adavosertib、sotorasib + adavosertib 併用を添加し、24 時間培養した。培養後、細胞にメチオニンのアナログである Click-iT HPG (L-ホモプロパルギルグリシン) を 30 分間取り込ませ、新規合成タンパク質を標識した。蛍光画像は BZ-X800 アナライザー (Keyence Corporation, Osaka, Japan) を用いて撮影し、蛍光強度のキャプチャおよび定量には

SpectraMax Paradigm (Molecular Devices) と SoftMax Pro ソフトウェア (ver.7.10) を使用した。

m7GTP プルダウンアッセイ

キャップ依存的翻訳に関わるタンパク質がキャップ構造 (m7GTP キャップ) に結合するかどうかを解析した。H23 細胞に対して DMSO、sotorasib、adavosertib、sotorasib + adavosertib 併用を添加し 24 時間培養後、細胞を回収して溶解バッファー (150 mM 塩化ナトリウム、50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)、1mM EDTA、0.5% NP-40) で溶解した。細胞溶解液を 14,000 g で 15 分間遠心し、上清を回収した。上清に対して m7GTP の類似構造を持つ γ -アミノフェニル-m7GTP アガロースビーズ (AC-155S、Jena Bioscience、Jena、Germany) を添加し 4°C で一晩回転混和した。翌日、非特異的な結合を最小限に抑える目的でビーズを溶解バッファーで 3 回洗浄したのち、SDS サンプルバッファー (50 mM トリス塩酸緩衝液 [pH 6.8]、10%グリセロール、1% SDS) で煮沸して溶出し、ウエスタンブロットに供した。

siRNA 実験

目的遺伝子のノックダウン実験には siRNA を用いた。siRNA は ON-TARGETplus SMARTpool siRNA (Thermo Fisher Scientific) の WEE1 siRNA (#L-005050-00-0005)、BCL2L1 siRNA (#L-004383-00-0005) 及びコントロール siRNA (#102207; QIAGEN) を使用した。トランスフェクションには、Lipofectamine RNAimax (Thermo Fisher Scientific) を用いた。ノックダウン効率をウエスタンブロット法によりタンパク質発現を確認することで評価した。

細胞周期解析

化合物が細胞周期に与える影響を、PI による DNA 染色およびフローサイトメトリー法を用いて評価した。H23 または H358 細胞を 60 mm ディッシュに $1.0\text{--}5.0 \times 10^6$ 個播種し、一晩培養した。翌日 DMSO、sotorasib、adavosertib、sotorasib + adavosertib 併用を添加し、さらに 24 時間培養した。培養後、細胞を回収し、PBS で洗浄した後、70%エタノールで懸濁し-2°Cで 2 時間以上固定した。固定後、PBS と 4%FBS を含むバッファーで洗浄し、PI バッファー

[PBS、PI 20 $\mu\text{g/mL}$ (Thermo Fisher Scientific)、RNase A 100 $\mu\text{g/mL}$ (NIPPON GENE、Toyama、Japan) 1 mL] で細胞を懸濁し、室温遮光下で 20 分間インキュベートした。フローサイトメトリー解析には FACSCanto™ II フローサイトメーター (Becton-Dickinson、Franklin Lakes、NJ、USA) を用い、1 サンプルあたり 10,000 個の細胞を解析した。フローサイトメトリーデータは FlowJo ソフト

ウェア (v.10.7.1、Becton-Dickinson) を使用し、DNA 量が 2 倍体である細胞を G1 もしくは S 期、4 倍体である細胞を G2 もしくは M 期と定義した。

アポトーシスの解析

アネキシン V アッセイ : Annexin V-Fluorescein Isothiocyanate (FITC) アポトーシス検出キット (Nacalai Tesque) を用いた。H23 または H358 細胞を 6 ウェルプレートに 1 ウェルあたり $1.0\text{--}5.0\times 10^5$ 個播種し一晩培養した。翌日、DMSO、sotorasib、adavosertib、sotorasib + adavosertib 併用を添加し、さらに 48 時間培養した。培養後、細胞を回収し PBS で 2 回洗浄した。アネキシン V 結合溶液を用いて、最終細胞密度が 1.0×10^6 cells/mL となるように細胞を懸濁し、懸濁液 100 μ L に対してアネキシン V-FITC 溶液と PI 溶液を各 5 μ L 添加した。室温遮光下で 15 分間インキュベートし、フローサイトメトリー解析に供した。フローサイトメトリー解析には FACSCanto™ II フローサイトメーター (Becton-Dickinson、Franklin Lakes、NJ、USA) を用い、1 サンプルあたり 10,000 個の細胞を解析した。フローサイトメトリーデータは FlowJo ソフトウェア (v.10.7.1、Becton-Dickinson) を使用し、アネキシン V 陽性かつ PI 陰性の細胞を早期アポトーシス細胞、アネキシン V 陽性かつ PI 陽性の細胞を後期アポトーシス細胞と定義した。

Caspase 3/7 アッセイ : Caspase-Glo3/7 アッセイ (Promega) を用いた。各細胞株を 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 3,000 個播種し、一晩培養した。翌日、化合物を添加してさらに 24 時間培養した。培養後、Caspase-Glo 3/7 アッセイ試薬を 50 μ L/ウェル添加し、室温遮光下で 1 時間インキュベートした。その後、SpectraMax Paradigm プレートリーダー (Molecular Devices) を用いて発光量を測定した。

免疫蛍光染色

薬剤添加後の新規タンパク合成能を評価するため、Puromycin 取り込みアッセイと免疫蛍光染色を実施した。H23 細胞を 35 mm ディッシュに $1.0\text{--}2.0\times 10^5$ 個播種し、一晩培養した。翌日、DMSO、sotorasib、adavosertib、またはその併用を添加し、さらに 24 時間培養した。培養後、Puromycin を最終濃度 10 μ g/mL となるように添加し、10 分間反応させた後に、PBS で 2 回洗浄した。その後 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液で 15 分間固定した。固定後、トリトン X-100 を含むバッファーで 15 分間透過処理を実施した。免疫蛍光アッセイには Puromycin (MABE343) 抗体を 1 μ g/mL の濃度で使用した。核染色には SlowFade Diamond Antifade Mountant with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) を使用した。画像は BZ-X800 アナライザー

(Keyence Corporation) を用いて撮影した。

免疫組織化学染色

マウス異種移植モデルから摘出した腫瘍サンプルは、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液を用いて24時間以上ホルマリン固定した。その後、パラフィン包埋、HE染色および免疫組織化学染色はMorphotechnology (Sapporo, Japan) に委託して実施した。免疫組織化学用いた一次抗体はWEE1 (#4936, Cell Signaling Technology) およびMCL-1 (#5453, Cell Signaling Technology) を用いた。免疫染色陽性細胞の定量は、ImageJソフトウェア (Ver1.52, National Institutes of Health) を用いて染色面積を算出することで行った。

マウス異種移植モデル

すべての動物実験は、国立がん研究センター動物実験管理委員会の承認を受けた。本研究は、動物使用に関するすべての関連する倫理規定を遵守して実施した。

細胞株由来異種移植モデル (Cell line-derived xenograft; CDX) : 5.0×10^6 個のH358細胞をヌードマウス (雌、8週齢、BALB/cAJcl-Foxn1nu, CLEA Japan) の側腹部に皮下接種した。治療群の設定には、腫瘍体積の平均が $100\text{--}150\text{ mm}^3$ となるようにマウスを無作為にグループ分けした。sotorasib および adavosertib は、それぞれ0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) に溶解し、 10 mg/kg (sotorasib) および 40 mg/kg (adavosertib) を1日1回経口投与した。2~3日ごとにマウスを観察し、キャリパーで腫瘍の長さ と幅を測定した。腫瘍体積は、次の式を用いて計算した： $1/2 \times (\text{長径} \times \text{短径}^2)$ 。

患者由来異種移植モデル (patient-derived xenograft; PDX) : PDX サンプル (JP-01、JP-02) は、国立がん研究センターJ-PDXライブラリーから提供された。PDX腫瘍をNOGマウス (雌、8週齢、NOD/Shi-scid、IL-2R γ KO Jic, In-Vivo Science Inc.) またはヌードマウスの皮下に移植した。治療群の設定には、腫瘍体積の平均が $100\text{--}150\text{ mm}^3$ となるようにマウスを無作為にグループ分けした。sotorasib および adavosertib は、それぞれ0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) に溶解し、 30 mg/kg (sotorasib) および 40 mg/kg (adavosertib) を1日1回経口投与した。2~3日ごとにマウスを観察し、キャリパーで腫瘍の長さ と幅を測定した。腫瘍体積は、次の式を用いて計算した： $1/2 \times (\text{長径} \times \text{短径}^2)$ 。

統計解析

連続変数の2群間の比較にはスチューデントの t 検定を、4群間の比較には一元配置分散分析 (Analysis of Variance、ANOVA) を行い、全体的な有意差を

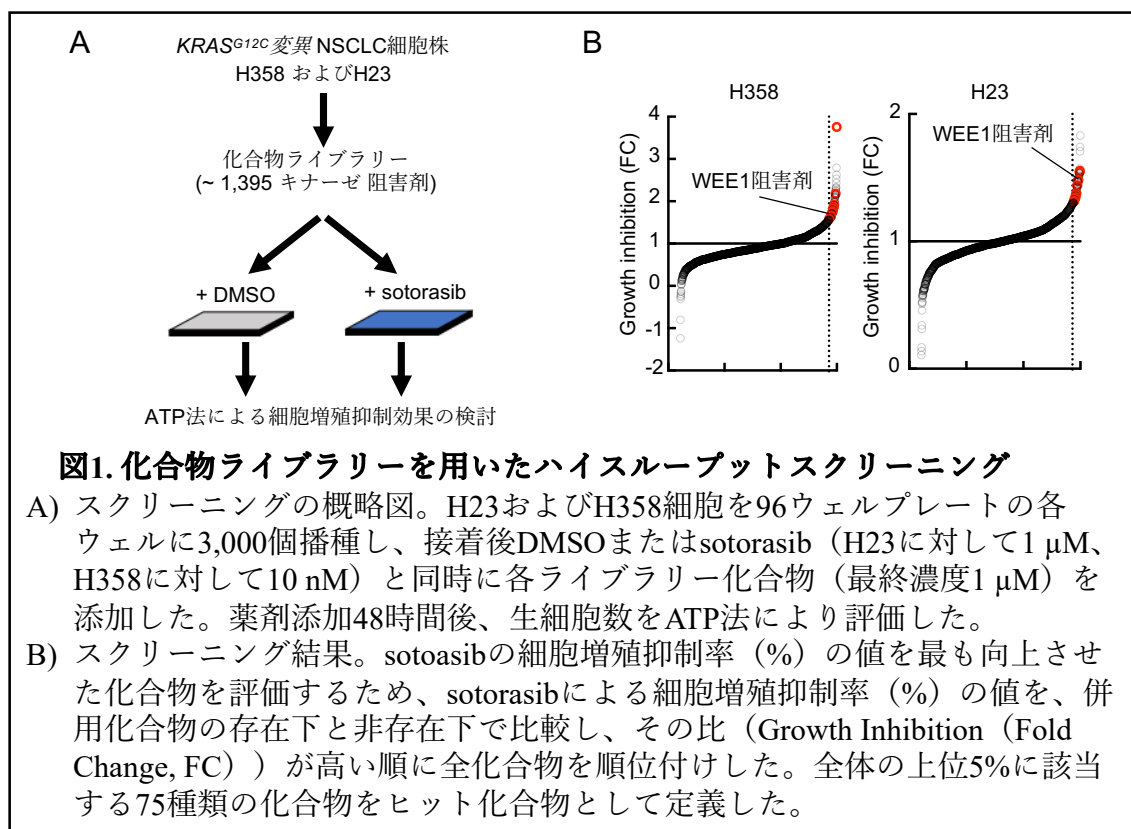
確認した後にチューキーの多重比較検定を適用した。生存曲線間の比較にはロ
グランク検定を適用した。統計学的有意水準は p 値 0.05 未満とした。統計解析
およびグラフの作成には GraphPad Prism v10.2.3 (GraphPad Software、San
Diego、CA、USA) を使用した。

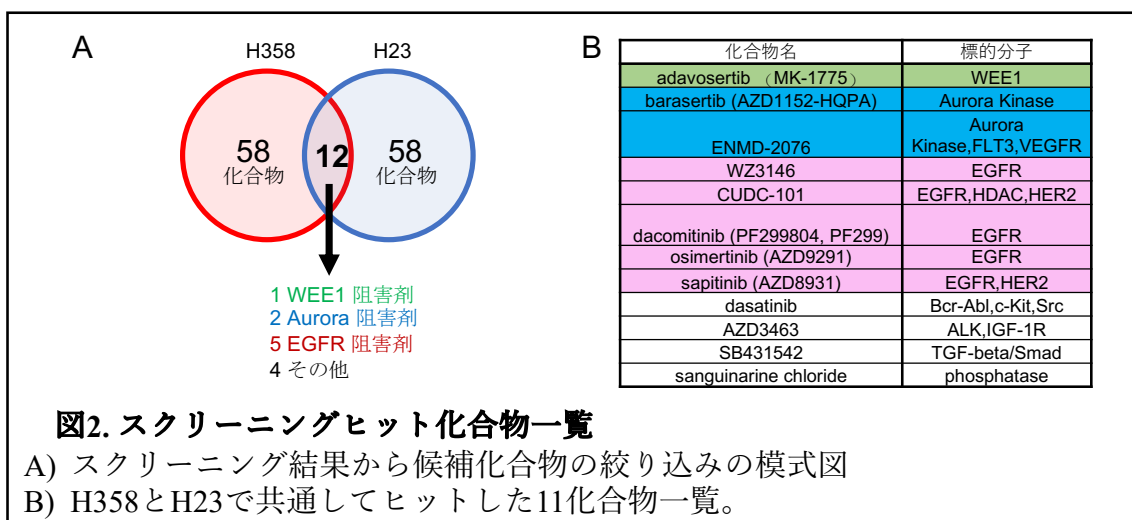
結果

1) 網羅的化合物スクリーニングによる sotorasib 新規併用パートナーの探索

KRAS^{G12C} 変異 NSCLC における sotorasib の治療効果向上が臨床における課題である。はじめに、sotorasib の新規併用化合物候補を包括的に探索し、さらには耐性メカニズム解明の足がかりとするため、国立がん研究センターが保有する 1,395 種の化合物ライブラリーを使用した網羅的ハイスループットスクリーニングを実施した。細胞株は *KRAS*^{G12C} 変異 NSCLC 細胞株として代表的な H358 及び H23 を使用した。sotorasib 単剤、各ライブラリー化合物単剤、sotorasib + ライブラリー化合物併用による細胞増殖抑制効果を Adenosine Triphosphate (ATP) 法 (Cell Titer Glo 2.0 assay) により評価した (図 1A)。得られた結果から sotorasib の増殖抑制効果が各ライブラリー化合物存在下でどの程度高まるか (Fold Change; FC) を評価した (図 1B)。

全化合物のうち、上位 5% (約 70 化合物) をヒット化合物と定義し、二つの異なる細胞株で共通してヒットした 11 化合物を抽出した (図 2A)。11 化合物の内訳は、WEE1 阻害薬 1 種、Aurora 阻害薬 2 種、EGFR 阻害薬 5 種、その他の化合物 4 種であった (図 2B)。WEE1 は細胞周期における G2/M チェックポイントを担うキナーゼタンパク質であり、その下流にある CDK1 の 15 番目のチロシン残基をリン酸化することで、その機能を抑制する。同様に Aurora キナ





ーゼは有糸分裂のチェックポイント機構を担う重要な分子である。さらに、WEE1 や Aurora と同様に G2/M 期を制御する一連のキナーゼ蛋白（Ataxia Telangiectasia and Rad3-related Protein Kinase（ATR）、Checkpoint Kinase 1（Chk1）等）の阻害剤も上位ヒット化合物に含まれており、これら有糸分裂のチェックポイント分子が KRAS 阻害薬の治療抵抗性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された（表 1）。また、EGFR 阻害薬は KRAS 阻害薬の併用パートナーとして過去に報告されており、これらの阻害薬がヒット化合物に含まれていたことは本スクリーニング結果の妥当性を示すものと考えられた（Xue *et al.*, 2020）。

表 1. H23 および H358 細胞株におけるヒット化合物上位 20 種一覧

順位	H23		H358	
	化合物名	標的分子	化合物名	標的分子
1	Panobinostat (LBH589)	HDAC	WZ3146	EGFR
2	CB-5083	ATPase	WZ8040	EGFR
3	CUDC-907	HDAC,PI3K	Gefitinib (ZD1839)	EGFR
4	GSK1838705A	ALK,IGF-1R	AST-1306	EGFR
5	Sanguinarine chloride	phosphatase	PD168393	EGFR
6	A-674563	Akt,CDK,PKA	BGT226 (NVP-BGT226)	mTOR,PI3K
7	Dasatinib	Bcr-Abl,c-Kit,Src	Lapatinib (GW-572016) Ditosylate	EGFR,HER2
8	LY2857785	CDK	AEE788 (NVP-AEE788)	EGFR,HER2,VEGFR
9	WAY-333945	c-Met	Gefitinib hydrochloride	EGFR
10	CHIR-124	Chk	NVP-ADW742	IGF-1R
11	TAK-901	Aurora Kinase	CUDC-101	EGFR,HDAC,HER2
12	PP121	DNA-PK,mTOR,PDGFR,Src,VEGFR,Bcr-Abl	Saracatinib (AZD0530)	Src
13	CH5132799	PI3K	Afatinib (BIBW2992)	EGFR,HER2
14	BTK inhibitor 1 (Compound 27)	BTK	AC480 (BMS-599626)	EGFR,HER2
15	Dasatinib hydrochloride	Abl/Src	BMS-754807	c-Met,IGF-1R,Trk receptor
16	HS-173	PI3K	WHI-P258	JAK
17	WAY-329356	Abl	Osimertinib mesylate	EGFR
18	Belizatinib (TSR-011)	ALK,Trk receptor	Temsirolimus (CCI-779, NSC 683864)	mTOR
19	ENMD-2076	Aurora Kinase,FLT3,VEGFR	Pictilisib (GDC-0941)	PI3K
20	Adavosertib (MK-1775)	Wee1	WHI-P180	VEGFR

2) Combination Index 算出による併用候補化合物の絞り込み

前項で抽出された 11 候補化合物の結果をもとに、臨床応用可能な新規 sotorasib 併用化合物候補を絞り込むため、二次スクリーニングを実施した (図 3A)。臨床的に利用可能、または臨床開発が進行中の WEE1 阻害剤 (adavosertib)、Aurora B 阻害剤 (barasertib)、Aurora A 阻害剤 (alisertib)、EGFR 阻害剤 (afatinib、osimertinib) の計 5 種と、*KRAS*^{G12C} 変異 NSCLC 細胞株

