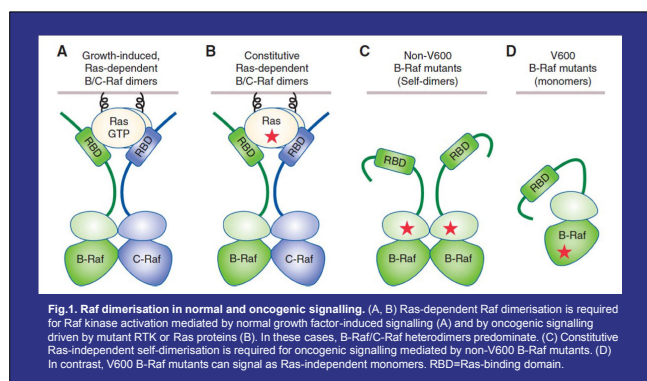


BRAf 阻害剤の創薬では化合物の RAF 二量体化促進活性を理解することが重要

RAF キナーゼ (ARAF, BRAF 及び CRAF) は RAS-RAF-MEK-ERK シグナリングカスケードの重要な因子であり、受容体型チロシンキナーゼなどの上流シグナルを受けて GTP 結合型に変換された RAS との結合により二量体化が誘導され、下流の MEK-ERK シグナル伝達を活性化します¹⁾ (Fig.1)。



中でも BRAF は、活性型 RAS 変異体の下流分子であり、またヒトでの腫瘍の 8%、特に黒色腫の ~60% で変異が見られることから、治療標的として大きな注目を集めています。BRAF[V600E] は BRAF 変異腫瘍の 90% 以上で検出されており、上流分子の活性化に依存することなく単量体として機能します。現在、3つの ATP競合型 RAF 阻害剤、vemurafenib、dabrafenib 及び encorafenib が、BRAF [V600E/K] 黒色腫の患者に対して顕著な臨床効果を示し、FDA からこの疾患の治療薬として承認を受けておりますが、これらの薬剤の継続的な投与は薬剤耐性及び腫瘍の再発を起こします。加えて、vemurafenib 及び dabrafenib については皮膚扁平上皮癌などの重篤な副作用をしばしば引き起こすことが報告されています²⁾。最近の研究から、薬剤耐性や副作用を含むこれらの望ましくない現象の原因は、薬剤投与後の RAF 二量体化促進による ERK の活性化であることが分かってきました³⁾。

Vemurafenib、dabrafenib 及び encorafenib などの type I 1/2 RAF 阻害剤は BRAF V600 変異単

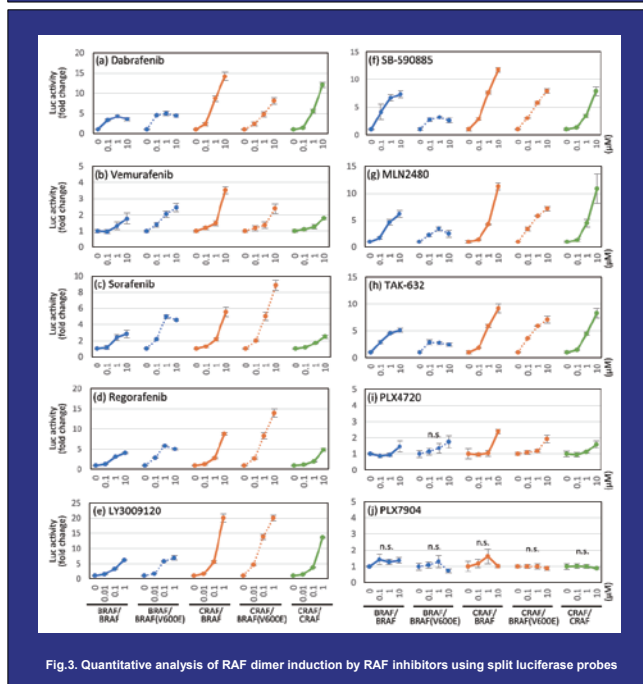
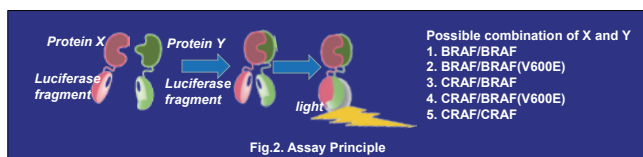
量体の活性を効果的に阻害するのですが、RAF 二量体に対しては 2 つのプロトマーのうちひとつへ結合すると、もう一方のプロトマーに対する次の阻害剤の結合親和性を低下させてしまうため (negative cooperativity)、RAF 二量体の活性を効果的に阻害することができません³⁾。そのため、type I 1/2 RAF 阻害剤の投与を継続した患者では、RAS 変異や上流の受容体型チロシンキナーゼの発現上昇による RAS の活性化⁴⁾、または RAS の活性化非依存的に二量体化できる BRAF[V600E] のスプライスバリエーションの発現⁵⁾ などによる RAF 二量体化の増加を原因とした、薬剤耐性が生じてしまいます。また vemurafenib や dabrafenib は RAF の二量体化を誘導するため、RAS が活性化している野生型 BRAF 細胞で投与後に皮膚扁平上皮癌等を引き起こすことがあります (paradoxical activation)²⁾³⁾。

