

論文の内容の要旨

論文題目 治療抵抗性 BRAF 変異陽性大腸がんに対する新規治療標的の解析
(Identification of molecular targets for the treatment of BRAF V600E mutated colorectal cancer)

氏 名 清水 裕貴

【研究背景】

現在死因の第一位であるがんは、2 人に 1 人が一生涯のうちに患うと言われているため、がんの克服は人類の課題である。がん化の原因としてドライバーがん遺伝子の異常が報告されており、ドライバーがん遺伝子の一つである *BRAF* 遺伝子異常は、悪性黒色腫患者の約 60 %や大腸がん患者の約 10 %、非小細胞肺癌患者の約 5%と多くのがん種で認められている。特に、大腸がんでは *BRAF* 遺伝子異常は予後不良因子としても報告されている。正常な *BRAF* タンパク質は上流シグナルを介して MAPK 経路を厳密に制御しているが、*BRAF* V600E 変異などの活性化変異により、*BRAF* タンパク質自体の恒常的な活性化が生じ、MAPK 経路の異常活性化を介して細胞のがん化を促進する。

近年、*BRAF* 変異陽性がんの克服に向けて、多くの *BRAF* 阻害剤が開発されており、*BRAF* 変異陽性悪性黒色腫や非小細胞肺癌患者に対して、*BRAF* 阻害剤とその下流分子 MEK に対する阻害剤の併用療法が高い有効性を示し、治療法として用いられている。一方で、*BRAF* 変異陽性大腸がんに対しては、*BRAF* 阻害剤と MEK 阻害剤の併用療法による有効性はごく一部の患者に限られており、治療法として承認には至っていない。原因としては、大腸がんでは *BRAF* 阻害によってフィードバック機構を介した EGFR の活性化が生じ、その結果として MAPK 経路等が再活性化することが報告されている。そのため、*BRAF* 変異陽性大腸がんに対しては、*BRAF* 阻害剤と抗 EGFR 阻害抗体の併用療法が有効であるとされ、臨床試験が行われた。その結果、*BRAF* 阻害剤と抗 EGFR 阻害抗体の併用療法は、既存の標準治療法である化学療法と比較して、無増悪生存期間と全生存期間の延長を示し、昨年わが国においても *BRAF* 変異陽性大腸がん患者に対する治療法としてこの併用療法が承認された。

しかしながら、*BRAF* 阻害剤と抗 EGFR 阻害抗体の併用療法による奏効率は約 20 %ほどであり、残りの約 80 %の患者では劇的な治療効果は認められていない。したがって、*BRAF* 阻害剤と抗

EGFR 阻害抗体との併用療法に対しても不応な BRAF 変異陽性大腸がんの克服は臨床上的大きな課題であり、有効な治療法の開発が必要である。

【研究目的】

本研究では、BRAF 変異陽性大腸がんの克服に向け、BRAF 阻害剤と抗 EGFR 阻害抗体の併用療法に耐性を示す BRAF 変異陽性大腸がんの新規治療標的と有効な治療法の同定を目指した。

【結果】

(1) 患者由来がん細胞株の樹立と BRAF 阻害剤に対する応答性評価

がん研究会の IRB にて承認された臨床研究計画に則り、同意が得られた BRAF 変異陽性大腸がん患者手術検体 67 症例より、BRAF 変異陽性患者由来細胞株 (BRAF positive colorectal cancer patient-derived cell; BRAF PDC) の樹立を行い、20 株の樹立に成功した。次に、これら 20 細胞株の BRAF 阻害剤 Dabrafenib および EGFR 阻害剤 Afatinib の併用に対する薬剤感受性を評価した。その結果、一部の細胞株では、Dabrafenib と Afatinib を併用することにより、50%阻害濃度 (IC50) の低下が認められた。一方で、一部の細胞株においては、Afatinib の併用による IC50 の低下率は低く、EGFR 阻害剤との併用効果が低いことが示唆された (図 1)。

