

令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07218

研究課題名(和文) 遺伝子変異情報に基づいた大腸癌に対する新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for colorectal cancers based on the gene mutation profiles.

研究代表者

長山 聡 (Nagayama, Satoshi)

公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・医長

研究者番号：70362499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 大腸癌幹細胞様細胞株の樹立 同時性多発肝転移を伴うStage IV症例で、原発巣を切除する症例や、術前生検によるBRAF変異症例や、KRAS変異(G12Cなど)症例は積極的に検体収集し、現在までに約550症例での樹立を試みている。

(2) 大腸癌幹細胞様細胞株の薬効評価 BRAF変異大腸癌由来の細胞株を用いた感受性スクリーニングでは、特定の薬剤に著効する一群の細胞株が存在し、その薬剤の標的分子をin vitro実験にて絞り込むことを行った。KRAS G12C変異を持つ樹立細胞株では、G12C阻害剤単剤では効果が乏しかったため、他剤との併用効果を検証し、有望な併用薬を絞りこむことが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、患者由来の癌幹細胞様細胞株を樹立し、各種阻害剤に対する薬剤感受性を評価し、遺伝子変異状況に基づいた薬剤感受性群の選出を行ってきた。さらにプロテオーム解析も加えて、ゲノミクス・プロテオミクスデータと薬剤感受性・抵抗性データを統合して、主要なシグナル伝達系を深く解析することで、KRAS変異型およびBRAF変異型大腸癌では、なぜ標的遺伝子がありながら効果的な薬剤が見出されていないのかという問いを解明してきており、本研究は新規薬物療法の開発にも大きく貢献すると考えている。

研究成果の概要(英文)：About 10% of colorectal cancer (CRC) patients harbor BRAF V600E mutation, which confers poor prognosis. Recently the combinational therapy of BRAF inhibitor with anti-EGFR antibody was approved for patients with CRC harboring BRAF V600E mutation. However, clinical benefit in the combination treatment is limited by the existence of intrinsic resistance. Therefore, new therapeutic strategies for BRAF V600E CRCs showing intrinsic resistance to the combination therapy are needed. In this study, we established more than 20 BRAF V600E CRC patient-derived cells (PDCs) from surgical specimens and examined drug sensitivity using a focused inhibitor library. More than 1/3 of BRAF-V600E PDCs showed highly resistance to BRAF and EGFR inhibition, but showed sensitivity to a kind of CDK inhibitor specifically. Our study proposed new potential therapeutic strategies to overcome the intrinsic resistance to BRAF and EGFR inhibition in BRAF V600E-mutated CRCs.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 癌細胞株 薬剤感受性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌に対する治療は、分子標的治療薬の導入と相まって化学療法を中心に、この数年で目覚ましい発展を遂げてきた。無治療の場合、約半年の予後と推測される進行再発大腸癌に対して、5-FU をキードラッグとしてオキザリプラチンまたはイリノテカンを併用する標準化学療法に抗 VEGF 阻害抗体 (Bevacizumab) あるいは抗 EGFR 阻害抗体 (Cetuximab あるいは Panitumumab) を併用することによって、約 3 年まで予後が延長できるようになってきた。この EGFR 阻害抗体は、ゲノム解析で KRAS 野生型の症例 (大腸癌全体の約 50-60%) (Roberts, Oncogene 2007) が適応となっているが、効果の認められる症例は 3-4 割程度と言われている (Roock, Lancet Oncol 2010)。ゲノム解析技術の進展とともに、大腸癌の全ゲノム解析情報が明らかにされている (TCGA, Nature 2012) が、臨床上活用されているのは、KRAS 変異の情報だけである。KRAS 変異型の大腸癌に対しては、KRAS を標的とする薬剤開発の困難さから、標準化学療法以外の治療法開発のための治療標的の探索が数多く研究されているが、未だ臨床応用できた新規治療法はない。一方で、大腸癌全体の約 10-15% に認められる BRAF 変異型 (V600E) 症例は、予後不良であり、BRAF 野生型症例に比べて、死亡率が約 70% も上昇することが示されている (Hutchins, J Clin Oncol 2011, Van Cutsem, J Clin Oncol 2011)。同一の BRAF 変異を持つメラノーマでは BRAF 阻害剤が約 60-80% の奏効率を發揮し (Chapman, N Engl J Med 2011) 肺癌でも BRAF 阻害剤に MEK 阻害剤を併用することで約 64% の奏効率が得られ (David, Lancet Oncol 2017) BRAF 阻害剤を利用した治療法が有用であることが示されている。しかしながら、BRAF 変異型大腸癌では、BRAF 阻害剤単独ではわずか 5% 程度の奏効率しか得られず (Scott, J Clin Oncol 2015) MEK 阻害剤を併用しても奏効率 12% 程度と報告されている (Corcoran, J Clin Oncol 2015)。この理由の一つとして、EGFR を介した MAPK シグナル伝達の再活性化が示されているが (Anirudh, Nature 2012)、現在はまだ、BRAF/MEK/EGFR 阻害剤併用の臨床試験が計画されている段階である (NCT01750918)