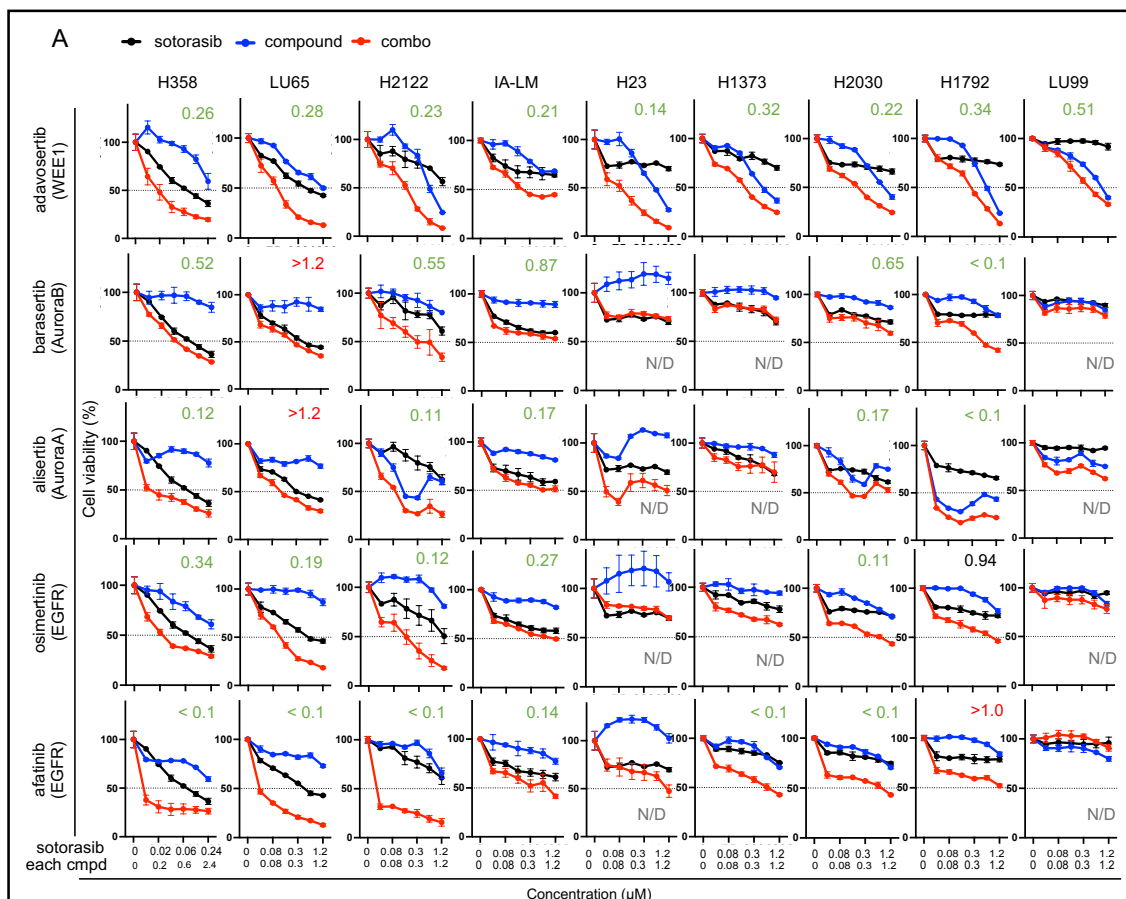


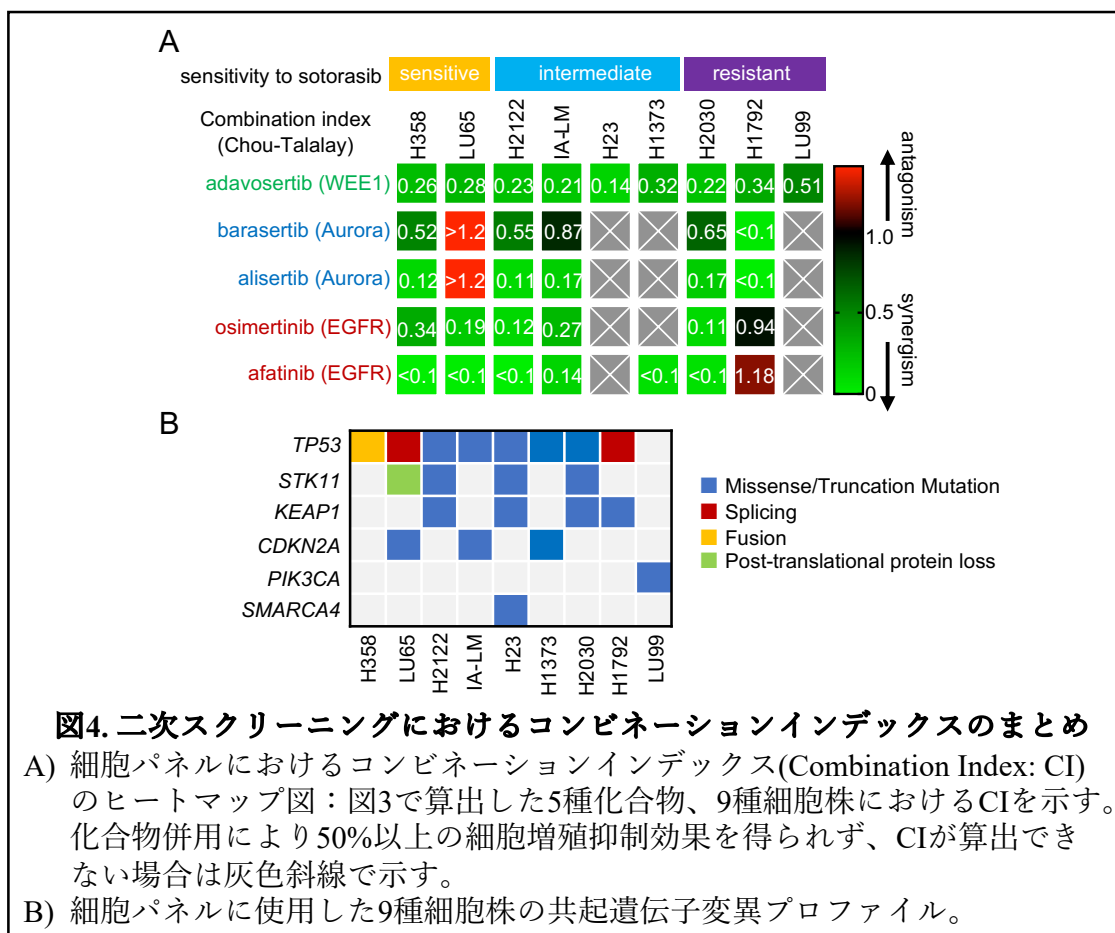
図3. ヒット化合物絞り込みのための2次スクリーニング

A) WEE1阻害剤 (adavosertib)、Aurora B阻害剤 (barasertib)、Aurora A阻害剤 (alisertib)、EGFR阻害剤 (afatinib、osimertinib) の計5種と、*KRAS*^{G12C}変異非小細胞肺癌細胞株9種 (H358、H23、H2122、H1373、H2030、H1792、IA-LM、LU65、LU99) を使用してsotorasibとの増殖抑制併用効果を評価した。各細胞株を96ウェルプレートの各ウェルに3,000個播種し、接着後にsotorasib、各薬剤単剤 (compound) あるいはその併用 (combo) を添加した。薬剤添加48時間後、生細胞数をATP法により評価した。sotorasibと各薬剤 (compound) の併用 (combo) については薬剤濃度比を1:1に混合し一定濃度比で段階希釈し使用した (H358のみsotorasib:compound比が1:10で使用した)。コンビネーションインデックス (Combination Index; CI) はCalcuSyn ソフトウェア (Biosoft, Cambridge, UK) を用いてChou-Talalay法により算出した。CIが0.8未満の場合に薬剤間の相乗効果があると判定した (Chou, 2010)。

9 種（H358、H23、H2122、H1373、H2030、H1792、IA-LM、LU65、LU99）を使用して sotorasib との増殖抑制併用効果を評価した。

化合物間の薬剤相互作用は CalcuSyn ソフトウェア（Biosoft, Cambridge, UK）を用いて Chou–Talalay 法によるコンビネーション・インデックス

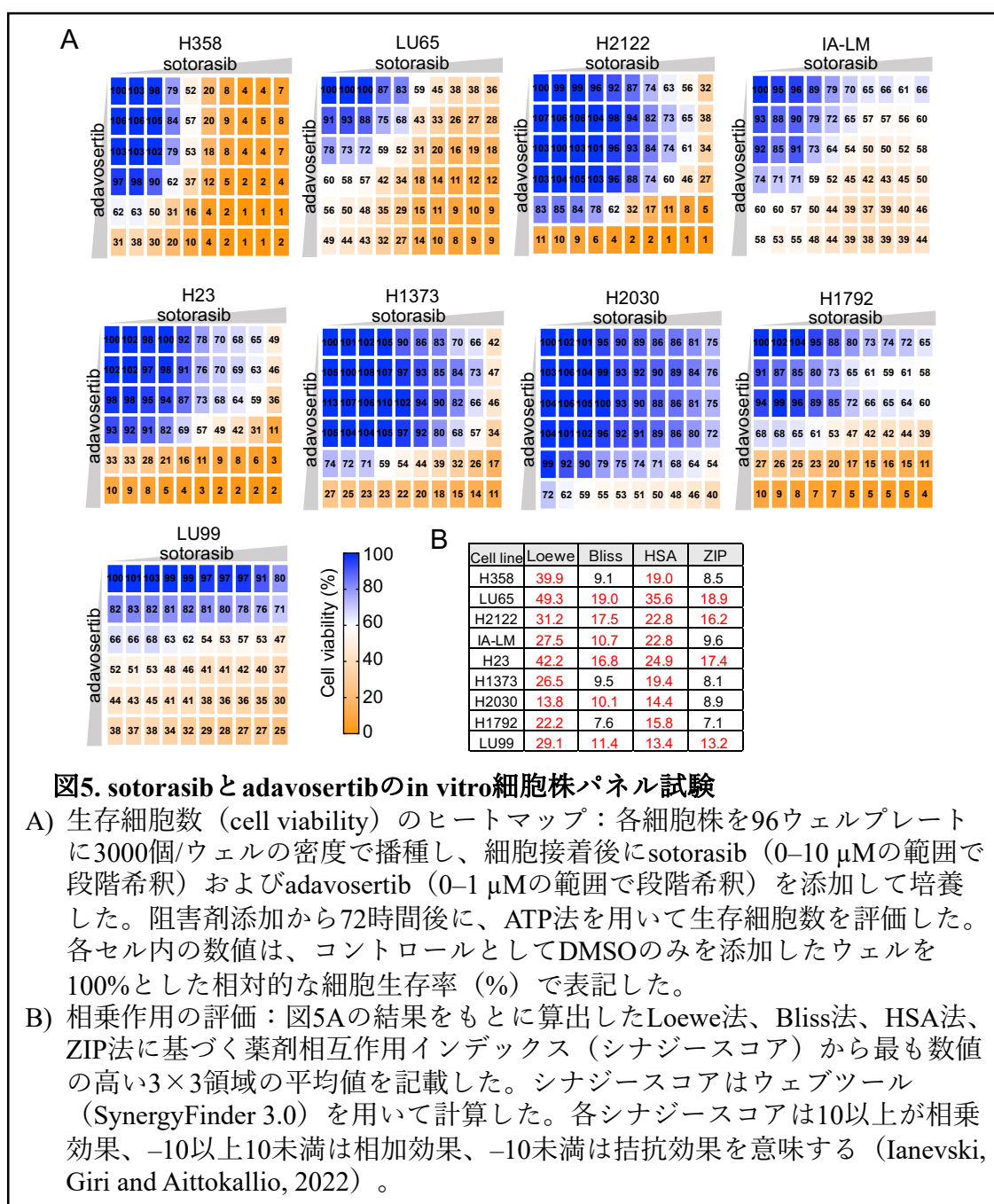
（Combination Index; CI）を算出して評価した（図 3A）（Chou, 2010）。図 4A に示す通り、5 種の化合物の中で、WEE1 阻害剤（adavosertib）が 9 細胞株全てにおいて sotorasib との相乗的な増殖抑制効果を示した。9 種の細胞株には、それぞれ sotorasib に対する感受性が高いものから低いものまで含まれており、TP53 や STK11 といった共起遺伝子異常のプロファイルも多様であった（図 4B）。先行研究と一致して、EGFR や Aurora 阻害剤も一部の細胞株で相乗効果を示したが、有効性スペクトラムは adavosertib が最も広範であった（Misale *et al.*, 2019; Xue *et al.*, 2020）。



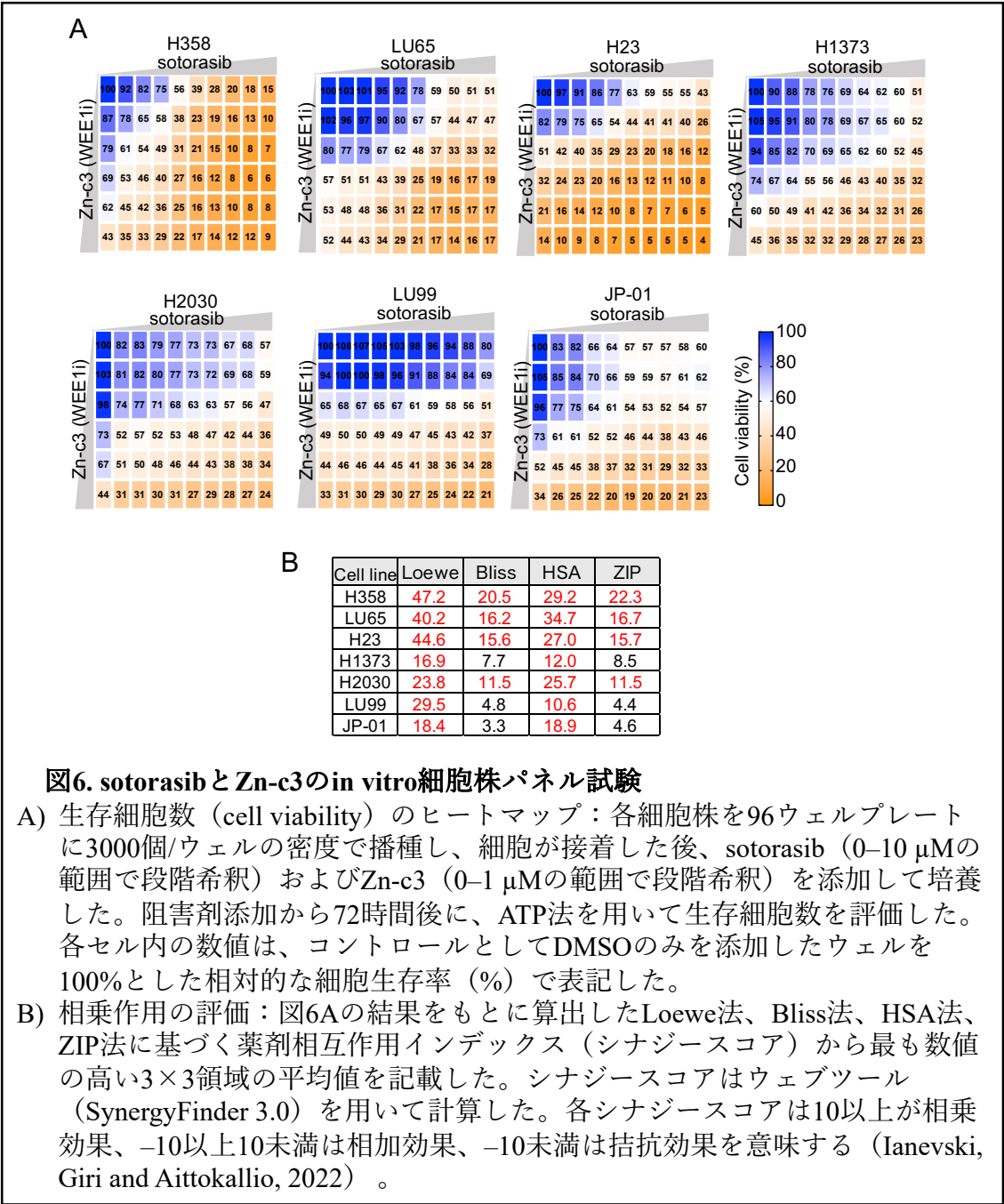
以上の結果から、adavosertib は sotorasib の新規併用パートナーとして有望であり、さらには WEE1 が KRAS 阻害剤に対する耐性メカニズムに何らかの関与をしているのではないかと仮説を立てた。

3) sotorasib と WEE1 阻害薬の増殖抑制相乗効果の細胞株パネル試験

sotorasib と adavosertib の相乗的増殖抑制効果の妥当性を確認するため、さらに詳細な細胞株パネル試験を実施した (図 5A)。sotorasib の濃度を 0~10 μ M、adavosertib の濃度を 0~1 μ M の範囲で調節し、細胞増殖抑制効果を検証した。得られた結果は、二次スクリーニングで使用した Chou-Talalay 法とは異なる薬剤相互作用インデックス (Loewe 法、Bliss 法、Highest Single Agent (HSA) 法、Zero Interaction Potency (ZIP) 法によるシナジースコア) を算出して評価した (図 5B) (Ianevski, Giri and Aittokallio, 2022)。sotorasib と adavosertib の併



用は、多くの細胞株で低～中程度の濃度域においても 50%以上の増殖抑制効果を示し、Loewe 法シナジースコアではすべての細胞株で相乗効果を認めた。また、いずれの細胞株においても 2 つ以上のシナジースコアで相乗的増殖抑制効果が確認された (図 5B)。さらには、別の WEE1 阻害剤である Zn-c3 も sotorasib との相乗効果を示し (図 6)、複数の WEE1 阻害薬が sotorasib の増殖抑制を相乗的に高めることが確認された。



4) sotorasib 及び WEE1 阻害薬処理細胞のトランスクリプトーム解析

sotorasib と adavosertib の併用が細胞内シグナルネットワークに及ぼす影響を包括的に検討するため、H23 細胞に対して DMSO、sotorasib、adavosertib、sotorasib + adavosertib 併用を 24 時間添加し、細胞を回収後に RNA を抽出してトランスクリプトーム解析を行った。コントロール（DMSO 処理）と比較して、sotorasib 単剤、adavosertib 単剤、および併用処理では、それぞれ 1926、1327、2766 遺伝子が発現上昇し、887、301、968 遺伝子が発現減少した発現変動遺伝子（Differentially Expressed Genes; DEGs）として検出された（図 7A）。

次に、各薬剤処理により抑制されるシグナル経路を特定するため、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) および Molecular Signatures Database (MSigDB) Hallmark Gene Sets (Hallmark) を用いて Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を実施した（図 7B）。sotorasib 単剤処理では、HALLMARK_MYC_TARGETS_V1 および V2 などの遺伝子セットがエンリッチされ、癌の増殖シグナル関連経路が抑制されていることが分かった。一方、adavosertib 単剤処理では、HALLMARK_G2M_CHECKPOINT、KEGG_NUCLEOTIDE_EXCISION_REPAIR、および KEGG_HOMOLOGOUS_RECOMBINATION といった細胞周期チェックポイントや DNA 損傷応答経路が抑制されていた。さらに、併用処理では、前述の遺伝子セットの双方がコントロール（DMSO）側にエンリッチされており、sotorasib による癌の増殖シグナル抑制と adavosertib による細胞周期チェックポイントおよび DNA 損傷応答経路の抑制が同時に生じていることが示された（図 7C、7D）。

次に、sotorasib 単剤処理に対する adavosertib の上乗せ効果が、どのシグナル経路に追加的な影響を及ぼしているかを検討するため、sotorasib 単剤処理と sotorasib + adavosertib 併用（combo）処理後の遺伝子発現を比較した。sotorasib 単剤処理と比較して、併用処理では 1056 の遺伝子が発現上昇し、375 の遺伝子が発現減少した DEGs として検出された（図 8A）。これら DEGs に対するエンリッチメント解析では、Cell Cycle、TP53 signaling、Apoptosis などの経路に加えて、Ribosome や Biosynthesis of Amino Acids といった KEGG タームがエンリッチされていた（図 8B、C）。また、コントロールと比較した併用処理の DEGs に対するエンリッチメント解析でも、Unfolded Protein Response や Cap-dependent translation initiation などの経路が検出された。以上から、タンパク質合成経路における障害が、sotorasib と adavosertib の併用効果に関与している可能性が示唆された（図 9）。