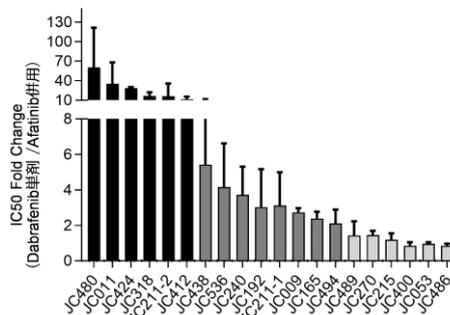


図1. EGFR阻害剤Afatinib併用によるIC50の変化

(2) BRAF と MEK 併用阻害が有効なサブタイプの発見

興味深いことに、EGFR 阻害剤との併用効果が限定的であった一部の細胞株 (JC053、JC270、JC486) では、他の BRAF PDC と比べ、Dabrafenib や MEK 阻害剤 Trametinib に対する薬剤感受性が高かった。このサブタイプの細胞株では、Dabrafenib 処理後の ERK の再活性化がほとんど認められず、BRAF 阻害のみで細胞死が誘導されることが明らかになった (図 2)。さらに、マウスモデルを用いた検討においても、Dabrafenib と Trametinib の併用治療のみで高い抗腫瘍効果を示し、抗 EGFR 阻害抗体 Cetuximab の併用効果は認められなかった (図 3)。したがって、このサブタイプに属する BRAF 変異陽性大腸がんに対しては、BRAF と MEK の阻害のみでがんの増殖抑制が可能であることが示唆された。

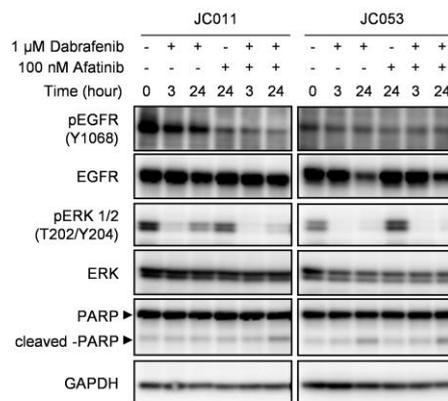


図2. BRAF阻害剤とEGFR阻害剤によるERKシグナルおよびアポトーシス誘導への寄与

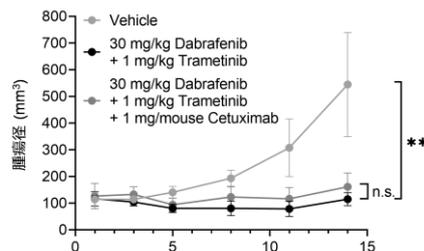


図3. JC053-CDXモデルにおけるDabrafenib、TrametinibおよびCetuximab併用による治療効果

(3) Bcl-xL 阻害剤高感受性サブタイプの発見と治療標的としての評価

次に、EGFR 阻害剤との併用効果が低かったサブタイプの細胞株に対して有効な阻害剤を探索するために、約 90 種類の標的既知の阻害剤で構成された所属研究室独自のライブラリーを用いて薬剤スクリーニングを行った。その結果、EGFR 阻害剤との併用効果が低かったサブタイプに属する JC400 細胞に対して、Bcl-2/Bcl-xL 阻害剤 Navitoclax が高い

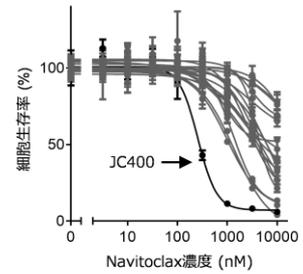


図4. NavitoclaxのJC400細胞に対する選択的な細胞増殖抑制効果

増殖抑制効果を示すことを見出した (図 4)。さらに興味深いことに、他の BRAF PDC と比較して、JC400 細胞は Bcl-2/Mcl-1 阻害剤 Obatoclox に対する薬剤感受性が低いことが示唆された。これら Navitoclax と Obatoclox の標的分子の違いから、JC400 細胞の生存には Bcl-xL が重要である可能性が考えられたため、siRNA を用いた Bcl-xL のノックダウンを行った。その結果、Navitoclax