### 2. 研究の目的

大腸癌の治療成績をさらに向上させるためには、遺伝子変異情報に基づいて、有望な治療レジメンを選択できるようにすること、化学療法の感受性・抵抗性を予測すること、が重要であると考えられる。本研究の主目的は、大腸癌手術検体から各患者由来の大腸癌幹細胞株を樹立して、以下の 2 点を行ない、より効果的な治療法ならびに新規治療標的の同定をすることである。

(1) 樹立した患者由来の大腸癌幹細胞株を用いて多種類の低分子阻害剤に対する薬効評価を行い、遺伝子変異情報に基づいた新たな治療薬剤の選択が可能かどうか検証するとともに新規治療標的の探索を行う。本研究では、特に KRAS 変異型と BRAF 変異型大腸癌の解析を優先的にを行い、臨床応用可能な新規治療戦略の開発を目指す。

(2) 同細胞株のプロテオゲノミクスプロファイリングと、該当患者の実際の薬剤治療効果判定との相関性を検討し、化学療法の感受性・抵抗性の指標を検索する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 大腸癌幹細胞様細胞株の樹立

大腸癌培養株の樹立に関しては、癌幹細胞性を持つ細胞が維持されるという培養液と条件 (Ohata, Cancer Res. 2012) を利用する。通常の大腸癌手術症例だけでなく、同時性多発肝転移を伴う Stage IV 症例で、原発巣を切除する症例や、術前生検検体にて KRAS 野生型と判明している右側結腸癌症例は積極的に検体収集する (BRAF 変異型症例が多いため)。特に、同時性多発肝転移を伴う Stage IV 症例では、原発巣切除後に全身化学療法を行うため、その治療効果判定 (RECIST) が得られ、樹立した大腸癌細胞株の薬剤感受性データ等との相関性が検証しやすい。化学療法後に肝転移巣が切除される場合にも、肝転移巣から細胞株を樹立しており、治療前後の変化を探索する上で貴重な解析対象になると考えている。

#### (2) 大腸癌幹細胞様細胞株のプロテオゲノムプロファイリングと薬効評価

##### ・遺伝子変異解析

KRAS、BRAF、PIK3CA、PTEN、APC、catenin など大腸癌において変異が報告されている遺伝子に加えて、データベースに登録されている変異遺伝子から合計 108 個を選別し、次世代シーケンサーを用いて、ターゲットシーケンスを行なう。由来する大腸癌組織と周囲の正常大腸組織についても遺伝子変異解析を行い、検体ごとの体細胞変異の特定を行う。

