



Characterization of BRAFThr599dup mutation as a targetable driver mutation identified in lung adenocarcinoma by comprehensive genomic profiling

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2025-05-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡邊, 裕文 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/0002000394

博士（医学）渡邊 裕文

論文題目

Characterization of *BRAF*^{Thr599dup} mutation as a targetable driver mutation identified in lung adenocarcinoma by comprehensive genomic profiling

（がんゲノムプロファイリングにより同定された肺腺がんにおける *BRAF*^{Thr599dup} 変異の治療標的可能なドライバー変異としての特徴付け）

論文の内容の要旨

[はじめに]

B-RAF proto-oncogene, serine/threonine kinase (BRAF) はセリン/スレオニンプロテインキナーゼである RAF ファミリーに属し、細胞の分化や増殖に関わる重要な細胞内シグナル伝達経路である mitogen-activated protein kinase 経路 (MAPK 経路) の構成要素である。がん遺伝子である *BRAF* の遺伝子変異は、非扁平上皮肺がんにおいて 1%—3% に認められるのみであるが、悪性黒色腫や甲状腺乳頭がんにおいては全体の約 50% に認められる。*BRAF* 遺伝子変異は、キナーゼ活性、RAS 依存性、二量体形成といった生化学的特性とシグナル伝達特性に基づいて 3 つのクラスに分類される。V600E 変異に代表されるクラス I 変異 BRAF は、RAS 非依存性に高いキナーゼ活性を有し、単量体で MAPK 経路を恒常的に活性化しがん化に関与する。クラス II 変異 BRAF はクラス I 変異と同様に RAS 非依存性の中程度または高いキナーゼ活性を持つ一方で、内因性の BRAF または CRAF との二量体形成を必要とする。クラス III 変異 BRAF はキナーゼ障害があるが、活性型 RAS に強く結合して内因性の CRAF とヘテロ二量体を形成し、CRAF 依存性に MAPK 経路のシグナル伝達を強化する。単量体のクラス I 変異 BRAF は、vemurafenib、dabrafenib、encorafenib などのタイプ I BRAF 阻害剤に感受性があるが、クラス II 変異 BRAF は耐性を示す。したがって、効果的な治療法を選択するために変異 BRAF を機能的に分類することは重要である。

我々は、包括的がんゲノムプロファイリングにより進行肺腺がん患者の再生検検体から *BRAF*^{Thr599dup} 変異 (599 番目のスレオニンの重複変異) を同定し、*BRAF*^{V600E} 変異陽性肺がんに準じた dabrafenib および MEK 阻害薬である trametinib の併用療法により病勢安定を得た症例を経験した。*BRAF*^{Thr599dup} 変異は稀な遺伝子変異であり、その機能や分子標的薬の有効性は明らかではないため、本研究は *BRAF*^{Thr599dup} 変異の特徴を明らかにすることを目的として行われた。

[材料ならびに方法]

はじめに、診断時の臨床検体より DNA を抽出し、digital PCR を実施し *BRAF*^{Thr599dup} の存在を確認した。次に、正常気道上皮細胞である BEAS-2B 細胞とインターロイキン-3 (IL-3) 依存性の Ba/F3 細胞において野生型 BRAF、

BRAF^{V600E}、または BRAF^{Thr599dup} を条件付きに発現させる系を樹立した。コントロールには EGFP 発現細胞を使用した。さらに、BRAF の二量体形成を阻害する R509H 変異 (509 番目のアルギニンをヒスチジンに置換) も有する二重変異型 BRAF (BRAF^{Thr599dup/R509H}、BRAF^{V600E/R509H}、BRAF^{K601E/R509H}) を導入した Ba/F3 細胞も作成した。さらに、Ba/F3-BRAF^{Thr599dup} 細胞および Ba/F3-BRAF^{V600E} 細胞において、CRISPR/Cas9 システムを用いて内在性 *BRAF* または *CRAF* のノックアウトをおこなった。これらの細胞において、細胞生存率、MAPK シグナル活性、がん化能の評価および dabrafenib と trametinib に対する感受性を評価した。本研究は、患者本人の同意後より開始し、浜松医科大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を受け実施した (承認番号: #4-33)。

[結果]

Digital PCR によって BRAF^{Thr599dup} 変異はアレル頻度 47.1% で検出され、診断時点で優位なクローンとして存在していたことを明らかにした。Ba/F3 細胞では、BRAF^{Thr599dup} と BRAF^{V600E} は同様に IL-3 非依存性の増殖を認め、ウェスタンブロット法により MAPK 経路の下流の MEK と ERK の活性化を認めた。さらに、BRAF^{Thr599dup} と BRAF^{V600E} は同様に BEAS-2B 細胞の足場非依存性増殖能を有意に増加させた。Ba/F3-BRAF^{V600E} 細胞と Ba/F3-BRAF^{Thr599dup} 細胞は、ともに trametinib および dabrafenib に対して高い感受性を示した (IC50: 29.7 nM vs. 13.1 nM)。クラス II 変異である BRAF^{K601E} を導入された場合とは対照的に、Ba/F3-BRAF^{Thr599dup} 細胞においては、内在性 *BRAF* または *CRAF* がノックアウトされた状況下や R509H 変異の導入により二量体形成能が阻害された状況下においても、IL-3 非依存性増殖能や MAPK 経路の活性化能は Ba/F3-BRAF^{V600E} 細胞と同様に維持された。

[考察]

BRAF のキナーゼドメインのうち、活性化セグメントと P ループ間の疎水性相互作用により BRAF の不活性構造が維持されている。活性化セグメントの Thr599 および Ser602 残基がシグナル伝達によってリン酸化されると、この疎水性相互作用が破壊され、BRAF タンパク質は活性化型に変化する。BRAF^{V600E} は、600 番目のバリンがグルタミン酸に置換することで疎水性相互作用が変化し活性型に変化することが知られているが、BRAF^{Thr599dup} は、スレオニン挿入とそれに続く 1 つのコドンのシフトによってこの疎水性相互作用が破壊され、活性型に変換されることが示唆されている。

単量体の BRAF 阻害薬である dabrafenib は、二量体を形成するクラス II 変異に対しては、二量体の一方に結合すると構造変化によってもう一方の部位への親和性が大幅に低下するため阻害効果がない。

[結論]

BRAF^{Thr599dup} 変異は、単量体で MAPK 経路を恒常的に活性化し、がん化を

引き起こす強力なドライバー遺伝子変異である。この変異は稀ではあるが様々ながん種で繰り返し報告されていることから、臨床的にもさらに研究されるべきである。希少変異であっても治療可能な遺伝子変異は存在しうるため、積極的な包括的がんゲノムプロファイリングの実施が望まれる。