

■受領No.1402

## KRAS 遺伝子変異を持つ癌に対する PRMT5 を介した新しい癌幹細胞維持機構を標的とした癌治療法の確立

代表研究者

阿部 芳憲

日本医科大学先端医学研究所遺伝子制御学部門 助教



### Establishment of therapeutic strategy for KRAS-mutant cancer targeting PRMT5-mediated cancer stem cells maintenance machinery

Principal Researcher

Yoshinori Abe,

Department of Molecular Oncology, Institute for Advanced Sciences, Nippon Medical School Assistant Professor

膵管由来細胞株などを使った解析から、PRMT5 は KRAS の活性化によって発現が亢進し、癌幹細胞の維持に重要な役割を果たす遺伝子群の発現誘導に関わることが分かった。In vitro 実験系で膵臓癌由来細胞株に PRMT5 阻害剤を処理すると、細胞増殖能や癌幹細胞自己複製が顕著に抑制された。さらに既存の抗癌剤との併用処理による相乗効果で、その抑制効果は亢進した。さらにヌードマウス皮下に癌細胞を移植して腫瘍形成後、PRMT5 単剤処理または PRMT5 阻害剤と既存の抗癌剤との併用処理によって、腫瘍縮小効果も認められた。

PRMT5 expression was enhanced downstream of KRAS in normal pancreatic ductal-derived cells and PDAC cells. Upregulated PRMT5 was involved in genes expression associated with tumor stemness. These data suggest suppression of PRMT5 activity attenuates PDAC cell proliferation and CSC maintenance. Then, we examined the effect of PRMT5 inhibitor treatment. PRMT5 inhibitor treatment suppressed cell proliferation and cancer stem cells (CSCs) maintenance. Furthermore, combination treatment of PRMT5 inhibitor and conventional anti-cancer drug further suppressed cell proliferation and CSCs maintenance through their synergy effect. Then, xenografted tumor was also shrunk after PRMT5 inhibitor treatment as well as combination treatment of PRMT5 inhibitor and conventional anti-cancer drug.

## 1. 研究内容

### 1.1 研究の背景と目的

膵臓癌は癌が進行するまで自覚症状はなく、早期発見が難しい。さらに膵臓癌は、直径 2 cm 以下の小さな癌でもすぐに周囲への浸潤や転移を伴うことが多いなど、極めて悪性度が高い。現在、全ての癌の 5 年生存率の平均が約 60% になる中、膵臓癌の 5 年生存率は約 5% とされ、極めて予後の

悪い癌と言える。全膵臓癌の 95% で KRAS 遺伝子変異が見られるが、KRAS 遺伝子変異を持つ癌に対しては KRAS の立体構造上、KRAS に対する阻害剤開発は困難とされる。最近、特定の変異を持つ KRAS に対する阻害剤が開発されたが、KRAS 遺伝子変異は多岐にわたるため、全ての KRAS 遺伝子変異癌に効果を示すものではない。

現在、腫瘍消失を目指す治療法開発において、

癌幹細胞が新たな標的として注目されている。これまでの研究から、癌幹細胞のみが腫瘍形成能や転移能を有し、腫瘍形成の起点になると考えられている。したがって癌幹細胞を消失させることができれば、*KRAS* 遺伝子変異を持つ肺癌の消失へつながることが期待される。PRMT5 は基質となるタンパク質のアルギニン残基をメチル化し、遺伝子発現制御や細胞内シグナル伝達を通じて ES 細胞や組織幹細胞の維持に関わる。また、PRMT5 は癌での発現亢進が報告されており、高発現の PRMT5 は予後不良因子の一つとなることが示唆されている。最近になって、PRMT5 は癌幹細胞の維持にも関与することが分かってきた。我々の先行研究から PRMT5 による癌幹細胞維持機構の一つとして、PRMT5 を介した癌幹細胞の維持と深く関わる転写制御分子 *GLI1* の活性化経路を見出した (Yoshinori Abe, et al., *Comm. Biol.* 2, Article number: 23 (2019))。さらにこの新しい癌幹細胞維持機構は、*KRAS* 遺伝子変異を持つ膵臓癌や大腸癌でも機能することも見出した。このことから、PRMT5 を介した癌幹細胞維持機構を抑制すれば、*KRAS* 遺伝子変異を持つ癌幹細胞の消失につながることが期待される。

申請者が見出した PRMT5 を介した癌幹細胞維持機構を標的とする、*KRAS* 遺伝子変異を持つ癌に対する癌治療法を臨床治験へ移行するべく、PRMT5 の機能抑制による癌幹細胞維持能の抑制効果と腫瘍縮小効果を検証する。さらに PRMT5 阻害剤とすでに癌治療に用いられている、既存の抗癌剤と PRMT5 の機能抑制との併用による癌幹細胞維持能の抑制効果と腫瘍縮小効果も検証する。

