

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07169

研究課題名(和文) BRAF変異大腸癌におけるnon coding RNA異常の同定と新規治療開発

研究課題名(英文) Identification of alterations in non-coding RNA and development of novel therapeutic strategy for BRAF-mutated colorectal cancer

研究代表者

高橋 雅信 (TAKAHASHI, MASANOBU)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00447161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、BRAF変異大腸癌における、Mcl1阻害薬の治療応用、さらに新規治療標的分子の同定を目的とした。申請者らは、Mcl1阻害薬あるいはsiRNAによるMcl1のknockdownがBRAF阻害薬による殺細胞性効果をさらに増強することを見出した。化合物スクリーニングにより、レチノイドがBRAF/MEK/EGFR阻害の効果増強を示すことを明らかにした(投稿中)。遺伝子スクリーニングにより、6種類の遺伝子のノックダウンによりBRAF阻害薬+MEK阻害薬+抗EGFR抗体の効果増強を示すことを明らかにした(投稿中)。これらの治験は、今後のBRAF変異大腸癌の新規治療開発につながりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BRAF変異大腸癌において、BRAF阻害薬+MEK阻害薬+抗EGFR抗体の併用療法群は、標準化学療法群と比べて全生存期間における優越性が第III相試験で示され、国内でも2020年に保険承認された。しかし、それでも全生存期間中央値が9ヶ月と依然予後不良であり、BRAF阻害薬+MEK阻害薬+抗EGFR抗体の効果増強をきたす治療法は開発されていない。

本研究から、BRAF阻害薬+MEK阻害薬+抗EGFR抗体の有効性をさらに高める薬剤や標的分子の候補が見いだされた。早期に臨床試験へ展開することを計画している。これらから本研究の学術的独自性と創造性は高く、がん診療においてもインパクトは高い。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop Mcl1 inhibitors for patients with BRAF-mutated colorectal cancer and to identify new molecular targets for BRAF-mutated colorectal cancer. We found that Mcl1 inhibitors or siRNA-mediated knockdown of Mcl1 further enhanced cytotoxic effect by BRAF inhibitor (Hiraide S et al. Cancer Sci. 2021 112:3856-3870). We also found that retinoid the enhanced cytotoxic effect by BRAF inhibitor (we are now submitting a paper). The gene knockdown screening identified the six gene knockdown enhanced the cytotoxic effect by BRAF/MEK/EGFR inhibition (we are now submitting a paper). These new findings could lead to developing new therapeutic options for patients with BRAF-mutated cancer.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：BRAF colorectal cancer Mcl1

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は切除不能の場合、5年生存率は約20%と未だに予後不良の疾患であり、治療法のさらなる改善が望まれる。大腸癌は、*APC*、*TP53*、*RAS*、*BRAF*をはじめとした遺伝子変異や microsatellite instability (MSI) などの genetic な異常、さらに、CpG island methylator phenotype (CIMP) などの epigenetic な異常など様々な分子学的特徴を持ち合わせる heterogenic な疾患である。*BRAF* 変異、MSI 陽性、CIMP 陽性の分子サブタイプ、特に *BRAF* 変異と CIMP 陽性は高率で overlap し、大腸癌の全体のおよそ10%を占める

2020年時点で、大腸癌で *RAS*、さらに *BRAF* の遺伝子検査が保険収載されており、がん薬物療法が適応となる stage IV の大腸癌患者ではほぼ100%これらの遺伝子検査が実査されている。*BRAF* V600E 遺伝子変異 (以後 *BRAF* 変異) がある場合、特に MSI 陰性の場合、予後不良である。大腸癌の40-45%でみられる *RAS* 変異サブタイプと比較し、同じ EGFR 経路下流の遺伝子変異にも関わらず、*BRAF* 変異でより予後不良である理由はまだ明確には解明されていない。全ゲノムシーケンスなど網羅的 DNA 解析の技術は飛躍的に進歩しているが、DNA 変異のみで説明がつかない要因の存在が示唆される。また、*BRAF* 阻害薬 + MEK 阻害薬などの治療法が開発中だが (Kopetz et al. N Engl J Med. 2019;381:1632-43) 初期抵抗性や獲得抵抗性などの問題から有効性は未だ十分でなく、他の有効な治療標的分子の同定が切に望まれる。