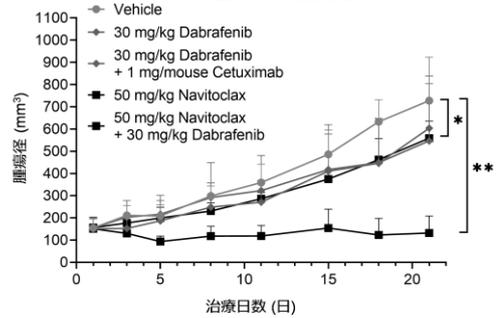


図5. JC400-PDXモデルにおけるDabrafenib、CetuximabおよびNavitoclax併用による治療効果

低感受性細胞 JC011 細胞では細胞生存率の低下はほとんど認められなかったが、JC400 細胞では細胞生存率の低下が認められた。さらに、JC400 patient-derived xenograft (PDX) マウスモデルを用いて、薬効評価を行った結果、*in vitro* の結果同様に、Dabrafenib に Cetuximab を併用しても抗腫瘍効果の増強は認められなかった一方で、Dabrafenib に Navitoclax を併用することで顕著な抗腫瘍効果の増強が認められた (図 5)。したがって、JC400 細胞のような特性を持つ BRAF 変異陽性大腸がんに対しては、BRAF と Bcl-xL の併用阻害が有効であることが示唆された。

(4) VEGFR 阻害剤 A 高感受性サブタイプの発見と標的分子探索

薬剤スクリーニングの結果から、EGFR 阻害剤との併用効果が低かったサブタイプに属する JC215 細胞に対しては、VEGFR 阻害剤 A が高い増殖抑制効果を示すことも見出した (図 6)。一方で、Foretinib などの他の VEGFR 阻害剤に対する JC215 細胞の薬剤感受性は、他の BRAF PDC と比較しても違いは認められなかった。これらの結果より、VEGFR 阻害剤 A の細胞選択的な増殖抑制効果は、VEGFR 以外の標的分子を阻害したことによる効果であると考えられた。そこで、VEGFR 阻害剤 A の標的分子を探索するために、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所の足立淳博士らとの共同研究にてリン酸化プロテオーム解析を行った。その結果、VEGFR 阻害剤 A 処理により有意な差をもって減少する 50 のリン酸化ペプチドが同定された。そして、VEGFR 阻害剤 A がどのような生物学的プロセスを抑制しているかを調べるために、これら 50 のリン酸化タンパク質を用いて Gene Ontology 解析を行ったところ、RNA ポリメラーゼのリン酸化が VEGFR 阻害剤 A 処理により抑制されている可能性が示唆された。そこで、VEGFR 阻害剤 A 処理により抑制された 50 のタンパク質のうち、複数部位のリン酸化が VEGFR 阻害剤 A 処理により変動し、かつ RNA ポリメラーゼの制御に関与するタンパク質 Protein X と Protein Y に着目した。

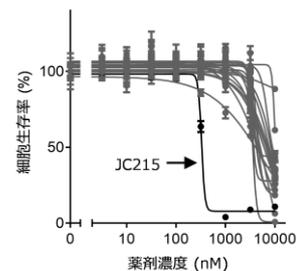


図6. VEGFR阻害剤AのJC215細胞に対する選択的な細胞増殖抑制効果

(5) Protein X と Protein Y の新規治療標的候補としての有効性評価

Protein X と Protein Y は、RNA ポリメラーゼのリン酸化を制御することが報告されている。そこで、VEGFR 阻害剤 A が RNA ポリメラーゼのリン酸化制御に影響を与えるかを検討した結果、VEGFR 阻害剤 A 処理により RNA ポリメラーゼのサブユニットである Protein Z のリン酸化が減弱した (図 7)。さらに、Protein X と Protein Y に対する阻害剤を用いて同検討を行った結果、VEGFR 阻害剤 A と同様に JC215 細胞では Protein Z のリン酸化の減弱に加え、

