

BRAF V600E 変異陽性大腸癌オルガノイドを用いたEGFR、 BRAF及びMAPK阻害の耐性に関わるバイオマーカーの解明

がん研有明病院 消化器化学療法科

副医長 大隅 寛木

(共同研究者)

がん研有明病院 消化器化学療法科

副部長 篠崎 英司

がん研有明病院 消化器化学療法科

医長 大木 暁

がん研究所 細胞生物部

部長 八尾 良司

はじめに

BRAF V600E 変異陽性大腸癌は大腸癌全体の5-10%程度の頻度であり、通常の標準化学療法では1次治療、2次治療の無増悪生存期間（PFS）中央値がそれぞれ約6ヶ月、約3ヶ月と治療効果が乏しく予後が著しく不良の集団である（Van Cutsem E, *J Clin Oncol* 2011⁽¹⁾）。また *BRAF* V600E 野生型大腸癌と比較し、女性、右側結腸原発、低分化型、深達度T4、リンパ節転移、腹膜播種及び高頻度マイクロサテライト不安定性を有する症例が多い等の臨床病理学的特徴を有する（Morris V, *Clin Colorectal Cancer* 2014⁽²⁾, Venderbosch S, *Clin Cancer Res* 2014⁽³⁾, Osumi H, *IJC* 2019⁽⁴⁾）。*BRAF* 阻害薬及びMEK阻害薬の登場により、*BRAF* V600E 変異を有する悪性黒色腫の治療は長足の進歩を遂げた。一方で同じ点突然変異を有する転移再発大腸癌においては、*BRAF* 阻害薬単剤では治療効果が乏しい（Kopetz S, *J Clin Oncol* 2015⁽⁵⁾）。前臨床のデータにおいて *BRAF* V600E 変異陽性大腸癌に対する *BRAF* 阻害薬への内因性の耐性メカニズムが同定され、*BRAF* V600E 変異陽性大腸癌に対して *BRAF* 阻害薬とEGFR阻害薬の併用投与が必要であ

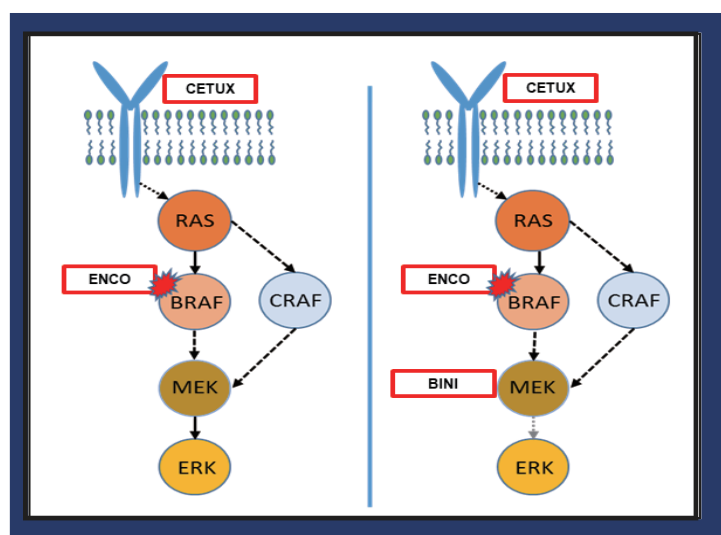


図1 MAPKシグナルに異常を認める腫瘍に対する分子標的治療
*BRAF*V600E変異陽性大腸癌に対して *BRAF* 阻害薬単剤では効果が乏しい。理由として、*CRAF*を介した下流へのシグナル伝達や、*ERK*から生じているnegative feedbackが減弱し、*EGFR*から *RAS*へのシグナル伝達が亢進することが考えられている。そこで、*EGFR*阻害薬またはMEK阻害薬を *BRAF* 阻害薬と併用することで、より治療効果を高める試みがなされ、併用療法が現在の標準治療となっている。

