

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) MAPK シグナル抑制が誘導するフィードバック機能の不均一性解明と制御に基づく KRAS/BRAF 変異腫瘍に対する新規治療開発
(英語) Development of new target therapy against KRAS/BRAF mutant cancers by regulating feedback mechanisms following MAPK inhibition.
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人金沢大学 がん進展制御研究所腫瘍内科 教授 矢野 聖二
(英語) Professor, Division of Medical Oncology, Cancer Research Institute, Kanazawa University
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 開発課題名： (日本語) MAPK シグナル抑制が誘導するフィードバック機構の不均一性解明と制御に基づく KRAS/BRAF 変異腫瘍に対する新規治療法開発
(英語) Clarification of heterogeneity in feedback mechanisms caused by MAPK signal inhibition and establishment of novel therapy against KRAS/BRAF mutated tumors.
- 研究開発代表者 所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人金沢大学 がん進展制御研究所腫瘍内科 教授 矢野 聖二
(英語) Professor, Division of Medical Oncology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Seiji Yano.
- 分担研究 開発課題名： (日本語) 各 KRAS/BRAF 変異腫瘍におけるフィードバック機構の解明と標的遺伝子の同定およびコンパニオン診断薬開発
(英語) Identification of molecular targets regulating feedback mechanisms following MAPK inhibition in KRAS/BRAF mutant cancers.
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人金沢大学 がん進展制御研究所腫瘍内科 准教授 衣斐 寛倫
(英語) Associate Professor, Division of Medical Oncology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Hiromichi Ebi.

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究は、フィードバック機構の臓器・組織間での多様性を検討することにより、BRAF 阻害薬・MEK 阻害薬と併用効果を示す治療標的を同定し新規治療法を開発するとともに、治療法選択/対象患者選択のコンパニオン診断薬を開発することを目的としている。最終的には、各 KRAS/BRAF 変異腫瘍に対し、MAPK シグナル抑制が惹起するフィードバック機構の制御による新規個別化治療戦略の確立を目指している。

今年度は、まず各臓器の KRAS/BRAF 変異がん細胞株を用い、MEK 阻害後にフィードバック機構が誘導されることを明らかにした。これらの腫瘍についてサブタイプ分類を行ったところ、KRAS 変異肺がん、膵がんでは上皮間葉移行（Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT）がサブタイプ分類と関係していた。一方、KRAS 変異大腸がんは、そのほとんどが上皮系の性質を示し、EMT に基づくサブタイプ分類は有効でないと考えられた。

次に、EMT によるサブタイプ分類が可能であった KRAS 変異肺がんについて、フィードバック機構の分子機序の解明を行った。その結果、上皮系 KRAS 変異肺がん細胞株では、MAPK シグナルの阻害により ERBB3 タンパクおよびリン酸化レベルの上昇が認められ、MAPK シグナルの再活性化と PI3 キナーゼ p85 サブユニットへの結合が亢進することが判明した。一方で、間葉系 KRAS 変異肺がん細胞株は、MAPK シグナル阻害により SPRY4 タンパクの発現が低下し、フィードバック抑制機構が解除されることにより FGFR-FRS2 パスウェイが活性化され、MAPK シグナルを再活性化することが明らかとなった。間葉系の性質を示すヒト患者由来ゼノグラフト（PDX）を用いた検討では、MEK 阻害薬トラメチニブまたは FGFR 阻害薬 BGB-398 は腫瘍の増殖をわずかに抑制したのみであったのに対し、両者の併用は腫瘍の縮小を誘導した。

また、BRAF 遺伝子のホットスポット変異である V600E 以外の変異（BRAF non-V600E 変異）を有する腫瘍についてフィードバック機構の解析を行った。MEK 阻害は、BRAF non-V600E 変異細胞株において、RAS のフィードバック活性化を誘導する。これらの細胞において、EGFR がフィードバック活性化に加え、定常状態における MAPK シグナルの活性化に関与することを明らかにした。そこで、MEK 阻害薬と EGFR 阻害薬の併用療法について検討を行ったところ複数の細胞株で併用効果を認めた。また、EGFR/RAF 阻害薬である BGB-283 の効果も検討し、in vitro で感受性を示すことを明らかにした。EGFR 阻害薬セツキシマブと MEK 阻害薬トラメチニブの併用は、BRAF non-V600E 変異マウスゼノグラフトを用いた検討においても、腫瘍の縮小効果と、ERK シグナルの完全な抑制を認めた。BGB-263 については、単剤で腫瘍の縮小効果を示し、その効果は EGFR 阻害薬と MEK 阻害薬を併用した場合とほぼ同等であった。

これらの結果をもとに、BRAF non-V600E 変異腫瘍に対する抗 EGFR 抗体と MEK 阻害薬の併用療法については、平成 29 年度「臨床研究・治験推進研究事業」に採択された「産学連携全国がんゲノムスクリーニング（SCRUM-Japan）患者レジストリを活用した BRAF 遺伝子変異陽性切除不能進行・再発大腸がんを対象にした医師主導治験」において有用性が評価されることとなった。

以上のように、平成 28 年度の計画をすべて実施しえた。

The purpose of this project is to identify molecular targets whose inhibition induces sensitivity to MEK/BRAF inhibition in KRAS/BRAF mutant cancer. Because of heterogeneity in signaling pathways among tissues and organs, we also try to develop companion diagnostics to optimize the stratification of patients who should be treated with each combinatorial regimen.