アポトーシスの促進も認められ、JC215 細胞は Protein X と Protein Y の阻害により増殖抑制されることが示唆された (図 7)。さらに、Protein X と Protein Y の細胞生存率への寄与をノックダウン法により評価した結果、JC215 細胞は Protein X のノックダウンにより生存率の顕著な低下を示した (図 8)。一方、Protein Y のノックダウンでは生存率の低下は認められなかったが、

Protein X と Protein Y のダブルノックダウンをすることで、それぞれの単独ノックダウンよりも顕著な生存率の低下が認められた。しかし、JC011 細胞においては、これらのタンパク質のノックダウンによる増殖抑制は認められなかった。これらの結果から、JC215 細胞と同様の特性を持つ BRAF 変異陽性大腸がんに対して Protein X の阻害が有効であることが明らかとなった。

【考察と今後の展望】

本研究では、BRAF 阻害剤と EGFR 阻害剤への薬剤感受性に基づいて、BRAF 変異陽性大腸がんを複数のサブタイプに分けられる可能性が示唆された。臨床試験においては、BRAF 変異陽性大腸がんに対する BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤の併用療法の治療効果は限定的ではあったものの、12%の患者では奏功が認められている。そのため、BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤の併用治療が有効であったサブタイプに対しては、これら 2 剤の併用による治療戦略が有望であると考えられる。また、BRAF と EGFR の併用阻害が有効ではないサブタイプの一部に対しては、Bcl-xL や Protein X の阻害が有効であることを見出した。Bcl-xL 阻害剤は一部の血液腫瘍に対して高い抗腫瘍効果を示すことが臨床試験でも示唆されており、また、他がん腫において Protein X の阻害により細胞増殖を抑制できることが近年示唆されてきているため、Bcl-xL や Protein X の阻害剤の開発は今後進んでいくと考えられる。したがって、本研究成果は、BRAF 阻害剤と抗 EGFR 阻害抗体の併用療法に対しても不応な BRAF 変異陽性大腸がんの克服に向けた重要な知見になることが期待される。

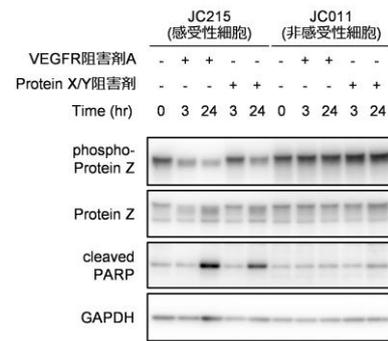


図7. VEGFR阻害剤AおよびProtein X/Y阻害剤処理による下流シグナルの抑制

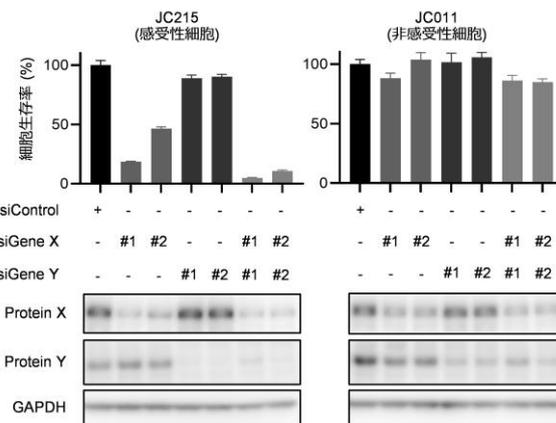


図8. Protein X/Yのノックダウンによる細胞生存率への影響