るという仮説が導き出された（図1）。第I相及び第II相試験において、転移再発大腸癌に対しBRAF阻害薬とEGFR阻害薬の併用療法とさらにMEK阻害薬もしくはPI3KCA阻害薬を併用した3剤併用療法を行う事で治療成績が向上した（Corcoran RB, J Clin Oncol 2015; Corcoran RB, Cancer Discov 2018^(6, 7):図1）。これらの結果を受け、1レジメンもしくは2レジメンの治療後に病勢が進行した *BRAF* V600E 変異陽性大腸癌患者に対する、Encorafenib: BRAF阻害薬、Binimetinib: MEK阻害薬及びCetuximab: EGFR阻害薬の3剤併用療法群（BRAF、MEK及びEGFR阻害薬）対2剤併用療法群（BRAF及びEGFR阻害薬）対標準治療群（EGFR阻害薬及び化学療法）を比較する第III相試験（BEACON CRC）試験が行われ、標準治療群に対する2剤併用療法と3剤併用療法双方の有効性が示された（Kopetz S, *NEJM* 2019⁽⁸⁾）。一方で、第III相試験の結果では3剤併用療法は疲労や貧血といった有害事象が高率であり、2剤併用療法と3剤併用療法の治療効果はほぼ同等であった。この結果を基にアメリカ食品医薬品局において2剤併用療法が *BRAF* V600E 変異陽性切除不能・進行再発大腸癌の2次化学療法として承認を受けている。

問題点:

2剤併用療法及び3剤併用療法を行った群においてもPFS及び全生存期間（OS）が *BRAF* V600E 変異陰性大腸癌に比較し、不良（PFS 約4ヶ月、OS 約9ヶ月）であり、さらなる治療成績の向上が期待されている。*BRAF* V600E 変異陽性大腸癌は、大腸癌でコンセンサスを得た特定の分子サブタイプで頻度が高く、さらにBRAF阻害薬とEGFR阻害薬の併用療法に対する獲得耐性機序として、*EGFR*、*KRAS*、及び *BRAF* V600E の増幅、ならびに *KRAS*、*EGFR*、及び *MAP2K1* の獲得変異が関与していることが報告されている（Corcoran R, *Cancer Disc* 2018⁽⁷⁾）。これらは、腫瘍内-腫瘍間ヘテロ不均一性とクローン進化の双方が、2剤及び3剤併用療法の治療効果に影響を与える潜在的な要因であることを示している。

解決方策:

治療効果を予測するバイオマーカーの探索及び2剤及び3剤併用療法の耐性機序の解明を目指すことは、有害事象を低減させ、治療成績をより向上させるために重要であると考えられる。またそれらのバイオマーカーは、HER2またはSRC阻害薬などに代表される耐性を克服する可能性のある新規併用療法の同定や、2剤及び3剤併用療法の層別化に役立つ可能性がある。

先行研究との比較:

BRAF V600E 変異陽性大腸癌に対する2剤及び3剤併用療法の耐性機序は明らかでなく報告は少ない。また検討の多くは2次元培養細胞を用いた検討であり、3次元培養のオルガノイドを用いた検討も少数である。我々は腫瘍内-腫瘍間ヘテロ不均一性とクローン進化の双方が、2剤及び3剤併用療法の治療効果に影響を与える潜在的な要因と考えており、従来

の2次元培養細胞または患者腫瘍移植マウスモデルを用いた検討では、特に腫瘍内-腫瘍間ヘテロ不均一性の評価が不十分になることが考えられる。患者腫瘍由来の癌オルガノイドは、もとの腫瘍の性質を高度に維持した3次元培養システムであり、腫瘍内-腫瘍間ヘテロ不均一性の評価に十分に耐えうると考えられる(図2)。