## 1.2 PRMT5 は *KRAS* の恒常的活性化による細胞の癌化の過程で発現が亢進する

正常膵管由来細胞株 (HPNE 細胞) に変異型 *KRAS* 遺伝子 (*KRAS* G12D) を安定発現させると、PRMT5 の発現亢進が見られた (図 1)。このことから、PRMT5 は RAS の下流で発現が正に制御さ

れ、細胞増殖や幹細胞の維持に関与している可能性が考えられた。

そこで RAS の下流で PRMT5 の発現誘導に直接関与する転写制御因子の特定を試みた。その結果、RAS 下流で活性化される転写制御因子のうち、*cMYC* または *STAT3* によって発現制御されていることも分かった (図 3)。

## 1.3 PRMT5 の機能抑制による細胞増殖能および癌幹細胞自己複製の抑制による腫瘍形成抑制効果

まずは *in vitro* 実験系を使って PRMT5 の機能抑制による効果を検証した。7 種の膵臓癌由来癌細胞株に PRMT5 阻害剤を処理すると、癌細胞および癌幹細胞の生存率が低下したが、PRMT5 阻害剤に対する感受性は細胞間で異なっていた (図 3)。なおデータは示さないが、PRMT5 阻害剤処理による生存細胞の低下は、アポトーシスの誘導によるものであった。さらに PRMT5 阻害剤処理による PRMT5 阻害剤に対する感受性を規定する新たな候補因子も明らかにすることができた (特許申請の都合上、詳細な結果の掲載は控えさせていただきます)。この結果をもとに、PRMT5 に対する感受性が低い癌細胞に対して、膵臓癌治療に用いられている既存の抗癌剤 (特許申請の都合上、薬剤名は控えさせていただきます) と PRMT5 阻害剤を併用処理した。その結果、細胞増殖能および癌幹細胞自己複製が両阻害剤の相乗効果によって顕著に抑制された (図 4)。また PRMT5 の機能を阻害すると、癌幹細胞の維持に重要な役割を果たす *SOX2*、*OCT4*、*NANOG* 遺伝子や、膵臓癌幹細胞の維持に関わる遺伝子 (*DCLK1*、*MSI1/2*) の発現が抑制した。このことから、PRMT5 は膵臓癌幹細胞において、癌幹細胞の維持に必要な基本因子や膵臓癌幹細胞の維持に関わる因子の発現制御に重要な役割を果たすことが考えられた。なお、*KRAS* 遺伝子変異を持つ肺癌細胞についても同様の実験を行ったが、膵臓癌由来癌細胞株と比

べ、全般的に PRMT5 阻害剤に対する感受性が低かったため、詳細な解析は膵臓癌のみを対象にすることとした。

次に、ヌードマウスへの癌細胞株移植による腫瘍形成抑制効果を調べた。Tet-ON システムを使って、ドキシサイクリン存在下で PRMT5 に対する siRNA を発現誘導できる癌細胞株を樹立し、この細胞をヌードマウス皮下に移植した。移植腫瘍の体積が約 150 mm<sup>3</sup> に達した時点で飲水にドキシサイクリンを添加して、PRMT5 に対する siRNA の発現を誘導させたところ、腫瘍の増大を抑制することが分かった (図 5)。

これらの結果をもとに、膵臓癌由来癌細胞株をヌードマウス皮下に移植後、腫瘍体積が 150 mm<sup>3</sup> に達した時点で PRMT5 阻害剤単独、または PRMT5 阻害剤と既存の抗癌剤の併用投与を行った。本実験では、in vitro 実験系から明らかになった、PRMT5 阻害剤に対する感受性の異なる 2 種

の膵臓癌由来癌細胞株を使った。その結果、PRMT5 阻害剤単剤処理でも腫瘍増大を抑制することができた。さらに PRMT5 と既存の抗癌剤との併用投与によって、腫瘍縮小効果が見られた (特許申請の都合上、詳細な結果の掲載は控えさせていただきます)。

