

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15383

研究課題名（和文）MAPK/ERKシグナル伝達経路遮断に基づく犬前立腺癌の新規分子標的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel molecular targeted therapy for canine prostate cancer based on blockade of MAPK/ERK signaling pathway

研究代表者

小林 正典（Kobayashi, Masanori）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：80600428

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）：本研究の目的は、MAPK/ERKシグナル伝達経路の遮断が、BRAF V450E変異を有する犬前立腺癌に対して抗腫瘍効果を発揮しうるか明らかにすることである。RAF、MEKおよびERKの選択的阻害は、*in vitro*において犬前立腺癌細胞の増殖を抑制した。さらに、RAFおよびMEK阻害剤は*in vivo*において、重大な副作用を起こすことなく腫瘍の増大抑制または縮小効果をもたらした。この結果は、BRAF変異が犬前立腺癌細胞の増殖や生存に関わるドライバー変異であることを示唆するものであり、MAPK/ERKシグナル伝達経路の遮断は、犬前立腺癌の新たな分子標的治療法として有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬前立腺癌は悪性腫瘍であり早期に局所浸潤や遠隔転移を引き起こすが、著効を示す治療法が確立されていない。本研究では、BRAF変異を有する犬前立腺癌に対するMAPK/ERKシグナル伝達経路の遮断によって腫瘍の増殖を抑制することが明らかにし、犬前立腺癌の新たな全身治療法の可能性が提示できたものと考えられる。犬前立腺癌のみならず獣医領域において同様のBRAF変異を持つ移行上皮癌などの他の腫瘍に対して、また前立腺癌が自然発症するヒトに対しても有益な情報をもたらすことができるだろう。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify whether blockade of MAPK/ERK signaling pathway may exert anti-tumor effect on canine prostate cancer with BRAF V450E mutation. Selective inhibition of RAF, MEK and ERK, which compose the MAPK/ERK signaling pathway, suppressed the proliferation of canine prostate cancer cells *in vitro*. In addition, RAF and MEK inhibitors produced tumor growth inhibitory or contracting effects *in vivo* without causing severe side effects. These results suggest that the BRAF mutation is a driver mutation involved in the growth and survival of canine prostate cancer cells, and blockade of the MAPK/ERK signal transduction pathway may be a new molecular targeted therapy for canine prostate cancer.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：犬 前立腺癌 分子標的治療

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自然発症の前立腺癌はヒトと犬で認められる悪性腫瘍であり、犬においては膀胱や直腸などの周囲組織への局所浸潤性が強く、かつ肺や所属リンパ節、骨などに早期に遠隔転移を起こす。犬前立腺癌の治療は、外科療法、放射線療法、および化学療法等が実施されるが、放射線治療や抗ガン治療の有効性は乏しい。また、外科療法に関しても多くの症例で、術後早期に遠隔転移を引き起こしうる。前立腺癌に罹患した大部分の犬は極めて予後不良であり、局所あるいは転移性疾患のために死亡する。そのため、有効性が高く、有害な副作用が少ない新規の全身治療法の開発が求められている。

BRAF は、RAF タンパク質ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼであり、Mitogen-activated protein kinase(MAPK)/ERK 経路に参与する。MAPK/ERK 経路の活性化は、細胞の分裂・増殖、分化、血管新生およびアポトーシスなどに参与しており、腫瘍の発生と病態進行において重要な役割を果たしている。近年、BRAF を活性型に類似した構造に変化させる遺伝子変異の存在が明らかとなった。遺伝子変異によって構造変化した活性型 BRAF は MAPK/ERK 経路を活性化させ、異常な細胞増殖を惹起する。ヒトにおいて最も高頻度に発生する BRAF 変異は、BRAF のエクソン 15 内に存在するコドン 600 のチミン(T)がアデニン(A)に変わり、バリン(V)がグルタミン酸(E)に変わる点突然変異である(V600E 変異)。BRAF V600E 変異は、悪性黒色腫や甲状腺癌など種々の癌で、様々な頻度で発現していることが報告されている。近年、ヒトにおける BRAF V600E 変異に相当する変異が、犬の腫瘍においても発現していることが報告され、犬においてはコドン 450 のチミン(T)がアデニン(A)に変わり、バリン(V)がグルタミン酸(E)に変わる点突然変異が認められた(V450E 変異)。BRAF V450E 変異は、犬の移行上皮癌、末梢神経鞘腫、悪性黒色腫などにおいて見られるが、特に前立腺癌では 80%の症例で変異が存在することが明らかとなった。特定の腫瘍において高頻度に発生する変異 BRAF の存在は、分子標的治療のターゲットとして有用であると考えられており、腫瘍の新規治療法として、BRAF タンパク質を選択的に阻害する RAF 阻害剤が近年注目されている。BRAF V600E 変異を持つヒトの悪性黒色腫において、抗癌剤と比較し、RAF 阻害剤または BRAF の下流分子である MEK に対する阻害剤がより効果的との報告もある。BRAF 変異を持つ多くの腫瘍では、活性型 BRAF が異常な細胞増殖を誘導するキーファクターであることが上記のように明らかとなっているが、犬前立腺癌においては、BRAF 変異が高頻度で認められるにも関わらず、活性型 BRAF が腫瘍の発生や病態進行へどのように関与するか明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、以前に我々が樹立に成功している BRAF 変異を有する犬前立腺癌細胞株(CHP-1)および今回新たに樹立した犬前立腺癌細胞株(CHP-2)を用いて、RAF 阻害剤(Vemurafenib、GDC-0879)およびその下流の MEK 阻害剤(Trametinib)、ERK 阻害剤(SCH772984)に対する *in vitro* の細胞増殖抑制効果の有無について検討を行なった。さらに、犬前立腺癌細胞(CHP-2)を免疫不全マウス皮下に移植した後、RAF 阻害剤および MEK 阻害剤をそれぞれ経口投与し、*in vivo* 抗腫瘍活性の有無を明らかにし、その投与量について検討を行なった。

