2.6.1 緒言

1 緒言

ダブラフェニブメシル酸塩（以下，ダブラフェニブ）は，BRAF の選択的阻害薬であり，アデノシン三リン酸（ATP）との競合阻害により，その作用を発揮する。本邦ではタフィンラー®の販売名で「BRAF 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫」の効能・効果で承認を得ている。トラメチニブ ジメチルスルホキシド付加物（以下，トラメチニブ）は，MEK1/2（以下，MEK）の活性化及び同キナーゼ活性に対する選択的阻害薬である。本邦ではメキニスト®の販売名で「BRAF 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫」の効能・効果でダブラフェニブとの併用において承認を得ている。今回，BRAF V600 遺伝子変異陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌（NSCLC）患者においてダブラフェニブ及びトラメチニブの併用による有効性及び安全性が確認されたことから，その治療薬としての効能・効果追加の製造販売承認事項一部変更承認申請を行う。

悪性黒色腫と同様に NSCLC においても，BRAF V600 遺伝子変異を有する患者が認められている。BRAF V600 遺伝子変異により MAPK シグナル伝達経路が恒常的に活性化され，過剰な腫瘍増殖シグナルをきたすことから，BRAF 及びその下流に存在する MEK を阻害するダブラフェニブ及びトラメチニブの BRAF V600 遺伝子変異を有する NSCLC に対する有効性が期待される。

ダブラフェニブ及びトラメチニブは，*in vitro* で BRAF V600E 遺伝子変異陽性のヒト NSCLC 由来 MV522 細胞株に対して増殖抑制作用を示し，併用時には悪性黒色腫由来 A375 細胞株に対する効果と同等の優れた併用効果を示した。これらの細胞では，MEK，ERK 及び S6 のリン酸化の抑制，細胞周期の G0/G1 期への停止を示すアポトーシス及び細胞周期関連分子の変化がみられたことから，ダブラフェニブ及びトラメチニブの増殖抑制作用は MAPK シグナル伝達経路の阻害によると考えられた。以上の結果から，ダブラフェニブ及びトラメチニブを併用することで，NSCLC に対して悪性黒色腫と同様の優れた効果を示すことが期待された。

ダブラフェニブ及びトラメチニブの化学構造をFigure 1-1，Figure 1-2に示す。

Figure 1-1　　ダブラフェニブメシル酸塩の構造式

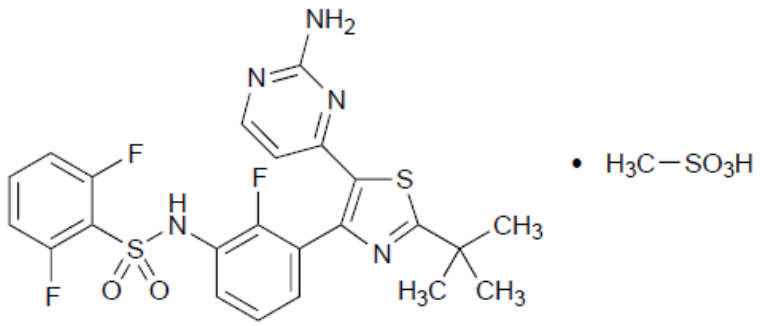
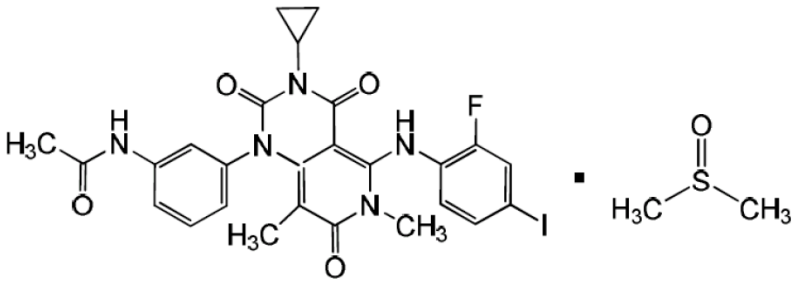


