

論文内容の要旨

論文提出者氏名 中 川 憲 夫

論文題目

Mutations in the RAS pathway as potential precision medicine targets in treatment of rhabdomyosarcoma

論文内容の要旨

近年、がんの遺伝子解析をまずおこない、その解析結果にもとづいて適切な抗がん剤などの治療薬を投与するという Precision Medicine(精密医療)という概念が注目を集めている。小児の軟部肉腫の一つである横紋筋肉腫は、近年の集学的治療の進歩により約 80% の長期生存が望めるようになったが、治療の合併症による性腺機能不全や恒常的な臓器機能欠損が深刻な問題となっている。そのうち二大組織亜型の一つである胎児型横紋筋肉腫 (ERMS) において、腫瘍間での heterogeneity が注目されており、その検討は Precision Medicine に繋がると考えている。RAS タンパク質は、HRAS、KRAS および NRAS の 3 種類のアイソタイプが発見されており、細胞周期進行、細胞移動、アポトーシス、老化、および他の生体機能に関与する多くのシグナル伝達経路に関連している。Ras 変異は、これまで血液腫瘍および固形腫瘍の両方において同定されており、胎児型横紋筋肉腫の一部 (約 10-20%) において RAS 遺伝子変異がドライバー変異として報告されている。近年、発がん性 RAS 遺伝子変異により異常活性化した RAS シグナル伝達の下流エフェクターを阻害する薬剤が開発されその効果が報告されている。今回、種々の横紋筋肉腫細胞株に RAF/MEK 特異的阻害剤を用い横紋筋肉腫の RAS 変異と薬剤効果の関係を評価することで、今後のオーダーメイド医療につながる基礎的な検討を行いたいと考えた。

11 種類の横紋筋肉腫細胞株の NRAS、HRAS、KRAS 各遺伝子の蛋白翻訳領域の全長をサンガー法で解析し、NRAS 変異株を 1 株、HRAS 変異株を 2 株同定した。BRAF 変異を持つ細胞は認めなかった。RAS 変異株と RAS 野生株に対して RAF/MEK 阻害剤 CH5126766(以下,CH)に対する感受性を WST-8 assay を用いて検討した。RAS 変異を有する細胞株では細胞増殖抑制効果を認めたが、RAS 野生株では増殖は抑制されなかった。CH がアポトーシスに対する影響を Annexin V assay により検討した。CH は RAS 変異の有無にかかわらずアポトーシスを誘導しなかった。

フローサイトメトリーによる細胞周期解析では RAS 変異株で濃度依存性に G1 arrest を認めたが、RAS 野生株では変化を認めなかった。

ウェスタンブロット法でシグナル伝達経路の解析を行った。CH は RAS 変異株、RAS 野

生株に対してともに ERK のリン酸化を抑制したが、RAS 変異株でのみ p21 を誘導し、リン酸化 Rb を抑制した。

CH の増殖抑制能をマウスのオルソトピックモデルを用いて検証した。ルシフェラーゼ強制発現 RAS 変異細胞株をヌードマウスの左腓腹筋に移植した。移植 4 週間後より CH (1.5 mg/kg) の経口投与を連日 4 週間行い、ルシフェラーゼ活性を経時的に評価した。CH は 10% 以上の体重減少を来すことなく、腫瘍の増大を抑制した。

以上の結果より新規 RAF/MEK 阻害剤 CH5126766 が RAS 変異を持つ横紋筋肉腫細胞に対して増殖抑制効果を示し、RAS 変異を持たない横紋筋肉腫細胞株の増殖を抑制しないことが示された。

胎児型横紋筋肉腫において高リスク群と RAS 経路の変異と関連するという報告や RAS に変異を導入することで横紋筋肉腫が発生したという報告がある。今回、RAS 変異株で薬剤の効果が得られ野生型株で効果が乏しかったことから RAS 変異がドライバ変異であった可能性が示唆される。また、効果が乏しかった野生型株でも ERK のリン酸化は抑制されており、これらの細胞株では腫瘍の維持に RAS 経路以外の経路が関係していると考えられる。RAS 変異がドライバ変異である場合には MAPK 経路をターゲットとする分子標的薬の効果が期待できる。