### 3. 研究の方法

#### 1) 犬前立腺癌の新規細胞株(CHP-2)の樹立

日本獣医生命科学大学付属動物医療センターにおいて前立腺癌と診断され、前立腺全摘出術を実施した症例から前立腺組織を採取し、10%牛胎子血清添加ダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地(DMEM)にて、37℃、5%CO<sub>2</sub>の湿潤条件下で初代分離培養および継代培養を行った。50回の継代後、免疫不全マウスの腰背部皮下に1匹あたり $1 \times 10^6$ 細胞を投与した。腫瘍形成を確認した後(接種後4週間)、病理組織学的検査のために腫瘍のサンプリングを行った。また、BRAF V450E 変異の有無を確認するために、摘出された前立腺組織ならびに継代培養された細胞から DNA または RNA を抽出し、PCR およびダイレクトシーケンス法によって、V450E 変異の有無について解析を行った。

#### 2) 犬前立腺癌細胞に対する RAF、MEK および ERK 阻害剤の細胞生存能の *in vitro* 評価

RAF や MEK 阻害剤による細胞の生存能とその毒性を評価するために、犬前立腺癌細胞株(CHP-1・CHP-2)に加え、BRAF V600E 変異の存在が確認されているヒトメラノーマ細胞株(A375)、BRAF 変異が存在しない犬腎臓尿管上皮細胞株(MDCK)または犬体幹皮膚由来表皮角化前駆細胞株(CPEK)を用い、RAF(Vemurafenib、GDC-0879)、MEK 阻害剤(Trametinib)および ERK 阻害剤(SCH772984)を0~10 $\mu$ Mの濃度になるように培地に添加し、48時間培養を行った。培養終了後、WST-1 cell proliferation assay kit (Takara)、マイクロプレートリーダーにより生細胞数を評価し、各細胞に対する50%細胞増殖抑制濃度(IC50)を、Prism 6(GraphPad Software)を用いて算出した。

#### 3) 犬前立腺癌細胞移植免疫不全マウスにおける RAF および MEK 阻害剤の *in vivo* 有効性評価

9週齢の免疫不全マウス(Balb/c-nu/nu)に対し、犬前立腺癌細胞 CHP-2 を  $1 \times 10^6$  細胞を腰背

部に皮下投与した。腫瘍形成後、RAF 阻害剤(GDC-0879)は 100 mg/kg の用量で 32 日間、MEK 阻害剤(Trametinib)は 0.3mg/kg または 1.0mg/kg の用量で 21 日間、胃ゾンデを用いてマウスに経口投与した。阻害剤の給与用量は既報告を参考に決定した。阻害剤非投与のコントロール群(Vehicle 投与群)には阻害剤の懸濁液に使用した溶媒を同量投与した。阻害剤投与群および Vehicle 投与群は、3~4 日に 1 回の腫瘍容積の測定とマウスの体重測定を実施した。最終投与後、病理組織学的検査のために腫瘍および諸臓器のサンプリングを実施した。それぞれの阻害剤の有効性を評価するため、unpaired t-test または Tukey 's multiple comparisons test を用い、Vehicle 投与群と阻害剤投与群の腫瘍容積を比較した。

