

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08893

研究課題名(和文) BRAF non-V600E変異陽性肺癌に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutics strategies for lung cancer harboring BRAF non-V600E mutations

研究代表者

湯川 拓郎 (Yukawa, Takuro)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：80388975

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)：BRAFは、EGFR、ALK、ROS1fusion、RET fusionなどと同様に肺癌の重要なドライバー遺伝子である。最も多いBRAF変異はV600E(41%)であるが、K601E、D594G、G469Aなど他のnon-V600E変異も多く検出されている。non-V600E変異は、さらに野生型BRAFと二量体を形成し、下流シグナルを活性化できる活性中間型、そして野生型CRAFと二量体を形成し、弱い活性を誘導する不活化型に大別される。本研究成果から、BRAF阻害剤とMEK阻害剤、またEGFR阻害剤との併用は上記non-V600E変異を持つ肺腺癌に高腫瘍効果を誘導できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオマーカーに基づいた患者選択いわゆるPrecision Medicineが現実化し、EGFR変異、ALK転座、ROS1転座およびBRAF変異に対する分子標的薬は、肺癌患者の予後を着実に延長している。BRAF変異は多種の癌に認められるが、有効な治療法開発はこれまでV600E変異を中心に進められてきた。これまでの研究成果から、肺癌は他の癌に比べnon-V600E変異が多く認められることが示されている。本研究は、活性中間型、そして不活型non-V600E変異を持つ肺癌に対する新規治療法開発の糸口を提示しており、その学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：BRAF is an important driver gene for lung cancer, as are EGFR, ALK, ROS1fusion, and RET fusion. The most common BRAF mutation is V600E (41%), but other non-V600E mutations such as K601E, D594G, and G469A are also frequently detected. Non-V600E mutations can be further classified into an intermediate type that forms a dimer with wild-type BRAF and can activate downstream signals, and an impaired type that forms a dimer with wild-type CRAF and induces weak activity.

The results of our study indicated that BRAF inhibitors in combination with MEK inhibitors and EGFR inhibitors may induce a high tumor effect in lung adenocarcinomas with the above non-V600E mutation.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 分子標的療法 BRAF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1: BRAF は、EGFR、ALK、ROS1 と同様に肺癌の重要なドライバー遺伝子である。また、BRAF 変異は肺癌のみならず、悪性黒色腫や大腸癌など様々な悪性腫瘍で起こることが知られており、BRAF の 600 番目のアミノ酸であるバリニン (V) がグルタミン酸 (E) に置換される BRAF V600E 変異のある悪性黒色腫には既に BRAF 阻害剤: ベムラフェニブが承認されている。肺癌においても BRAF V600E 陽性例に対して、BRAF 阻害剤: ダブラフェニブと MEK 阻害剤: トラメチニブ併用療法の有効性が報告され、2018 年 3 月に我が国でも承認されている。LC-SCRUM-Japan の報告から、EGFR 変異が陰性の非扁平上皮非小細胞肺癌における BRAF 変異は 5% であり、他のドライバー変異と相互排他性が認められている。最も多い変異は V600E (41%) であるが、K601E、D594G、G469A など他の変異も多く検出されている (日本肺癌学会 肺癌患者における BRAF 遺伝子変異検査の手引き第 1.0 版、図 1)。これらの non-V600E 変異を持つ肺癌に対する標的治療法は未確立であり、現在世界でおよそ 4 万人以上が死亡している (Lin et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 111: E748-57. 2014)。

## 2. 研究の目的

BRAF 遺伝子変異は、悪性黒色腫や大腸癌、肺癌などの様々な癌種に起こることが知られている。これらの変異は、BRAF タンパク質の activation loop (A-loop) をコードするコドン 599 ~ 602 と、phosphate binding loop (P-loop) をコードするコドン 464 ~ 469 の周辺に集中している。悪性黒色腫では殆どが V600E 変異であるのに対し、肺癌では 4 割に過ぎず、多くは non-V600E 変異が占めている。V600E 変異は BRAF キナーゼを活性化し、下流シグナルである ERK の活性化により悪性細胞への形質転換を誘導する。一方、non-V600E 変異における増殖シグナルは未だ分からないことが多い中、現在一部の変異においては、キナーゼ活性を持つことが明らかになってきた。BRAF non-V600E 変異に対する分子標的治療法は確立されていないが、これらの変異の中には高いキナーゼ活性を持つものがあり、種類によっては、non-V600E 変異に対して有効な治療法開発ができる可能性がある。そこで本研究において、BRAF non-V600E 変異への有効な抗腫瘍効果の誘導法を明らかにし、新しい治療法開発のための基礎検討を行った。