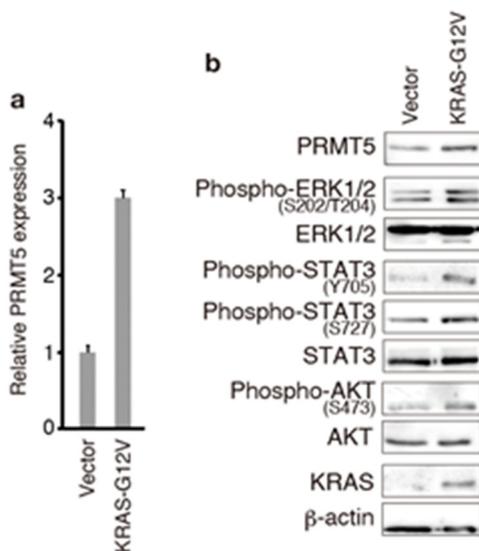


図 1: HPNE 細胞に変異型 KRAS (KRAS-G12V) を安定発現させたときの PRMT5 の発現亢進

a. KRAS-G12V 発現細胞での PRMT5 の mRNA 発現量。細胞から RNA を抽出し、cDNA へ逆転写した。これらのサンプルを使って qPCR 法を行って PRMT5 の mRNA 発現量を調べた。b. KRAS-G12V 発現細胞における PRMT5 タンパク質発現量。細胞からタンパク質を回収し、ウエスタンブロット法を行って、PRMT5 のタンパク質発現量と KRAS-G12V 発現による、様々な細胞増殖シグナルの活性化を調べた。

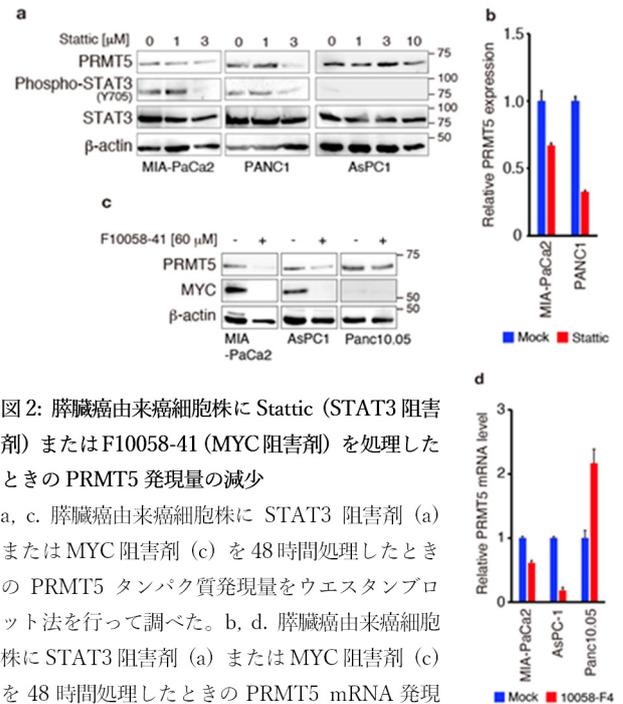


図 2: 膵臓癌由来癌細胞株に Stattic (STAT3 阻害剤) または F10058-41 (MYC 阻害剤) を処理したときの PRMT5 発現量の減少

a, c. 膵臓癌由来癌細胞株に STAT3 阻害剤 (a) または MYC 阻害剤 (c) を 48 時間処理したときの PRMT5 タンパク質発現量をウエスタンブロット法を行って調べた。b, d. 膵臓癌由来癌細胞株に STAT3 阻害剤 (a) または MYC 阻害剤 (c) を 48 時間処理したときの PRMT5 mRNA 発現量をリアルタイム定量 PCR 法を行って調べた。この結果から STAT3 の活性が低い細胞で (AsPC-1) は cMYC が PRMT5 の発現制御を担い、cMYC の発現が低い細胞 (Panc10.05) では STAT3 が PRMT5 の発現制御を行っている可能性が考えられた。

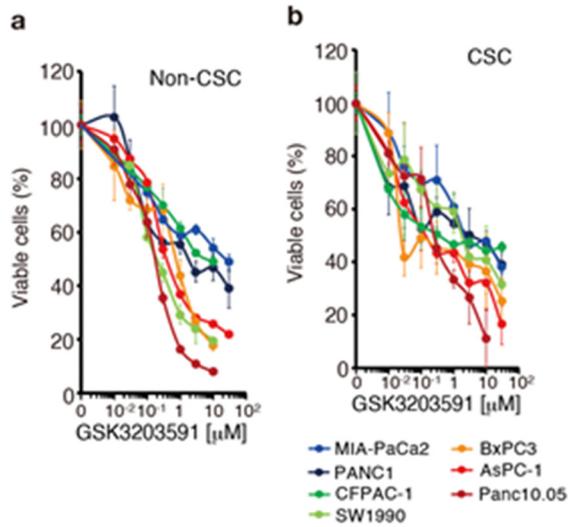


図3: 膵臓癌由来癌細胞株にGSK3203591 (PRMT5阻害剤)を処理したときの生存細胞の割合

a, c. 膵臓癌由来癌細胞株の癌細胞および癌幹細胞にPRMT5阻害剤を72時間(癌細胞: a) または7日間(癌幹細胞: b) 処理したときの生存細胞の割合をMTT法を行って調べた。

