

博士論文 (要約)

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)

清水 裕貴

序章

がんは世界規模で死因の第一位である疾患であり、本邦においても2人に1人は一生涯のうちにがんを罹患すると推定されている。昨今、肺癌や大腸がんをはじめ、その他多くのがん種におけるがん化の原因として、細胞の異常増殖を抑制する役割を担うがん抑制遺伝子や、非常に強力に細胞増殖を亢進しがん化を促進するドライバーがん遺伝子の存在が明らかとなってきた。そして、近年ではこれらドライバーがん遺伝子陽性がんを克服するために、数多くの分子標的治療薬が開発されてきている。

肺癌は、本邦のみでなく世界でも最も死亡者数が多いがん種である。肺癌の約70%は肺腺がんが占め、日本人の肺腺がん患者の3-5%では、未分化リンパ腫キナーゼ (*Anaplastic lymphoma kinase: ALK*) 融合遺伝子がドライバーがん遺伝子として認められている。現在、ALK陽性肺癌の治療薬として、第一世代ALK阻害薬 Crizotinib、第二世代ALK阻害薬 Alectinib および Ceritinib、Brigatinib、そして第三世代ALK阻害薬 Lorlatinib の5剤が承認されており、Alectinib はALK陽性肺癌の一次治療薬として主に用いられている。一方で、治療後数年以内に薬剤耐性腫瘍の出現によって再発することが臨床上の課題とされている。Alectinib 治療後に再発した症例の半数以上では、ALKのキナーゼ領域内の変異が認められている。そこで、第一世代、第二世代ALK阻害薬に対して耐性を示す獲得耐性変異を克服するために Lorlatinib が開発された。Lorlatinib は獲得耐性変異を持つ患者に対しても、高い有効性を示すことが臨床試験の結果から明らかとなり、第一世代、第二世代ALK阻害薬による一次治療後に再発した患者に対する二次治療において主に用いられてきた。一方で、Lorlatinib は野生型のALK融合タンパク質に対しても高い活性を示すこともあり、ALK陽性肺癌患者の一次治療においても高い有効性を示している。そのため、昨今 Lorlatinib がALK陽性非小細胞肺癌患者を対象にした一次治療薬としても承認された。

しかしながら、Lorlatinib に対してもALKキナーゼ領域内にL1256Fの単独変異や複数の変異が生じる重複変異が生じることにより耐性化することが前臨床モデルのみでなく実臨床でも報告されている。また、SrcやMEKなどのALK以外のタンパク質の活性化によるバイパス経路を介した薬剤耐性が出現することも報告されているが、バイパス経路による耐性化の機構に関してはまだ不明な点も多く、その克服法の確立には至っていない。したがって、多様な獲得耐性を克服するためには、耐性を獲得したがん細胞に対して有効な治療法の確立のみでなく、獲得耐性細胞の出現を防ぐことができるような治療戦略の確立が必要となる。

上述したように、ドライバーがん遺伝子の同定と分子標的治療薬の飛躍的な発展により、ALK融合遺伝子などのドライバーがん遺伝子ごとに患者を層別化することで、ドライバーがん遺伝子陽性肺癌の治療法のパラダイムシフトが起こっている。一方で、肺癌に次いで死亡者数が多く、また最も罹患患者数の多いがん種である大腸がんにおける薬物療法は、従来からの殺細胞性抗がん剤を中心とした化学療法が中心であり、遺伝子異常を指標にして層別化された治療法の確立には至っていない。

大腸がん患者の約 40%では *KRAS* 遺伝子の変異、そして約 10%では *BRAF* 遺伝子の変異が認められている。特に、*BRAF* 遺伝子変異陽性大腸がん患者は、*KRAS/BRAF* 遺伝子いずれも野生型である大腸がん患者や *KRAS* 変異陽性大腸がん患者と比較して全生存期間が短く、予後不良であることが報告されている。*BRAF* 遺伝子がコードする *BRAF* タンパク質は *ARAF*、*CRAF* と共に *RAF family* の一員であり、*MAPK* 経路に属するセリン/スレオニンキナーゼタンパク質である。正常細胞における *BRAF* タンパク質は、*EGFR* などの *RTK* を含む受容体からの増殖シグナルが生じると、*RAS family* タンパク質である *KRAS* や *NRAS* を介して *BRAF* タンパク質とのホモ二量体もしくは *CRAF* タンパク質とのヘテロ二量体を形成して活性化する。一方で、*BRAF V600E* 変異が生じることにより、*BRAF* タンパク質が上流からのシグナル伝達の有無に関わらず単量体で活性化することが報告されている。この *BRAF* タンパク質の異常活性化により、*MAPK* 経路が恒常的に活性化することで細胞増殖が異常に亢進してがん化が促されると考えられている。