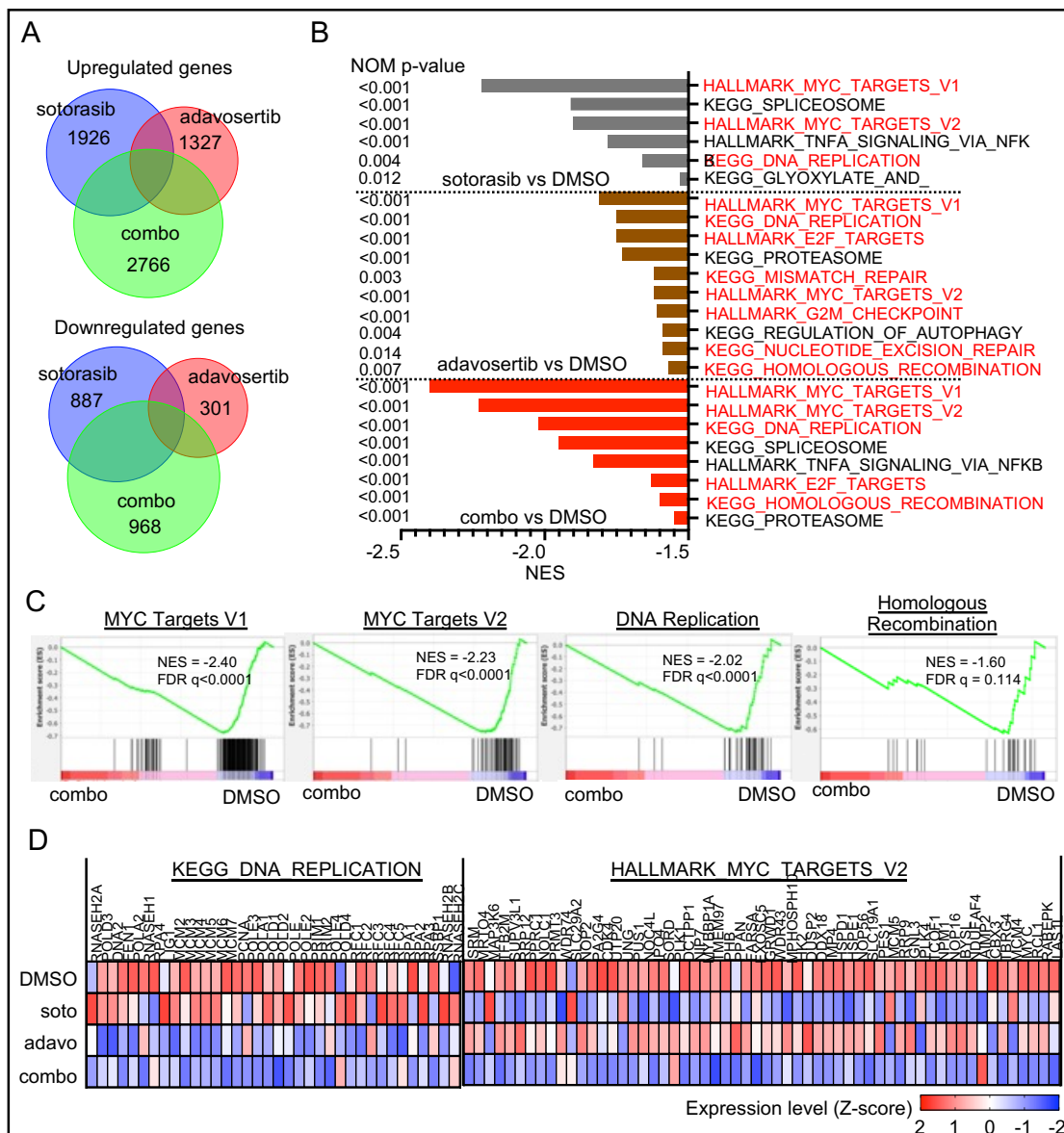
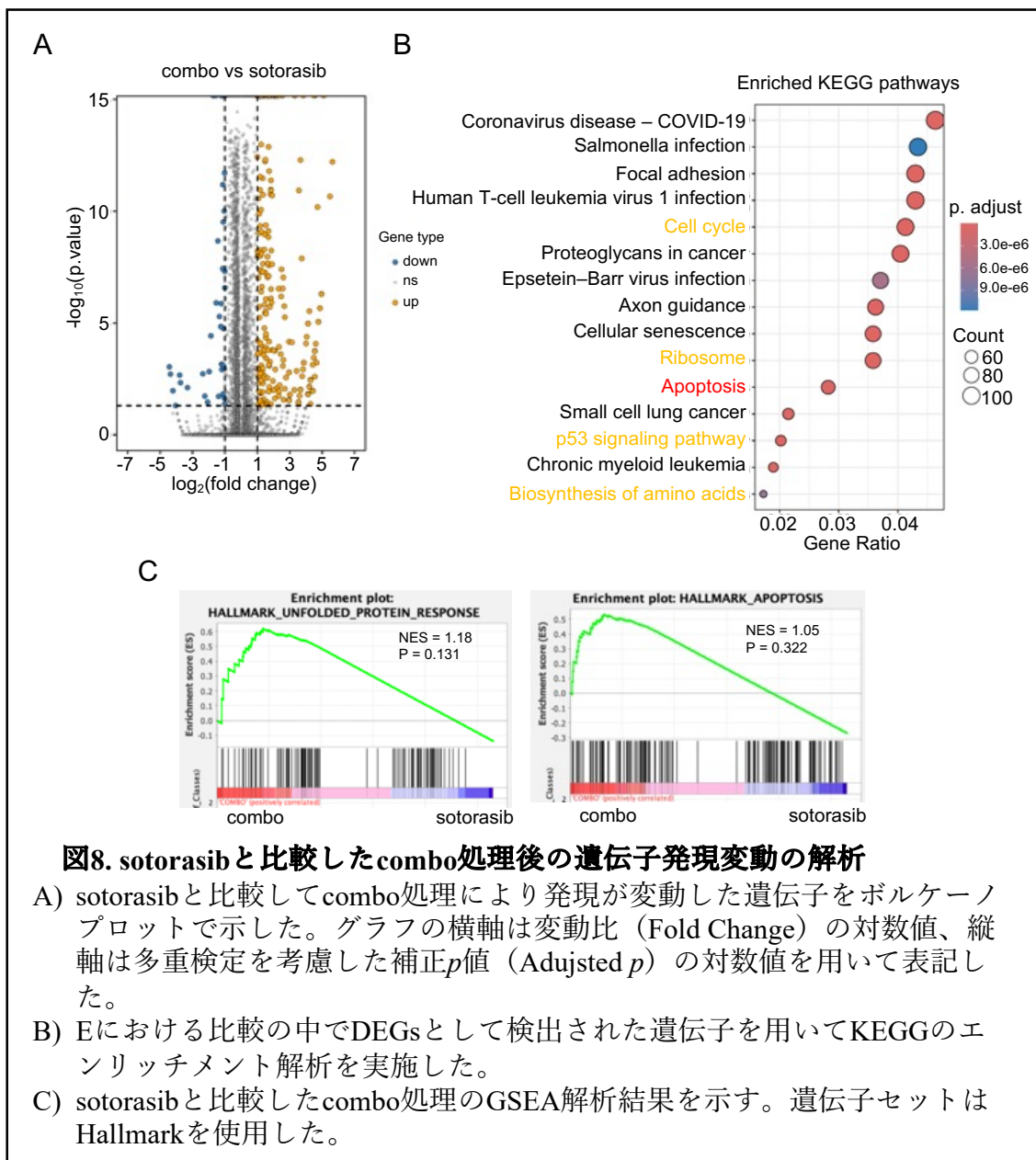
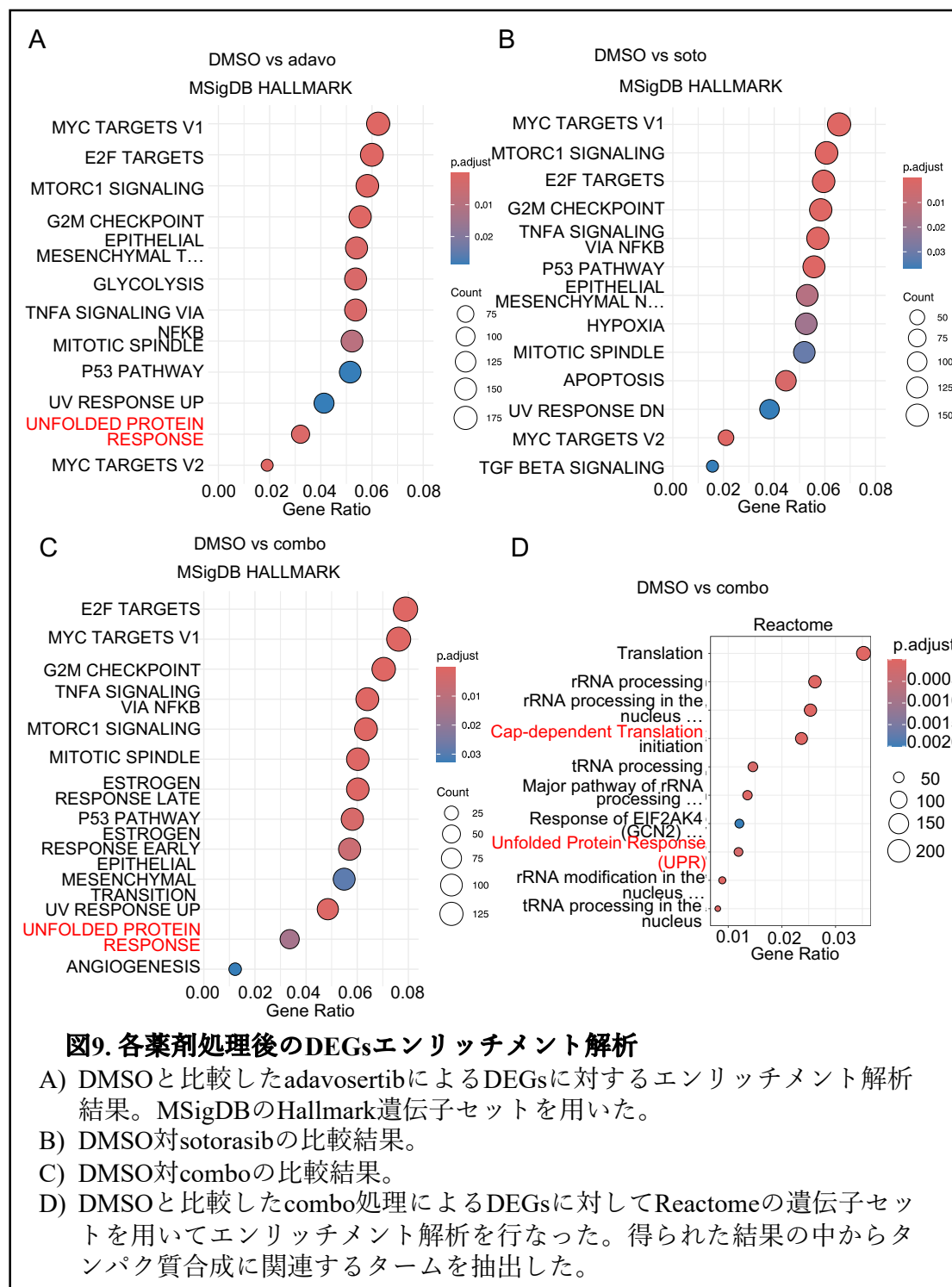


図7. 薬剤処理後の遺伝子変動の網羅的解析

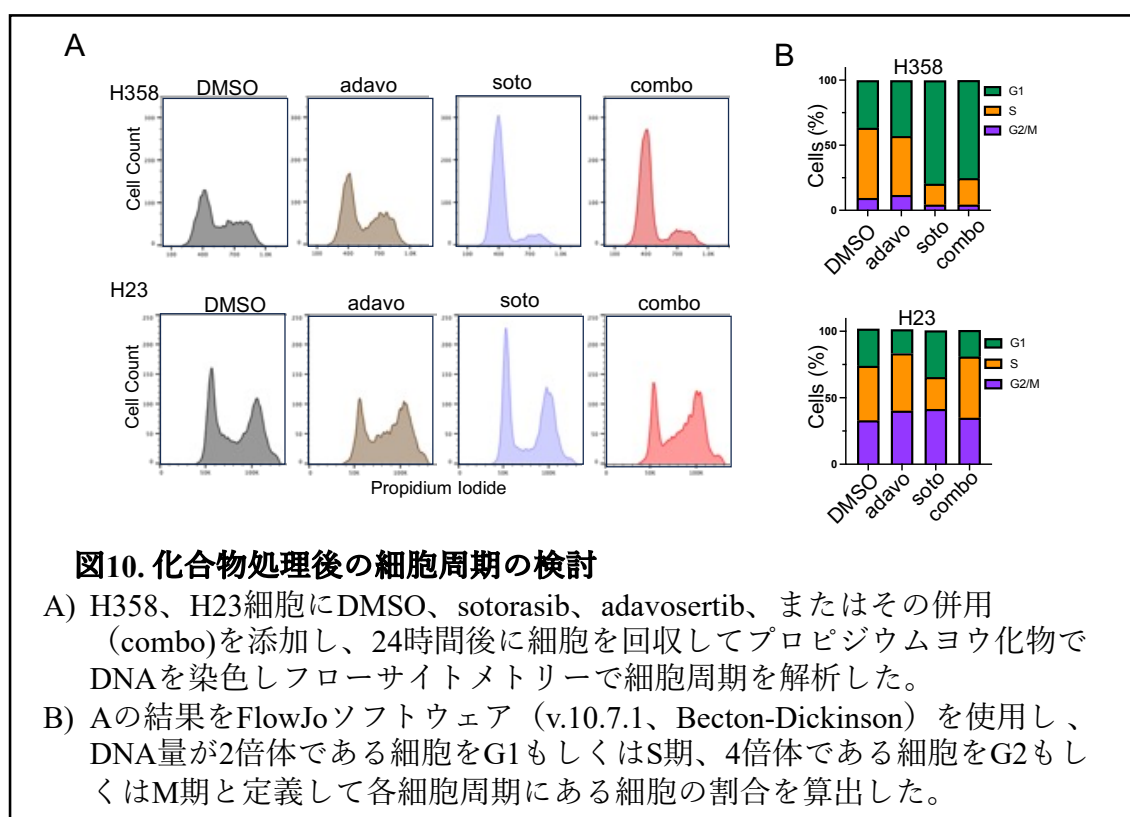
- A) コントロール (DMSO) と比較してsotorasib、adavosertib、またはその併用 (combo) 群の差次的発現遺伝子 (Differentially Expressed Genes, DEGs) を算出した。DEGsのうち発現が上昇した遺伝子 (Upregulated genes) もしくは減少した遺伝子 (Downregulated genes) の数をベン図により表記した。
- B) コントロール (DMSO) とsotorasib、adavosertib、comboを比較してGene Set Enrichment Analysis (GSEA) を実施した。算出されたEnrichment Score (ES) が-1.5以下の遺伝子セット (薬剤添加で遺伝子発現が抑制されている遺伝子セット) を表記した。
- C) Bの解析結果のうち増殖シグナル経路 (MYC)、DNA損傷応答経路に関する代表的な遺伝子セットのGSEA結果について詳細を示した。
- D) KEGG_DNA_REPLICATION及びHALLMARK_MYC_TARGETS_V2の遺伝子セットについて、各群の遺伝子発現を遺伝子毎に正規化しヒートマップを製作した。





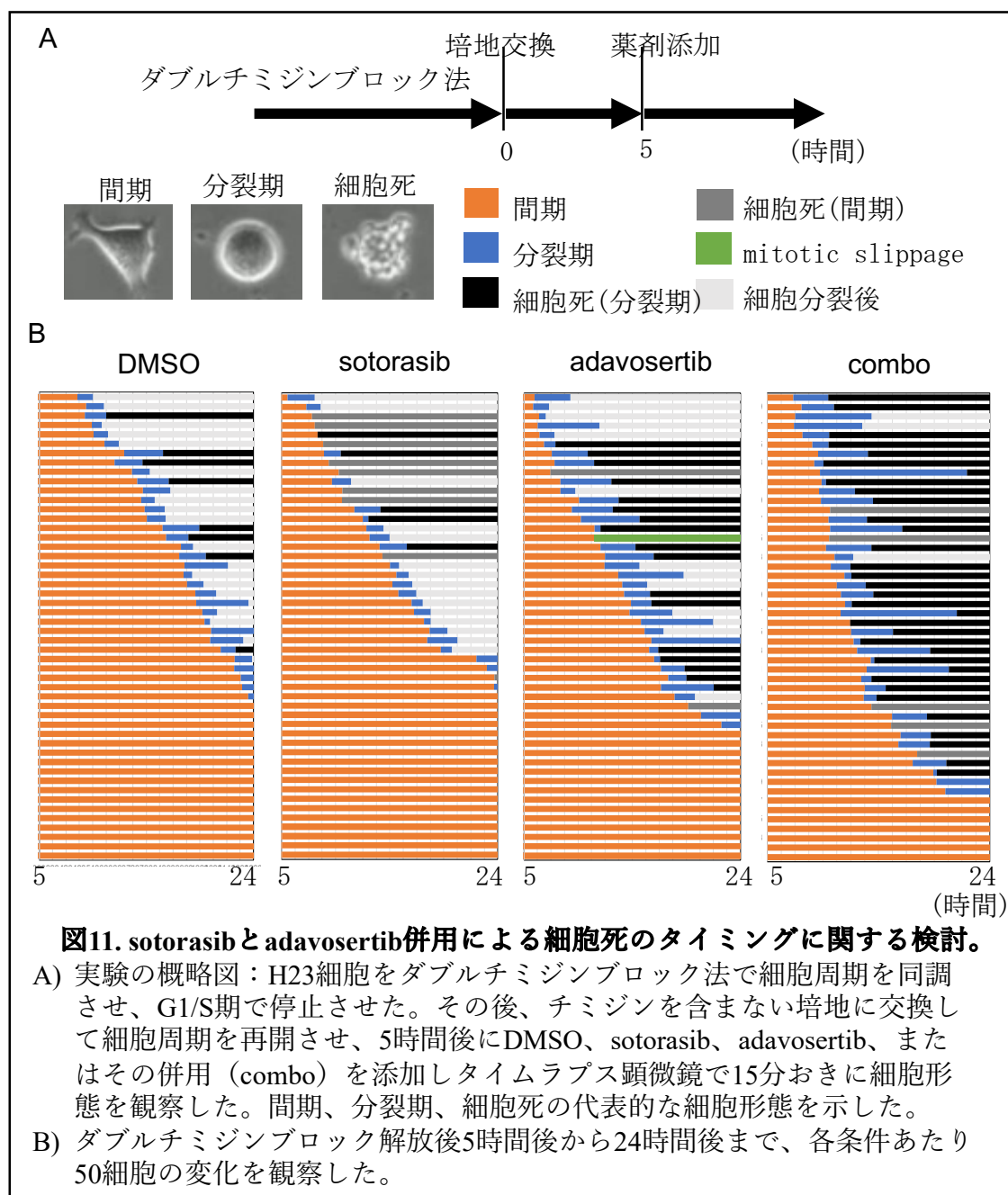
5) sotorasib と adavosertib 併用処理による細胞周期に対する影響の検討

WEE1 は下流の CDK1 を抑制的にリン酸化することで G2/M チェックポイントの維持に関与する。sotorasib、adavosertib、sotorasib + adavosertib 併用が細胞周期に与える影響を解析した。H23 および H358 細胞株に DMSO、adavosertib、sotorasib、またはその併用 (combo) 処理を 24 時間施し、細胞を回収してエタノール固定した後、PI で染色し、フローサイトメトリーにより細胞周期解析を実施した。その結果、sotorasib 処理では G1 期細胞の割合が増加し、adavosertib 処理では S 期または G2/M 期細胞の割合が増加する傾向が確認された。一方、sotorasib 単剤、adavosertib 単剤と比較して combo 処理による特異的な細胞周期変化は観察されなかった (図 10)。

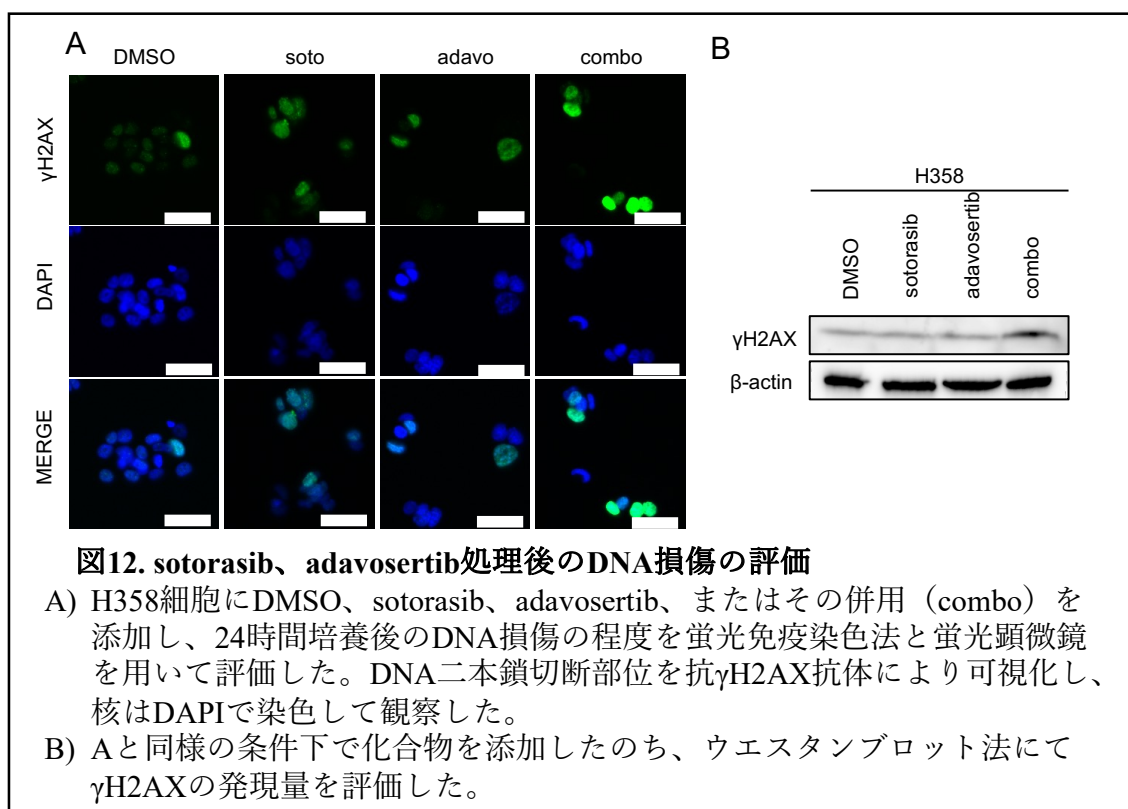


既報では、WEE1 阻害薬が分裂期における細胞死を誘導することが示されている (Caiola *et al.*, 2018; Takashima *et al.*, 2020)。そこで、sotorasib と adavosertib の併用処理が分裂期での細胞死を引き起こすかを評価するため、タイムラプス顕微鏡を用いた形態観察を行った。ダブルチミジンブロック法を用いて細胞周期を G1/S 移行点で同調・停止させた後、培地交換により細胞周期を再開し、5 時間後に DMSO、sotorasib、adavosertib、sotorasib + adavosertib 併用 (combo) を添加し、タイムラプスイメージングを実施した (図 11A)。細胞形態に基づいて間期、分裂期、細胞死を判別したところ、combo 処理により分

