

京都大学	博士 (医 学)	氏 名	戸田 孝祐
論文題目	Metabolic Alterations Caused by KRAS Mutations in Colorectal Cancer Contribute to Cell Adaptation to Glutamine Depletion by Upregulation of Asparagine Synthetase (結腸直腸癌における KRAS 遺伝子変異による代謝変化は、アスパラギン合成酵素の発現亢進を介してグルタミン欠乏に対する耐性を獲得する)		
(論文内容の要旨)			
<p>KRAS 遺伝子は多くの癌種で変異が認められる癌遺伝子であり、大腸癌の分子標的治療薬である抗 EGFR 抗体薬の治療効果予測のバイオマーカーとしても注目されている。さらに近年では種々の癌において KRAS 遺伝子変異は糖代謝をはじめとしたエネルギー代謝経路に関与することが分子レベルで解明されてきた。本研究では、KRAS 遺伝子変異によるヒト大腸癌の代謝変化に着目し、治療への応用の可能性について検討することを目的とした。</p> <p>初めに KRAS 遺伝子変異を内在性にもつヒト結腸癌細胞株(HCT116、DLD-1)と、その変異アレルを相同組み換え法により欠失させた KRAS 野生型細胞株 (HKh-2、HKe-3、DKO-4) を用いてメタボローム解析を行い、KRAS 遺伝子変異と代謝変化との関連について検討した。数ある代謝経路の中で、アミノ酸代謝が KRAS 遺伝子変異と強く相関しているのが明らかとなった。なかでも KRAS 変異型細胞株の細胞内アスパラギン酸濃度は KRAS 野生型と比較し著しく減少していた。アスパラギン酸生成にかかわる代謝関連遺伝子群の発現を変異型細胞株と野生型細胞株とで比較したところ、変異型細胞株ではアスパラギン合成酵素 (ASNS: asparagine synthetase)の発現が有意に上昇していることを見出した。ASNS の発現は PI3K 阻害剤(LY294002)と mTOR 阻害剤(Rapamycin)により抑制されたことから、ASNS の発現制御には PI3K-mTOR 経路が関与していることが示唆された。さらに、京都大学医学部附属病院 消化管外科で 2009～2013 年に原発巣切除した結腸直腸癌 93 症例について KRAS 遺伝子と ASNS 発現の関連について検討したところ、KRAS 遺伝子変異症例では ASNS 陽性率が有意に高いことが明らかとなった。</p> <p>次に ASNS の機能解析のため KRAS 変異型細胞株(HCT116)の ASNS をノックダウンした細胞株を樹立しマウス皮下腫瘍モデルで検討したところ、ノックダウン細胞株では腫瘍増殖速度が有意に抑制され、Ki-67 陽性細胞数も減少していた。また <i>in vitro</i> 実験において、ASNS の発現を抑制するとグルタミン欠乏条件下での細胞増殖が抑制されアポトーシスが誘導された。さらにこれらの表現型は、アスパラギンを培地に添加したり、抑制された ASNS 発現を強制発現系ベクターで回復させると元に戻ることが確認された。</p> <p>ASNS の発現を抑制させたところ、抗癌剤 L-Asparaginase に対する感受性が有意に上昇した。さらに ASNS 発現を抑制する Rapamycin と L-Asparaginase との併用療法では、<i>in vitro</i>、<i>in vivo</i> いずれの実験においても KRAS 変異型細胞株の腫瘍増殖が有意に抑制された。</p> <p>本研究により、KRAS 遺伝子変異を有するヒト大腸癌細胞は ASNS の高発現を介してグルタミン欠乏に対する耐性を獲得していることが明らかとなった。また、ASNS の発現抑制により腫瘍の増殖が抑制され、さらに L-Asparaginase との併用療法により著明な細胞増殖抑制効果を認めたことから、ASNS は大腸癌に</p>			

対する新規の治療ターゲットになりうることを期待される。

(論文審査の結果の要旨)

KRAS 遺伝子変異型大腸癌は抗 **EGFR** 抗体治療の効果が期待できず新規治療法の開発が望まれている。本研究で申請者は、代謝をターゲットとした新規治療法の開発を目的とし、ヒト大腸癌細胞株と臨床検体を用いて検討した。

メタボローム解析において、**KRAS** 変異型細胞株は野生型細胞株に比べアミノ酸代謝が著しく変化しており、特に **KRAS** 変異型では細胞株、臨床検体ともにアスパラギン合成酵素(ASNS)の発現が有意に上昇していることを見出した。さらに ASNS 発現は mTOR 経路を介して誘導され、Rapamycin により ASNS 発現が抑制されることを明らかにした。

KRAS 変異型細胞株の ASNS 発現を RNAi 法にて抑制すると、グルタミン欠乏条件下での細胞増殖が抑制され、かつアポトーシスが誘導された。さらにこれらの現象は、各種アミノ酸の中でアスパラギンを添加したときのみ元に戻せることが確認された。マウス皮下腫瘍モデルでの検討では、ASNS 発現を抑制すると腫瘍増殖が有意に抑制された。さらに抗がん剤である L-Asparaginase と Rapamycin との併用療法では、**KRAS** 変異型細胞株の細胞増殖が有意に抑制されたことから、臨床応用への可能性が示唆された。

以上の研究は大腸癌における **KRAS** 遺伝子変異に係る代謝の分子機構の解明に貢献し今後の **KRAS** 遺伝子変異型大腸癌に対する治療に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 2 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。