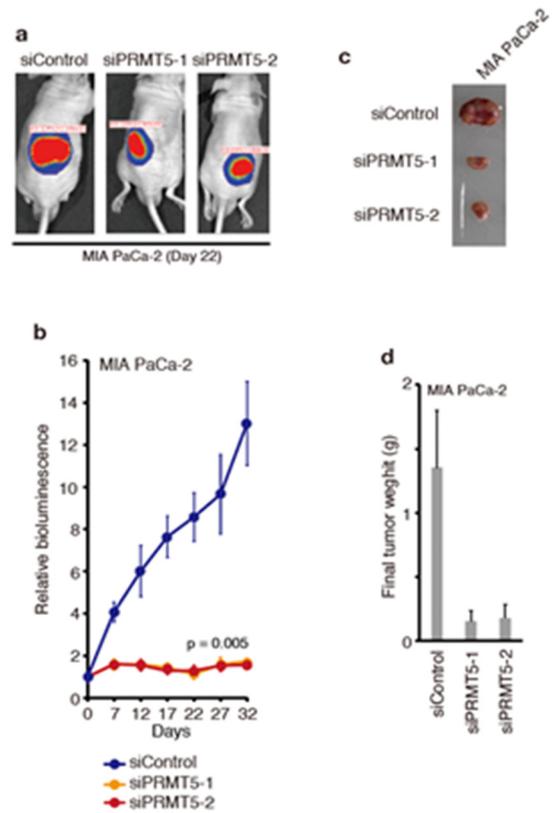


図5: Tet-ONシステムによるPRMT5 siRNAを発現誘導できる膵臓癌由来癌細胞株の腫瘍形成能

a, b. ドキシサイクリン存在下でPRMT5 siRNAを発現誘導でき、ルシフェラーゼを安定発現するMIA-PaCa2細胞をヌードマウス皮下に移植した。腫瘍の大きさが150 mm<sup>3</sup>に達した時点で1.0 mg/mlのドキシサイクリン入り飲水に交換し、自由摂取させてPRMT5の発現を抑制させた。そのときの腫瘍形成能を経時的に調べた。測定前にルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを腹腔内投与し、酵素と基質の反応による化学発光をin vivo imaging system (IVIS)で定量化し、腫瘍の大きさの指標とした(n=5)。a.にIVISの測定例を示し、b.に腫瘍形成能のグラフを示す。コントロールはヒト遺伝子を発現抑制しないsiRNAを発現誘導した細胞とした。c. PRMT5発現抑制から32日後のマウスから採取した腫瘍。d. ヌードマウスにできた癌細胞移植腫瘍の重さ(n=5)。

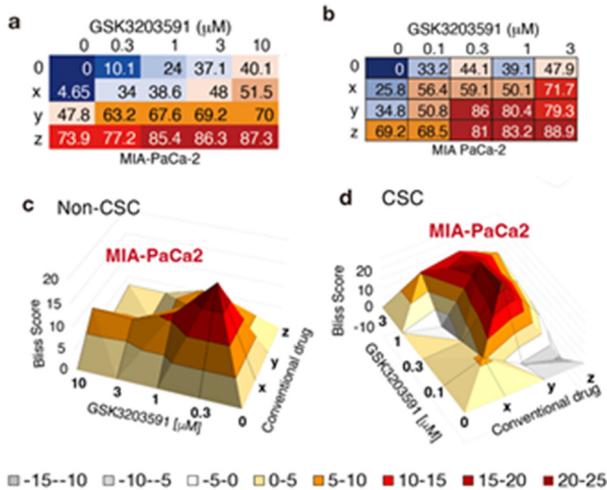


図4: 膵臓癌由来癌細胞株にGSK3203591 (PRMT5阻害剤)を処理したときの生存細胞の割合

a, b. 膵臓癌由来癌細胞株の癌細胞および癌幹細胞にPRMT5阻害剤と既存の抗癌剤を72時間(癌細胞: a) または7日間(癌幹細胞: b) 処理したときの生存細胞の抑制率をMTT法を行って調べた。c, d. a, bの結果をもとに併用処理による生存細胞の抑制率が相乗的か否かを判定するBLISSスコア(Stat Biopharm Res. 2018; 10 (2): 112-122.)を算出した。BLISSスコアが高いほど、両阻害剤の相乗効果が高いと判断される。

## 2. 発表 (研究成果の発表)

国内外の学会誌、学会講演会等における発表があれば 5 件程度記載。

記載内容：氏名、題目、誌名、巻、号、頁 (年次)、  
学会名 (場所、年次)

### 1. 阿部芳憲, 田中信之

PRMT5はEGFR変異非小細胞癌において癌幹細胞維持と薬剤耐性獲得に関わる

日本癌学会 第79回日本癌学会学術総会 (2020)

### 2. 佐野匠, 阿部芳憲, 田中信之

肺癌におけるSTAT3とPRMT5の相互活性化機構の役割

日本分子生物学会 第44回日本分子生物学会年会 (2021)