これまでに、*BRAF* 変異陽性がんの克服に向け、数多くの *BRAF V600E* 変異特異的阻害剤が開発されてきており、臨床試験にてその有効性が評価されてきた。大腸がん患者のみでなく、肺腺がん患者の 1-2%、悪性黒色腫患者の 60%においても *BRAF* 変異が認められており、*BRAF* 阻害剤単剤と *MEK* 阻害剤の併用による臨床試験では、*BRAF* 変異陽性肺腺がん患者の 63.2%、*BRAF* 変異陽性悪性黒色腫患者の 69%において奏功が認められた。これらの臨床試験の結果を受け、現在では *BRAF V600E* 変異陽性の非小細胞肺癌や悪性黒色腫患者の治療として、*BRAF* 阻害剤と *MEK* 阻害剤の併用療法が承認されている。しかしながら、*BRAF V600E* 変異陽性大腸がん患者においては、*Dabrafenib* と *Trametinib* の併用療法の奏功率は 12%であり、非小細胞肺癌や悪性黒色腫ほどの治療効果は認められていない。

大腸がんでは、*BRAF* や *MEK* の阻害により下流シグナル分子である *ERK* の活性が抑制されることで、フィードバック機構を介した *EGFR* の活性化が生じることが報告されている。そのため、*BRAF V600E* 変異陽性大腸がんに対しては、*BRAF* や *MEK* の阻害に加え *EGFR* の阻害が有効であることが報告されている。そこで、*BRAF V600E* 変異陽性大腸がん患者を対象にして、*BRAF* 阻害剤、*MEK* 阻害剤、および抗 *EGFR* 阻害抗体の併用療法が複数の臨床試験にて評価されてきた。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の大きな課題であり、有効な治療法の開発が必要である。

第一章 患者由来細胞株の樹立とがん関連遺伝子異常解析

がん研究会の IRB にて承認された臨床研究計画に則り、同意が得られた大腸がん患者のうち家族性腺腫症やリンチ症候群など遺伝性腫瘍症候群ではない 599 症例より、異所性多発がんも含めた計 625 の手術組織検体を収集した。この 625 症例のうち、病院内検査にて KRAS の変異が認められない、かつ BRAF 変異の有無が不明な 256 検体に対して droplet digital PCR (ddPCR) 法を用いて BRAF V600E 変異陽性検体のスクリーニングを行った。その結果、計 48 検体 (18.8%) が BRAF V600E 変異陽性であった。さらに、病院内検査により BRAF V600E 変異が陽性であると診断された 19 検体を合わせて、収集した全 625 手術検体のうち計 67 検体 (10.7%) が BRAF V600E 変異陽性であることが明らかとなった。そして、これら 67 検体から、BRAF 変異陽性患者由来大腸がん細胞株 (BRAF positive colorectal cancer patient-derived cell ; BRAF PDC) 20 株の樹立に成功した。

第二章 BRAF 阻害剤に対する応答性に基づいたサブグループ化

樹立に成功した BRAF PDC 20 株における BRAF 阻害剤 Dabrafenib 単剤処理および EGFR 阻害剤 Afatinib 併用処理に対する薬剤感受性を調べるために、細胞生存アッセイを行った。50%阻害濃度 (IC₅₀) を指標に薬剤感受性を評価した結果、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。

Dabrafenib に Afatinib を併用することにより IC₅₀ 値が低下する細胞において、Dabrafenib 単剤処理や Afatinib 併用処理をすることにより、細胞内シグナルがどのように変化するかをウエスタンブロッティング法を用いて調べた。EGFR 阻害剤の併用効果が大きい細胞株の代表として JC111 細胞、EGFR 阻害剤の併用効果が中程度の細胞株の代表として JC165 細胞を用いて解析した結果、いずれの細胞株においても Dabrafenib 単剤処理により BRAF の直下のシグナル分子である MEK のリン酸化の減弱を伴って、ERK のリン酸化が抑制されることが認められた。しかし、ERK のリン酸化の抑制は一時的であり、経時的に ERK のリン酸化が回復することが認められた。一方で、Dabrafenib に Afatinib を上乗せすることで、経時的な ERK のリン酸化の回復がキャンセルされることが認められると共に、アポトーシス促進の指標である Bim や切断型 PARP (cleaved-PARP) の増加が認められ、アポトーシスが誘導されていることが示唆された。以上の結果より、先行研究での知見と同様に、新たに樹立した BRAF V600E 変異陽性 PDC の一部においても、BRAF 阻害剤と EGFR 阻害剤の併用療法が有効であることが示唆された。

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。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。したがって、このサブグループに属する 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。

第三章 阻害剤ライブラリーの構築とアッセイ系の有用性評価

前章では、EGFR 阻害剤の併用効果が低い BRAF 変異陽性 PDC の一部に対しては、BRAF と MEK の併用阻害が有効である可能性を示唆した。一方で、EGFR 阻害剤との併用効果が低かった BRAF 変異陽性 PDC は EGFR 以外のシグナルに依存して細胞の生存、増殖を促している可能性も考えられる。そのため、依存している生存シグナルを同定し、その生存シグナルと BRAF を併用阻害することにより、EGFR 阻害剤の併用療法よりも有効な治療法となる可能性が考えられる。