裂期での細胞死が著しく増加することが観察された（図 11B）。さらに、細胞死時の形態的变化として細胞の収縮や膜ブレブの形成に続いて細胞の小断片化が観察され、分裂期においてアポトーシスが誘導されている分裂期細胞死（Mitotic cell death）と考えられた（図 11B）。



次に、薬剤処理による DNA 損傷の評価を行うため、化合物添加後の γ H2AX の発現を免疫蛍光染色およびウエスタンブロット法により評価した (図 12)。免疫蛍光染色では sotorasib、adavosertib 単剤処理後、核内に γ H2AX の点状のシグナルが観察され DNA 損傷が生じていることが示唆された (図 12A)。さらには combo 処理により γ H2AX の核内蛍光シグナルが増強し、核全体が染色性を示す汎染色パターンを示していたことから、強力な複製ストレスが細胞に生じている可能性が示唆された (Moeglin *et al.*, 2019) (図 12)。



6) sotorasib と WEE1 阻害薬の併用による細胞死の評価

図 11A に示したように、sotorasib + adavosertib 併用後、24 時間以内の短時間でアポトーシス様の細胞死形態を示す細胞が増加していた。このことから相乗的増殖抑制効果のメカニズムとして、癌細胞に強力なアポトーシスが誘導されているのではないかと仮説を立て薬剤処理後のアポトーシス誘導について解析を行った。*KRAS*^{G12C} 変異を有する非小細胞肺癌細胞株 (H358、LU65、H2122、H23、IA-LM、H1373、H2030、H1792、LU99) を用い、sotorasib (0–1 μ M) および adavosertib (0 または 300 nM) を同時添加し、Caspase 3/7 Glo アッセイ (Promega) によりカスパーゼ-3 および-7 の活性を測定した。その結果、いずれの細胞株においても sotorasib の用量依存的なカスパーゼ活性の増強が観察され、さらに adavosertib の併用により有意な活性増強が認められた (図 13)。

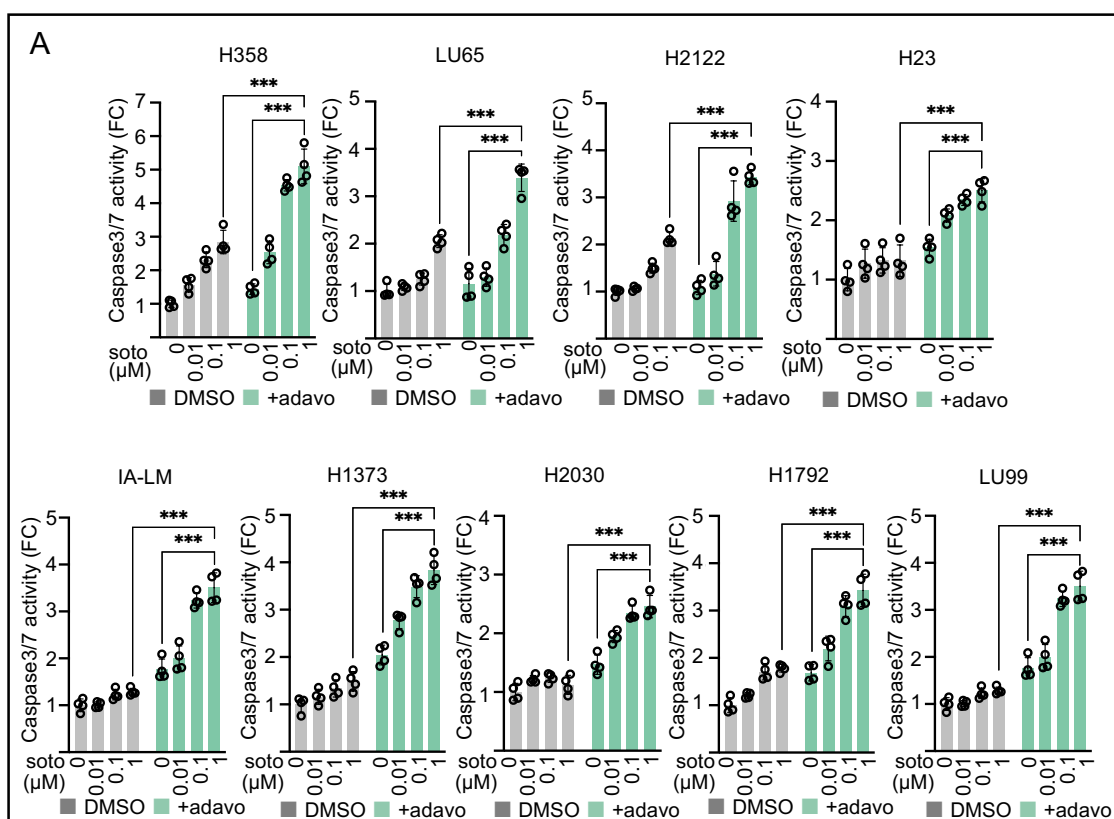
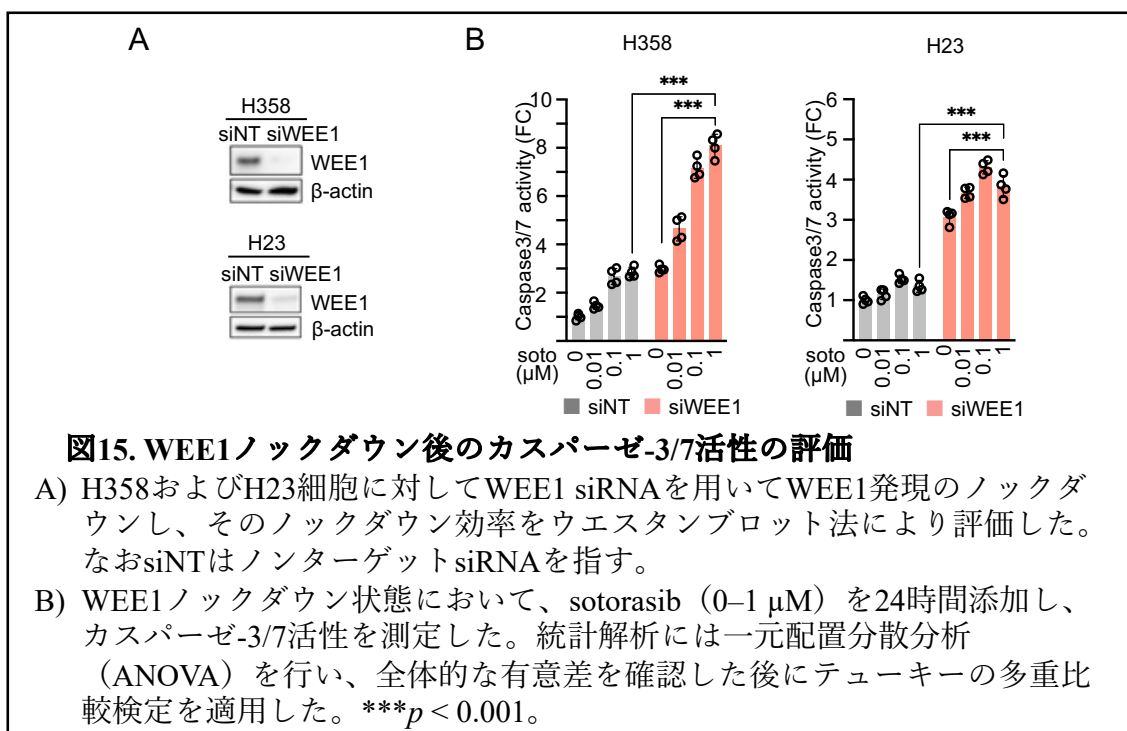
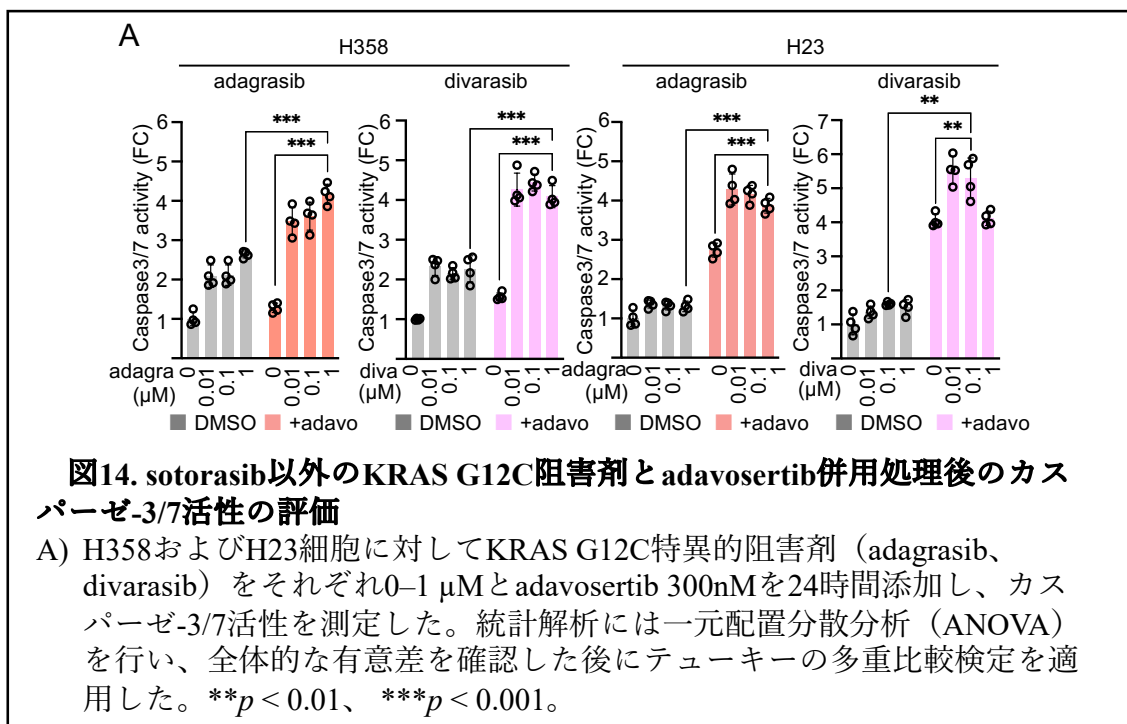


図13. sotorasib+adavosertib処理後のカスパーゼ-3/7活性の評価

A) 化合物処理後のアポトーシス誘導を評価するため、9種の*KRAS* G12C変異非小細胞肺癌細胞株にDMSO、sotorasib (0–1 μ M)、adavosertib (300 nM) またはその両方を添加し、24時間後にカスパーゼ-3/7活性を測定した。統計解析には一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、全体的な有意差を確認した後にチューキーの多重比較検定を適用した。*** $p < 0.001$ 。

また、sotorasib 以外の *KRAS*^{G12C} 阻害薬 (adagrasib、divarasib) についても、

adavosertib との併用により同様のカスパーゼ活性誘導の増強が確認された (図 14)。siRNA を用いた WEE1 ノックダウン実験でも、薬剤と同様に sotorasib によるカスパーゼ活性の誘導を有意に増強した (図 15)。



カスパーゼ活性の増強が最終的に細胞死に至ることを確認する目的で、薬剤添加 48 時間後にアネキシン V および PI の二重染色を行い、フローサイトメトリー解析を実施した（図 16）。いずれの細胞株においても sotorasib と adavosertib の併用によりアネキシン V 陽性細胞の割合が各単剤およびコントロールと比較して有意に増加し、アポトーシスの発生が確認された。さらに、長期間（12 日間）にわたる薬剤添加後の細胞生存率を評価するため、クリスタルバイオレット染色による細胞生存アッセイを行った（図 17）。その結果、sotorasib 単剤による治療抵抗性残存細胞は、adavosertib の併用により消失することが明らかとなった。

以上の結果から、*KRAS* 変異と WEE1 の同時阻害は癌細胞において強力なカスパーゼ活性を誘導し、アポトーシスを引き起こすことが明らかとなった。

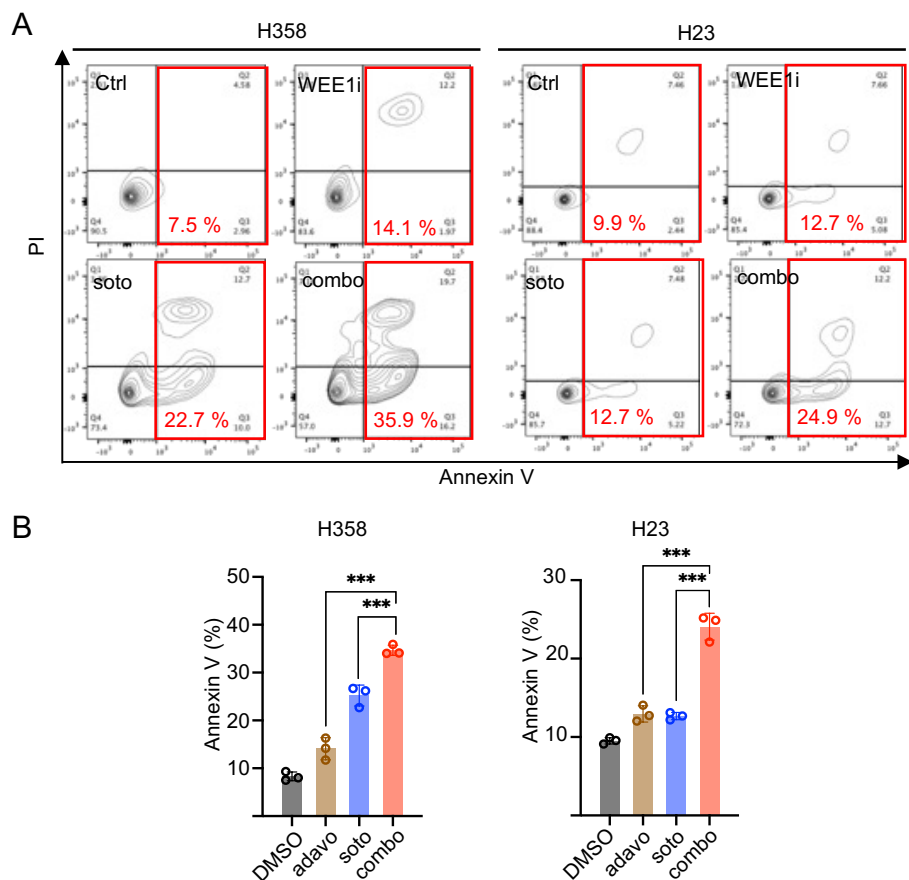


図16. sotorasib + adavosertib処理後のアネキシン Vアッセイ

- A) H358およびH23細胞に対してDMSO、sotorasib (100 nM)、adavosertib (300 nM) またはその両方 (combo) を添加した。48時間後にアネキシン VとPIで二重染色し、フローサイトメトリーにより解析を行なった。二次元プロットにはアネキシン V陽性細胞を赤枠で示し、全細胞数における陽性細胞数の割合 (%) を示した。
- B) Aにおけるアネキシン V陽性細胞数の割合を各条件で比較した。統計解析には一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、全体的な有意差を確認した後、チューキーの多重比較検定を適用した。*** $p < 0.001$ 。

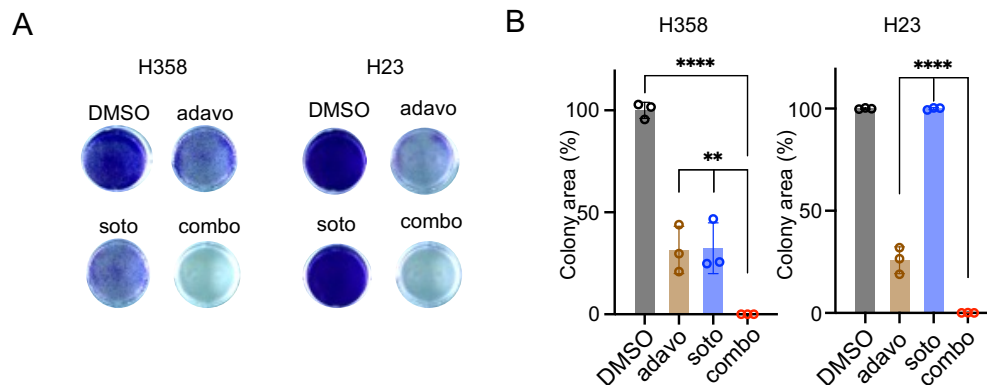


図17. sotorasib + adavosertib 長期間処理後のコロニー形成アッセイ

- A) H358およびH23細胞に対してDMSO、sotorasib (100 nM)、adavosertib (300 nM) またはその両方 (combo) を添加し、12日間培養を行った。その後、クリスタルバイオレットにより染色しコロニー形成を評価した。
- B) ImageJ ソフトウェアを用いて染色面積を定量し、各条件間で比較した。統計解析には一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、全体的な有意差を確認した後にチューキーの多重比較検定を適用した。** $p < 0.01$ 、**** $p < 0.0001$ 。

7) sotorasib と WEE1 阻害薬併用による細胞死誘導のメカニズム解析

次に、sotorasib と adavosertib の併用がアポトーシスを誘導するメカニズムを解明するため、アポトーシス調節に関わる BCL2 ファミリータンパク質の発現に着目して解析を行った。先行研究によれば、KRAS の下流分子である ERK を抑制すると、アポトーシス促進分子である BIM の脱リン酸化を引き起こされ、安定化することでアポトーシスシグナルを誘導することが報告されている (Costa *et al.*, 2007; K. Tanaka *et al.*, 2021)。本研究でも、sotorasib 処理により BIM の増加が観察され、抗アポトーシスタンパク質 MCL-1 の発現が低下することが確認された。さらに、sotorasib と adavosertib の併用処理により、MCL-1 の発現は顕著に減少した。一方、BCL-xL や BCL2 など他の抗アポトーシスタンパク質の発現には有意な変化は見られなかった (図 18A)。

次に、MCL-1 の減少が sotorasib と adavosertib の併用によるカスパーゼ活性誘導に必須であるかを検証するため、H23 および H358 細胞に MCL-1 を過剰発現させたのち、化合物添加によるカスパーゼ活性の誘導を評価した。コントロール (Empty Vector) 群では、sotorasib + adavosertib (combo) により有意に増強したカスパーゼ活性は、MCL-1 の過剰発現によりほぼ完全に打ち消された。このことから、combo によるアポトーシス誘導には MCL-1 タンパク質の発現抑制が必須であると考えられた (図 18B)。次に、MCL-1 阻害薬 S63845 および BCL2/BCL-xL 阻害薬 ABT-737 と sotorasib との併用効果を検討したところ、H23 細胞では MCL-1 阻害薬 S63845 と sotorasib の併用により相乗的な増殖抑制効果が観察された。一方で、BCL2/BCL-xL 阻害薬 ABT-737 との併用では、同様の相乗効果は認められなかった (図 19)。以上から、sotorasib + adavosertib 併用後の MCL-1 抑制がアポトーシス誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

