

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：87102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16852

研究課題名(和文) マイクロサテライト安定性に基づくBRAFV600E変異陽性大腸がんの治療開発

研究課題名(英文) Classification of BRAF V600E mutated colorectal cancer based on microsatellite stability

研究代表者

中野 倫孝 (Nakano, Michitaka)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・消化管・腫瘍内科医師

研究者番号：30839478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は予後不良であるBRAFV600E変異陽性(BRAF-mt)大腸がんを免疫プロファイリングに基づき分類し、新たな治療標的を探索することを目的としている。TCGA・GEOなどのデータベースを用いて、それぞれに特徴的な遺伝子群を同定した。さらに、九州がんセンターにおいて臨床情報に紐づけられたコホート(37症例)において網羅的遺伝子発現を測定し同様の結果をえた。これらの結果から、BRAF変異陽性大腸がんにおいて、免疫チェックポイント阻害薬に対する奏効群を抽出し、さらに非奏効群における最適な治療選択候補を探索することができるため、同患者群における個別化医療の推進が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は予後不良であるBRAFV600E変異陽性(BRAF-mt)大腸がんを免疫プロファイリングに基づき分類し、新たな治療標的を探索することを目的としている。BRAF変異陽性大腸がんにおいて、免疫チェックポイント阻害薬に対する奏効群を抽出し、さらに非奏効群における最適な治療選択候補を探索することができるため、同患者群における個別化医療の推進が期待される。

研究成果の概要(英文)：The study aims to stratify BRAF V600E mutated colorectal cancer which shows dismal prognosis by classifying them with immunogenicity. Particularly, discovering therapeutic targets in microsatellite stable (MSS) tumor which is known to be less responsive to microsatellite instability high (MSI-H) is crucial for the personalized cancer therapy. We identified specific gene expression profiles on each of the subgroup by using 2 cohort build through TCGA and GEO database. Furthermore, nCounter gene expression panel analysis in our cohort with clinical data shows consistent data. These results will stratify the responder to checkpoint blockade in BRAF V600E mutated colorectal cancer, and discover the optimal therapeutic targets for low immunogenic BRAF V600E colorectal cancer.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：BRAF MSI colorectal cancer immune checkpoint

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

切除不能進行・再発大腸がんに対する遺伝子変異に応じた個別化医療において、RAS・BRAF などの遺伝子変異を標的とした分子標的薬に加えて、マイクロサテライト安定性に応じた免疫チェックポイント阻害薬の有効性が示され、大腸がんの薬物療法は今後さらに詳細に層別化されていくことが想定される。BRAfV600E 変異陽性 (BRAf-mt) 大腸がんは予後不良な患者群であるが、生物学的には多様な患者集団であり、特異的な生物学的特徴を示す高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-H) とマイクロサテライト安定性 (MSS) 大腸がんの2群がほぼ同じ割合で存在していることが報告されている。MSI-H BRAf-mt 大腸がんにおいては、豊富な腫瘍浸潤リンパ球が存在するため、これらを標的とした免疫チェックポイント阻害薬は今後の治療選択肢として有望である一方で、BRAf 野生型 MSI-H との比較検討は充分なされていなかった。さらに、MSS BRAf-mt 大腸がんがどのような免疫プロファイルを有し免疫反応性があるか十分に明らかでなかった。

## 2. 研究の目的

MSI-H および MSS BRAf 変異大腸がんに対する有効な治療標的は何か、という学術的な「問い」に対して、免疫プロファイルに基づく分類により有効な治療標的を探索することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 網羅的な遺伝子発現解析による治療標的のスクリーニング

公開されている後述のデータベースを統合して解析ソフト Gene Spring (Agilent technologies) を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行なった。TCGA, PETACC-3, GSE39582, GSE35896, GSE75317、これらの計 2002 例のうちで遺伝子変異情報の明らかかな症例の中から、2つのコホートを作成した (コホート 1: BRAf 変異 MSI-H n=111, BRAf 変異 MSS n=80、コホート 2: BRAf 変異 MSI-H n=37, BRAf 変異 MSS n=22)。得られた遺伝子発現情報を適切な手法を用いて標準化し、各群特異的な遺伝子発現プロファイルを同定し、新規治療標的候補とした。パスウェイ解析、Gene Ontology 解析、クラスタリング解析などにより、各群を特徴付ける生物学的意味合いを検討した。

