

増強せず、また UFT/LV がペプチド特異的免疫能の誘導・増強を阻害しないことを示した。RNF43・TOMM34 由来新規ペプチドワクチン療法と UFT/LV の併用療法は、安全性を損なうことなく施行でき、全生存期間の改善が期待できる有望な治療法であると考えられた。

本論文は、はじめて大腸癌に特異的なペプチドワクチンと UFT/LV の併用療法の臨床効果と免疫応答能について検討し、今後の大腸癌免疫化学療法の可能性を示している。以上のことより本論文は医学博士の学位に値する論文と判断する。

氏 名	竹 澤 健
学位の種類	博 士 (医学)
学位記番号	医 第 1 0 3 1 号
学位授与の日付	平 成 2 2 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Sorafenib inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting B-RAF in <i>KRAS</i> wild-type cells and C-RAF in <i>KRAS</i> mutant cells (非小細胞肺癌株におけるソラフェニブの抗腫瘍効果)
論文審査委員 (主 査)	教 授 中 川 和 彦
(副主査)	教 授 工 藤 正 俊
(副主査)	教 授 義 江 修

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

ソラフェニブは BRAF および CRAF を標的とするマルチキナーゼ阻害剤である。BRAF および CRAF はいずれも細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) シグナル伝達経路で機能するが、それぞれ別の下流標的を有する。しかし、腫瘍細胞における BRAF および CRAF シグナル伝達に対するソラフェニブの相対的効果は不明である。本研究では KRAS 遺伝子変異を有する、または有さない非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞株を用いて、ソラフェニブおよび RNA 干渉による BRAF または CRAF の発現低下が細胞増殖および ERK シグナル伝達に及ぼす影響を検討した。

【方法】

ソラフェニブが細胞内シグナルに与える影響を Western blot 法で、細胞周期に与える影響を、フローサイトメーターを用いて検討した。さらに、BRAF と CRAF の siRNA を用いることでそれぞれの特異的な下流シグナルおよび細胞増殖に与える影響を検討した。

【結果】

ソラフェニブは KRAS 野生型 NSCLC 株において ERK のリン酸化を阻害したが、KRAS 変異型 NSCLC 細胞株では阻害しなかった。この ERK リン酸化へ及ぼす影響の違いにもかかわらず、ソラフェニブは KRAS 変異型、野生型双方で細胞増殖を阻害し、G1 期停止を誘発した。BRAF 発現低下は KRAS 野生株において ERK リン酸化を阻害し、細胞増殖抑制と G1 期停止をもたらしたが、CRAF 発現低下にこの作用はなかった。一方、CRAF 発現低下は KRAS 変異株において ERK リン酸化に影響を与えることなく細胞増殖を抑制し G1 期停止を誘発した。これらのデータから、KRAS 野生型 NSCLC では BRAF-ERK シグナルが、KRAS 変異型 NSCLC では CRAF シグナルが細胞増殖の調節に主要な役割を果たしていることが考えられた。よって、ソラフェニブは KRAS 野生型 NSCLC では BRAF を、KRAS 変異型 NSCLC では CRAF を標的とすることで NSCLC 細胞増殖を阻害することが示唆された。

【考察】

ソラフェニブの抗腫瘍効果に関してはその VEGFR 阻害に基づいた血管新生阻害効果によるものが注目されているが、もう一つのターゲットである RAF キナーゼへの阻害が、どのようなバイオロジーを呈するかに関する検討は少ない。RAF キナーゼは RAS の下流に存在するセリンスレオニンキナーゼであり、癌細胞の増殖、進展に関わる。RAF は BRAF、CRAF の 2 つが主要なイソタイプであり、ソラフェニブはこの双方の酵素活性を阻害することが示されている。しかし、BRAF、CRAF がそれぞれ、どのような役割を担っているかは不明な点が多い。今回の研究からソラフェニブは KRAS 変異の有無に関わらず NSCLC 株に対して増殖抑制を示すが、その際に KRAS 野生株では BRAF を、KRAS 変異株では CRAF をターゲットにしていることを示した。現在、再発非小細胞肺癌を対象に Global 試験が進行中であり、本剤の臨床的有用性が示されることが望まれる。

【結論】

ソラフェニブは非小細胞肺癌株において KRAS 野生型に対しては BRAF を、KRAS 変異型に対しては CRAF を標的とすることで抗腫瘍効果を発揮する。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2009年8月15日 公 表	出版物名 Cancer Research Vol. 69 No. 16 p. 6515 ~ 6521
	公 表 内 容	2009年8月15日 発 行
	全 文	