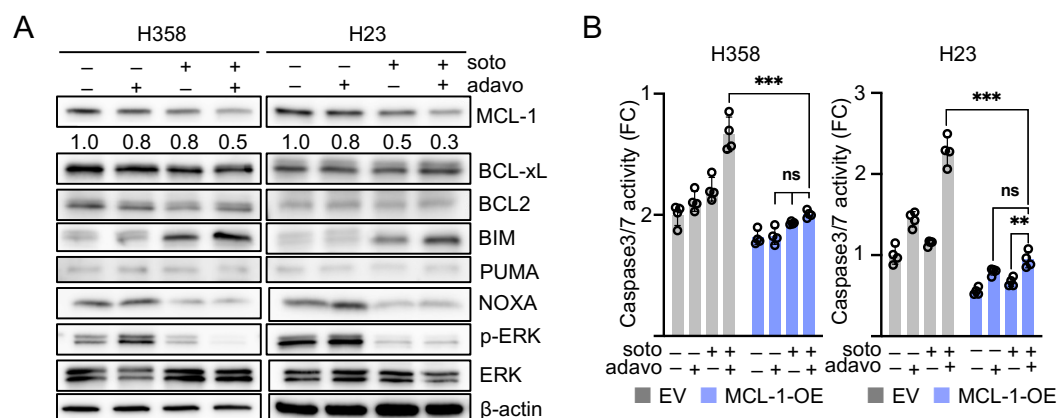


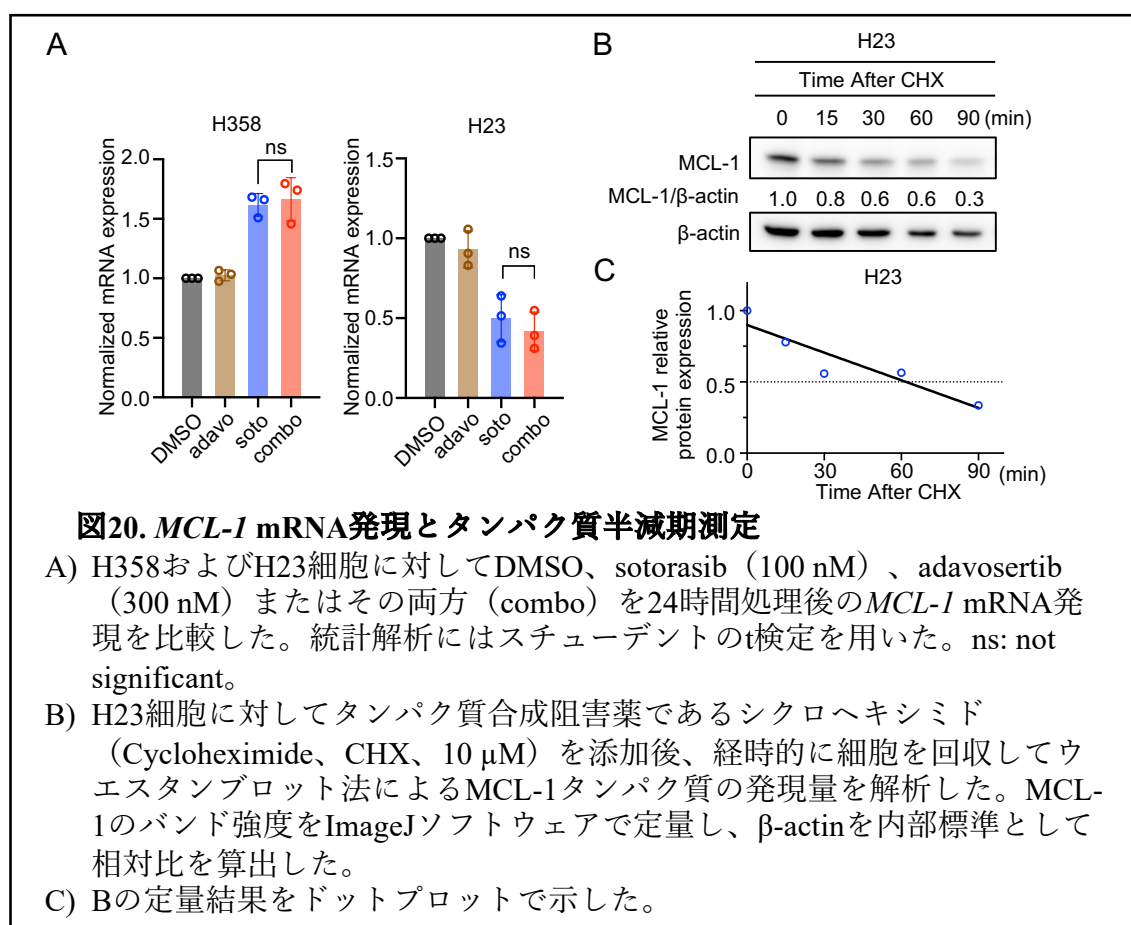
図18. sotorasib + adavosertib処理後のBCL2ファミリー分子の発現評価

- A) H358およびH23細胞に対してDMSO、sotorasib (100 nM)、adavosertib (300 nM) またはその両方 (combo) を添加し、24時間培養を行いサンプルを回収した。ウエスタンブロット法でBCL2ファミリー及びERKのタンパク質発現をウエスタンブロット法で評価した。
- B) H358およびH23細胞に対してMCL-1発現プラスミドをトランスフェクションし、その後にDMSO、sotorasib (100 nM)、adavosertib (300 nM) またはその両方 (combo) を24時間添加し、カスパーゼ-3/7活性を測定した。統計解析には一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、全体的な有意差を確認した後にチューキーの多重比較検定を適用した。*** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、ns: not significant。

8) sotorasib と WEE1 阻害薬併用による MCL-1 発現抑制のメカニズム解析

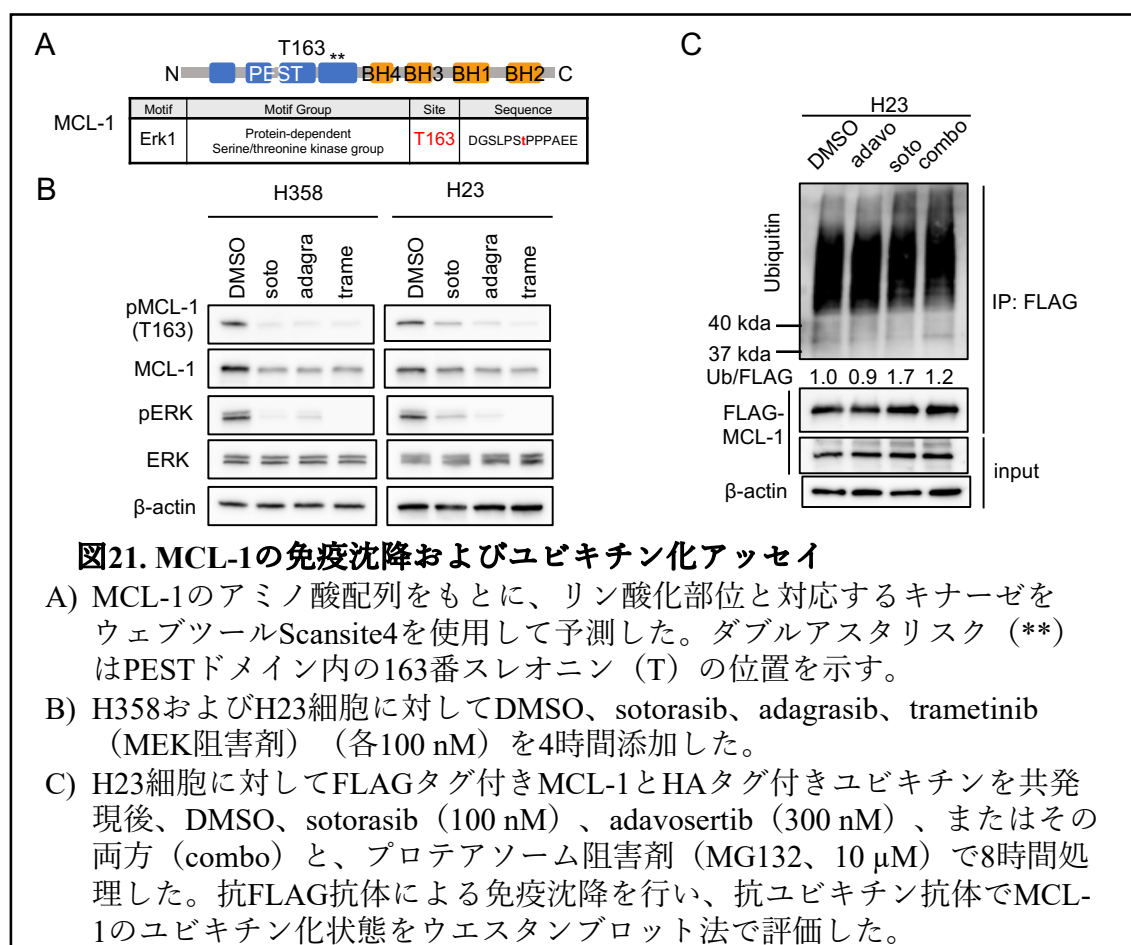
次に、sotorasib と adavosertib の併用がどのように MCL-1 を抑制するかを検討した。H23 および H358 細胞株に sotorasib、adavosertib、あるいはその併用を添加し、24 時間後に細胞を回収して RNA を抽出し、MCL-1 TaqMan プローブを用いて定量的 PCR を実施した。同条件下の薬剤処理によりウェスタンブロット法では MCL-1 タンパク質の発現低下が確認されたのに対して (図 18A)、mRNA 発現には顕著な変化は観察されなかった (図 20A)。このことより、MCL-1 の発現調節は転写レベルではなく、タンパク質の合成・分解の段階で行われているのではないかと考えた。

MCL-1 タンパク質はプロリン (P)、グルタミン酸 (E)、セリン (S)、スレオニン (T) といったアミノ酸配列の繰り返しからなる PEST ドメインを持ち、他の BCL2 ファミリータンパク質に比べて速やかに分解されることが知られている (Chu *et al.*, 2016; Senichkin *et al.*, 2020)。実際に、シクロヘキシミドを用いて MCL-1 タンパク質の半減期を測定したところ、約 60 分と非常に短いことが確認された (図 20B、C)。さらに、MCL-1 のリン酸化部位と対応するキナーゼを予測するため、ウェブツール Scansite 4 を使用した解析を行ったところ、KRAS の下流分子である ERK が MCL-1 のスレオニン 163 (T163) をリン

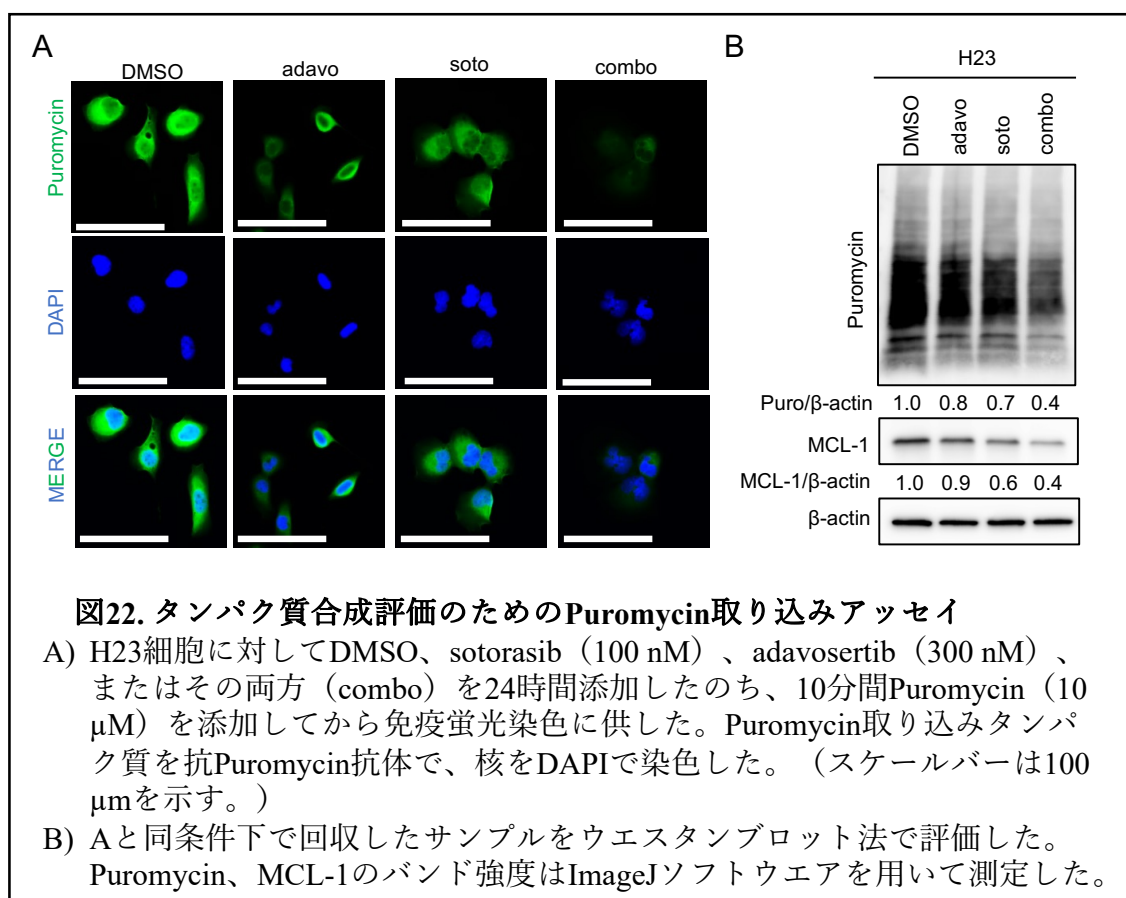


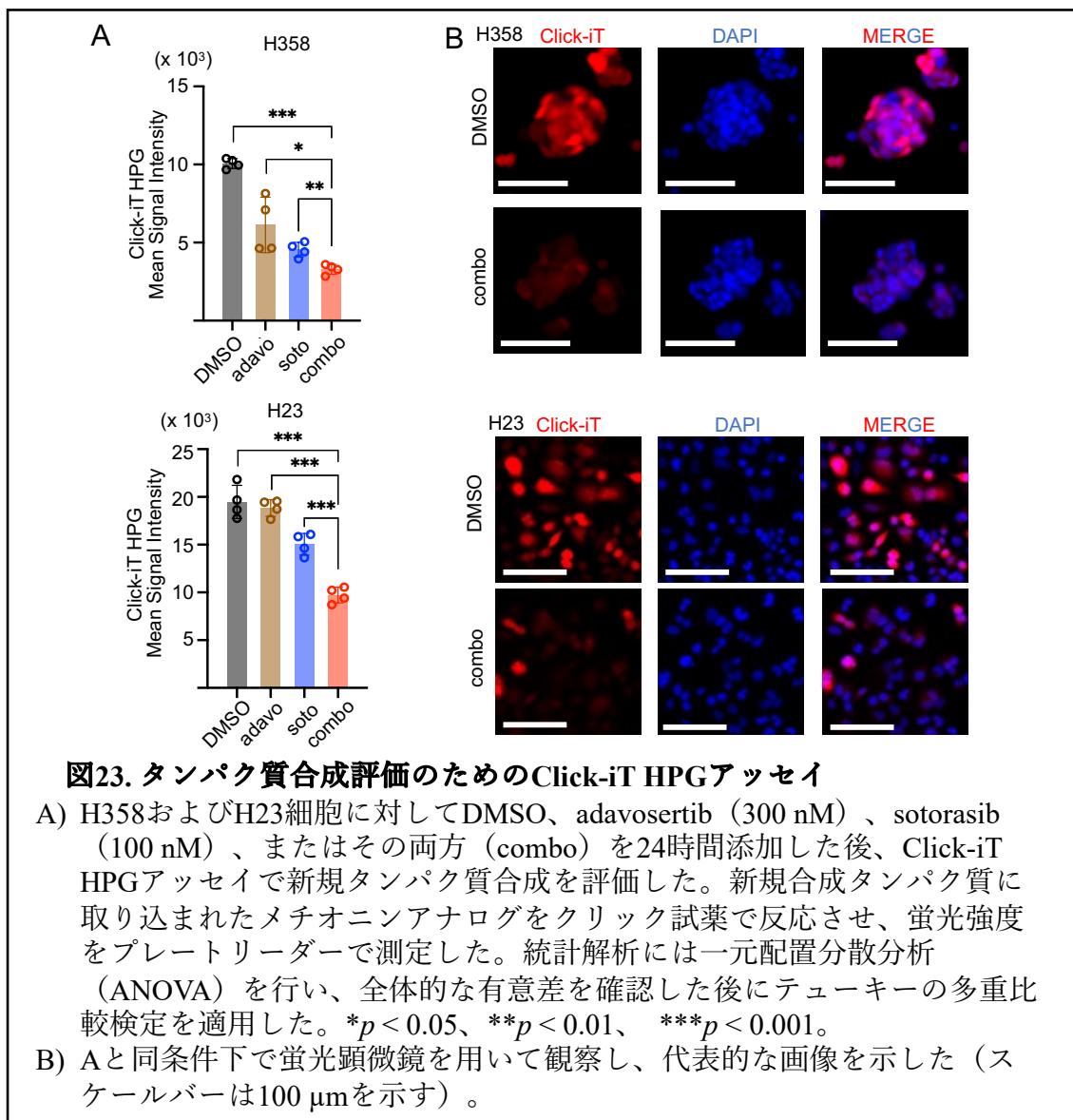
酸化する可能性が示された (図 21A)。既報でも、ERK が MCL-1 T163 のリン酸化を介してタンパク質の安定化に寄与することが知られており (Domina *et al.*, 2004)、実際に KRAS^{G12C} 阻害薬 (sotorasib、adagrasib) や MEK 阻害薬 (trametinib) 処理により、MCL-1 T163 のリン酸化が抑制され、MCL-1 タンパク質の発現が低下することが実証された (図 21B)。

次に、MCL-1 の発現低下がユビキチンプロテアソーム系によるタンパク質分解促進によるものかを検討するために、免疫沈降アッセイを行い MCL-1 のユビキチン化状態を評価した。H23 細胞に対して DMSO、sotorasib、adavosertib、またはその両方 (combo) を添加後、図 21A の結果と一致して sotorasib 添加により MCL-1 のユビキチン化修飾は増加していた。一方で、adavosertib 単剤や combo ではそれぞれコントロールや sotorasib 単剤と比較してユビキチン化修飾の増加を認めなかった。これらの結果から、sotorasib による ERK 阻害が MCL-1 のユビキチンプロテアソーム系を介した分解亢進を引き起こしている一方で、adavosertib はこの分解亢進に直接寄与しないと考えられた。



次に、adavosertib 併用による MCL-1 抑制がタンパク質翻訳の障害に起因しているのではないかと考えた。具体的には、化合物添加後の新規合成タンパク質を検出するために、Puromycin 取り込みアッセイおよび Click-iT HPG アッセイを行った。まず、Puromycin 取り込みアッセイでは H23 細胞株に DMSO、sotorasib、adavosertib、またはその併用を添加し、24 時間後に Puromycin を 10 分間処理したのちにウェスタンブロット法と蛍光免疫染色法を用いて Puromycin 取り込み量を測定した。コントロールと比較して adavosertib および sotorasib 単剤処理ではピューロマイシンの取り込み量がやや低下、combo 処理ではさらに顕著に低下していた (図 22)。次に、新規合成タンパク質に取り込ませたメチオニンアナログ (HPG) をクリック試薬により反応させ、タンパク質合成能を評価する Click-iT アッセイを実施した。Puromycin 取り込みアッセイと同様に、combo 処理により HPG の細胞内取り込みが有意に抑制されており、新規タンパク質合成が強く抑制されることが示された (図 23)。検討 (4) におけるトランスクリプトーム解析でも、combo 処理群においてタンパク質合成経路の障害が示唆されており、sotorasib と adavosertib の併用が何らかの小胞体ストレスを介してリボソームにおける新規タンパク質合成を障害している可能性が示唆された (図 9)。

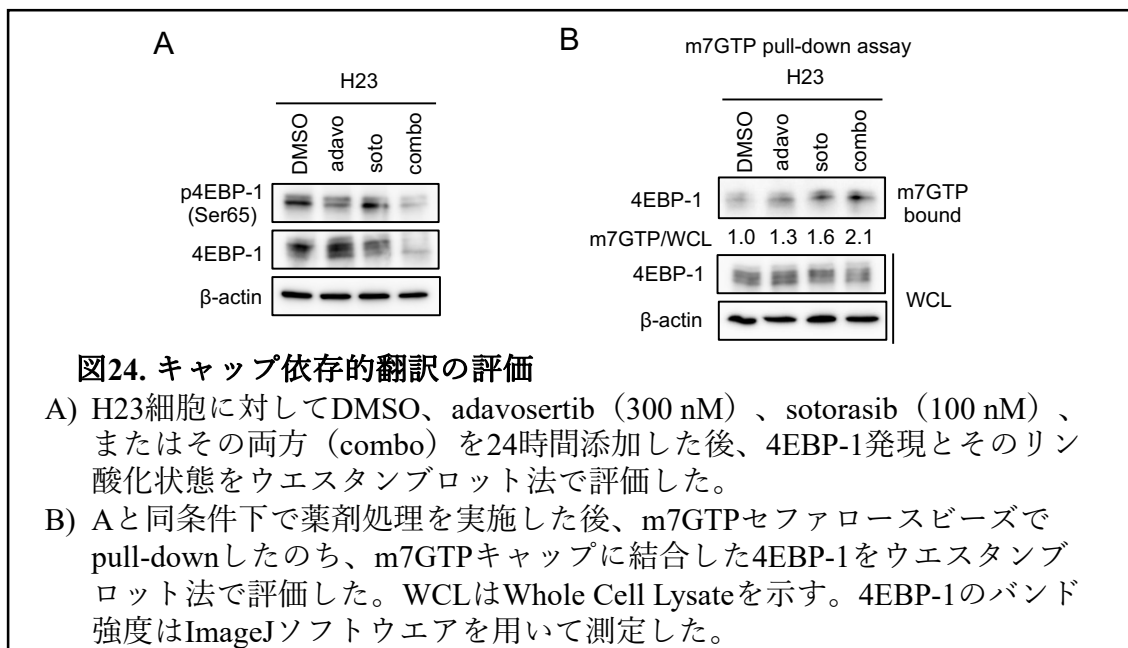




MCL-1 はキャップ依存的翻訳によりその発現が一部制御されていると報告されている (Song *et al.*, 2018)。キャップ依存的翻訳では、真核生物翻訳開始因子 4E (eIF4E) の阻害タンパク質である Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP-1) がリン酸化されると、eIF4E がキャップ複合体から解放されタンパク質翻訳が開始される。図に示すように combo 処理後の細胞では、DMSO、sotorasib 単剤、adavosertib 単剤に比べて、4EBP-1 のリン酸化レベルが大幅に減少しており (図 24A)、さらに、キャップ構造に類似した γ -アミノフェニル-7-メチルグアノシン (m7GTP) C10 スペーサーアガロースビーズを用いたプルダウンアッセイにより、併用治療が H23 細胞において m7GTP-eIF4E キャップ複合体への 4EBP-1 のリクルートメントを増強することが示され