### ヒト大腸がん組織における標的分子の発現の検証

当院で 2012 年-2021 年に診療した 800 例を超える切除不能大腸がん検体の中で、BRAfV600E 遺伝子変異を有するサンプルを、Real-time PCR(Extended RAS, riken genesis)および RASKET-B キットでスクリーニングし、約 40 例の BRAf-mt 大腸がん (MSI-H/MSS) FFPE ブロックをえた。これらにおける遺伝子発現を細胞障害性 T 細胞およびマクロファージなど免疫細胞に関する約 780 プローブを持つ nCounter PanCancer IO360 panel を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

##### 免疫プロファイルに基づく BRAF 変異陽性大腸がんの分類

TCGA・GEO などのデータベースを用いて網羅的遺伝子発現データに紐づいた最大規模の BRAF 変異陽性大腸がんのコホートを作成した（コホート 1：BRAF 変異 MSI-H n=111, BRAF 変異 MSS n=80、コホート 2：BRAF 変異 MSI-H n=37, BRAF 変異 MSS n=22）。クラスタリング解析、パスウェイ解析を用いて①MSI-H BRAF 変異陽性大腸がんも一般的な MSI-H 同様に高い免疫反応性をもつことが示唆された。さらに、概して免疫反応性の低いとされる②MSS BRAF 変異陽性大腸がんにおいても高い免疫原性を有する患者群が存在することや、③MSS BRAF 変異陽性大腸がんにおいて TGF-beta シグナルや Wnt シグナルなどの潜在的に免疫反応性を高める治療標的があることを明らかにした。（図 1）

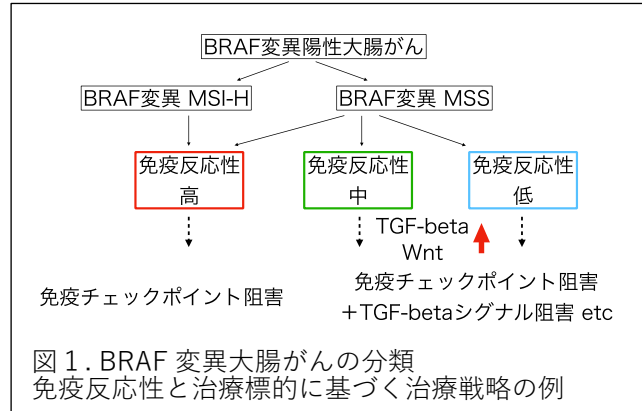


図 1. BRAF 変異大腸がんの分類  
免疫反応性と治療標的に基づく治療戦略の例

実際に、九州がんセンターで 2018 年 3 月から 2022 年 8 月にかけて診療した切除不能 BRAF 変異陽性大腸がん患者 25 例において、BRAF 変異 MSI-H 3 例, BRAF 変異 MSS 22 例の生存期間を比較したところ明らかに BRAF 変異 MSI-H の予後が良好であった。また興味深いことに BRAF 変異 MSI-H 症例における免疫チェックポイント阻害薬の治療効果は、一次治療無病増悪生存期間 18 ヶ月と極めて良好な治療効果であった。（図 2）これらのことから、BRAF 変異陽性大腸がんは、治療選択を決定する要因である MSI /MSS に分類した理解が必要であることが明らかとなった。