#### 4 . 研究成果

##### 1) BRAF V450E 変異陽性新規犬前立腺癌細胞株(CHP-2)の樹立

継代培養後に免疫不全マウスに接種された前立腺癌細胞は、ほとんどのマウスで 1 週間後には腫瘍を形成しはじめ、肉眼的に確認することができるようになった。接種から 4 週後にサンプリングされた腫瘍の病理組織学的検査では、異型の強い癌細胞が増殖しており、摘出された前立腺組織の病理組織学的所見と一致していた。また、V450E 変異解析の結果、摘出された前立腺組織ならびに継代培養によって得られた細胞ともに BRAF V450E が発現していることが明らかとなった。以上の結果から、BRAF V450E 変異陽性の新規犬前立腺癌細胞株(CHP-2)の樹立に成功したと考えられる。以前に我々が樹立に成功していた CHP-1 細胞と比較し、in vivo における生着性および増殖性に優れており、以降の in vivo における各種阻害剤の有効性の検討には CHP-2 細胞を用いることにした。

##### 2) 犬前立腺癌細胞における RAF、MEK、ERK 阻害剤の細胞増殖抑制効果

BRAF V450E 変異陽性犬前立腺癌細胞株(CHP-1 および CHP-2)における RAF、MEK、および ERK 阻害剤の in vitro での抗腫瘍効果を明らかにするため、細胞増殖阻害試験を実施した。

RAF 阻害剤 Vemurafenib では、BRAF V600E 変異を有する A375 細胞において 100nM 添加条件で生存細胞数の減少が認められ、IC50 は 646nM であった。一方、BRAF 変異の発現がない MDCK 細胞では、本研究の阻害剤添加濃度の範囲(0~10 $\mu$ M)では明らかな生存細胞数の減少は認められなかった。CHP-1 および CHP-2 細胞はともに 1 $\mu$ M 添加条件で生存細胞数の減少が認められたものの、10 $\mu$ M 添加条件でも阻害剤未添加と比較して約 30%の減少にとどまり(推定される IC50 はそれぞれ 163 $\mu$ M および 81 $\mu$ M)、腫瘍の増殖抑制にはより高濃度の阻害剤暴露が必要であると推察された。

RAF 阻害剤 GDC-0879 では、A375 細胞において 10nM 添加条件で、MDCK 細胞では 1 $\mu$ M 添加条件で生存細胞数の減少が認められ、IC50 は A375 で 160nM、MDCK で 4 $\mu$ M であった。CHP-1 および CHP-2 細胞ではともに 10nM 添加条件で生存細胞数減少が観察され、IC50 はそれぞれ 841nM および 921nM であった。したがって、GDC-0879 は Vemurafenib と比較し、細胞毒性はやや強いものの、より低濃度で犬前立腺癌細胞の増殖を抑制できるものと考えられた。

MEK 阻害剤 Trametinib では、A375、CHP-1 および CHP-2 細胞において、0.1~1nM 添加条件で生存細胞数の減少が認められ、IC50 はそれぞれ 2nM、19nM および 8nM であった。一方、BRAF 変異の発現がない COPK 細胞では、本研究の阻害剤添加濃度の範囲では明らかな生存細胞数の減少は認められなかった。以上の結果から、Trametinib は細胞毒性が弱く低濃度で犬前立腺癌細胞の増殖を抑制することがわかった。

ERK 阻害剤 SCH772984 では、A375 細胞において 10nM 添加条件で、CHP-1 および CHP-2 細胞では 10~100nM 添加条件で生存細胞数の減少が認められ、IC50 は A375 で 96nM、CHP-1 で 201nM、CHP-2 で 435nM であった。一方、COPK 細胞は 100nM 添加条件で生存細胞数の減少が観察され、IC50 は 4 $\mu$ M であった。したがって、SCH772984 は細胞に対し毒性をある程度有するものの、低濃度で犬前立腺癌細胞の増殖を抑制することが可能であると考えられた。

##### 3) 犬前立腺癌細胞移植免疫不全マウスにおける RAF および MEK 阻害剤の腫瘍増殖抑制効果

犬前立腺癌細胞に対して in vivo で抗腫瘍効果が得られた RAF 阻害剤 GDC-0879 および MEK 阻害剤 Trametinib を、犬前立腺癌細胞移植マウスに経口投与を行い、in vivo においても抗腫瘍効果が得られるかどうか検討を行った。

