



Title	BRAFV600E inhibition stimulates AMP-activated protein kinase-mediated autophagy in colorectal cancer cells
Author(s)	末田, 聖倫
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59546">https://hdl.handle.net/11094/59546</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨  
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	末田 聖倫
論文題名 Title	BRAF <sup>V600E</sup> inhibition stimulates AMP-activated protein kinase-mediated autophagy in colorectal cancer cells (大腸癌においてBRAF阻害剤はAMPKを介したオートファジーを誘導する)

## 論文内容の要旨

## 〔目的 (Purpose) 〕

BRAF変異型大腸癌は、既存の抗癌剤治療では予後が約1年と不良なため、新たな治療開発が必要とされている。また、オートファジーは細胞の恒常性維持において重要な役割を担っており、ストレス曝露後の細胞の生死においても重要な因子とされる細胞内分子機構であり、抗癌剤の治療抵抗性にも関与しているという報告が散見される。本研究では、BRAF変異型大腸癌における新たなオートファジーの分子メカニズムを解明することで、予後不良なBRAF変異型大腸癌に対する新規治療戦略を提案することを目的としている。

## 〔方法ならびに成績 (Methods/Results) 〕

BRAF変異型大腸癌において、BRAF阻害剤によってオートファジーが誘導されるかどうかを検証するため、KRAS<sup>WT</sup>/BRAF<sup>WT</sup>を有するヒト大腸癌細胞株であるHT29及びRKOを用いて、蛋白レベルでのLC3の発現量を確認した。既知としてオートファジーの誘導はLC3の発現量で評価するが、2種類の細胞株においてウエスタンプロット及び細胞蛍光染色でオートファジーが濃度・時間依存性に誘導された。結果、BRAF変異とオートファジーとの関連性が示唆された。次に、誘導されたオートファジーの機能的役割を解明するため、オートファジーの阻害実験を行った。オートファジーの阻害には、①クロロキンを用いた薬理学的な手法、②オートファジー関連遺伝子をsiRNAを用いてノックダウンする手法、が知られており、2種類の細胞株においてAnnexin-Vを用いたapoptosis assay及びMTT assayを行った。結果、BRAF阻害剤にオートファジーの阻害を併用することで、単剤と比較してcell viabilityの低下及びアポトーシス細胞の増加も認めた。以上から、BRAF変異型大腸癌に対するオートファジーの機能は癌細胞保護性に作用することが示唆され、オートファジーの阻害はBRAF阻害剤の抗腫瘍効果を増強する可能性が示された。続いて、BRAF変異とオートファジーに関連したシグナル伝達の解明を行った。結果、AMPKがBRAF阻害剤によって誘導されるオートファジーに関連していることを見出した。実際に、BRAF阻害剤によってBRAF下流のシグナルが抑制された状況下で、AMPKの活性化とそれに続くオートファジー誘導を確認できた。これらの結果は、BRAF変異型大腸癌でAMPK活性がオートファジー依存性の細胞保護機能において重要な役割を果たしていることを示唆した。さらに、AMPK活性はBRAFの下流に存在するMEK-ERK-RSK経路の活性と相反するものであり、BRAF活性が阻害されることで、オートファジーを誘導する可能性が示唆された。

最後に、in vivoでの抗腫瘍効果を調べるために、ヒト大腸癌細胞株であるHT29を用いて皮下腫瘍を有する免疫不全マウスを作成した。コントロール群・BRAF阻害剤投与群・クロロキン投与群・BRAF阻害剤+クロロキン併用群の4群に分けて抗腫瘍効果を検討し、さらに皮下腫瘍を用いてオートファジーの誘導とシグナル伝達を検証した。結果、コントロール群及びクロロキン投与群と比較して、BRAF阻害剤投与群だけでも抗腫瘍効果は得られたが、BRAF阻害剤+クロロキン併用群において最も強い抗腫瘍効果を示した。また皮下腫瘍を用いた実験でもin vitroの実験結果と同様、BRAF阻害剤+クロロキン併用群で有意にオートファジーの誘導を認め、さらにその誘導はAMPKを介したものであった。

## 〔総 括 (Conclusion) 〕

BRAF変異型大腸癌において、BRAFの活性阻害はAMPKを介したオートファジーを誘導することで、治療抵抗性を示すことが示唆された。そのため、オートファジーを標的とした治療は、BRAF変異型大腸癌における抗癌剤の治療抵抗性を克服する新規治療法となりうる可能性が示された。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 末田 聖倫		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 大阪大学教授	森 正樹
	副 査 大阪大学教授	奥村 明之進
副 査 大阪大学教授	竹原、直之印	
論文審査の結果の要旨		
<p>BRAF変異型大腸癌は、既存の抗癌剤治療では予後不良であるため、新たな治療法の開発が必要とされている。本研究は、BRAF変異型大腸癌において抗癌剤の治療抵抗性に関与しているオートファジーの新たな分子メカニズムを解明することで、予後不良なBRAF変異型大腸癌に対する新規治療戦略を提案することを目的としたものである。</p> <p>本研究では、BRAF変異を有するヒト大腸癌細胞株を用いて、①BRAF阻害剤曝露後のオートファジー誘導、②BRAF阻害剤曝露により誘導されたオートファジーの機能的役割、③BRAF変異とオートファジーに関連したシグナル伝達経路、④In vivoでの再現、についての検討を行った。</p> <p>その結果、BRAF変異型大腸癌に対するオートファジーの機能は癌細胞保護性に作用することが示唆され、オートファジーの阻害はBRAF阻害剤の抗腫瘍効果を増強する可能性が示された。また、BRAF阻害剤曝露後に誘導されたオートファジーはAMPKを介したものであった。さらに、in vivoでもin vitroと同様の結果を得た。</p> <p>本研究より、BRAF変異型大腸癌においてBRAFの活性阻害はAMPKを介したオートファジーを誘導することで、治療抵抗性を示すことが示唆された。そのため、オートファジーを標的とした治療は、BRAF変異型大腸癌における抗癌剤の治療抵抗性を克服する新規治療法となりうる可能性が示された。</p> <p>以上より、BRAF変異型大腸癌においてBRAF阻害剤の治療抵抗性に寄与するオートファジーに着目した本研究は、癌研究における新たな知見と考えられ、学位に値すると考える。</p>		