Figure 1-2　　トラメチニブ ジメチルスルホキシド付加物の構造式



2.6.2 薬理試験の概要文

目　次

目　次 2
図 一 覧 2
略号一覧 3
1　薬理試験の概要文 4
1.1　まとめ 4
2　効力を裏付ける試験 6
2.1　NSCLC に対する効果 6
2.1.1　BRAF V600 遺伝子変異陽性ヒト NSCLC 細胞に対する作用 6
3　副次的薬理試験 9
4　安全性薬理試験 9
5　薬力学的薬物相互作用試験 10
6　考察及び結論 10
7　参考文献 10

図 一 覧

Figure 1-1　増殖因子受容体チロシンキナーゼを解した細胞内シグナル伝達（MAPK 経路） 5
Figure 2-1　BRAF V600E 遺伝子変異陽性 NSCLC 由来 MV522 細胞株及び悪性黒色腫由来 A375 細胞株に対するダブラフェニブ及びトラメチニブの増殖抑制作用（併用効果） 7
Figure 2-2　BRAF V600E 遺伝子変異陽性 NSCLC 由来 MV522 細胞株におけるダブラフェニブ及びトラメチニブの MAPK 経路分子又は PI3K 経路分子発現に及ぼす影響 8
Figure 2-3　BRAF V600E 遺伝子変異陽性悪性黒色腫由来 A375 細胞株におけるダブラフェニブ及びトラメチニブの MAPK 経路分子又は PI3K 経路分子発現に及ぼす影響 9

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
ARAF	A-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase	—
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
BRAF	B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase	—
CRAF	C-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase	—
CI	combination index	コンビネーションインデックス
ERK	extracellular signal-regulated kinase	—
IC50	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IC70	70% inhibitory concentration	70%阻害濃度
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	—
MAPK	mitogen-activated protein kinase	—
MEK	mitogen-activated extracellular signal-related kinase	マイトジェン活性化細胞外シグナル関連キナーゼ
NSCLC	non-small cell lung cancer	非小細胞肺癌
RAF	Serine threonine-protein kinase activating downstream effectors involved in tumorigenesis	—
RAS	Protein activating signaling cascades （promoting cell proliferation, neoplastic transformation and oncogenesis）	—

1 薬理試験の概要文

1.1 まとめ

ダブラフェニブメシル酸塩（以下，ダブラフェニブ）は，BRAF の選択的阻害薬であり，アデノシン三リン酸（ATP）との競合阻害により，その作用を発揮する。本邦ではタフィンラー®の販売名で「BRAF 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫」の効能・効果で承認を得ている。

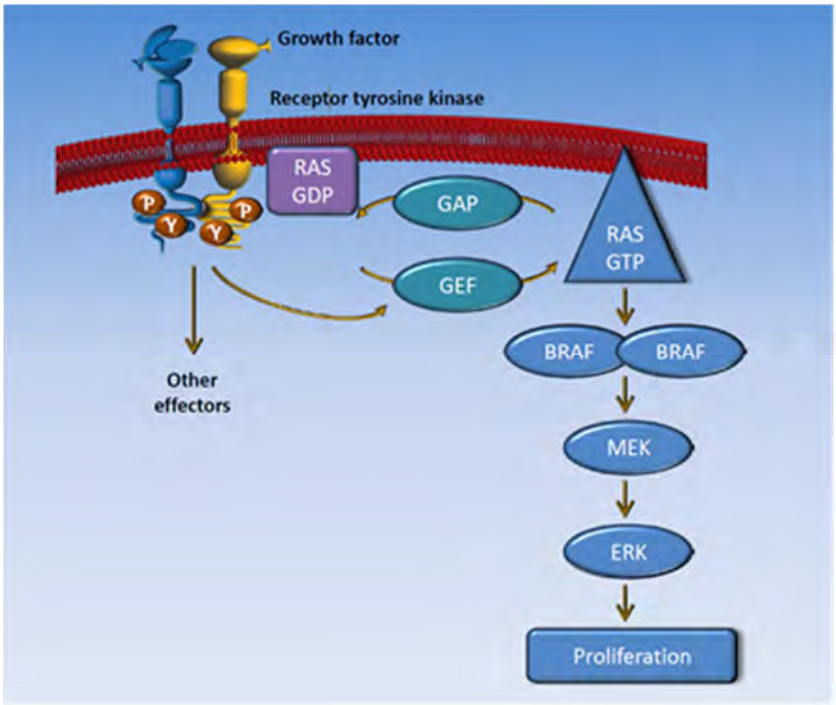
トラメチニブ ジメチルスルホキシド付加物（以下，トラメチニブ）は，MEK1/2（以下，MEK）の活性化及び同キナーゼ活性に対する選択的阻害薬である。本邦ではメキニスト®の販売名で「BRAF 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫」の効能・効果でダブラフェニブとの併用において承認を得ている。