結果として、GDC-0879 投与群では Vehicle 投与群と比較して、投与開始 4 日目より腫瘍の増殖速度に差がみられるようになり(p<0.05)、最終投与日(投与 32 日目)の阻害剤投与群の腫瘍容積は、Vehicle 投与群のその 65%程度となり、阻害剤の投与によって腫瘍の増殖が抑制されることがわかった(p<0.05)。しかし、投与期間中、阻害剤投与群の腫瘍容積は、Vehicle 投与群と同様に増大し続けていたことから、腫瘍の縮小効果は不十分であるものと考えられた(図 1A)。

Trametinib 投与群では Vehicle 投与群と比較して、投与開始 3 日目には明らかに腫瘍の増殖速度に差が認められ(p<0.05)、最終投与日(投与 21 日目)の阻害剤投与群の腫瘍容積は、MEK 阻害剤 0.3mg/kg 投与群では Vehicle 投与群の 23%程度(p<0.001)、1.0mg/kg 投与群では 15%程度

( $p < 0.001$ )に縮小した。また、Trametinib 0.3mg/kg 投与群と 1.0mg/kg 投与群の比較により、腫瘍容積の縮小は Trametinib の用量に依存して起こることもわかった ( $p < 0.05$ ) (図 1B)。また、本研究で用いた 2 種の阻害剤の経口投与による重篤な副作用は、上記の用量では生じなかった。

本研究では、細胞増殖シグナル伝達経路である MAPK/ERK 経路を構成する RAF、MEK および ERK を *in vitro* において選択的に阻害することにより、BRAF 変異陽性の犬前立腺癌細胞の増殖が抑制されることを明らかにした。以上の結果は、BRAF 変異が犬前立腺癌細胞の増殖や生存に深く関わるドライバー変異であることを強く示唆するものである。さらに、RAF 阻害剤 GDC-0879 や MEK 阻害剤 Trametinib は *in vivo* において、腫瘍の増大抑制や縮小効果をもたらした。これらの阻害剤は未だ著効を示す治療が確立されていない犬前立腺癌の新たな分子標的治療薬として有用となる可能性があると考えられる。

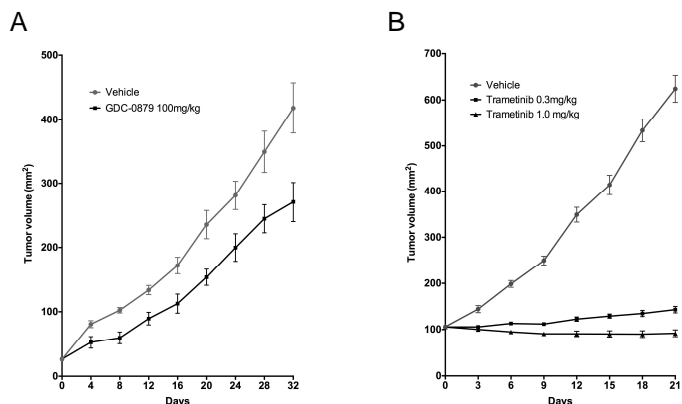


図 1 犬前立腺癌細胞移植マウスにおける GDC-0879(A) および Trametinib(B) 投与による腫瘍容積の変化

本研究で用いた 2 種の阻害剤の経口投与による重篤な副作用は、上記の用量では生じなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 KOBAYASHI Masanori, SAITO Akiko, TANAKA Yoshikazu, MICHISHITA Masaki, KOBAYASHI Masato, IRIMAJIRI Mami, KANEDA Takeharu, OCHIAI Kazuhiko, BONKOBARA Makoto, TAKAHASHI Kimimasa, HORI Tatsuya, KAWAKAMI Eiichi	4. 巻 79
2. 論文標題 MicroRNA expression profiling in canine prostate cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 719 ~ 725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.16-0279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 HORI Tatsuya, Masuda Taku, KOBAYASHI Masanori, KAWAKAMI Eiichi	4. 巻 52
2. 論文標題 Role of prostatic fluid in cooled canine epididymal sperm	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Reproduction in Domestic Animals	6. 最初と最後の頁 655 ~ 660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/rda.12963	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 KOBAYASHI Masanori, HORI Tatsuya, KAWAKAMI Eiichi	4. 巻 80
2. 論文標題 Therapeutic effects of oral clomiphene citrate in 2 dogs with low plasma testosterone levels and poor semen quality	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1233 ~ 1235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.18-0108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林正典
2. 発表標題 犬前立腺癌細胞株に対するMEK阻害剤 およびRAF/MEK阻害剤の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林正典
2. 発表標題 犬前立腺癌細胞株CHP-1細胞に対するBRAF阻害剤の有効性に関する研究
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林正典
2. 発表標題 新規の犬前立腺癌細胞株CHP-2に対するRAF阻害剤GDC-0879の抗腫瘍活性
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
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