



Title	Concurrent Targeting of KRAS and AKT by MiR-4689 is a Novel Treatment against Mutant KRAS Colorectal Cancer
Author(s)	平木, 将之
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51951
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	平木 将之
論文題名 Title	Concurrent Targeting of KRAS and AKT by MiR-4689 is a Novel Treatment against Mutant KRAS Colorectal Cancer (microRNA-4689によるKRASとAKTの多分子制御が、KRAS変異型大腸癌に対する新規治療法と成り得る)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕 KRAS野生型大腸癌には抗EGFR抗体が効果を発揮するが、大腸癌の約半数を占めるKRAS変異型ではその恩恵を受けることができない。これはKRAS変異によりMAPK/ERKやPI3K/AKT pathwayなどの下流シグナルが恒常的に活性化し、癌細胞が浸潤・増殖を続けるためである。KRAS下流分子に対するinhibitorを用いた臨床試験が現在行われているが、単独では効果が限られ、2剤併用だと副作用の問題が大きい。microRNA(miRNA)はヒトに内在する18-25塩基長の小さなnon coding RNAであり、副作用は比較的少ないと考えられている。KRAS変異により活性化される細胞内のシグナル伝達を癌細胞の内側から阻害すべくKRAS変異により変化を来たすmiRNAを同定し治療応用することを目的とした。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 ヒト胎児腎細胞HEK293とヒト肺線維芽細胞MRC5に、KRAS変異遺伝子を導入しmiRNAの発現プロファイルの変化をmiRNA arrayで解析した。正常細胞にKRAS遺伝子を導入する手法により、癌細胞における様々なgenetic およびepigeneticな変化によって引き起こされるmiRNAの変化を排除することができ、KRAS変異のみによって誘導されるmiRNAに焦点を当てることを可能とした。Arrayの結果、KRAS変異の過剰発現によりdown-regulateするmiRNAを多く認めた。そのうち、両細胞でFold change>8で発現が低下した6つのmiRNAとKRAS下流分子(MEK2)にbinding siteをもつmiR-4685-3pについて解析を進めた。 KRAS変異過剰発現HEK293、KRAS変異型大腸癌細胞株 (DLD1, SW480, HCT116) を用いて、luciferase assayによりEGFR下流の主な経路であるMAPK/ERK pathwayとMAPK/JNK pathwayを制御するmiRの抽出を行った。この二つのpathwayの下流で働く転写因子Elk-1/SRFおよびAP-1が結合するSRE, AP1 elementを含むreporter plasmid を作成し、KRAS下流シグナルを抑制するmiRNAを検索した。上記7つのmiRのうち、KRAS変異過剰発現HEK293、KRAS変異型大腸癌細胞株のすべてにおいて、MAPK/ERK pathwayとMAPK/JNK pathwayのシグナル活性を抑制し、さらに強い抗腫瘍効果も認めるmiR-4689を同定した。 その機序としては、KRAS の3' UTRとAKT1の Coding sequence (CDS)に直接結合することにより、mRNA/タンパクレベルでKRASとAKT1の発現を低下させ、EGFR下流の主要なMAPK/ERK pathwayとPI3K/AKT pathwayを同時に抑制した。また、miR-4689過剰発現により、アポトーシス促進分子群(BAD, BAX, BAK, CytC) の活性化と抑制分子群(BCL2, BCLXL)の不活化、TUNEL Positive 細胞数の増加を確認し、アポトーシスも誘導することを示した。 miR-4689の発現レベルは、大腸癌細胞株においてKRAS野生型よりKRAS変異型で低い傾向にあった。また、大腸癌患者44例の非癌部と比べ癌部において有意に低下していた。さらに、KRAS野生型(34例)と比較してKRAS変異型大腸癌臨床検体(12例)で有意に低発現であることを確認した。 臨床応用に向け、静注で効率よくmiRNAを腫瘍に到達させるsuper carbonate apatite nanoparticle (sCA)の開発を進めており、このmiR-4689によるマウス<i>in vivo</i>静注でKRAS変異型大腸癌に対して強い抗腫瘍効果も認めた。<i>in vivo</i>腫瘍においても、<i>in vitro</i>と同様の分子の変化を確認した。同時に、非担癌マウスにsCAを用いたmiR-4689を投与し、体重変化、血液生化学的検査、各臓器のHE染色を解析し、その安全性を確認した。	
〔総 括(Conclusion)〕 KRAS変異型大腸癌に奏効するmiR-4689を同定した。miR-4689は、KRASとAKT1に対する直接的な多分子制御を通じて抗腫瘍効果とアポトーシスを誘導しKRAS変異型大腸癌に対する有望な新規治療薬になることが示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 平木 将之		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授 森 正 樹
	副 査	大阪大学教授 石 井 香 始
	副 査	大阪大学教授 小 川 和 孝
論文審査の結果の要旨 KRAS野生型大腸癌には抗EGFR抗体が奏功するが、約半数を占める変異型ではその効果は期待できず、現在新規治療法の開発が求められる。本論文は、KRAS変異により活性化される細胞内シグナル伝達を阻止するmiRNAを同定し、有効な治療法が限られているKRAS変異型大腸癌の新規治療法について検討を行ったものである。 miRNA-arrayによる解析、Luciferase assayを用いたmiRNAの抽出、臨床検体を用いた検証、標的遺伝子の同定、miRNAによる増殖能・アポトーシスへの影響の検証、動物実験における検証によって、miR-4689がKRASとAKT1に対する直接的な多分子制御を通じて強い抗腫瘍効果とアポトーシスの誘導を発揮することが示唆された。これらの解析は、miR-4689がKRAS変異型大腸癌に対する新たな治療薬となる可能性を初めて示したものであり、博士（医学）の学位に値すると考える。		