た（図 24B）（Fujimoto *et al.*, 2020）。これらの結果は、sotorasib と adavosertib の併用処理がキャップ依存的翻訳を抑制することを示している。

以上の結果から、sotorasib と adavosertib の併用は、1. ERK 阻害を介した MCL-1 タンパク質の分解亢進と、2. タンパク質翻訳（合成）経路の障害による MCL-1 の新規合成低下によって、MCL-1 タンパク質の発現を抑制していると考えられた。



9) WEE1 過剰発現細胞株の作製と sotorasib 耐性との関連に関する検討

WEE1 が sotorasib 耐性に果たす役割を検討するため、H23 細胞株に WEE1 を過剰発現させた細胞株を作成した。コントロール (Empty Vector 導入 H23 細胞; H23-Empty Vector (EV)) と比較して、WEE1 安定発現細胞株 (H23 WEE1-Over Expression (OE)) では sotorasib による増殖抑制効果の減弱が認められた (図 25A)。さらに H23 WEE1-OE 細胞では H23 EV と比較して MCL-1 の発現が上昇していた (図 25B)。また、コロニー形成アッセイでは sotorasib が H23 WEE1-OE 細胞の増殖を抑制せず、むしろ増殖が加速していることが確認された (図 25C、D)。さらに、H23 WEE1-OE 細胞に adavosertib と sotorasib の併用を行ったところ、H23 WEE1-OE 細胞の sotorasib への感受性が、コントロール (H23 EV) と同程度まで回復した (図 25E)。MCL-1 阻害薬 S63825 併用下では同様に sotorasib の感受性が増強するのに対して、BCL2/-xL 阻害薬 ABT-737 併用下では sotorasib の感受性は変化しなかった (図 26)。また、WEE1 の過剰発現の細胞周期への影響や、多倍体形成などによる二次的な sotorasib 感受性低下を引き起こしている可能性を検討するために H23 WEE1-OE 細胞の細胞周期解析を実施した。PI 染色後のフローサイトメトリー解析では EV 細胞と比較して WEE1-OE 細胞の細胞周期分布は変わらず、4n 以上の多倍体形成増加も認めなかった (図 27)。

次に、sotorasib を段階的用量増加しながら長期曝露することで H358 および H23 の sotorasib 耐性細胞株を樹立した (H358SR、H23SR) (図 28A)。ATP 法による細胞生存アッセイでは、親株と比較して H358SR、H23SR の sotorasib による増殖抑制効果が低下しており、耐性化が確認された (図 28B)。また、sotorasib 耐性細胞株では親株と比較して WEE1 および MCL-1 の発現量が増加しており (図 28C)、H23 WEE1-OE 細胞での MCL-1 発現上昇と一致する結果であった。さらに、adavosertib または MCL-1 阻害薬 S63845 の併用で sotorasib の感受性が親株と同程度まで回復しており (図 28D、図 28E)、WEE1 および MCL-1 が sotorasib 耐性への責任遺伝子として寄与していると考えられた。以上の結果から、WEE1 は MCL-1 の発現増強を介して sotorasib への耐性獲得に寄与し、さらには sotorasib と adavosertib の併用は sotorasib への耐性を克服する可能性が示された。

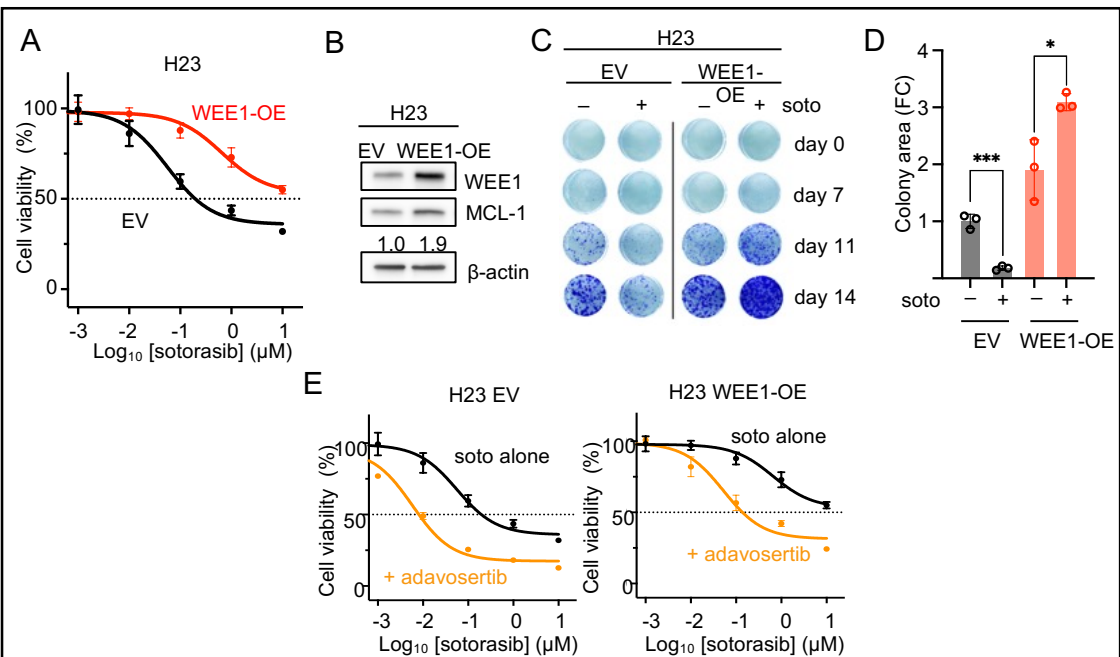


図25. WEE1安定発現細胞の作製とsotorasib耐性との関連に関する検討

- A) H23細胞を用いてWEE1安定発現細胞（WEE1-OE）を作製しsotorasibの増殖抑制効果をATP法で評価した。（EV: Empty Vector）
- B) H23 WEE1-OE細胞におけるWEE1およびMCL-1の発現をウェスタンブロット法で評価した。MCL-1のバンド強度はImageJソフトウェアを用いて測定した。
- C) H23 EVおよびWEE1-OE細胞に対してsotorasibを添加し、経時的にコロニー形成をクリスタルバイオレット法で評価した。
- D) Cの結果をImageJソフトウェアを用いて染色面積を定量した。統計解析にはスチューデントのt検定を適用した。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 。
- E) H23 EVおよびWEE1-OE細胞に対してsotorasib単剤またはadavosertib（300 nM）添加条件下でのsotorasibの増殖抑制効果をATP法で評価した。
- F) H23 WEE1-OEに対してsotorasib単剤またはMCL-1阻害剤（S63845、1 μM ）またはBCL2/-xL阻害剤（ABT-737、1 μM ）添加条件下でのsotorasibの増殖抑制効果をATP法で評価した。

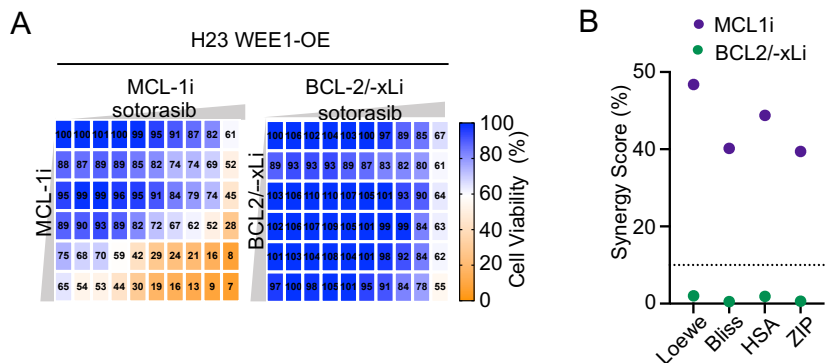


図26. WEE1安定発現細胞の作製とsotorasib耐性との関連に関する検討

- A) 生存細胞数 (cell viability) のヒートマップ：H23 WEE1-OE細胞を96ウェルプレートに3000個/ウェルの密度で播種し、細胞が接着した後、sotorasib (0–10 μ Mの範囲で段階希釈) およびMCL1i (S63845、0–1 μ Mの範囲で段階希釈) またはBCL2/-xLi阻害剤 (ABT-737、0–1 μ Mの範囲で段階希釈) を添加して培養した。阻害剤添加から72時間後に、ATP法を用いて生存細胞数を評価した。各セル内の数値は、コントロールとしてDMSOのみを添加したウェルを100%とした相対的な細胞生存率 (%) で表記した。
- B) 相乗作用の評価：Bの結果をもとに算出したLoewe法、Bliss法、HSA法、ZIP法に基づく薬剤相互作用インデックス (シナジースコア) から最も数値の高い3×3領域の平均値を記載した。シナジースコアはウェブツール (SynergyFinder 3.0) を用いて計算した。各シナジースコアは10以上が相乗効果、-10以上10未満は相加効果、-10未満は拮抗効果を意味する (Ianevski, Giri and Aittokallio, 2022)。

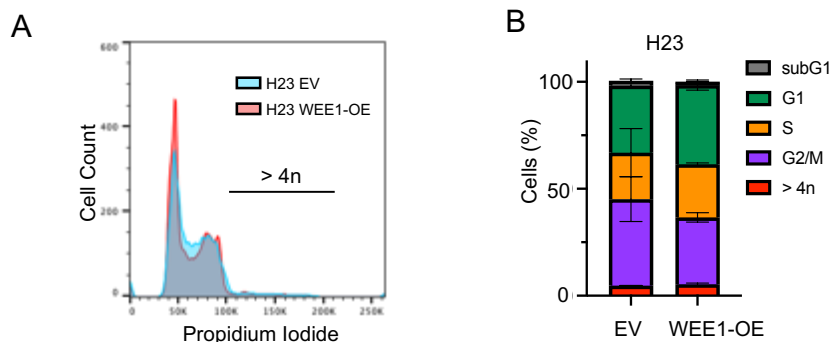
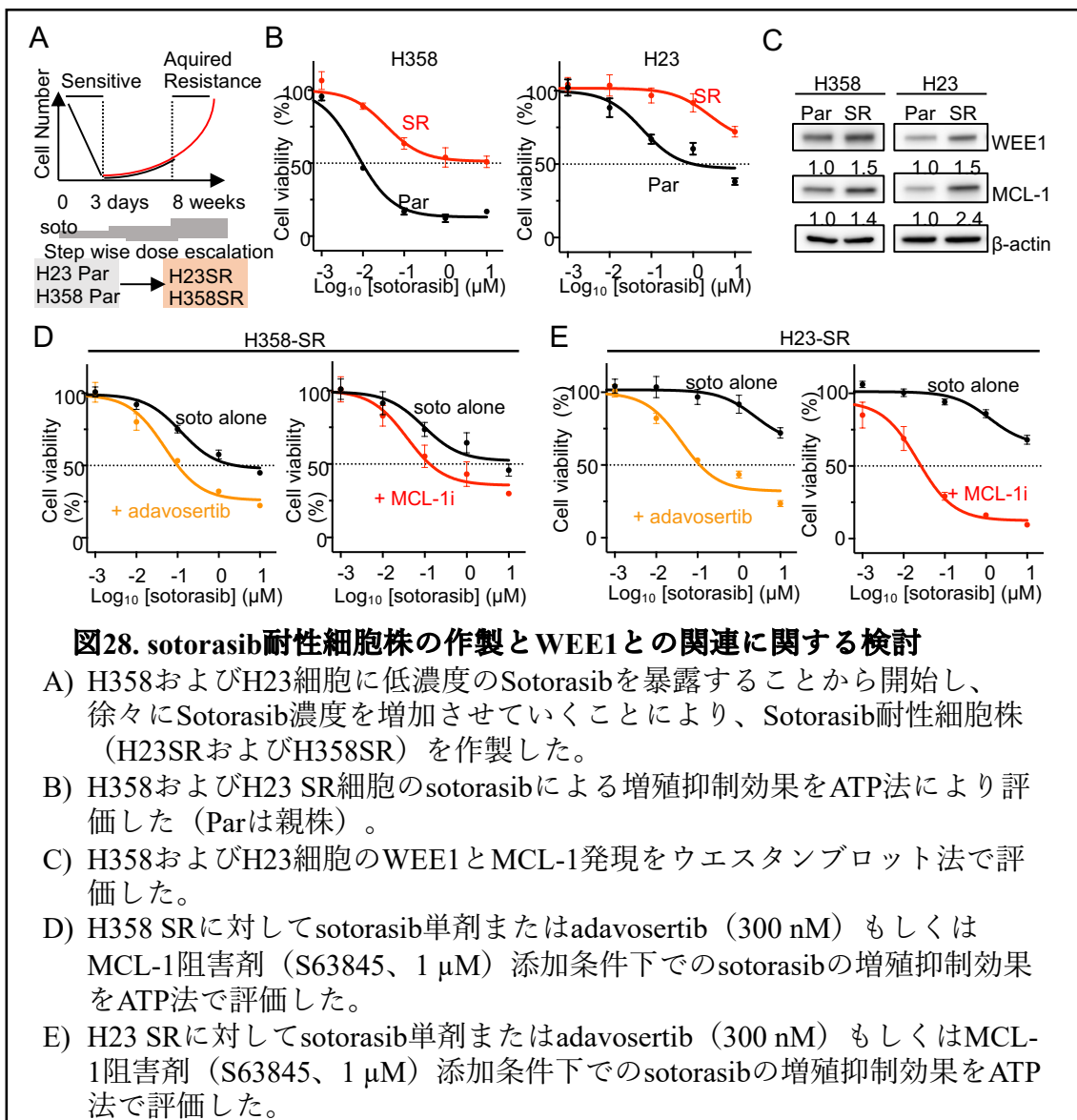


図27. WEE1安定発現細胞の作製とsotorasib耐性との関連に関する検討

- A) H23 EVおよびWEE1-OE細胞に対してプロピジウムヨウ化物でDNAを染色しフローサイトメトリーで細胞周期を解析した。
- B) Aの結果をFlowJoソフトウェアを使用し、DNA量が2倍体である細胞をG1もしくはS期、4倍体である細胞をG2もしくはM期と定義して各細胞周期にある細胞の割合を算出した。



10) CDX モデル、PDX モデルの作製と薬効薬理試験

sotorasib と adavosertib の併用療法による *in vivo* での抗腫瘍効果を検討するため、H358 細胞株由来 (Cell line-Derived Xenograft, CDX) および 2 つの患者由来非小細胞肺癌 (JP-01 および JP-02 Patient-Derived Xenograft, PDX) 異種移植モデルを用いて *in vivo* 試験を行った。H358CDX に対してコントロール (0.5%メチルセルロース溶液)、sotorasib 単剤、adavosertib 単剤、またはその併用 (combo) を 25 日間連日経口投与した。治療 20 日目の腫瘍抑制率 (% T/C) は、sotorasib 単剤で 28%、adavosertib 単剤で 76%、併用療法で 35%であった (図 29A)。マウスの体重はコントロール群と比較して有意な変化は見られず、20 日目の体重変化率はビークルで 2.4%、sotorasib で 0.32%、adavosertib で 0.29%、併用で 2.9%であった (図 29B)。併用療法は腫瘍の再増殖を 40 日目まで抑制し、薬剤耐性細胞の出現を抑制した。

KRAS^{G12C} 変異、野生型 *TP53*、*STK11*、*KEAP1* を有する JP-01 患者由来 NSCLC PDX モデルでも、併用療法の抗腫瘍効果が増強され、28 日目の % T/C は sotorasib 単剤で 46%、adavosertib 単剤で 104%、併用療法で 11%であった (図 29C)。体重変化もビークル投与群と有意差はなく、コントロール群で 8.3%、sotorasib で 5.7%、adavosertib で 3.9%、併用療法で 6.9%の増加が見られた (図 29D)。JP-02 PDX モデルも同様に、併用療法は顕著な抗腫瘍効果を示し、体重変化から見た毒性も許容範囲内であった (図 29E、29F)。さらに、JP-01 PDX 由来の腫瘍組織を免疫組織化学染色では、併用療法群で MCL-1 タンパク質の発現が抑制されており、*in vitro* での結果と一致していた (図 30A、30B)。以上から、複数の PDX モデルを含む *in vivo* モデルでも sotorasib と adavosertib が強い抗腫瘍効果を発揮することが確認された。

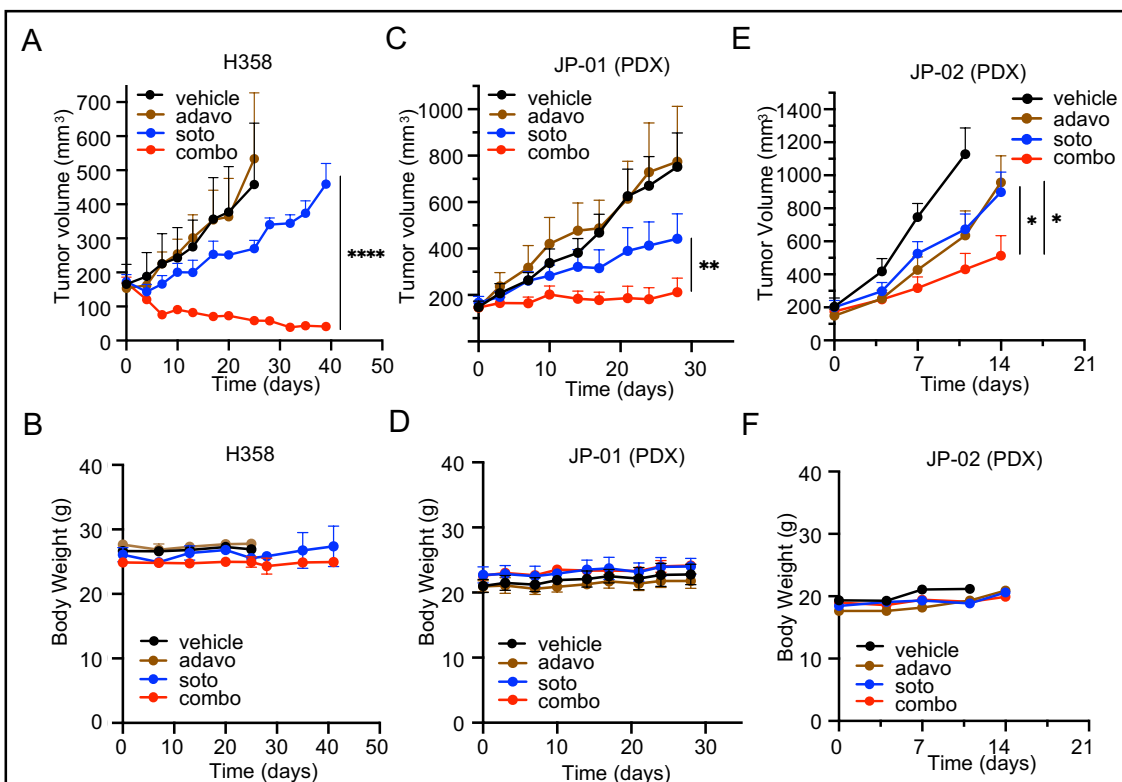


図29. sotorasib + adavosertibの*in vivo*薬効試験

- A) H358ヌードマウス異種移植モデルに対してvehicle control (0.5%メチルセルロース)、sotorasib (10 mg/kg)、adavosertib (40 mg/kg)、および併用 (combo) を21日間経口投与し抗腫瘍効果を評価した。**** $p < 0.0001$ 。
- B) Aの実験におけるマウス体重の経時的変化を観察した。
- C) JP-01ヌードマウス異種移植モデルに対してvehicle control (0.5%メチルセルロース)、sotorasib (30 mg/kg)、adavosertib (40 mg/kg)、および併用 (combo) を28日間経口投与し抗腫瘍効果を評価した。** $p < 0.01$ 。
- D) Cの実験におけるマウス体重の経時的変化を観察した。
- E) JP-02 NOGマウス異種移植モデル (Cell line-derived xenograft model, CDX) に対してvehicle control (0.5%メチルセルロース)、sotorasib (30 mg/kg)、adavosertib (40 mg/kg)、および併用 (combo) を14日間経口投与し抗腫瘍効果を評価した。 $p < 0.05$ 。
- F) Dの実験におけるマウス体重の経時的変化を観察した。
- 統計解析には二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) を適用した。