細胞増殖因子により，受容体チロシンキナーゼが刺激されると，RAS，続いて RAF，MEK さらに ERK（MAPK シグナル伝達経路）が活性化される（Figure 1-1）。RAF には 3 種類のサブタイプ（ARAF，BRAF 及び CRAF）が知られており，ホモ又はヘテロ二量体を形成して，下流に位置する MEK1/2 の 2 つのセリン残基をリン酸化する。MEK は，セリン/スレオニンキナーゼであり，RAF により活性化した MEK は，ERK のスレオニン及びセリン残基をリン酸化する。リン酸化 ERK は核内へ移行し，細胞周期及び細胞増殖関連遺伝子の転写を制御することにより，細胞の成長，増殖や生存を調節する（Cargnello and Roux 2011，Lito et al. 2013）。

種々のがん種において BRAF 遺伝子の変異が高頻度に認められており，その変異の多くは BRAF の立体構造の変化をもたらし，その下流に存在する MEK 及び ERK を異常に活性化する。中でも最も高頻度の変異は Exon15 における T1799 塩基置換型の点突然変異であり，キナーゼドメイン内に位置する 600 番目のアミノ酸であるバリン（V600）が主にグルタミン酸，アスパラギン酸又はリジンに変異する（V600E，V600D 又は V600K）（Wellbrock et al. 2004，Wan et al. 2004，Bello et al. 2013）。V600 遺伝子変異陽性の BRAF は野生型と比較して高い活性を持つことが報告されており（Wan et al. 2004），RAS の活性化に関係なく恒常的に MEK 及び ERK を活性化すると考えられている。MEK 及び ERK の恒常的な活性化は，細胞周期促進因子（サイクリン D1 等）の発現上昇及び細胞周期抑制因子（p27 等）の発現低下を誘導すること，及びアポトーシス関連因子の機能を調節することにより，がん細胞の増殖を促進すると考えられる（Bello et al. 2013）。このことから，BRAF および MEK は BRAF V600 遺伝子変異陽性のがんに対する分子標的薬のターゲットになると考えられている（Sasaki et al. 2004，Ashida et al. 2012）。事実，非臨床及び臨床試験において BRAF V600 遺伝子変異陽性の悪性黒色腫に対し，ダブラフェニブにおける腫瘍増殖抑制効果が認められている。さらに，トラメチニブとの併用により MAPK 経路の BRAF 及び MEK を同時に阻害することで，より強力かつ持続的な腫瘍増殖抑制効果が認められており，併用療法の妥当性が支持されている。