In this year, we first analyzed the existence of feedback reactivation of MAPK signaling in KRAS mutant cancer cell lines derived from lung, colorectal, and pancreatic cancers. Unsupervised analyses of gene expression profile revealed epithelial-mesenchymal transition (EMT) status was related to the subtype of KRAS mutant lung and pancreatic cancers. In contrast, most of colorectal cancer cell lines were epithelial phenotype. In epithelial-like KRAS-mutant lung cancers, this feedback was attributed to ERBB3-mediated activation of MEK and AKT. In contrast, in mesenchymal-like KRAS-mutant lung cancers, FGFR1 was dominantly expressed but suppressed by the negative regulator Sprouty proteins; MEK inhibition led to repression of SPRY4 and subsequent FGFR1-mediated reactivation of MEK and AKT. The combination of a MEK inhibitor trametinib and an FGFR inhibitor BGJ-398 induced cell death in vitro and tumor regressions in a patient-derived xenograft model with mesenchymal phenotype.

We have also analyzed feedback mechanisms induced following MAPK inhibition in BRAF mutant cancers. In addition to hot spot mutations at V600E, a wide range of other missense mutations (non-V600E) has been reported. Despite the successes of treating BRAF mutant V600E melanoma with BRAF pathway inhibitors, treatment strategies targeting other non-V600E mutant cancers have not been fully identified. We found that EGFR, and in some cases FGFR, tonically activated the MEK/ERK pathway, despite the presence of BRAF mutants with elevated kinase activity. In the low BRAF kinase activity mutants, EGFR had even greater control over the MEK/ERK pathway, essentially contributing completely to the tonic MAPK signal. These findings indicate that EGFR plays roles both in basal and feedback activation of MAPK signaling. Combination of anti-EGFR antibody, cetuximab, with trametinib achieved tumor shrinkage in xenografts derived from BRAF non-V600E mutant cancer cell lines. Furthermore, a clinically relevant dual inhibitor of EGFR and RAF, BGB-283, was effective at shrinking tumors in mouse models of BRAF non-V600E mutants.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 3件)

1. Kitai H, Ebi H. Key roles of EMT for adaptive resistance to MEK inhibitor in KRAS mutant lung cancer. *Small GTPases*, 2016 Jul 8:1-5. [Epub ahead of print]
2. Kitai H*, Ebi H**, Tomida S, Floros KV, Kotani H, Adachi Y, Oizumi S, Nishimura M, Faber AC, Yano S**. Epithelial-to-mesenchymal transition defines feedback activation of receptor tyrosine kinase signaling induced by MEK inhibition in KRAS mutant lung cancer. *Cancer Discov*, 2016; 6:754-69. (*; Co-First Author, **; Co-Corresponding Author)

3. Nanjo S, Arai S, Wang W, Takeuchi S, Yamada T, Hata A, Katakami N, Okada Y, Yano S. *MET* copy number gain is associated with gefitinib resistance in leptomeningeal carcinomatosis of *EGFR*-mutant lung cancer. *Mol Cancer Ther*, 2017; 16:506-15.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Feedback mechanism as a cause of resistance and therapeutic targets in molecular targeted therapy). 口頭, 衣斐寛倫, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会 インターナショナルシンポジウム 10 Resistance of cancer molecular targeted drug and new insights of overcoming therapy 2016 年 7 月, 国内
2. Targeting RAS/RAF mutant cancers: Regulation of MAPK signaling is the key 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会 口頭, 衣斐寛倫, インターナショナルシンポジウム 18 Future direction of treatment for RAS/RAF-driven cancers 2016 年 7 月, 国内
3. EMT defines feedback activation of RTK signaling included by MEK inhibition in KRAS mutant lung cancer. 口頭, 衣斐寛倫, 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月, 国内
4. 上皮間葉移行に基づいた KRAS 変異肺癌に対する MEK 阻害薬の新規治療戦略, 口頭, 北井秀典, 衣斐寛倫, 小谷浩, 足立雄太, 富田秀太, 大泉聡史, 西村正治, 矢野聖二. 第 57 回日本肺癌学会学術集会シンポジウム 2016 年 12 月, 国内
5. Combinatorial Approach Targeting KRAS Mutant Lung Cancers, 口頭, Ebi H. Kanazawa University /Duke-NUS Joint Cancer Symposium 2016 年 2 月, 国外
6. EMT and feedback activation of RTK signaling induced by MEK inhibition in KRAS mutant lung cancer. 口頭, Ebi H. The Kanazawa University Cancer Research Institute International Symposium 2016 2016 年 11 月 国内
7. Epithelial-to-mesenchymal transition defines feedback activation of receptor tyrosine kinase signaling induced by MEK inhibition in KRAS mutant lung cancer. 口頭, Ebi H. 6th FUSCC-CRIKU Joint Symposium on Tumor Biology 2016 年 9 月, 国外
8. EMT defined combinatorial strategy for treating KRAS mutant lung cancer, 口頭, Ebi H. Hokkaido Univ-Kanazawa Univ International Cancer Forum for Young Scientists 2016 年 11 月, 国内
9. Circumvention of EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer. 口頭, Yano S. European Society for Medical Oncology (ESMO) 2016 Congress. 2016 年 10 月, 国外
10. Novel Treatment Strategy Based on Gene Profiling of Lung Cancer. 口頭, Yano S. The 21st Japan – Korea Cancer Research Workshop. 2016 年 12 月, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当無し

(4) 特許出願
該当無し