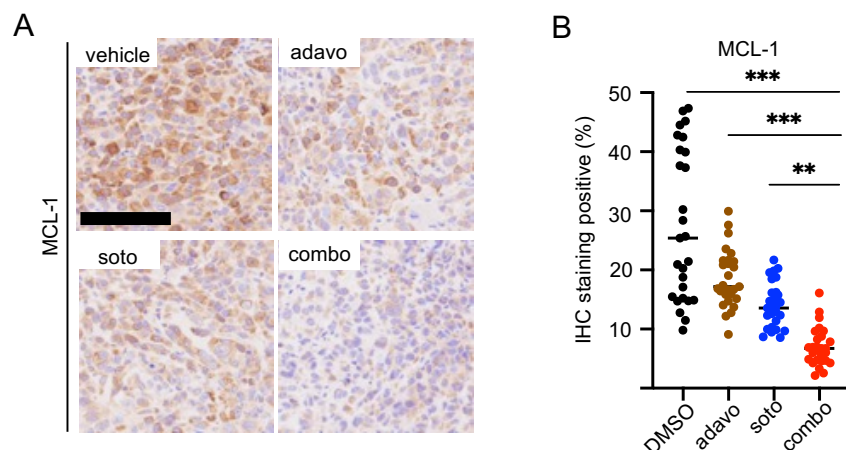


図30. *in vivo* 摘出腫瘍検体を用いた免疫組織化学染色

- A) JP-01 異種移植モデル（図29B）の摘出腫瘍検体を抗MCL-1抗体を用いて免疫組織化学染色で解析した。（スケールバーは100 μmを示す。）
- B) Aの結果をImageJソフトウェアを用いて免疫染色陽性細胞の面積を定量し各条件で比較した。統計解析は統計解析には一元配置分散分析（ANOVA）を行い、全体的な有意差を確認した後にチューキーの多重比較検定を適用した。** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

11) 公共データベースを用いた WEE1、MCL-1 の腫瘍内発現と臨床的意義に関する検討

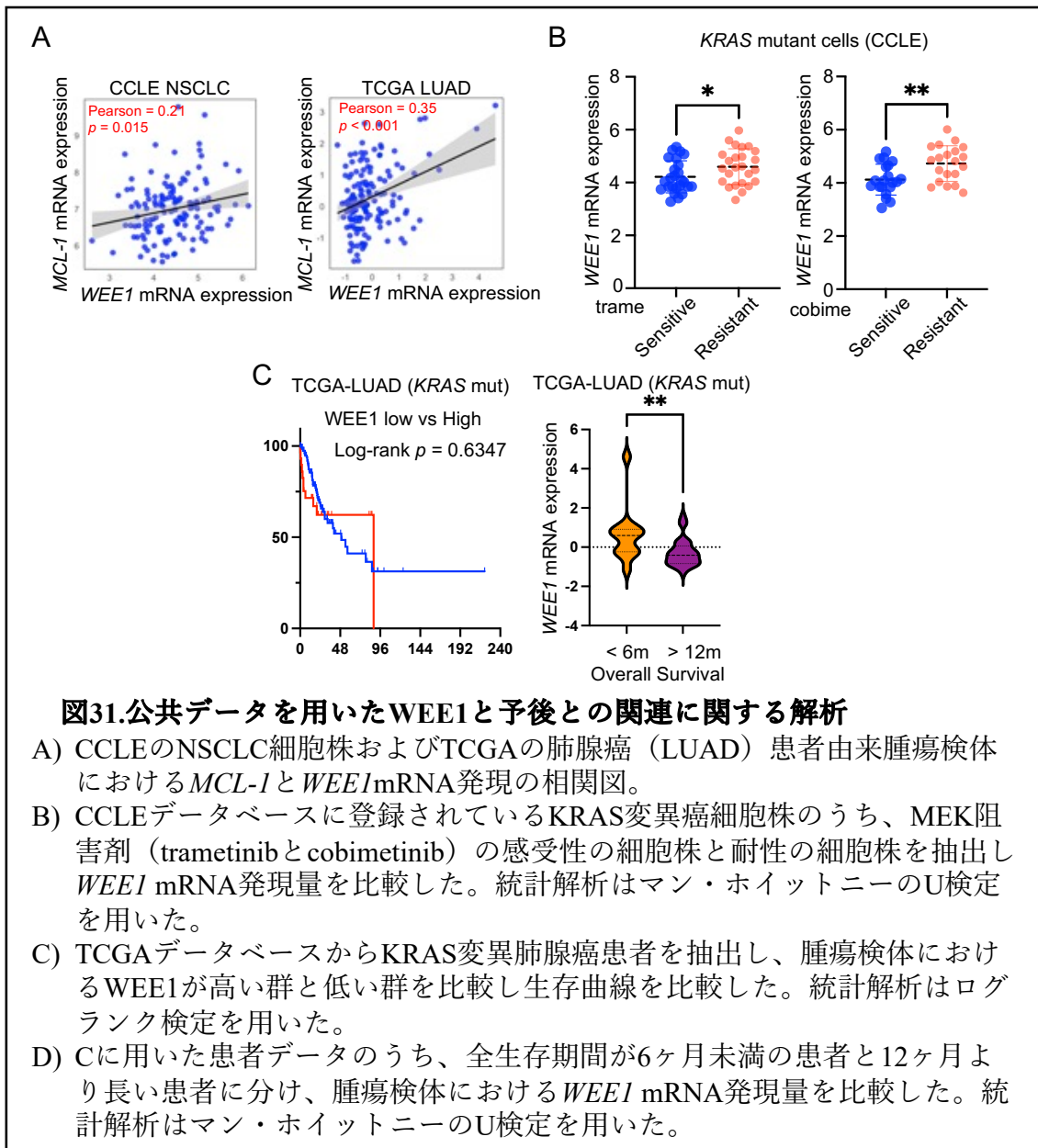
最後に公共データベースを用いた解析を行い、WEE1 と MCL-1 の関連やこれらの腫瘍内発現が持つ臨床的意義を評価した。ヒト由来 NSCLC 細胞株 (Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)) と肺腺癌患者由来腫瘍組織 (The Cancer Genome Atlas (TCGA)) の双方において、*WEE1* と *MCL-1* の mRNA 発現は有意な正の相関を示していた (図 31A)。また、*KRAS* 変異癌細胞株では、MEK 阻害薬への抵抗性細胞株は、感受性細胞株と比較して WEE1 mRNA の発現が有意に高いことが分かった (図 31B)。

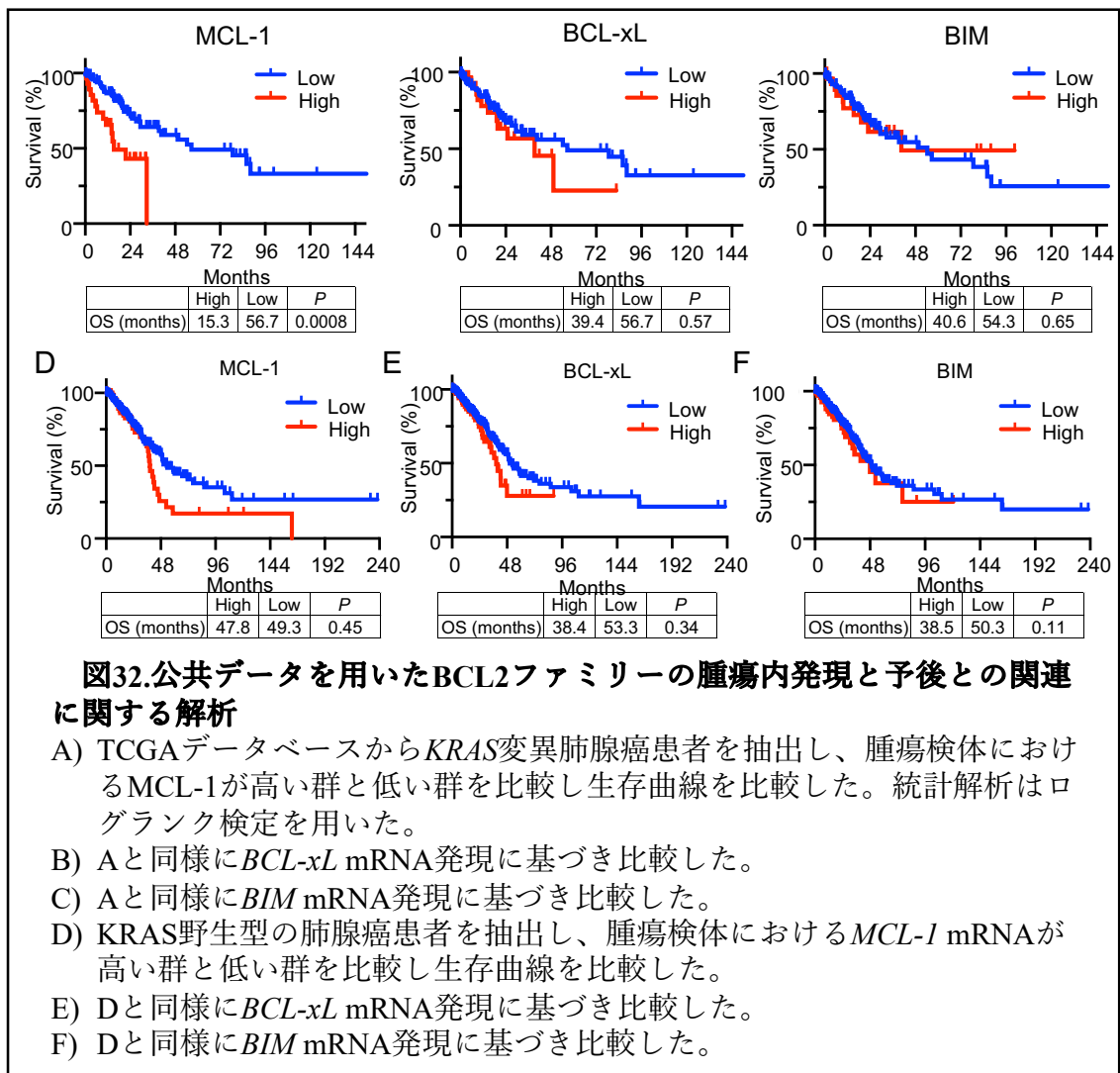
また、WEE1 の発現については、高発現の患者は低発現の患者と比較して生存期間曲線間に統計学的に有意な差は認められなかった (図 31C)。一方で、生存期間が 6 ヶ月以内の患者群では、1 年以上生存した患者群と比較して腫瘍組織の *WEE1* mRNA 発現が有意に高く、予後不良群の方が *WEE1* mRNA が高い可能性が示唆された (図 31C)。

次に、BCL-2 ファミリー分子の mRNA 発現と予後と比較した。*KRAS* 変異肺癌患者では、*MCL-1* 低発現群では高発現群と比較し有意に長い全生存期間を示した (56.7 か月 vs. 15.3 か月、 $p = 0.0008$ 、図 32A)。一方で、*BIM* や *BCL-xL* 発現は予後との有意な相関はなかった (図 32A、B)。さらに、*KRAS* 野生型肺癌患者では、*MCL-1*、*BIM*、*BCL-xL* の mRNA 発現と予後との関連性は認めなかった (図 32D-F)。

また、*KRAS* 変異肺癌の共遺伝子変異として代表的な *TP53*、*STK11*、*KEAP1* 共変異の有無と予後の比較も行った。これらの共遺伝子変異は、sotorasib 治療感受性や免疫チェックポイント阻害剤の反応性に関連していると報告されている。本解析では、*TP53*、*STK11*、*KEAP1* 遺伝子変異型で共に全生存期間が短い傾向はあるものの有意な差は見られなかった。さらに *MCL-1* mRNA 発現はこれらの共遺伝子変異の有無によらず (図 33D)、*MCL-1* 発現が *KRAS* 変異 NSCLC の独立した予後予測因子であることが示唆された。

以上、公共データベースを用いた解析でも WEE1 および MCL-1 の相関や、これらの腫瘍内発現量と *KRAS* 変異肺癌患者の予後との関連が示された。特に *MCL-1* は予後予測バイオマーカーとしての有用性が強く示唆され、今後の臨床的検討が求められる。





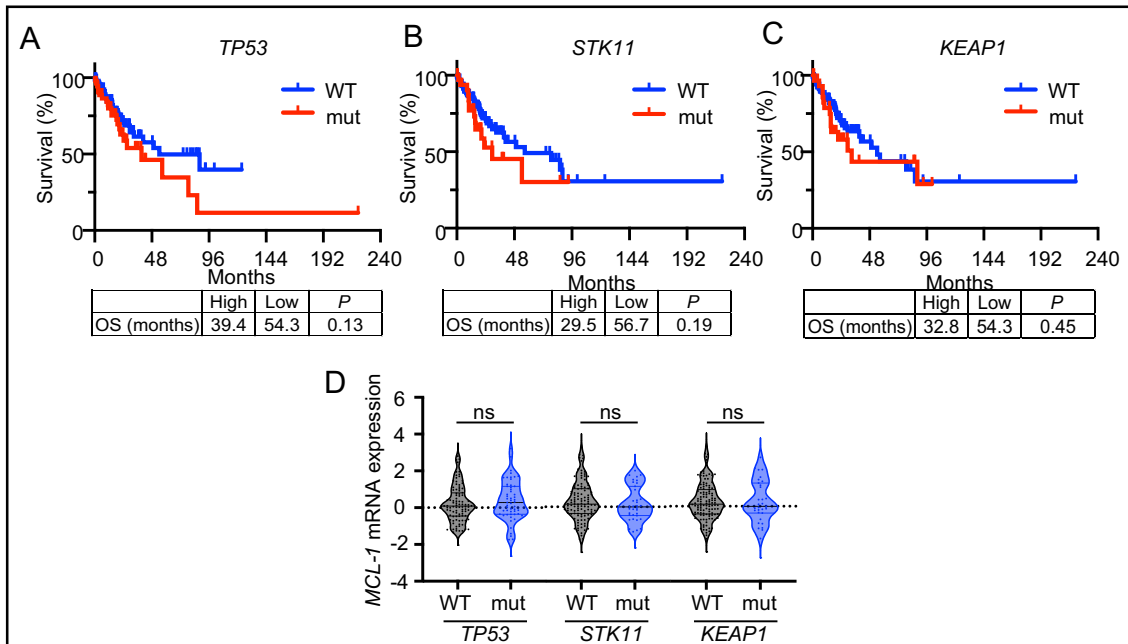


図33.公共データを用いた共遺伝子プロファイルに基づく生存解析

- A) TCGAデータベースから*KRAS*変異肺腺癌患者を抽出し、*TP53*変異と野生型で生存曲線を比較した。統計解析はログランク検定を用いた。
- B) Aと同様に*STK11*変異と野生型間で比較した。
- C) Aと同様に*KEAP1*変異と野生型間で比較した。
- D) *TP53*、*STK11*、*KEAP1*野生型と変異型間での*MCL-1* mRNA発現量を比較した。統計解析はマン・ホイットニーのU検定を用いた。

考察

大規模化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングにより、KRAS^{G12C} 阻害薬である sotorasib の増殖抑制効果を相乗的に高める新規併用候補化合物として WEE1 阻害薬 adavosertib を同定した。本研究では、sotorasib と adavosertib の併用により、MCL-1 の発現が低下し、アポトーシスが促進され、幅広い KRAS^{G12C} 変異 NSCLC 細胞株で相乗的な増殖抑制効果が観察された。さらに、複数の異種移植モデル（CDX 及び PDX モデル）においても併用療法の抗腫瘍効果が確認された。また、WEE1 の過剰発現が sotorasib 耐性を引き起こすことが示され、WEE1 が MCL-1 発現増加を通じて耐性に寄与している可能性が示唆された。

KRAS シグナルと WEE1 のクロストークは未解明な部分が多いが、腫瘍における複製ストレス（Replication Stress、RS）がその関連の鍵となる可能性がある。KRAS 変異によるがん遺伝子の活性化は、DNA 複製の異常を引き起こし、癌細胞に複製ストレスをもたらす。複製ストレスは DNA 損傷やゲノム不安定性を引き起こし、WEE1 を含む細胞周期チェックポイントや DNA 損傷応答経路の活性化を通じて DNA 修復と生存を促進する。特に、KRAS 変異癌細胞は自発的に DNA 損傷応答（DDR）シグナルを活性化し、KRAS によって誘導される RS に適応することが報告されている（Igarashi *et al.*, 2023）。さらに、KRAS 変異癌細胞は抗がん剤により誘発される RS に対して脆弱であり（Iwai *et al.*, 2021）、KRAS 活性化と DDR 経路の生物学的相互作用が示唆されている。

本研究では sotorasib 及び adavosertib 処理が癌細胞に及ぼす影響を網羅的に検討するため、トランスクリプトーム解析を実施した（図 7）。図 7B、C に示すように sotorasib もしくは combo 処理後の細胞では MYC 関連遺伝子群の発現が顕著に抑制されていた。MYC 遺伝子は細胞周期や増殖、分化に関与する転写因子をコードしており、がん原遺伝子として知られている。ラット線維芽細胞モデルを用いた過去の研究では、ERK がリン酸化を介した MYC の安定化に寄与することや、AKT が FoxO の抑制を介して、MYC 発現を亢進させることが報告されている（Bouchard *et al.*, 2004, Sears *et al.*, 2000）。sotorasib による KRAS 阻害は癌の増殖シグナル（MAPK 経路や PI3K-AKT 経路）を抑制し、MYC 関連遺伝子群の発現を抑制すると推察される。KRAS^{G12C} 阻害剤に対して耐性となった膵癌症例を対象とした検討では MYC の過剰発現は複製ストレスの誘導や KRAS 阻害薬耐性に関与することも報告されており（Dilly *et al.*, 2024）、KRAS と MYC のクロストーク機構や、NSCLC における KRAS 阻害薬耐性に MYC が果たす役割についてさらなる解明が待たれる。

近年、複数の前臨床研究で、WEE1 阻害薬と KRAS の下流因子を標的とする

阻害薬との併用効果が報告されている。例えば、sorafenib (RAF/マルチキナーゼ阻害薬) や AZD2014 (Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) 阻害薬) が WEE1 阻害の抗腫瘍効果を増強することが示されている (Hai *et al.*, 2017; Caiola *et al.*, 2018)。また、WEE1 阻害が MEK-ERK シグナルの逆説的な活性化を引き起こし、WEE1 と MEK 阻害薬の併用が KRAS 変異膀胱癌でアポトーシスを増強することが報告されている (Diehl *et al.*, 2021)。本研究の結果からも KRAS と WEE1 の同時阻害により何らかの強力な複製ストレスが誘導されている可能性が示唆されており (図 11、12)、今後さらなる検討が必要である。

図 10 では sotorasib と adavosertib の処理が細胞周期に及ぼす影響を検討した。単剤処理の結果、sotorasib 処理では G1 期の細胞集団が増加し、adavosertib 処理では S 期および G2/M 期の細胞集団が増加することを確認した。一方、併用処理では両剤の影響が相互に打ち消されるような結果となり、併用処理特有の細胞周期変化は観察されなかった。sotorasib は KRAS シグナルを遮断することで細胞を G1 期で停止させる作用を持つ。WEE1 は CDK1 をリン酸化することでその活性を抑制し、G2 期から M 期への移行を阻害している。また、CDK2 の抑制にも関与しており、WEE1 阻害が G2 期から M 期への強制移行を引き起こすだけでなく、G1 期から S 期への移行をも促進することが報告されている (Aarts *et al.*, 2012)。このように、sotorasib と adavosertib は細胞周期において互いに反する作用を持つことが明らかであり、細胞周期解析の結果はこれに一致するものであった。