一方、小分子 non-coding RNA である microRNA (miRNA) は癌の発生・進行過程の様々な段階に深く関与することが明らかにされつつある。しかしながら、ある特定の miRNA 群が *BRAF* 変異/CIMP 陽性大腸癌の発癌過程に関連しているかどうかを調べる研究はほとんど行われてこなかった。申請者らは、全ゲノムワイドの miRNA 発現スクリーニングにより、*BRAF* 変異大腸癌組織において特異的に発現異常を呈する数種類の miRNA を同定し、その内 miR-193a-3p が大腸癌細胞において癌抑制遺伝子として働き、その腫瘍内における発現量が抗 EGFR 抗体治療における薬剤感受性と相関することを見出した。*BRAF* 変異大腸癌における特定の miRNA の制御異常が *BRAF* の属する EGFR 経路あるいは他の *BRAF* 関連シグナル伝達経路の活性化につながることで、*BRAF* 変異大腸癌の予後不良また治療抵抗性の臨床的特徴を賦与している可能性が示唆された。さらに申請者らは、miR-193a-3p の癌細胞内過剰発現が、*in vitro* において *BRAF* 阻害薬 + MEK 阻害薬による殺細胞性効果を高めること、またその効果増強の機構に Mcl1 の抑制が密接に関与していることを見出した。miRNA 群の *BRAF* 変異大腸癌の発癌機構への関与についてさらに詳細に解明することにより、miRNA の補充療法や miRNA 標的分子阻害など、新規治療に結びつけることを計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*BRAF* 変異大腸癌における Mcl1 阻害薬の治療応用、*BRAF* 変異大腸癌発がんにおける miRNA 群や lncRNA 群の同定と関連する標的遺伝子群を含めた新規治療標的分子の同定、であった。

申請者らは、*BRAF* 変異大腸がん特異的に、miR-193a-3p ががん抑制的に働くことを *in vitro* の解析にて初めて明らかにし既に報告している (Takahashi H et al. BMC Cancer 2017;17:723) 。さらに申請者らは、miR-193a-3p の癌細胞内過剰発現が、*in vitro* において Mcl1 による殺細胞性効果を高めること、またその効果増強の機構に、miR-193a-3p の標的であり抗アポトーシスタンパク質の1つである Mcl1 の抑制が密接に関与していることを見出した。Mcl1 阻害薬の *BRAF* 阻害薬 + MEK 阻害薬 + 抗 EGFR 抗体への細胞増殖抑制増強効果を各種培養がん細胞株を用いて *in vitro*, *in vivo* での実験を開始した。また、*BRAF* 変異大腸がんにおける *BRAF* 阻害薬 + MEK 阻害薬 + 抗 EGFR 抗体の治療効果を増強しうる Mcl1 以外の新規標的分子を探索するため、CRISPER-CAS9 技術を用いた *in vitro* での遺伝子スクリーニングの実験を開始している。

3. 研究の方法

(1) *BRAF* 変異大腸癌における Mcl1 阻害薬の治療応用— *in vivo* での proof of concept

申請者らは、前述のように、*BRAF* 変異大腸癌では *in vitro* において、Mcl1 阻害薬あるいは siRNA による knockdown が *BRAF* 阻害薬 + MEK 阻害薬による殺細胞性効果をさらに増強することを見出した (Hiraide S et al. Cancer Sci. 2021 112:3856-3870) 。Mcl1 が *BRAF* 変異大腸癌において、有力な新規治療標的となることを示唆している。癌皮下移植マウスモデル下でノックダウン系などのシステムを用いて、Mcl1 阻害薬や Mcl1 の knockdown により、*BRAF* 変異型大腸癌での *BRAF* 阻害薬 + MEK 阻害薬 + 抗 EGFR 抗体の併用効果の *in vivo* でのさらなる増強効果の有無を検討する。