今回申請の非小細胞肺癌（NSCLC）においても，BRAF 遺伝子変異を有する患者が認められており，BRAF 遺伝子変異の約 50%を BRAF V600E 遺伝子変異が占めることが報告されている（Marchetti et al.2011，Cardarella et al. 2013）。既に承認を取得している BRAF 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫と同様に，BRAF V600 遺伝子変異陽性の NSCLC においても BRAF V600 を分子標的とすることで治療効果の優れた新たな治療薬を臨床現場に提供可能と考えられる。

Figure 1-1　　増殖因子受容体チロシンキナーゼを解した細胞内シグナル伝達（MAPK 経路）



Source : (Alcala and Flaherty 2012 を改変)

In vitro 試験において，BRAF V600E 遺伝子変異陽性のヒト NSCLC 由来 MV522 細胞株に対し，ダブラフェニブとトラメチニブの併用は各々を単独で用いた場合に比較してより強い増殖抑制作用を示した。また， MEK，ERK，S6 のリン酸化の抑制，細胞周期の G0/G1 期への停止を示すアポトーシス及び細胞周期関連分子の変化がみられた。ダブラフェニブとトラメチニブの併用効果は，併用係数の比較で，BRAF V600E 遺伝子変異陽性の悪性黒色腫由来 A375 細胞株でみられた効果とほぼ同等であった。

以上より，ダブラフェニブ及びトラメチニブの併用は，RAS/RAF/MEK/ERK（MAPK）経路を阻害することにより BRAF V600 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌の増殖を抑制し，抗腫瘍効果を示すものと考えられる。

2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験では，NSCLC に対するダブラフェニブ及びトラメチニブ併用での作用を記載する。

2.1 NSCLC に対する効果

2.1.1 BRAF V600 遺伝子変異陽性ヒト NSCLC 細胞に対する作用

BRAF V600 遺伝子変異を有する腫瘍細胞に対するダブラフェニブ及びトラメチニブの抗腫瘍効果を，BRAF V600E 遺伝子変異陽性のヒト NSCLC 由来 MV522 細胞株（以下，MV522 細胞株）及び BRAF V600E 遺伝子変異陽性の悪性黒色腫由来 A375 細胞株（以下，A375 細胞株）を用いて *in vitro* で検討した [Table 2.6.3.1-2013N169244_00]。その他，BRAF G469A 遺伝子変異陽性の NSCLC 由来細胞株（NCI-H1395 及び NCI-H1755 細胞株）に対する作用についても検討した。各細胞株をダブラフェニブ及びトラメチニブの単独又は併用下で 72 時間培養した後，CellTiterGlo アッセイにより生細胞数を計測し，増殖抑制作用の 50%阻害濃度（IC50）及び 70%阻害濃度（IC70）を算出した。

ダブラフェニブ及びトラメチニブは，いずれも単独で BRAF V600E 遺伝子変異を有する MV522 細胞株に対して増殖抑制作用を示し，その IC50 はそれぞれ 4.3 nM 及び 1.3 nM であった。A375 細胞株に対しても同程度の増殖抑制作用を示し，その IC50 はそれぞれ 5.8 nM 及び 1.1 nM であった。一方，NCI-H1395 細胞株に対してはいずれも増殖抑制作用を示さなかった（IC50 > 1000nM）。NCI-H1755 細胞株に対しては，ダブラフェニブは増殖抑制作用を示さず（IC50 > 10,000nM），トラメチニブはある程度の活性を示したのみであった（IC50: 59nM）。