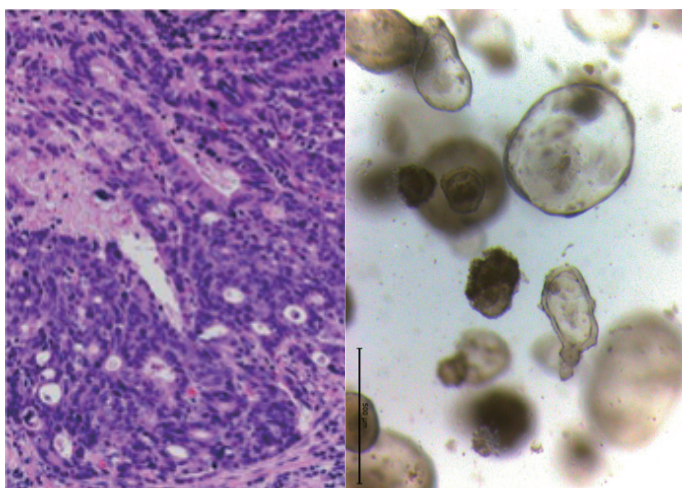


図2 大腸癌組織由来のオルガノイドと原発腫瘍のHE染色像
オルガノイドは3次元構造として育てられた培養細胞を指し、1つの幹細胞から生体内の組織に似た構造を培養皿の中で作り出すことが可能である。様々な組織の幹細胞を無限に増やすことが可能であり、がん研究において非常に注目を集めている技術である。

当該研究の位置付け、意義:

2020年4月にアメリカ食品医薬品局において *BRAF* V600E 変異陽性転移再発大腸癌に対する2次化学療法として *BRAF* 阻害薬と *EGFR* 阻害薬の2剤併用療法が承認を受け、欧州医薬品庁もこれに続き2剤併用療法の承認を得た。本邦では2剤と3剤併用療法双方が承認されており、また *BRAF* V600E 変異陽性大腸癌1次治療としての3剤併用療法の臨床試験が進行中である。今後も2剤と3剤併用療法の耐性機序及び最適化に関する議論が生じてくると考えられ、本研究はその疑問の解明に寄与する重要な検討になると考えられる。

研究のインパクト及び将来の見通し:

2剤併用療法及び3剤併用療法の耐性機序を特定することは *BRAF* V600E 変異陽性大腸癌患者のさらなる生存期間の延長に寄与すると考えられる。また分子標的薬の最適化は医療経済に貢献すると考えられる。

目 的

BRAF V600E 変異陽性大腸癌の2剤及び3剤併用療法に対する1次、2次耐性機序の解明、及び2剤及び3剤併用療法の2次耐性を克服する可能性のある新規併用療法の同定を目標とする。

方 法

1. *BRAF* V600E 変異陽性大腸癌より樹立したPDOを用いて検討を行う。またさらに複数の *BRAF* V600E 変異陽性大腸癌PDOを樹立する。

2. PDO樹立時に組織の腫瘍成分をヘマトキシリン・エオジン染色で確認を行う。*BRAF* V600E 変異は、サンガーシーケンスによって生殖系列DNAと比較することで評価する。変異の有無は実験開始前と実験終了後に評価を行い、継代培養や薬物治療がクローン進化や *BRAF* V600E 変異を含めた点突然変異の喪失、また新規インデルの獲得につながる可能性を確認する。
3. 薬効評価 (2剤及び3剤併用療法) は、Real-Glo^{MT}/ Cell Titer Glo Viability Assay を用いて生細胞を確認する。またIC50値に基づき、PDOを治療効果良好群と無効群に分類する。
4. 治療感受性群と無効群のPDOを用い、全エクソームシーケンス、遺伝子発現プロファイル (RNA シーケンス) 及びタンパク発現 (逆相タンパク質アレイ、免疫組織染色、ウェスタンブロッティング) を行い比較する。薬物応答の予測性の向上のため、薬効評価前後の検体でも比較を行う。
5. 治療効果の向上及び耐性を克服する併用薬剤を、治療前と治療後双方のPDOで同定されたゲノム異常と遺伝子/タンパク質発現プロファイルを元に推定する。

結 果 ・ 考 察

助成期間内に検討できた項目は1-3の一部であり、4、5に関しては現在検討中である。

1.に関してはまず、手術前の内視鏡検査検体を用いMEBGEN RASKETTM-Bキットを用い*RAS/BRAF*遺伝子変異検査を行い *BRAF* V600E 変異を同定した後に、その手術時の検体を用いて、PDOの作成を試みた。PDOの保存まで可能であった症例を培養成功例とし、既報を参考に3種類の培養液 (ENR/WENR/WENR-AS)* を用いて培養を行った。培養成功割合はそれぞれ、58.8% (10/17)、81.8% (9/11)、72.7% (8/11)であった (図3)。さらにサンガーシーケンスを用い *BRAF* V600E 変異を確認したところ *BRAF* V600E 変異陽性割合は、それぞれ80.0% (8/10)、88.8% (8/9)、62.5% (5/8)であった (図3)。WENR-ASでは通常正常粘膜からのPDO培養に用いる培養液であり、培養成功割合が高い一方で *BRAF* V600E 変異の変異陽性割合が低くなった要因と考えられた。以上より *BRAF* V600E PDOの最適な培養液はENRもしくはWENRと考えられ、一部Wintシグナルに依存している *BRAF* V600E PDOが存在する可能性が示唆された。