さらに、*in vivo* での Mcl1 阻害の有効性が確認できれば、さらに EGFR 関連シグナル経路を含む各細胞内シグナル経路の網羅的遺伝子発現・miRNA 解析や western blot、免疫組織化学

染色等による分子解析を移植腫瘍組織を用いて行い、BRAF 阻害薬 + MEK 阻害薬 + 抗 EGFR 抗体 + Mcl1 阻害による殺細胞性効果の増強のメカニズムをより詳細に解析する。

(2) BRAF 変異大腸癌における miRNA 群の同定と関連する標的遺伝子群を含めた新規治療標的分子の同定

申請者は、miR-193a-3p が BRAF 変異大腸癌の発癌過程に関わる重要な miRNA で、さらにその標的である Mcl1 が 1 つの有望な新規治療標的分子候補ではあるが、miR-193a-3p 以外の miRNA が関与する分子経路が新規治療標的の候補となり得るとも考えている。そのため、miR-193a-3p 以外の miRNA、さらに lncRNA などの non-coding RNA が BRAF 変異大腸癌に関与するか、またその関与する分子経路の解明を目指す。

大腸癌細胞株を用いて、候補 miRNA の precursor や lncRNA の cDNA をリポフェクションし、細胞内タンパク質発現量の変化を、iTRAQ 法などを用いて網羅的に解析する。有意に発現量が増加したタンパク質分子群の関連経路を同定し、各々の候補標的タンパク質発現量の変化を western blot 解析で検証する。

これらの実験により miRNA や lncRNA の新規標的分子を同定すれば、miRNA の mimic や inhibitor、または miRNA や lncRNA の標的分子の阻害薬などの新薬開発につながる知見となりうる。

4. 研究成果

(1) BRAF 変異大腸癌における Mcl1 阻害薬の治療応用

ヌードマウス皮下移植モデルマウスで、Mcl1 阻害薬の BRAF 阻害薬+MEK 阻害薬+抗 EGFR 抗体の治療効果増強効果を検証した。複数の大腸癌細胞株を用いて複数の各薬剤の濃度を用いた複数条件で検証したが、*in vitro* での Mcl1 阻害薬の BRAF 阻害薬+MEK 阻害薬+抗 EGFR 抗体の効果増強は認められなかった。

(2) BRAF 変異大腸癌における miRNA 群の同定と関連する標的遺伝子群を含めた新規治療標的分子の同定

上記 1 の実験で Mcl1 阻害薬の *in vivo* での有効性を検証できなかったこともあり、次の方策として、既存化合物の BRAF 阻害薬+MEK 阻害薬+抗 EGFR 抗体の効果増強を示す薬剤のスクリーニング、CRISPER-CAS9 技術を用いた *in vitro* での遺伝子スクリーニングを行った。

では、既存化合物スクリーニングより、レチノイドが BRAF 阻害薬+MEK 阻害薬+抗 EGFR 抗体の効果増強を *in vitro* と *in vivo* で示すことを明らかにした(投稿中)。

では、CRISPER-CAS9 技術を用いた *in vitro* での遺伝子スクリーニングにより、6 種類の遺伝子のノックダウンにより BRAF 阻害薬+MEK 阻害薬+抗 EGFR 抗体の効果増強を *in vitro* で示すことを明らかにした(投稿中)。そのうちの 1 つの SHP2 阻害薬は *in vivo* モデルでも BRAF 阻害薬+MEK 阻害薬+抗 EGFR 抗体の効果増強を示すことを明らかにした(投稿中)。

これらの *in vitro*、*in vivo* での結果をもとに、現在レチノイドや SHP2 阻害薬を用いた治験の開始を計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiraide Sakura, Takahashi Masanobu, Yoshida Yuya, Yamada Hideharu, Komine Keigo, Ishioka Chikashi	4. 巻 112
2. 論文標題 Tumor suppressor miR 193a 3p enhances efficacy of BRAF/MEK inhibitors in BRAF mutated colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3856 ~ 3870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特許権	発明者 高橋雅信	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P 2 0 2 1 0 0 4 8	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------