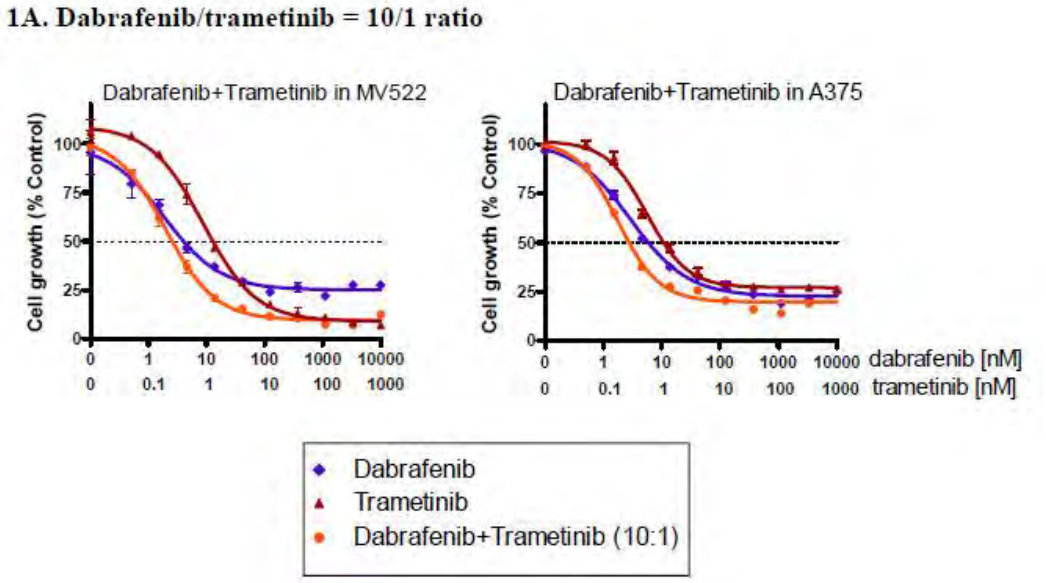
ダブラフェニブ及びトラメチニブの併用（モル濃度比 10:1）では，MV522 細胞株に対して単独より強い増殖抑制作用を示し，その IC50 はダブラフェニブとして 2.3 nM 及びトラメチニブとして 0.2 nM であった。ダブラフェニブ及びトラメチニブ併用時の細胞増殖抑制作用をそれぞれの単独と比較し，その併用効果を評価した。評価にはコンビネーションインデックス（CI）法を用いた。CI 法では Chou&Talalay の方法（Chou and Talalay 1984）を用い，CI＜0.9（相乗効果），0.9~1.1（相加効果）及び CI＞1.1（拮抗作用）と定義した。ダブラフェニブ及びトラメチニブ併用による CI は IC50, IC70 でそれぞれ 0.89 及び 0.42 であり，相加的又は相乗的な効果を示した。また，A375 細胞株に対しても同程度の増殖抑制作用を示し，その IC50 はそれぞれダブラフェニブとして 2.7 nM 及びトラメチニブとして 0.3 nM，ダブラフェニブ及びトラメチニブ併用による CI は IC50，IC70 でそれぞれ 0.84 及び 0.35 であった（Figure 2-1）。

ダブラフェニブは MV522 細胞株及び A375 細胞株に対して，MAPK 経路の MEK 及び ERK，その下流に位置する S6 のリン酸化を濃度依存的に抑制した。 また，アポトーシスの指標である切断型 parp が誘導され，その作用は併用でより顕著であった。さらに，MV522 細胞株に対してはダブラフェニブ及びトラメチニブの併用において，A375 細胞株に対してはダブラフェニブ及びトラメチニブの単独又は併用において細胞周期抑制因子 p27 の発現が亢進し，細胞周期促進因子

サイクリン D1 の発現が低下した。一方で，単独，併用のいずれにおいても，PI3K シグナル経路の下流に位置する AKT のリン酸化レベルにほとんど影響はみられなかった（Figure 2-2，Figure 2-3）。