このような状況から、より高い安全性と持続的な効果を備えた新しい次世代の阻害剤の開発において、如何に RAF の二量体化を防ぐかということは有効な戦略であるといえ、このことから RAF 二量体形成を同定できる適切な細胞アッセイの必要性が高まっています。

現在 type II pan-RAF 阻害剤及び paradox-breaker を含む次世代の BRAF 阻害剤の臨床試験が進められています。Type II pan-RAF 阻害剤は RAF 二量体と RAF 単量体の両方を同程度に標的とすることができますが、RAF を α -C helix IN 構造に固定化してしまい、その結果 RAF の二量体化を強く誘導します。そのため低度ではありまますが paradoxical activation 引き起こしてしまいます。一方、paradox-breaker である PLX8394 は、BRAF 又は CRAF の α -C helix の C 末端を外側に押し出すことで BRAF ホモ二量体及び BRAF/CRAF ヘテロ二量体の形成を妨害することから paradoxical activation を非常に低く抑えます⁶⁾⁷⁾。

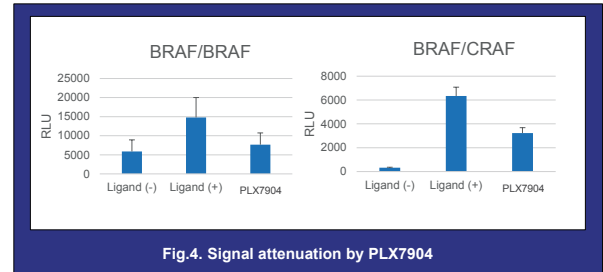
カルナバイオサイエンスでは相補型スプリットルシフェラーゼアッセイ技術を用いて RAF

dimerization assayを開発し (Fig.2)、5つの異なるRAFアイソフォームの組み合わせ (BRAF/BRAF, BRAF/BRAF[V600E], CRAF/BRAF, CRAF/BRAF[V600E], CRAF/CRAF) について、type I 1/2 RAF 阻害剤 (dabrafenib, vemurafenib, PLX4720)、type II pan-RAF 阻害剤 (LY3009120, MLN2480, TAK-632) 並びに paradox-breaker (PLX7904) を含む RAF 阻害剤の RAF 二量体化促進活性を測定し、結果がこれまでの知見と一致していることを確認しました²⁾(Fig.3)。この結果は Scientific Reports で発表されています。



弊社ではこの RAF dimerization assay の受託試験を提供しております。このシンプル、迅速そして定量的なアッセイでは、化合物による RAF 二量体化誘導を評価することが可能で、RAF 二量体化並びに paradoxical activation や薬剤耐性といった有害事象の発生を抑えた RAF 阻害剤を開発するための薬物スクリーニングに有用な評価ツールとしてご利用頂けます。また、同 Assay では予め LY3009120 によって二量体化を誘導し

たアッセイを用いて、その二量体化を化合物が阻害するかどうかを定量的に測定することも出来ます (Fig.4)



さらに BRAF, BRAF[V600E] 及び CRAF(RAF1) をターゲットとした ELISA kit も販売しており、お客様ご自身で簡易にデータを取得していただけます。

RAF Dimerization カスタムアッセイサービス QuickScout Screening Assist® ELISA アッセイキット

弊社提供製品・サービスについてのご相談、ご質問等ございましたら、お気軽にお問い合わせください。

引用：

- 1) Br J Cancer. 2018; 118(1):3-8. Durrant DE.
- 2) Sci Rep. 2019; 9(1): 636. Miyamoto K.
- 3) Nat Rev Cancer. 2017; 17(11): 676-691. Karoulia Z.
- 4) Nature. 2010; 468(7326): 973-7. Nazarian R.
- 5) Nature. 2011; 480(7377): 387-90. Poulidakos PI.
- 6) Biochem Soc Trans. 2021; 49(1): 237-251. Cook FA.
- 7) Nat Med. 2019; 25(2): 284-291. Yao Z.

このニュースレターの中で論文から引用した情報の日本語翻訳文はカルナバイオサイエンス社が作成しました。