本研究では、sotorasib と adavosertib の併用抗腫瘍効果のメカニズムとして、MCL-1 の抑制が重要な生物学的イベントであることを示した。MCL-1 は 1 時間未満と半減期が非常に短いタンパク質であり、リボソームにおけるタンパク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で発現レベルが緻密に調整されている (Senichkin *et al.*, 2020)。WEE1 阻害による翻訳抑制のメカニズムは完全には解明されていないが、CDK1 脱リン酸化を介した eIF4G1 の抑制や、mTOR シグナルとのクロストークが示唆されている (Dobrikov *et al.*, 2014; Sen *et al.*, 2017)。さらに、adavosertib は細胞周期チェックポイントを解除し、DNA 損傷を誘発することで ribosome RNA 合成を阻害し、翻訳開始を抑制する可能性がある (Calkins, Iglehart and Lazaro, 2013; Murai *et al.*, 2024)。sotorasib と adavosertib の併用は複数のメカニズムを介してタンパク質合成を阻害している可能性があり、今後さらなる知見の蓄積が必要である。

本研究は、WEE1 阻害薬 adavosertib が sotorasib との併用候補化合物として有望であることに加えて、WEE1 が sotorasib への耐性に寄与していることを新規に示した。これまでの研究で、WEE1 が癌遺伝子を標的とする分子標的薬への耐性に関与している可能性が報告されている。胃癌では WEE1 の発現増加が

HER2 療法に対する耐性を引き起こし、WEE1 阻害薬との併用で耐性細胞が再感受化されるという前臨床研究の報告がある (Jin *et al.*, 2021)。血液悪性腫瘍においても、WEE1 は FMS-like Tyrosine Kinase 3 (FLT3) 阻害薬への耐性を促進し、WEE1 阻害薬の併用で強力な抗増殖効果が得られたと報告されている (Massacci *et al.*, 2023)。また、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬耐性後の EGFR 変異 NSCLC で WEE1 の発現が上昇していたことが報告されている (Liu *et al.*, 2019)。

本研究の課題及び限界点として WEE1 と MCL-1 の生物学的関係や WEE1 が分子標的治療に対して耐性化を誘導するメカニズムの解明が挙げられる。具体的には、本研究では KRAS および WEE1 の同時阻害が、タンパク質翻訳を抑制することを示したものの、WEE1 と MCL-1 の間の特異的な機能的関連性を十分に示すには至っておらず、今後の検討課題となっている。また、WEE1 の発現が sotorasib およびその他の分子標的治療に対して耐性化を誘導するメカニズムについても依然として不明な点が多く、これらについても今後の研究で明らかにしていく必要がある。

本研究に先行し、KRAS 及び TP53 共変異非小細胞肺癌の前臨床モデルにおいて KRAS^{G12C} 阻害薬と WEE1 阻害薬の併用が相乗的な抗腫瘍効果を示すことが報告されている (Fukuda *et al.*, 2024)。本研究は、この先行研究の結果を、より強固なものとするとともに、以下の 4 点において新規性及び優位性を有すると考える。第一に、WEE1 阻害薬を候補化合物として同定するために用いたスクリーニング手法の違いである。本研究では、sotorasib の効果を高める化合物を探索するためのスクリーニング実験デザインを行い、「最適な併用パートナー」としての WEE1 阻害薬を同定することに成功した。

第二に、作用スペクトラムの点である。Fukuda らの研究では、KRAS^{G12C} 阻害薬と WEE1 阻害薬は TP53 変異かつ KRAS 変異 NSCLC に対象を絞って検討されている。本研究の結果では、TP53 変異の有無に関わらず広範な KRAS^{G12C} 変異 NSCLC 細胞株に対してこれらの併用が有効性を示すことを見出した。このことは、将来の臨床応用の観点で、幅広い患者の治療選択肢となりうることを示唆している点で意義がある。

第三に、作用メカニズムの解析の点である。本研究では KRAS 阻害薬と WEE1 阻害薬の併用が、新規タンパク質合成を抑制し MCL-1 を抑制することがアポトーシスの強力な誘導につながることを示した。このことは KRAS と WEE1 という異なるシグナル経路が生物学的にどのように関わっているかを明らかにしていくための手がかりとなる分子生物学的に意義のある知見である。

第四に、WEE1 が KRAS^{G12C} 阻害薬への耐性機構に関与している可能性を示した点である。この発見は、治療抵抗性を克服するための新たなアプローチ

の基盤となると考えられる。以上に述べた点が、先行研究と本研究を差別化する独自性のある点であると考ええる。

全体として、WEE1 阻害薬 adavosertib が sotorasib の有望な新規併用候補化合物であることを同定し、そのメカニズムとしてタンパク質合成経路の障害が関与していることを示した。さらに、WEE1 が sotorasib 耐性にも寄与していることを示した。今後の臨床応用を目指して、臨床への橋渡しとなる患者検体解析を含む臨床的評価を重ねる必要がある。

総括及び結論

1. 本研究にて以下の知見が得られた。

- ・化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより、sotorasib の新規併用パートナーとして WEE1 阻害剤 (adavosertib) を新規に見出した。
- ・sotorasib と adavosertib の併用により、タンパク質新規合成経路の障害を介して抗アポトーシスタンパク質である MCL-1 を抑制することにより癌細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした。
- ・WEE1 が sotorasib 耐性に寄与することを新規に示し、WEE1 阻害剤の併用が sotorasib 耐性克服に有効である可能性を示した。

2. 新知見の意義

KRAS 変異を標的とした薬剤開発は急速に進んでいるが、単剤治療の治療効果は未だ十分とは言えない。KRAS 阻害剤の治療効果を高めるために、分子標的併用療法の開発が積極的に試みられているものの、最適な組み合わせは見つからない。本研究で新規に見出した sotorasib と adavosertib の併用療法は、幅広い細胞株や複数のゼノグラフトモデルにおいて抗腫瘍効果を示すことができ、臨床においても有効な新規治療戦略となりうることを示した。

また、WEE1 過剰発現細胞で sotorasib への耐性が誘導されることは、adavosertib が単に sotorasib と併用効果があることにとどまらず、生物学的にも WEE1 が KRAS 変異肺癌の薬剤耐性機構に重要な役割を担っている可能性を示すものである。がん遺伝子を標的とした分子標的薬剤に対する耐性機構の根幹に関わっている可能性を示したことは今後の耐性克服治療の開発の点で非常に重要な知見である。

3. 今後の研究展開

最終的な目標は、KRAS 阻害剤と WEE1 阻害剤の新規併用療法を臨床応用することであり、臨床試験への橋渡しとなるデータの蓄積が必要である。具体的には、sotorasib 以外の新規 KRAS 阻害剤 (GTP 結合型や pan-RAS 標的型) の臨床開発が進んでおり、今後標準治療となってくることが予想されるため、これらの開発中薬剤でも同様に併用効果が得られるのか幅広く検討していく必要がある。また、マウス同種移植モデルを用いた毒性 (骨髄抑制等) の検討を充実させること。さらには、臨床検体を用いた解析を行い、今回得られた知見が実際に臨床に外挿可能かについてさらなる検討を進めていく。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究院呼吸器内科学教室教授である今野哲先生、国立がん研究センター先端医療開発センターのセンター長である土原一哉先生に深謝申し上げます。また、本研究において直接のご指導を賜りました、国立がん研究センター先端医療開発センター共通研究開発分野ユニット長である大橋紹宏先生に深謝申し上げます。北海道大学病院呼吸器内科・地域医療連携福祉センター榊原純教授、北海道大学病院朝比奈肇診療准教授、北海道大学大学院医学研究院呼吸器内科学教室北井秀典助教に感謝の意を表します。

本研究は、JSPS 特別研究員奨励費（24KJ0251）の助成を受けました。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Aarts M, Sharpe R, Garcia-Murillas I, Gevensleben H, Hurd MS, Shumway SD, Toniatti C, Ashworth A, and Turner, NC (2012) Forced Mitotic Entry of S-Phase Cells as a Therapeutic Strategy Induced by Inhibition of WEE1. *Cancer Discovery* 2, 524–539.

Adachi Y, Kimura R, Hirade K, Yanase S, Nishioka Y, Kasuga N, Yamaguchi R and Ebi H (2023) Scribble mis-localization induces adaptive resistance to KRAS G12C inhibitors through feedback activation of MAPK signaling mediated by YAP-induced MRAS. *Nat Cancer* 4, 829–843.

Awad MM, Liu S, Rybkin II, Arbour KC, Dilly J, Zhu VW, Johnson ML, Heist RS, Patil T, Riely GJ, et al (2021) Acquired resistance to KRAS G12C inhibition in cancer. *N Engl J Med* 384, 2382–2393.

Bean GR, Ganesan YT, Dong Y, Takeda S, Liu H, Chan PM, Huang Y, Chodosh LA, Zambetti GP, Hsieh JJ-D, et al (2013) PUMA and BIM are required for oncogene inactivation–induced apoptosis. *Sci Signal* 6, rs3.

Bouchard C, Marquardt J, Brás A, Medema RH, and Eilers M (2004) Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J* 23, 2830–2840.

Caiola E, Frapolli R, Tomanelli M, Valerio R, Iezzi A, Garassino MC, Broggin M and Marabese M (2018) Wee1 inhibitor MK1775 sensitizes KRAS mutated NSCLC cells to sorafenib. *Sci Rep* 8, 948.

Calkins AS, Iglehart JD and Lazaro J-B (2013) DNA damage-induced inhibition of rRNA synthesis by DNA-PK and PARP-1. *Nucleic Acids Res* 41, 7378–7386.

Chou T-C (2010) Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 70, 440–446.

Chu R, Alford SE, Hart K, Kothari A, Mackintosh SG, Kovak MR and Chambers TC (2016) Mitotic arrest-induced phosphorylation of Mcl-1 revisited using two-dimensional gel electrophoresis and phosphoproteomics: nine phosphorylation sites identified.

Oncotarget 7, 78958–78970.

Costa DB, Halmos B, Kumar A, Schumer ST, Huberman MS, Boggon TJ, Tenen DG and Kobayashi S (2007) BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med* 4, e315.

De Langen AJ, Johnson ML, Mazieres J, Dingemans A-MC, Mountzios G, Pless M, Wolf J, Schuler M, Lena H, Skoulidis F, et al (2023) Sotorasib versus docetaxel for previously treated non-small-cell lung cancer with KRASG12C mutation: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 401, 733–746.

Diehl JN, Klomp JE, Snare KR, Hibshman PS, Blake DR, Kaiser ZD, Gilbert TSK, Baldelli E, Pierobon M, Papke B, et al (2021) The KRAS-regulated kinome identifies WEE1 and ERK coinhibition as a potential therapeutic strategy in KRAS-mutant pancreatic cancer. *J Biol Chem* 297, 101335.

Dilly J, Hoffman MT, Abbassi L, Li Z, Paradiso F, Parent BD, Hennessey CJ, Jordan AC, Morgado M, Dasgupta S, et al (2024) Mechanisms of Resistance to Oncogenic KRAS Inhibition in Pancreatic Cancer. *Cancer Discovery* 14, 2135–2161.

Dobrikov MI, Shveygert M, Brown MC and Gromeier M (2014) Mitotic phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4G1 (eIF4G1) at Ser1232 by Cdk1:Cyclin B inhibits eIF4A helicase complex binding with RNA. *Mol Cell Biol* 34, 439–451.

Domina AM, Vrana JA, Gregory MA, Hann SR and Craig RW (2004) MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* 23, 5301–5315.

Du J, Kageyama S, Yamashita R, Hirata H, Hakoziaki Y, Okumura M, Motegi A, Hojo H, Nakamura M, Hirano Y, et al (2022) Impacts of the STING-IFNAR1-STAT1-IRF1 pathway on the cellular immune reaction induced by fractionated irradiation. *Cancer Sci* 113, 1352–1361.

Edwards AC, Stalneck CA, Jean Morales A, Taylor KE, Klomp JE, Klomp JA, Waters AM, Sudhakar N, Hallin J, Tang TT, et al (2023) TEAD inhibition overcomes YAP1/TAZ-driven primary and acquired resistance to KRASG12C inhibitors. *Cancer Res* 83, 4112–

4129.

Fujimoto Y, Morita TY, Ohashi A, Haeno H, Hakozaki Y, Fujii M, Kashima Y, Kobayashi SS and Mukohara T (2020) Combination treatment with a PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitor overcomes resistance to anti-HER2 therapy in PIK3CA-mutant HER2-positive breast cancer cells. *Sci Rep* 10, 21762.

Fukuda K, Takeuchi S, Arai S, Nanjo S, Sato S, Kotani H, Kita K, Nishiyama A, Sakaguchi H, Ohtsubo K, et al (2024) Targeting WEE1 enhances the antitumor effect of KRAS-mutated non-small cell lung cancer harboring TP53 mutations. *Cell Reports Medicine* 101578.

Gandara D, Marrone K, Govindan R, Skoulidis F, Durm G, Clarke J, Frank R, Krauss J, Snyder W, Dai T, et al (2021) A phase 1b study evaluating the combination of sotorasib, a KRASG12C inhibitor, and afatinib, a pan-ErbB tyrosine kinase inhibitor, in advanced KRAS p.G12C mutated non-small cell lung cancer (NSCLC). *Mol Cancer Ther* 20, P05-02.

Hai J, Liu S, Bufe L, Do K, Chen T, Wang X, Ng C, Li S, Tsao M-S, Shapiro GI, et al (2017) Synergy of WEE1 and mTOR inhibition in mutant KRAS-driven lung cancers. *Clin Cancer Res* 23, 6993–7005.

Hata AN, Engelman JA and Faber AC (2015) The BCL2 family: key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics. *Cancer Discov* 5, 475–487.

Hata AN, Yeo A, Faber AC, Lifshits E, Chen Z, Cheng KA, Walton Z, Sarosiek KA, Letai A, Heist RS, et al (2014) Failure to induce apoptosis via BCL-2 family proteins underlies lack of efficacy of combined MEK and PI3K inhibitors for KRAS-mutant lung cancers. *Cancer Res* 74, 3146–3156.

Ianevski A, Giri AK and Aittokallio T (2022) SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. *Nucleic Acids Res* 50, W739–W743.

Igarashi T, Mazevet M, Yasuhara T, Yano K, Mochizuki A, Nishino M, Yoshida T, Yoshida Y, Takamatsu N, Yoshimi A, et al (2023) An ATR-PrimPol pathway confers tolerance to

oncogenic KRAS-induced and heterochromatin-associated replication stress. *Nat Commun* 14, 4991.

Iwai K, Nambu T, Kashima Y, Yu J, Eng K, Miyamoto K, Kakoi K, Gotou M, Takeuchi T, Kogame A, et al (2021) A CDC7 inhibitor sensitizes DNA-damaging chemotherapies by suppressing homologous recombination repair to delay DNA damage recovery. *Sci Adv* 7, eabf0197.

Jin M-H, Nam A-R, Bang J-H, Oh K-S, Seo H-R, Kim J-M, Yoon J, Kim T-Y and Oh D-Y (2021) WEE1 inhibition reverses trastuzumab resistance in HER2-positive cancers. *Gastric Cancer* 24, 1003–1020.

Liu D, Cao Z, Xu W, Lin G, Zhou X, Ding X, Wang N, Wu C and Su B (2019) Enhancement of chemosensitivity by WEE1 inhibition in EGFR-TKIs resistant non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother* 117, 109185.

Massacci G, Venafrà V, Latini S, Bica V, Pugliese GM, Graziosi S, Klingelhuber F, Krahmer N, Fischer T, Mougiakakos D, et al (2023) A key role of the WEE1-CDK1 axis in mediating TKI-therapy resistance in FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 37, 288–297.

Misale S, Fatherree JP, Cortez E, Li C, Bilton S, Timonina D, Myers DT, Lee D, Gomez-Caraballo M, Greenberg M, et al (2019) KRAS G12C NSCLC models are sensitive to direct targeting of KRAS in combination with PI3K inhibition. *Clin Cancer Res* 25, 796–807.

Moeglin E, Desplancq D, Conic S, Oulad-Abdelghani M, Stoessel A, Chipier M, Vigneron M, Didier P, Tora L and Weiss E (2019) Uniform widespread nuclear phosphorylation of histone H2AX is an indicator of lethal DNA replication stress. *Cancers* 11, 355.

Mok TSK, Yao W, Duruisseaux M, Doucet L, Azkárte Martínez A, Gregorc V, Juan-Vidal O, Lu S, De Bondt C, De Marinis F, et al (2024) KRYSTAL-12: Phase 3 study of adagrasib versus docetaxel in patients with previously treated advanced/metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring a KRAS G12C mutation. *JCO* 42, LBA8509–LBA8509.

Murai J, Ogawa A, Isoyama S, Izumikawa K, Mori M, Watanabe S, Jo U, Taniyama D, Kitajima S, Fujiwara K, et al (2024) SLFN11 induces apoptosis through ribosome biogenesis impairment. Preprint(<https://doi.org/10.2139/ssrn.4831222>).

Negrao MV, Araujo HA, Lamberti G, Cooper AJ, Akhave NS, Zhou T, Delasos L, Hicks JK, Aldea M, Minuti G, et al (2023) Comutations and KRASG12C inhibitor efficacy in advanced NSCLC. *Cancer Discov* 13, 1556–1571.

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.

Punekar SR, Velcheti V, Neel BG, and Wong K-K (2022) The current state of the art and future trends in RAS-targeted cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 19, 637–655.

Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, Cho BC, Gray JE, Ohe Y, Zhou C, Reungwetwattana T, Cheng Y, Chewaskulyong B, et al (2020) Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC. *N Engl J Med* 382, 41–50.

Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, and Nevins JR (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* 14, 2501–2514.

Sen T, Tong P, Diao L, Li L, Fan Y, Hoff J, Heymach JV, Wang J and Byers LA (2017) Targeting AXL and mTOR pathway overcomes primary and acquired resistance to WEE1 inhibition in small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 23, 6239–6253.

Senichkin VV, Streletskaia AY, Gorbunova AS, Zhivotovsky B and Kopeina GS (2020) Saga of Mcl-1: regulation from transcription to degradation. *Cell Death Differ* 27, 405–419.

Skoulidis F and Heymach JV (2019) Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 19, 495–509.

Solomon BJ, Liu G, Felip E, Mok TSK, Soo RA, Mazieres J, Shaw AT, De Marinis F, Goto Y, Wu Y-L, et al (2024) Lorlatinib versus crizotinib in patients with advanced ALK-positive non-small cell lung cancer: 5-year outcomes from the Phase III CROWN

Study. JCO 42, 3400–3409.

Song K-A, Hosono Y, Turner C, Jacob S, Lochmann TL, Murakami Y, Patel NU, Ham J, Hu B, Powell KM, et al (2018) Increased synthesis of MCL-1 protein underlies initial survival of EGFR-mutant lung cancer to EGFR inhibitors and provides a novel drug target. Clin Cancer Res 24, 5658–5672.

Takashima Y, Kikuchi E, Kikuchi J, Suzuki M, Kikuchi H, Maeda M, Shoji T, Furuta M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, et al (2020) Bromodomain and extraterminal domain inhibition synergizes with WEE1-inhibitor AZD1775 effect by impairing nonhomologous end joining and enhancing DNA damage in nonsmall cell lung cancer. Int J Cancer 146, 1114–1124.

Tamiya Y, Matsumoto S, Zenke Y, Yoh K, Ikeda T, Shibata Y, Kato T, Nishino K, Nakamura A, Furuya N, et al (2023) Large-scale clinico-genomic profile of non-small cell lung cancer with KRAS G12C: Results from LC-SCRUM-Asia study. Lung Cancer 176, 103–111.

Tanaka K, Yu HA, Yang S, Han S, Selcuklu SD, Kim K, Ramani S, Ganesan YT, Moyer A, Sinha S, et al (2021) Targeting Aurora B kinase prevents and overcomes resistance to EGFR inhibitors in lung cancer by enhancing BIM- and PUMA-mediated apoptosis. Cancer Cell 39, 1245–1261.e6.

Tanaka N, Lin JJ, Li C, Ryan MB, Zhang J, Kiedrowski LA, Michel AG, Syed MU, Fella KA, Sakhi M, et al (2021) Clinical acquired resistance to KRASG12C inhibition through a novel KRAS switch-II pocket mutation and polyclonal alterations converging on RAS–MAPK reactivation. Cancer Discov 11, 1913–1922.

Tsuchiya Y, Morita T, Kim M, Iemura S, Natsume T, Yamamoto M, Kobayashi A (2011) Dual regulation of the transcriptional activity of Nrfl by β -TrCP- and Hrd1-dependent degradation mechanisms. Mol Cell Biol 31, 4500–4512.

Xue JY, Zhao Y, Aronowitz J, Mai TT, Vides A, Qeriqi B, Kim D, Li C, De Stanchina E, Mazutis L, et al (2020) Rapid non-uniform adaptation to conformation-specific KRAS(G12C) inhibition. Nature 577, 421–425.

Zhao Y, Murciano-Goroff YR, Xue JY, Ang A, Lucas J, Mai TT, Da Cruz Paula AF, Saiki AY, Mohn D, Achanta P, et al (2021) Diverse alterations associated with resistance to KRAS(G12C) inhibition. *Nature* 599, 679–683.