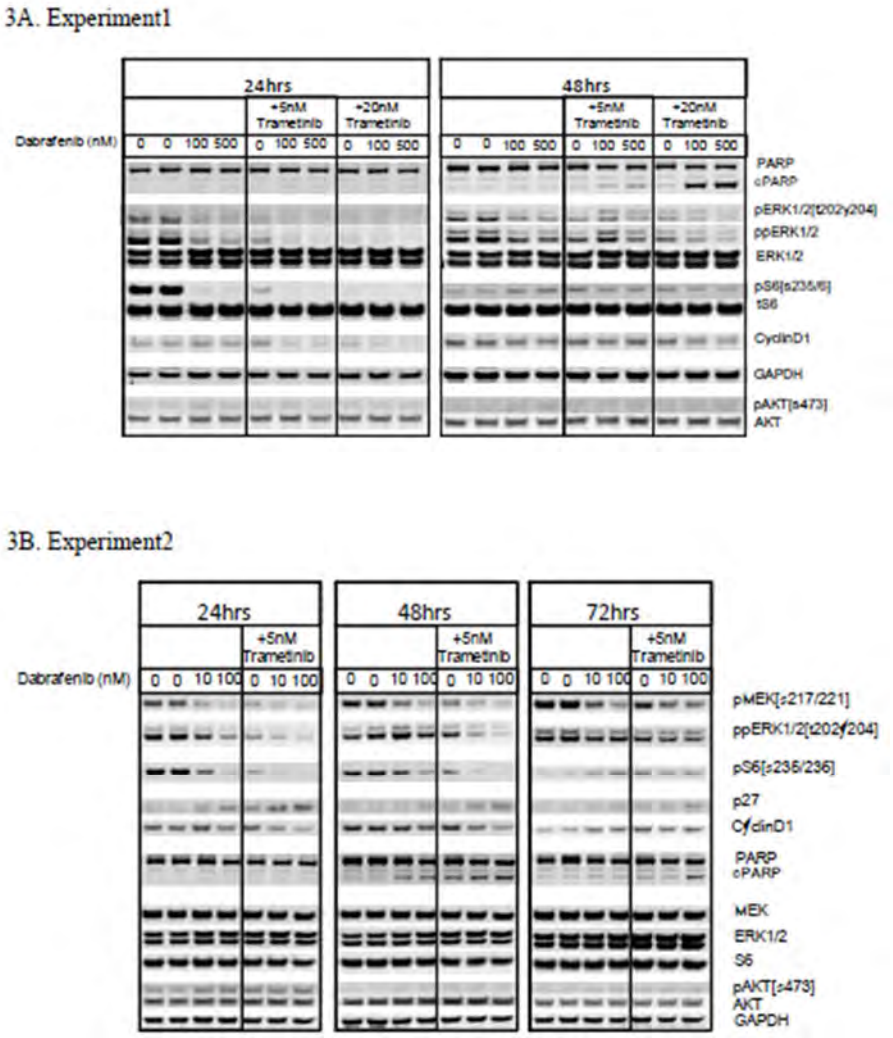
以上のように，BRAF V600E 遺伝子変異陽性のヒト NSCLC 由来 MV522 細胞株を用いた検討の結果，悪性黒色腫由来 A375 細胞株と同じようにダブラフェニブとトラメチニブの併用による増殖抑制効果が認められ，MAPK 経路及び下流の分子，並びにアポトーシス及び細胞周期関連分子の変化が確認された。

Figure 2-1　BRAF V600E 遺伝子変異陽性 NSCLC 由来 MV522 細胞株及び悪性黒色腫由来 A375 細胞株に対するダブラフェニブ及びトラメチニブの増殖抑制作用（併用効果）



MV522 細胞株及び A375 細胞株をダブラフェニブ及びトラメチニブ存在下で 72 時間培養後，CellTiterGlo アッセイにより生細胞数を計測した。点線は溶媒（DMSO）対照群の 50%細胞数を示す。Figure は代表的なデータの一例を示す。

Figure 2-2　BRAF V600E 遺伝子変異陽性 NSCLC 由来 MV522 細胞株におけるダブラフェニブ及びトラメチニブの MAPK 経路分子又は PI3K 経路分子発現に及ぼす影響

