

氏名（本籍）	成田 悠介
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 7465 号
学位授与年月	平成 27 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Novel ATP-competitive MEK inhibitor E6201 is effective against vemurafenib-resistant melanoma harboring the MEK1-C121S mutation in a preclinical model. (MEK1-C121S 変異を持つ vemurafenib 耐性メラノーマにおける ATP 競合型 MEK 阻害剤 E6201 の有用性検討)
主査	筑波大学教授 博士（医学） 藤本 学
副査	筑波大学教授 薬学博士 金保 安則
副査	筑波大学教授 博士（医学） 関堂 充
副査	筑波大学教授 博士（医学） 小田 竜也

論文の内容の要旨

(目的)

メラノーマは原発巣が小さいうちに転移しやすく、予後が極めて不良の皮膚癌として知られている。**Vemurafenib** (変異型 **Braf** 選択的阻害薬)は、**Braf** 変異に基づき患者層別を行った臨床試験において高い治療効果を示し、転移性 **Braf** 変異型メラノーマの第一選択薬として承認された。一方で、薬剤処置後 2 ヶ月～18 ヶ月には、**Vemurafenib** に対する耐性が起こることが報告され、耐性化したメラノーマに対する治療手法の確立が新たな課題としてクローズアップされてきた。最近になって、その耐性メカニズムの一つとして **Vemurafenib** 処置による **MEK1** の二次的変異 **C121S** が報告された。

本研究では、各種 **MAPK** 阻害剤の **MEK1 C121S** 変異および **BRAF** 変異を持ったメラノーマに対する薬理学的活性と有効性を検証する目的で、特に **E6201** を中心に研究が行われた。

(対象と方法)

MAPK 経路阻害剤として、**BRAF** 阻害剤 **vemurafenib**, アロステリック **MEK** 阻害剤、**AZD6244**, **ATP** 競合型 **MEK** 阻害剤 **E6201** が用いられた。

細胞はメラノーマ細胞株を用いて、推奨メディアウムを用いて 37 度 5% **CO2** 環境下で培養された。

増殖阻害アッセイとして、WST-8 試薬を用いて発色後、吸光度測定することにより検討された。

MAPK 経路阻害活評価は、cell lysate を lysis buffer で回収後、SDS sample を調整し、SDS-PAGE 後、各種抗体を用いて Western blotting にて検討された。遺伝子導入は、transfection 試薬を用いて Azami-Green と MEK1 の遺伝子導入が行なわれた。また、必要に応じて puromycin で selection することにより安定発現株が取得された。

免疫組織学的検査は、CyclinD1 を抗体で染色して、DAPI により核染色を行われた。インセルアナライザーにより、Azami-Green と CyclinD1 および細胞核の解析が行われた。

MEK1 と E6201 結合解析は、マエストロソフトウェアの induced fit module を用いて MEK1 タンパク質と E6201, Selumetinib との結合シミュレーションが行われた。

(結果)

はじめに、MEK1 cell free assay 系において、E6201 が評価されたところ、濃度依存的に MEK1 活性を阻害し、その阻害活性は ATP 濃度に依存することから、E6201 は ATP 競合型 MEK 阻害剤であることが明らかとなった。

次に、各種 MAPK pathway 阻害剤のメラノーマにおける特徴を把握するため、BRAF inhibitor, vemurafenib, allosteric MEK inhibitor selumetinib, ATP-competitive-MEK inhibitor E6201 の3つの薬剤の増殖阻害活性、MAPK 阻害活性を評価した。結果、どの薬剤とも、BRAF V600E をもつ株に対してのみ、選択的に増殖阻害活性を示し、同時に BRAF V600E を持つ株において、MAPK 経路の阻害活性を示した。BRAF WT 株に対しては、どの薬剤も増殖阻害活性を示さなかったが、selumetinib, E6201 に関しては、MAPK 経路は阻害された。

次に BRAF 変異株に対して MEK1 変異型 C121S を遺伝子導入し、各種 MAPK 阻害剤の増殖阻害活性を評価した。その結果、MEK1 C121S 変異によって、BRAF 選択的阻害薬 Vemurafenib やアロステリック MEK 阻害剤 Selumetinib に対する耐性が付与されることが確認された。一方、ATP 競合型 MEK 阻害剤 E6201 に対して、耐性は付与されず、増殖阻害活性を保持していた。さらに E6201 が MEK1 C121S に対して有効であるメカニズムを解析するため、MEK1 タンパク質と E6201 の結合解析や MAPK 阻害活性化解析をおこなった。結果、E6201 の結合部位が Selumetinib 結合部位と比較して C121S 遺伝子変異部位と遠いことが確認された。

(考察)

実験結果から、ATP 競合型 MEK 阻害剤は、BRAF V600E MEK1 C121S mutation をもつメラノーマにたいして有効である可能性が示唆された。本結果は、Vemurafenib 処理によって生じた MEK1 C121S 二次性変異をもつメラノーマ患者に、あらたな治療法を提供できる可能性を示唆するものであり、E6201 の今後の臨床試験をサポートする結果であると考えられる。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、ATP 競合型 MEK 阻害剤である E6201 が、BRAF V600E MEK1 C121S mutation をもつメラノーマに対して有効である可能性を主として in vitro の実験において示唆している。本研究は、種々の実験系を用いて、その有効性を多角的に検討しており、その結果は信頼に足るものである。本薬剤は、

臨床試験による開発がすすめられており、実臨床で本研究の結果を基盤としてメラノーマ患者に福音をもたらすことを期待でき、メラノーマの治療戦略を構築する上で重要な知見として高く評価できる。

平成 26 年 12 月 25 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。