##### ・遺伝子発現解析

樹立した大腸癌幹細胞様癌細胞株の一部についてはマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析もを行い、それぞれの特性を明らかにする。また必要に応じて由来する大腸癌組織についても解析し、

クラスタリング解析を行い、大腸癌幹細胞様癌細胞株と元の大腸癌組織との相関を検討する。

・プロテオミクス

樹立した大腸癌幹細胞様癌細胞株を用いて、プロテオーム解析を行う。質量分析計を用いたプロテオーム解析については、共同研究により実施する。可能であれば、分子標的薬の主要標的となっているチロシンリン酸化に特化したチロシンリン酸化プロテオーム解析も同時に行う。

・薬効評価

樹立した大腸癌幹細胞様癌細胞株を用いて、標的が明確となっている 92 種類の抗腫瘍薬剤からなるオリジナルライブラリー（EGFR 阻害剤、VRGF 阻害剤、FGFR 阻害剤、mTOR 阻害剤、PI3K 阻害剤、MEK 阻害剤、Wnt 系阻害剤など）に対する薬剤感受性を検討する。

4. 研究成果

(1) 大腸癌幹細胞様細胞株の樹立

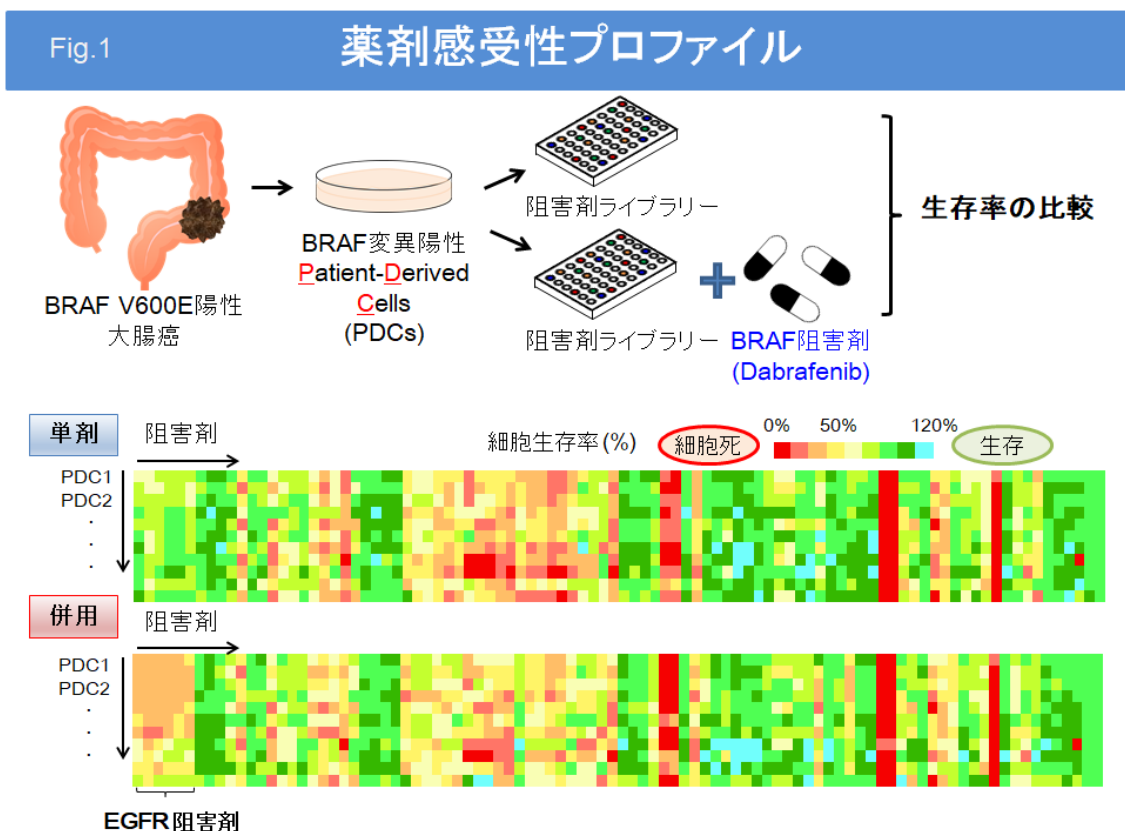
大腸癌培養株の樹立には、癌幹細胞性を持つ細胞が維持されるという培養液と条件（Ohata, Cancer Res. 2012）を利用した。同時性多発肝転移を伴う Stage IV 症例で、原発巣を切除する症例や、術前生検による BRAF 変異症例や、KRAS 変異（G12C など）症例は積極的に検体収集してきた。現在までに約 550 症例での樹立を試みた。