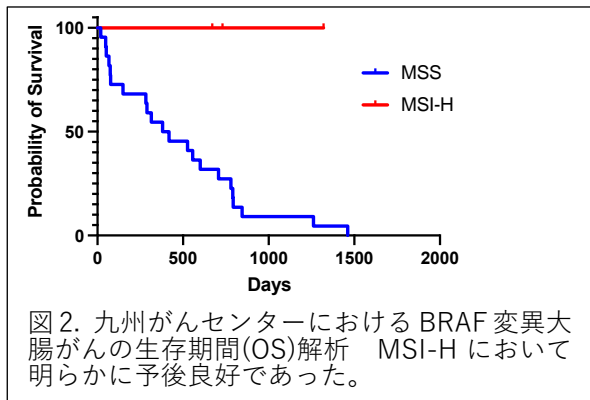


図 2. 九州がんセンターにおける BRAF 変異大腸がんの生存期間(OS)解析 MSI-H において明らかに予後良好であった。

##### BRAF 変異陽性大腸がんにおける新たな治療選択肢の探索

当院データでも予後不良であることが示された BRAF 変異陽性 MSS 大腸がんにおいて治療標的の探索を目的として NanoString 社 nCounter を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。nCounter は FFPE など保存検体からの微量な遺伝子発現の定量に有効性が示されており、研究分担者（九州大学プレジジョン医学、宮脇恒太）が解析を担当した。興味深いことに、MSI-H BRAF 変異陽性大腸がんも一般的な MSI-H 同様に高い細胞障害性 T 細胞マーカー（GZMA GZMB PRF1）の発現を認め、大規模コホートにお

るデータと矛盾ないことが確認された。さらに、MSS 大腸がんにおいてもやはり中等度の免疫反応性が示唆される患者群が存在することが明らかとなった (図 3)。また得られた知見を基にサンプル数を増やして、免疫細胞の位置から推測される細胞相互作用を把握するために、CODEX を用いた多重染色による空間的解析を予定している。それに向けて研究分担者 (九州がんセンター病理部、田口健一) が BRAF 大腸がん 35 症例を蓄積し、解析予定である。これらはいずれも、臨床データと紐づいた希少な BRAF 変異陽性大腸がんの研究であり今後の治療選択において重要な示唆的なデータとなる。

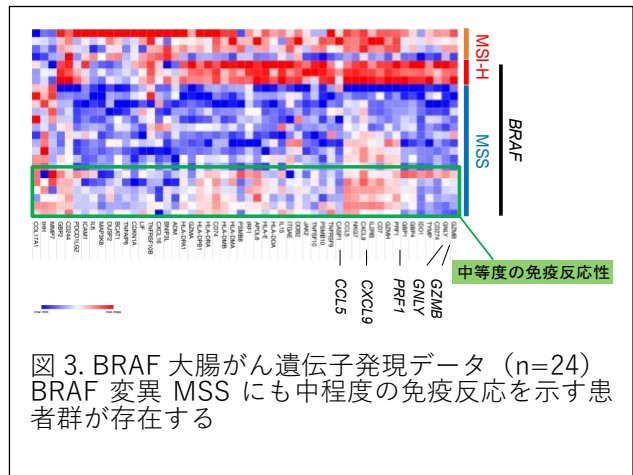


図 3. BRAF 大腸がん遺伝子発現データ (n=24) BRAF 変異 MSS にも中程度の免疫反応を示す患者群が存在する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakano M, Taguchi R, Kikushige Y, Isobe T, Miyawaki K, Mizuno S, Tsuruta N, Hanamura F, Yamaguchi K, Ariyama H, Kusaba H, Nakamura M, Maeda T, Kuo CJ, Akashi K	4. 巻 -
2. 論文標題 RHAMM marks proliferative subpopulation of human colorectal cancer stem cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15795	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 該当する

1. 著者名 Ito M, Nakano M, Ariyama H, Yamaguchi K, Tanaka R, Semba Y, Sugio T, Miyawaki K, Kikushige Y, Mizuno S, Isobe T, Tanoue K, Taguchi R, Ueno S, Kawano T, Murata M, Baba E, Akashi K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Macrophages are primed to transdifferentiate into fibroblasts in malignant ascites and pleural effusions.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2022.215597	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Michitaka Nakano, Kosuke Sagara, Sakuya Koreishi, Tomomi Aikawa, Tomohiro Nishijima, Kotoe Takayoshi, Masato Komoda, Eishi Baba, Taito Esaki
2. 発表標題 Classification of BRAF V600E mutated colorectal cancer based on microsatellite stability
3. 学会等名 ASCO-GI（国際学会）
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
研究協力者	宮脇 恒太  (Miyawaki Kohta)	九州大学・プレジジョン医療学・助教  (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	田口 健一  (Taguchi Kenichi)	九州がんセンター 臨床研修センター・病理診断科・部長  (87102)	

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		
米国	スタンフォード大学 医学部		