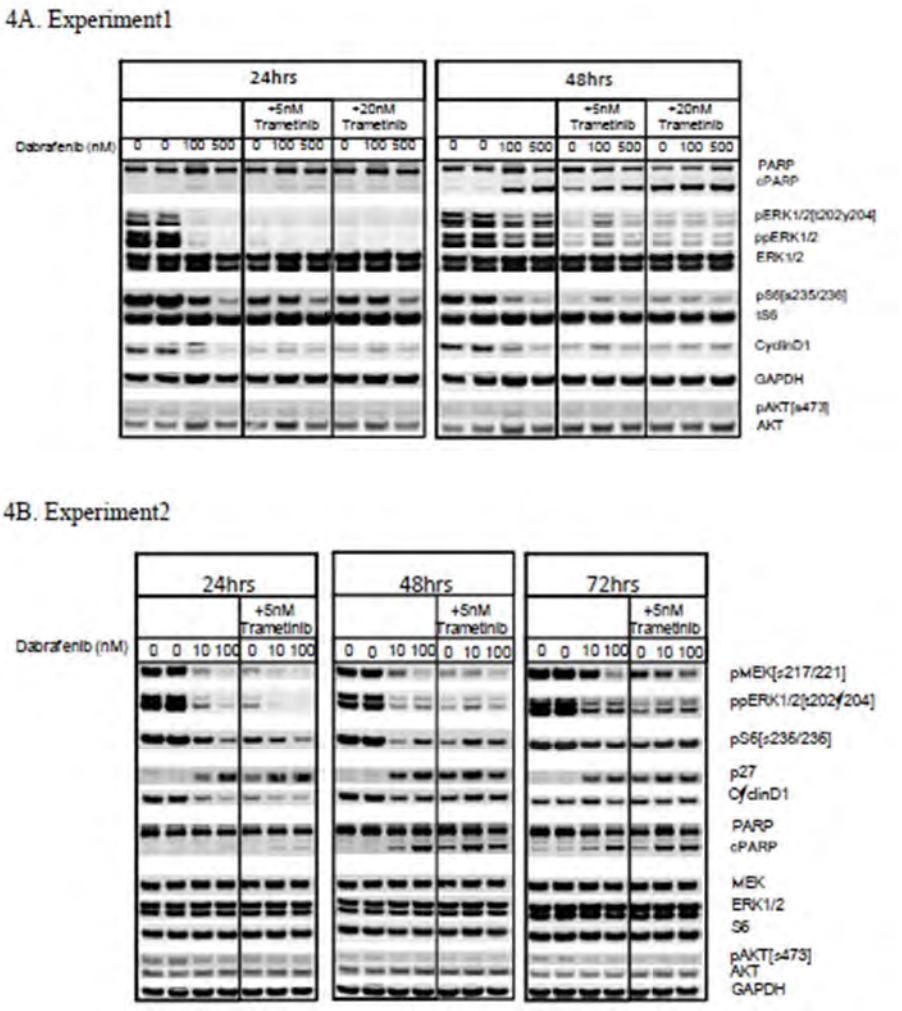


実験 1: ダブラフェニブ（0, 100 又は 500 nM）及びトラメチニブ（5 又は 20 nM）の単独及び併用下で MV522 細胞株を 24，48 時間培養した。

実験 2: ダブラフェニブ（0, 10 又は 100 nM）及びトラメチニブ（5 nM）の単独及び併用下で MV522 細胞株を 24，48，72 時間培養した。

ウエスタンブロット法により各分子のタンパクレベルを測定した。

Figure 2-3　BRAF V600E 遺伝子変異陽性悪性黒色腫由来 A375 細胞株におけるダブラフェニブ及びトラメチニブの MAPK 経路分子又は PI3K 経路分子発現に及ぼす影響



実験 1: ダブラフェニブ（0, 100 又は 500 nM）及びトラメチニブ（5 又は 20nM）の単独及び併用下で A375 細胞株を 24，48 時間培養した