*ENR: Advanced DMEM/F12 medium, penicillin/streptomycin, HEPES, GlutaMAX, B27, gastrin I, N-acetylcysteine, mouse recombinant EGF, mouse recombinant noggin, human recombinant R-Spondin 1.

WENR: Advanced DMEM/F12 medium, penicillin/streptomycin, HEPES, GlutaMAX, B27, gastrin I, N-acetylcysteine, mouse recombinant EGF, mouse

recombinant noggin, human recombinant R-Spondin 1, Wnt3A

WENR-AS: Advanced DMEM/F12 medium, penicillin/streptomycin, HEPES, GlutaMAX, B27, gastrin I, N-acetylcysteine, mouse recombinant EGF, mouse recombinant noggin, human recombinant R-Spondin 1, Wnt3A, A83-01, SB202190

図3 培養成功例のBRAF V600E PDOとその組織検体のヘマトキシリン・エオジン染色の鏡検像

Establishment of BRAF ^{V600E} mutated PDO	Confirmation of BRAF ^{V600E} mutation using direct sequencing	HCT147-1T	HCT158-1T	HCT166-1T
HCT147-1T	V600E			
HCT152-1T	V600E			
HCT153-1T	V600E			
HCT154-1T	Wild			
HCT156-1T	V600E			
HCT157-1T	Wild			
- 3LM	- Not yet performed			
- 4LM	- Not yet performed			
- 5LM	- Not yet performed			
HCT158-1T	V600E			
HCT161-1T	V600E			
HCT162-1T	V600E			
HCT163-1T	V600E			
HCT166-1T	V600E			
HCT169-1T	V600E			
HCT178-1T	Not yet performed			

Work performed by Dr Osumi

続いて細胞増殖の速い5つのPDOを用いて、EGFR阻害薬であるCetuximab、BRAF阻害薬であるEncorafenib及びMEK阻害薬であるBinimetinibを用いて単剤の薬効評価を行った。単剤では5つのPDO全てにおいてCetuximab、Encorafenibは無効であり、Binimetinibは一部のPDOで増殖抑制が認められた。併用療法（2剤、3剤）に関しては現在追試中である。今後の展望として、ドイツのシャリテ大学と国際共同研究を行う予定であり、日本、ドイツ各々のBRAF V600E PDOの薬効評価、治療前後の全エクソームシーケンス、遺伝子発現プロファイル（RNA シーケンス）及びタンパク発現比較を行うことで、BRAF V600E 変異大腸癌の地域差の有無なども確認する予定である。

要 約

BRAF V600E 変異陽性大腸癌からのPDO樹立は通常の大腸癌PDOの培養成功割合よりは低いものの培養、保存は可能であった。またEGFR阻害薬、BRAF阻害薬は臨床データと同様に単剤では効果が認められなかった。

文 献

1. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 2011-9.
2. Morris V, Overman MJ, Jiang ZQ, et al. Progression-free survival remains poor over sequential lines of systemic therapy in patients with BRAF-mutated colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*. 2014; 13: 164-71.
3. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014; 20: 5322-30.
4. Osumi H, Shinozaki E, Wakatsuki T, et al. Non-V600E BRAF mutations and EGFR signaling pathway in colorectal cancer. *International journal of cancer*. 2019; 145: 2488-95.
5. Kopetz S, Desai J, Chan E, et al. Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2015; 33: 4032-8.
6. Corcoran RB, Atreya CE, Falchook GS, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition With Dabrafenib and Trametinib in BRAF V600-Mutant Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2015; 33: 4023-31.
7. Corcoran RB, Andre T, Atreya CE, et al. Combined BRAF, EGFR, and MEK Inhibition in Patients with BRAF (V600E) -Mutant Colorectal Cancer. *Cancer Discov*. 2018; 8: 428-43.
8. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *The New England journal of medicine*. 2019; 381: 1632-43.