(2) 大腸癌幹細胞様細胞株のプロテオゲノムプロファイリングと薬効評価

1) 遺伝子変異解析：KRAS、BRAF、PIK3CA、PTEN、APC、catenin など大腸癌において変異が報告されている遺伝子に加えて、データベースに登録されている変異遺伝子から合計 108 個を選別し、次世代シーケンサーを用いて、ターゲットシーケンスを順次行ってきた。

2) プロテオミクス：樹立した大腸癌幹細胞様癌細胞株（特に BRAF 変異株）を用いて、プロテオーム解析を開始した。分子標的薬の主要標的となっているチロシンリン酸化に特化したチロシンリン酸化プロテオーム解析も同時に行ってきた。

3) 薬効評価：樹立した大腸癌幹細胞様癌細胞株を用いて、標的が明確となっている 92 種類の抗腫瘍薬剤からなるオリジナルライブラリー（EGFR 阻害剤、VRGF 阻害剤、FGFR 阻害剤、mTOR 阻害剤、PI3K 阻害剤、MEK 阻害剤、Wnt 系阻害剤など）に対する薬剤感受性を順次行ってきた (Fig.1)

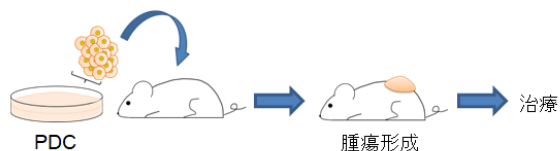


(3) 解析状況

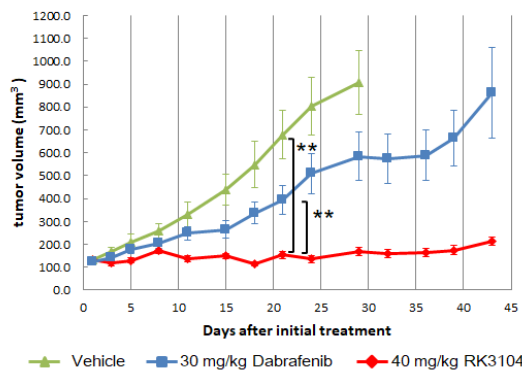
BRAF 変異大腸癌由来の細胞株を用いた感受性スクリーニングでは、特定の薬剤に著効する一群の細胞株があることがわかった (Fig.2)。現在、この著効した薬剤の標的を同定するために、in

in vitro 実験を積み重ね、標的候補を絞り込むことが出来た。KRAS G12C 変異を持つ樹立細胞株では、肺癌の場合と異なり、G12C 阻害剤単剤では効果が乏しかったため、他剤との併用効果を検証し、有望な併用薬を絞りこむことが出来た。

Fig.2 マウス実験での検証



*In vivo*マウスモデル (JC-215) N=6



Mann-Whitney U test \*P<0.05, \*\*P<0.01

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 裕貴、きょう 博、大原 智子、長山 聡、藤田 直也、片山 量平
2. 発表標題 BRAF V600E変異陽性大腸がんの有効な既存薬の発見
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	片山 量平  (Katayama Ryohei)  (60435542)	公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 基礎研究部・部長    (72602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------