## 3. 研究の方法

1. 活性中間型および不活化型 non-V600E 変異を持つ肺癌に対する BRAF 阻害剤および MEK 阻害剤の有効性の検討  
2 種の BRAF 阻害剤: ベムラフェニブ、エンコラフェニブ、そして MEK 阻害剤: トラメチニブ、ビニメチニブを用い、活性中間型および不活化型に対する治療有効性の評価を行った。活性中間型 BRAF G469A を持つ肺腺癌株: H1395、H1775、そして不活化型 BRAF G466V を持つ肺腺癌株: H1666 に対し上記標的薬を投与し 72 時間後の cell viability を細胞内 ATP の定療法を用いて測定した。
2. 他種 MEK 阻害剤による治療有効性の評価  
阻害剤の種類を増やし、上記細胞株における抗腫瘍生の追加検討を行った。
3. BRAF 阻害剤および MEK 阻害剤さらに EGFR 阻害剤との併用効果の検討。  
BRAF 阻害剤:エンコラフェニブと MEK 阻害剤: トラメチニブ、さらに BRAF 阻害剤:エンコラフェニブと EGFR 阻害剤との併用効果を、検討項目 1 と同様の方法で解析した。

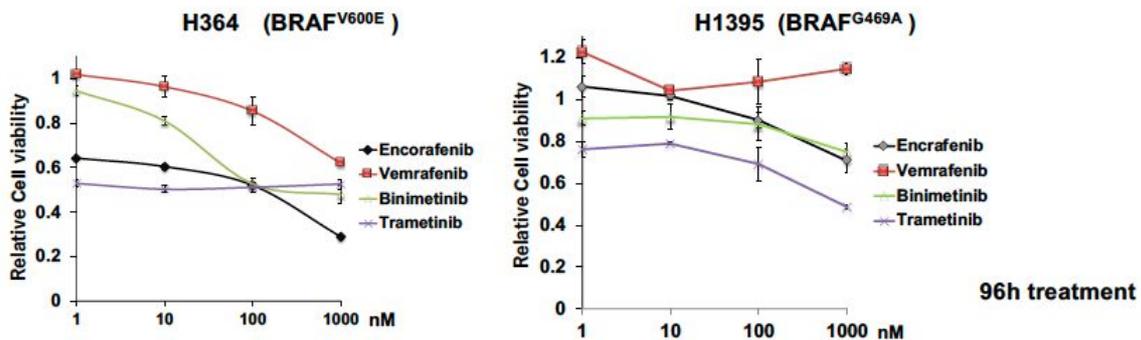
4. 患者由来オルガノイドを用いた併用効果の検証

BRAF G469A を持つ患者由来肺腺癌オルガノイド PDT-LUAD#5 を用いて、上記併用効果の検討を行った。

4. 研究成果

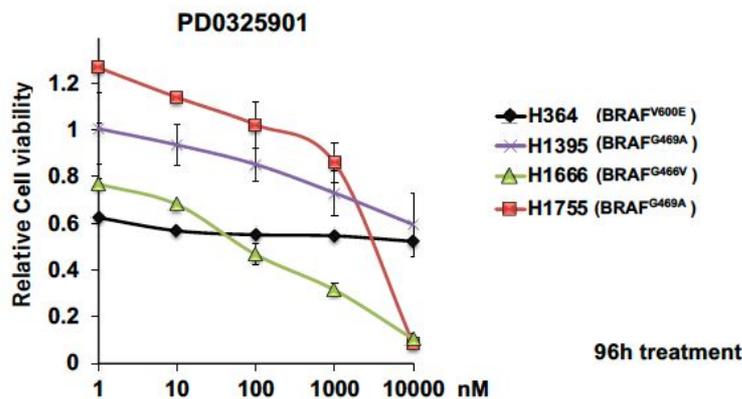
1) BRAF non-V600E 変異肺癌に対する BRAF 阻害剤および MEK 阻害剤の有効性の検討

BRAF non-V600E 変異 (G469: 活性中間型) を有する肺癌株 H1395 は、BRAF 阻害剤：ベムラフェニブ、エンコラフェニブおよび MEK 阻害剤：ビニメチニブに対して、BRAF V600E 変異を持つ H364 に比して、低感受性であった。