そこで、がん細胞が生存、増殖のために依存しているシグナル経路を同定するために、標的分子が既知の阻害剤で構成された阻害剤ライブラリーを構築した。そして、構築した阻害剤ライブラリーの有用性を評価することも目的に、BRAF 遺伝子と同様、ドライバーがん遺伝子の一つである ALK 融合遺伝子陽性の非小細胞肺癌における ALK 阻害剤に対する薬剤耐性を克服可能な阻害剤の探索を行った。

がん研究会の IRB 承認済みのプロトコールに則り同意の得られた ALK 陽性肺癌患者の胸水より樹立した ALK 阻害薬に感受性を示す患者由来細胞株 JFCR-028-3 を Lorlatinib に比較的短期間暴露させることで、Lorlatinib 存在下でも生存可能な抵抗性細胞を樹立した。興味深いことに、これら抵抗性細胞は Lorlatinib 非存在下で培養することで、Lorlatinib に再感受性化する性質を示すことが明らかとなり、薬剤処理後に残存する細胞である Drug tolerant persister (DTP) 細胞様の特性を持つことが示唆された。そこで、樹立した JFCR-028-3-DTP 細胞に対する有効な薬剤を探索するために約 90 種類の既承認薬を中心とした阻害剤スクリーニングを実施したところ、GSK3 阻害剤が高い増殖抑制効果を示した。さらに、Lorlatinib と GSK3 阻害剤の併用は、JFCR-028-3-DTP 細胞のより顕著な増殖抑制および細胞死誘導を示すことが明らかとなった。また、GSK3 阻害剤は DTP 細胞のみでなく、ALK 阻害薬に対して獲得耐性を得た細胞に対しても増殖抑制効果を示した。これらの結果から、GSK3 の阻害は Lorlatinib 耐性細胞の克服のみでなく、Lorlatinib 耐性細胞の出現自体を抑制できる可能性があり、ALK 陽性肺癌の克服に向けた有望な治療戦略開発に繋がるかもしれない。

第四章 薬剤感受性プロファイルに基づいた新規治療標的探索

次に、第三章にて構築した阻害剤ライブラリーを用いて、本研究にて新たに樹立した BRAF V600E 変異陽性 PDC 20 株の薬剤感受性プロファイルを取得し、BRAF V600E 変異陽性大腸がんに対する新規治療標的の同定を目指した。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、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グループに属する JC400 細胞に対して、抗アポトーシス分子 Bcl-2/Bcl-xL の阻害剤 Navitoclax が高い増殖抑制効果を示すことを見出した。さらに興味深いことに、JC400 細胞は他の BRAF PDC と比較して、Navitoclax に対して高い感受性を示す一方で、Bcl-2/Mcl-1 特異的阻害剤である Obatoclax に対しては、感受性が低いことが示唆された。これら Navitoclax と Obatoclax 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結果、JC400 細胞にて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。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。

さらに、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 X が高い増殖抑制効果を示すことも見出した。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 X 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。

第五章 VEGFR 阻害剤 X の標的探索と新規治療標的候補としての有効性評価

前章において、VEGFR 阻害剤 X が一部の BRAF 変異陽性 PDC (JC215 細胞) に対して高い有効性を示した。一方で、その作用機序に関しては VEGFR 阻害剤 X のオフターゲットによるものだと考えられたため、VEGFR 阻害剤 X 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 X 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 X 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 X 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 X 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 X 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。

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 X 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 X 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。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 X 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。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。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。

終章 総合討論

進行性 BRAF V600E 変異陽性大腸がんは、KRAS 変異陽性や KRAS および BRAF いずれも野生型である大腸がんと比較して悪性度が高いこともあり、その克服のために BRAF を標的とした治療法開発が近年盛んに行われている。現在では、切除不能な進行性 BRAF V600E 変異陽性大腸がん患者を対象に BRAF 阻害剤と抗 EGFR 阻害抗体の 2 剤併用療法もしくはこれら 2 剤に加え MEK 阻害剤を併用した 3 剤併用療法が治療法として承認されているが、その有効性は一部の患者に限られている。先行研究においては、BRAF V600E 変異陽性大腸がんにおける遺伝子発現パターンに基づくことで、これら併用療法に対する薬効予測ができる可能性が示唆されている。

一方で本研究では BRAF V600E 変異陽性大腸がんの患者由来細胞株を新たに樹立し、BRAF 阻害剤と EGFR 阻害剤の併用に対する薬剤感受性を評価することで薬効予測に繋がる知見が得られないか検討した。その結果、BRAF 阻害剤の薬剤感受性に基づいて、BRAF 阻害剤と EGFR 阻害剤の併用が有効であるサブタイプ (タイプ 1)、BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤の併用が有効であるサブタイプ (タイプ 2)、そして EGFR 以外の他のシグナルへの依存性が高く、EGFR の併用阻害が有効ではないサブタイプ (タイプ 3) の 3 つに分類できる可能性を示唆した。

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タイプ 2 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タイプ 3 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、難治性の他がん腫において 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。