

KRAS 阻害剤によるがん細胞および免疫微小環境の相互作用への影響

愛知県がんセンター
がん標的治療 TR 分野 研究員
田中伯享

目的

GTPase の一種である KRAS は、多様ながん種に渡って遺伝子変異が頻発し、がんを惹起することが広く知られており、近年 KRAS 阻害剤の開発研究が活発に行われている。現在承認されている KRAS 阻害剤は分子標的が G12C 変異陽性の KRAS に限られていることや阻害剤に対するがんの耐性を克服することを考慮した際、KRAS 関連シグナルの抑制に伴う腫瘍退縮効果という KRAS 阻害剤の主作用に止まらない広い理解が必要である。当研究室の先行研究より、KRAS^{G12C} 陽性のがん細胞を KRAS 阻害剤に長期間暴露させ続けることによって、がん細胞内における代謝機能の変動とそれに伴う免疫微小環境のリプログラミングについての知見を得ている。一般に、M1 型と M2 型のマクロファージの存在が知られており、M1 型は免疫促進性である一方で、M2 型は免疫抑制性かつ血管新生や転移を促進することで腫瘍の悪性化にも寄与するとされている。従って、KRAS 阻害剤で処理し続けることによって M2 型マクロファージを介したがんの悪性化や治療抵抗性を誘導する可能性が示唆されている。ただし、現段階ではこれらの現象が KRAS 阻害剤による治療におよぼす影響については未解明であるため、申請者は KRAS 阻害剤の処理に伴うマクロファージの分化および薬剤感受性に関する分子メカニズムについて解析することを目的として研究を遂行した。

方法

1. M2 型マクロファージの分化誘導メカニズムの解析

先行研究より、がん細胞が分泌する細胞呼吸に関わる代謝産物 X がマクロファージに発現する細胞表面タンパク質（分子 Y）を介して M2 型マクロファージへの分化を誘導する知見を得ていることから、その詳細なメカニズムを明らかにするべく、以下の実験を行った。

(1) がん細胞における代謝産物 X の産生メカニズム

KRAS 阻害剤で長期間処理した NCI-H358 および LU-65 細胞において産生される代謝産物 X の合成経路を予測するために、ミトコンドリア欠損 (p0) 細胞の樹立を試みた。

(2) マクロファージにおける分子 Y の発現誘導メカニズム

転写因子である C/EBP β が M2 型マクロファージへの分化に関わるとの報告がある¹⁾。C/EBP β による分子 Y の発現誘導について解析するために、PMA で処理することによって M0 型マクロファージへと誘導したヒト白血病由来の THP-1 細胞における C/EBP β をノックダウンした後、LPS あるいは IL-4/IL-13 処理に伴う M1 型あるいは M2 型 THP-1 への分化の有無および分子 Y の発現量について評価した。また、分子 Y による M2 型マクロファージへの分化誘導能を検証するために、野生型の C57BL/6 マウスおよび分子 Y をノックアウトした遺伝子改変マウス由来の腹腔内マクロファージを回収後、同マクロファージとマウス肺がん由来 LLC/Nras KO 細胞 (Kras G12C 陽性、Nras 欠損) の共培養に伴う M2 型マクロファージへの分化能および分子 Y の発現量の変化を評価した。

2. M2 型マクロファージによる KRAS 阻害剤感受性への影響

NCI-H358 および LU-65 細胞を M0 型 THP-1 と共培養した際に、NCI-H358 と LU-65 の KRAS 阻害剤に対する感受性の変化について検討した。また、分子 Y ノックアウトマウスの尾静脈に LLC/NrasKO 細胞を移植した肺転移モデルを用いて、sotorasib を投与に伴うマウスの生存率を比較した。

結果

1. M2 型マクロファージの分化誘導メカニズムの解析

(1) がん細胞における代謝産物 X の産生メカニズム

H358 と LU-65 細胞の p0 細胞樹立を試みたが、適切に細胞を樹立することができなかったため、p0 細胞を用いた検証を行うことができなかった。

(2) マクロファージにおける分子 Y の発現誘導メカニズム

C/EBP β のノックダウン M2 型マクロファージのマーカーである CD206 や ARG1 の mRNA 発現量は減少した一方で、分子 Y の発現量は増大した。また、分子 Y をノックアウトした遺伝子改変マウス由来の腹腔内マクロファージを回収後、同マクロファージとマウス肺がん由来 LLC/Nras KO 細胞 (Kras G12C 陽性、Nras 欠損) の共培養に伴う M2 型マクロファージへの分化能および分子 Y の発現量の変化を評価した。まず、マクロファージ

のゲノム DNA における分子 Y の変異を確認した。野生型マウスに由来する腹腔マクロファージを LLC 細胞と共培養すると Cd206 や Arg1 の発現量が増大した。一方、分子 Y ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージを LLC と共培養した際には、Cd206 や Arg1 の発現量が増大したものの、その上昇率は野生型と比べて顕著に低かった。

3. M2 型マクロファージによる KRAS 阻害剤感受性への影響

M0 あるいは M2 型の THP-1 と共培養した H358 細胞と LU-65 細胞の KRAS 阻害剤に対する感受性は、同細胞を単独で培養した時と比較して有意な変化を示さなかった。また、野生型および分子 Y ノックアウトマウスの尾静脈より LLC/Nras 細胞を移植後、sotorasib による治療効果を比較したところ、野生型および分子 Y ノックアウトマウスにおける有意な差は認められなかった。

考察

M0 型 THP-1 細胞を M2 型へと分化するとともに、分子 Y の発現が増大することを認めたが、THP-1 における C/EBP β をノックダウンした際には M2 型マクロファージへ分化を抑制した一方で分子 Y の発現は増大した。このことから、IL-4 と IL-13 を用いた M2 マクロファージの誘導に伴う分子 Y の発現には C/EBP β とは異なる転写因子が関与することが明らかとなり、当該分子を同定するために今後の課題として ATAC-seq や RNA-seq などの網羅的な遺伝子解析を行うことを計画している。また、マウス由来のがん細胞およびマクロファージを共培養する実験系では、M2 型マクロファージへの誘導を認めたが、分子 Y については変化が認められなかった。この点はヒト由来の細胞を用いた系と異なる。マウスのマクロファージでは分子 Y の発現量が著しく低いとの報告もあり、実験モデルのさらなる検討が必要である。また、野生型および分子 Y ノックアウトマウスの肺転移モデルを用いた系で、sotorasib による治療効果に有意な差を認めなかったのも同様にマウスマクロファージにおける分子 Y の発現量が低いことが原因である可能性も考えられる。また、尾静脈投与という技術的なハードルがやや高い系を用いたことで肺への腫瘍の生着率もややばらつきが大きかったため、肺に直接がん細胞を同所移植するモデルを用いた解析を検討している。

文献

- 1) Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, Kirstetter P, Lopez RG, Rosenthal N, Nerlov C. A CREB-C/EBP β cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes

muscle injury repair. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009, 106(41):17475-80