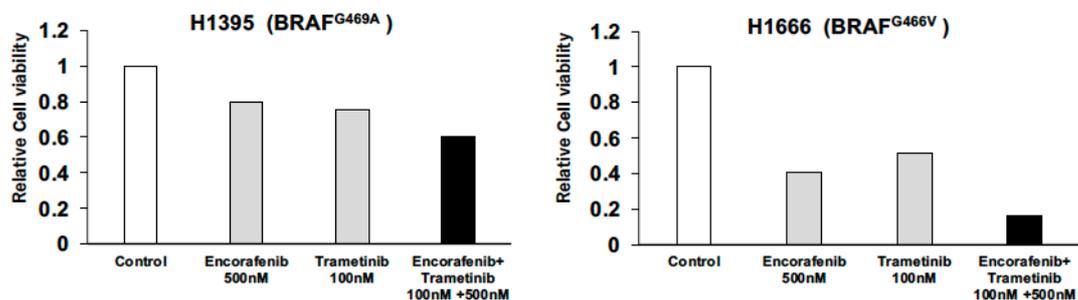


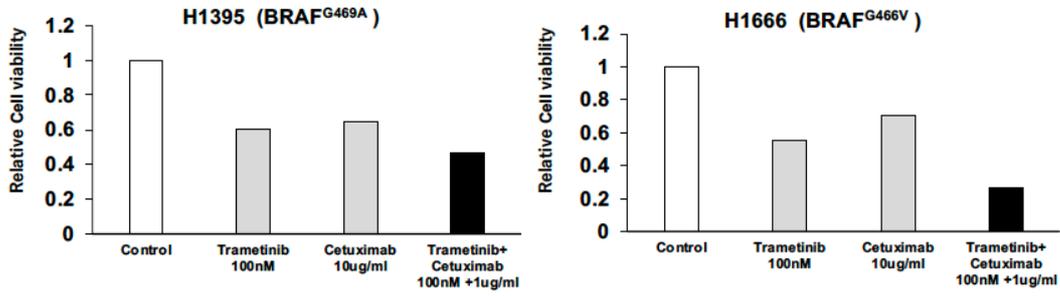
2) MEK 阻害剤 PD0325901 の効果の検討

単剤投与における追加の検討において、MEK 阻害剤:PD0325901 は BRAF non-V600E 変異 (G466V: 不活化型) を有する肺腺癌株 : H1666 に対して抗腫瘍効果を誘導することができた。



3) BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤、EGFR 阻害剤との併用効果の検討



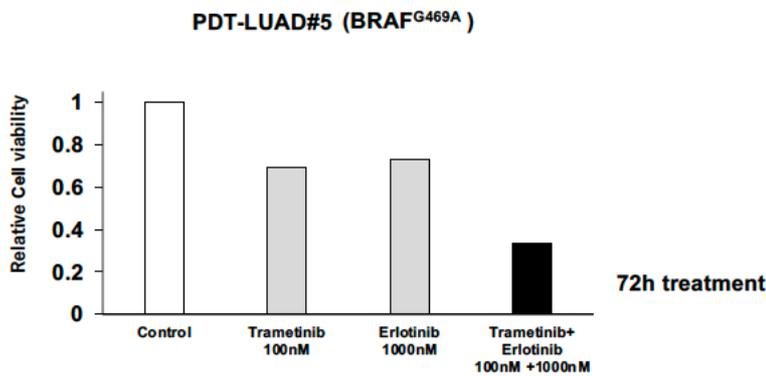


72h treatment

BRAF 阻害剤:エンコラフェニブと MEK 阻害剤:トラメチニブの併用は、BRAF non-V600E 変異 (G466V: 不活化型) を有する肺腺癌株 : H1666 に対し、それぞれの単独より強い抗腫瘍効果を誘導した。またトラメチニブと EGFR 阻害剤: セツキシマブの併用は BRAF non-V600E 変異 (G469: 活性中間型) を有する肺癌株 H1395 および H1666 に対し、併用効果を誘導した。

4) 患者由来オルガノイドを用いた併用効果の検証

BRAF G469A を持つ患者由来肺腺癌オルガノイド PDT-LUAD#5 において MEK 阻害剤: トラメチニブと EGFR 阻害剤: エルロチニブは、併用にて単独よりも有効な抗腫瘍効果を誘導した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Yokota E, Iwai M, Yukawa T, Yoshida M, Naomoto Y, Haisa M, Monobe Y, Takigawa N, Guo M, Maeda Y, Fukazawa T, Yamatsuji T	4. 巻 5
2. 論文標題 Clinical application of a lung cancer organoid (tumoroid) culture system.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ Precis Oncol	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41698-021-00166-3.	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深澤拓也, 横田悦子, 岩井美樹, 湯川拓郎, 羽井佐実, 瀧川奈義夫, 物部泰昌, 吉田将和, 前田豊, Minzhe Guo, 猶本良夫.
2. 発表標題 個別化医療のための切除肺癌組織由来オルガノイドの作製肺癌.
3. 学会等名 第38回 日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤拓也, 横田悦子, 岩井美樹, 湯川拓郎, 吉田将和, 羽井佐実, 瀧川奈義夫, 猶本良夫, 前田豊, Minzhe Guo, 山辻知樹
2. 発表標題 肺癌オルガノイド培養システムの確立とその臨床応用.
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤拓也, 横田悦子, 岩井美樹, 石田雄大, 湯川拓郎, 吉田将和, 羽井佐実, 瀧川奈義夫, 物部泰昌, 前田豊, Minzhe Guo, 山辻知樹
2. 発表標題 肺癌オルガノイド樹立におけるFISH法を用いた核型解析の有用性
3. 学会等名 第62回 日本肺癌学会学術総会
4. 発表年 2021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	猶本 良夫  (Naomoto Yoshio)  (00237190)	川崎医科大学・医学部・教授   (35303)	
研究 分担者	深澤 拓也  (Fukazawa Takuya)  (20379845)	川崎医科大学・医学部・准教授   (35303)	

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