実験 2: ダブラフェニブ（0, 10 又は 100 nM）及びトラメチニブ（5nM）の単独及び併用下で A375 細胞株を 24，48，72 時間培養した。

ウエスタンブロット法により各分子のタンパクレベルを測定した。

3　副次的薬理試験

該当資料なし。

4　安全性薬理試験

該当資料なし。

5 薬力学的薬物相互作用試験

該当資料なし。

6 考察及び結論

ダブラフェニブ及びトラメチニブは，*in vitro* で BRAF V600E 遺伝子変異陽性のヒト NSCLC 由来 MV522 細胞株に対して増殖抑制作用を示し，併用時には悪性黒色腫由来 A375 細胞株に対する効果と同等の優れた併用効果を示した。

これらの細胞では，MEK，ERK 及び S6 のリン酸化の抑制，細胞周期の G0/G1 期への停止を示すアポトーシス及び細胞周期関連分子の変化がみられたことから，ダブラフェニブ及びトラメチニブの増殖抑制作用は MAPK シグナル伝達経路の阻害によると考えられた。

以上の結果から，ダブラフェニブ及びトラメチニブを併用することで，NSCLC に対して悪性黒色腫と同様の優れた効果が期待される。

7 参考文献

[Alcala AM and Flaherty KT (2012)] BRAF inhibitors for the treatment of metastatic melanoma: clinical trials and mechanisms of resistance. Clin Cancer Res; 18:33-9.

[Ashida A, Uhara H, Kiniwa Y, et al. (2012)] Assessment of *BRAF* and *KIT* mutations in Japanese melanoma patients. J Dermatol Sci; 66:240-2.

[Bello DM, Ariyan CE, Carvajal RD (2013)]. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. Cancer Control; 20:261-81.

[Cardarella S, Ogino A, Nishino M, et al. (2013)] Clinical, Pathological, and Biological Features Associated with BRAF Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res; 19(16):4532-40.

[Cargnello M and Roux PP (2011)] Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. Microbiol Mol Biol Rev; 75(1):50-83.

[Chou TC and Talalay P (1984)] Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul; 22:27-55.

[Lito P, Rosen N, Solit DB, et al. (2013)] Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. Nat Med; 19(11):1401-9.

[Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, et al. (2011)] Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring BRAF Mutations. J Clin Oncol; 29(26):3574-9.

[Sasaki Y, Niu C, Makino R, et al. (2004)] *BRAF* point mutations in primary melanoma show different prevalences by subtype. J Invest Dermatol; 123:177-83.

[Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, et al. (2004)] Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell; 116(6):855-67.

[Wellbrock C, Karasarides M, Marais R (2004)] The RAF proteins take centre stage. Mol Cell Biol. 2004;5:875-85.

2.6.3 薬理試験概要表

目　次

目　次 2
略号一覧 3
2.6.3.1　薬理試験一覧表 4
2.6.3.2　薬効を裏付ける試験 5
2.6.3.3　副次的薬理試験 5
2.6.3.4　安全性薬理試験 5

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
BRAF	B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase	—
NSCLC	non-small cell lung cancer	非小細胞肺癌

2.6.3.1 薬理試験一覧表

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
効力を裏付ける試験					
>*In vitro* 薬理試験					
BRAF V600 遺伝子変異陽性ヒト NSCLC 細胞に対する作用	ヒト NSCLC 由来 MV522 細胞株をダブラフェニブ及びトラメチニブと培養し，CellTiterGlo アッセイにより生細胞数を測定。	*in vitro*	Immuno-Oncology & Combinations DPU GlaxoSmithKline Research and Development	2013N169244_00	4.2.1.1-1

2.6.3.2　薬効を裏付ける試験

該当なし（2.6.3.1 薬理試験一覧表に記載したため。）。

2.6.3.3　副次的薬理試験

該当なし。

2.6.3.4　安全性薬理試験

該当なし。