論文審査結果の要旨

ソラフェニブはマルチキナーゼ阻害剤として開発された新規分子標的薬である。血管内皮細胞において VEGF 受容体を直接阻害し、腫瘍の血管新生を阻害し抗腫瘍効果を示す。また腫瘍細胞において RAF キナーゼを阻害することで腫瘍細胞増殖を抑制する。RAF キナーゼは MAPK シグナル伝達経路における重要なメディエーターのひとつであるセリンスレオニンキナーゼであり、3つのイソタイプが報告されている。その主たるタイプは BRAF と CRAF であり、特に BRAF はさまざまな固形癌で高頻度に遺伝子変異を起こすことが報告され注目を集めている。ソラフェニブは BRAF、CRAF どちらも抑制するが、CRAF のほうにより強い抑制効果を示すことが知られている。非小細胞肺癌において BRAF と CRAF がそれぞれどのように MAPK に関わっているのかはまだ全く分かっていない。またソラフェニブが非小細胞肺癌細胞に対してどのような効果をもたらすかについてもほとんど報告がない。本研究ではソラフェニブによる RAF キナーゼ抑制が細胞にどのような効果を与えるかを検討した。非小細胞肺癌はその約 20%に KRAS の遺伝子変異が起こると報告されている。RAF キナーゼは RAS が直接制御するキナーゼであるので、KRAS の遺伝子のステータスがソラフェニブの効果を左右する可能性を考慮し、検討に用いた細胞株を KRAS の遺伝子変異で区別した。

方法

ソラフェニブの RAF キナーゼの下流シグナルへの影響をウエスタンブロット法で、細胞増殖抑制効果を MTT アッセイで確認した。増殖抑制の機序をフローサイトを用いて細胞周期の変化を確認した。BRAF と CRAF それぞれの特異的な下

流シグナルを検出するために small interfering RNA 法 (siRNA) を用いた。

結果と考察

RAF キナーゼの下流にある ERK のリン酸化に対するソラフェニブの影響をウエスタンブロット法で確認した。ソラフェニブは KRAS 野生型 NSCLC 株において ERK リン酸化を阻害したが、KRAS 変異型 NSCLC 細胞株では阻害しなかった。この ERK リン酸化へ及ぼす影響の違いにもかかわらず、ソラフェニブは KRAS 変異型、野生型双方で細胞増殖を阻害し、G1 期停止を誘発した。このことから KRAS 変異細胞ではソラフェニブは ERK 非依存性に細胞増殖抑制と G1 期停止をもたらしている可能性があることが示唆される。そこで、BRAF と CRAF それぞれがどのように下流の ERK リン酸化にかかわっているのかを siRNA を用いて検討した。BRAF 発現低下は KRAS 野生株において ERK リン酸化を阻害し、細胞増殖抑制と G1 期停止をもたらしたが、CRAF 発現低下にこの作用はなかった。一方、CRAF 発現低下は KRAS 変異株において ERK リン酸化に影響を与えることなく細胞増殖を抑制し G1 期停止を誘発した。これらのデータから、KRAS 野生型非小細胞肺癌では BRAF-ERK シグナルが、KRAS 変異非小細胞肺癌では CRAF シグナルが細胞増殖の調節に主要な役割を果たしていることが考えられた。CRAF の下流にあると考えられている cyclin E の発現は、BRAF の発現低下ではなく、CRAF の発現低下とソラフェニブの治療によって抑制されたことから、KRAS 変異型細胞においてソラフェニブはやはり CRAF シグナルを抑制することで細胞増殖抑制効果をもたらしているものと考えられた。よって、ソラフェニブは KRAS 野生型 NSCLC では BRAF を、KRAS 変異 NSCLC では CRAF を標的とすること

で非小細胞肺癌細胞増殖を阻害することが示唆された。これらの知見はソラフェニブの RAF キナーゼ阻害を介する抗腫瘍効果に関する新たな発見であり、現在進行中の再発非小細胞肺癌を対象とした Global 試験における本剤の臨床的有用性を検討する上で、極めて重要な分子生物学的事象である。よって本研究は、学位論文として価値のあるものとする。

氏名	竹原 俊幸
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	生第22号
学位授与の日付	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	マウス胎子性神経幹細胞の可塑性に関する研究

論文審査委員 (主査)	教授	細井美彦
(副主査)	教授	佐伯和弘
(副主査)	教授	松本和也