

受賞対象論文

Isozaki H, Ichihara E, Takigawa N, Ohashi K, Ochi N, Yasugi M, Ninomiya T, Yamane H, Hotta K, Sakai K, Matsumoto K, Hosokawa S, Bessho A, Sendo T, Tanimoto M, Kiura K : Non-Small Cell Lung Cancer Cells Acquire Resistance to the ALK Inhibitor Alectinib by Activating Alternative Receptor Tyrosine Kinases. *Cancer Res* (2016) 76, 1506-1516.

磯崎 英子

Hideko Isozaki

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 臨床薬剤学

Department of Clinical Pharmaceutics, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences



<プロフィール>

昭和55年生まれ

平成14年3月 摂南大学薬学部薬学科卒業

平成14年4月 岡山大学医学部附属病院 薬剤部

平成17年4月 光生病院 薬剤部

平成18年7月 岡山大学医学部・歯学部附属病院 薬剤部

平成28年6月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了
現在に至る

研究の背景と経緯

昭和56年以降、がんは日本における死因のトップを維持しています。なかでも肺癌は死亡率第1位（男性は1位、女性は大腸癌に次いで2位）であり、年間死亡数は約7万人にも及びます¹⁾。この30年、遺伝子解析や創薬技術の発展により、がんを取り巻く環境は飛躍的に進歩してきました。しかしながら、がんは死因第一位を維持し続けている、すなわち根治することができていない。その原因の一つとして、今回の私の研究テーマである薬剤耐性が挙げられます。血液・腫瘍・呼吸器内科では、肺癌の薬剤耐性メカニズムを解明し、克服する手段を見出すことにより、長期生存さらには根治を目指した基礎および臨床研究をおこなっています。大学院に入学当初、研究テーマを思案している中で、当科肺癌グループの研究に興味を抱いた私は、カンファレンスへの出席を希望しました。薬剤師である私が医局で開かれているカンファレンスに赴くことはとても勇気のいることでしたが、みなさま暖かく迎えてくださいました。そして木浦教授から、うちで研究してみますかと優しくお声をかけていただき、私の研究はスタートしました。

EML4-ALK 融合遺伝子は、受容体型チロシンキナーゼをコードする ALK 遺伝子と EML4 遺伝子が融合し

てできた異常ながん遺伝子であり、2007年に日本のグループによって発見されました²⁾。この遺伝子異常によって発現する EML4-ALK 融合タンパクは恒常的な ALK チロシンキナーゼの活性化により、癌細胞の増殖や進展を促します。非小細胞肺癌患者の約3~5%に見られ、若年、肺腺癌、非喫煙者に多い傾向にあります。この ALK 陽性肺癌に対しては、異常活性化した ALK のチロシンキナーゼ活性を阻害できる ALK チロシンキナーゼ阻害薬が有効であることが明らかとなっており、2017年1月現在、本邦では3種の ALK 阻害薬が臨床応用されています。

私が大学院生として研究を開始した2011年5月、中外製薬鎌倉研究所において創薬された第二世代 ALK 阻害剤 CH5424802 (のちのアレクチニブ) の有効性を検証した *in vitro* および *in vivo* のデータが *Cancer Cell* 誌に報告されました³⁾。先行薬であるクリゾチニブと比較して、アレクチニブは ALK に対する選択性が高く、毒性の軽減や奏効率の観点から大きな期待を背負っており、岡山大学病院呼吸器内科でも国内第 I / II 相試験に参加していました。しかしながら、分子標的薬は高い奏効率が期待できる一方、多くの症例において数年以内に癌細胞が薬剤に耐性を獲得し、再燃をきたしてしまうことが問題となっていました。アレクチニブについても同様の現象が起こることが懸念され

ており、これが私の研究テーマとなりました。アレクチニブは日本で創薬された経緯もあり、研究開始当初、当科以外はまだ入手できない薬であると木浦教授から伺っておりました。開発段階の薬について、発売後に生じる問題を世界に先駆けて行うことは、まさに私が憧れていた研究内容でした。このような研究に携わる機会に恵まれたことは本当にありがたく、私は本研究に夢中になってゆきました。

研究成果の内容

1. アレクチニブ耐性株の樹立

ALK 肺癌は希少疾患であり、EML4-ALK 陽性肺腺癌細胞株も当初はかなり希少でした。購入できる株は今でも一種類、H2228のみです。幸運なことに、当科の患者胸水から当時大学院生であった八杉先生が細胞株 ABC-11 を樹立することに成功され⁴⁾、私は2種類の細胞株を用いて実験を行うことができました。これは臨床の研究室ならではの手法であり、本研究にさらに引き込まれてゆく出来事でした。まず EML4-ALK 陽性肺腺癌細胞株 (H2228 および ABC-11) に対し、アレクチニブを継続的に曝露することにより、耐性株を樹立しました。

イマチニブやゲフィチニブといったキナーゼ阻害剤の代表的な耐性機序として、キナーゼドメインの二次性遺伝子変異が報告されています。二次変異が生じることによって、薬剤の結合部位に構造変化がおこり、薬剤の親和性が低下し、効果が減弱するという現象です。今回樹立したアレクチニブ耐性株について、ダイレクトシーケンスにより ALK キナーゼドメイン部の配列を確認しましたが、二次変異はみとめられませんでした。

2. H2228/CHR における EML4-ALK 融合遺伝子の消失

H2228/CHR について実験をすすめてゆくと、ひとつ奇妙な結果が得られました。耐性株において、ALK タンパクが消失している。外観の変化もなく、親株との起源確認も問題なく、コンタミネーションではないようでした。私は、おかしな耐性株を樹立してしまったと思いました。5 ヶ月かけて育てた耐性株でしたが、やり直しを命じられるだろうと落ち込んでいたところ、「面白いね」とみんな喜んでくれました。実験は初めてで、その手技に全く信用のない私が出したデータ

を信じてくれたことが、何より嬉しかったのを記憶しています。

さらに実験をすすめる、耐性株樹立の過程でストックしていた各細胞株について ALK の免疫染色をおこなってみると、樹立過程で ALK タンパクが徐々に失われていたことがわかりました。この結果は mRNA および DNA レベルにおいても同様であり、アレクチニブ継続曝露により耐性化していく過程で EML4-ALK 融合遺伝子が消失するという現象が確認されました。そして、その消失に応じて、アレクチニブへの感受性が低下していることも明らかとなりました。

3. H2228/CHR における IGF1R および HER3 の活性化

Driver oncogene である EML4-ALK を失った H2228/CHR ですが、ALK に代わり IGF1R および HER3 が活性化していることが明らかとなりました。このような耐性機構においては、IGF1R および HER3 チロシンキナーゼの両阻害が有効であることが示唆されました。

4. ABC-11/CHR における HGF 自己分泌および MET の活性化

もう一つの耐性株である ABC-11/CHR においては、MET の活性化が pRTK アレイにより確認されました。ウェスタンブロットリングおよび定量 PCR の結果から、MET の過剰発現や MET 遺伝子の有意な増幅は認められませんでした。そこで、MET の活性化の機序としてそのリガンドである肝細胞増殖因子 (HGF) に着目し、その発現を検討しました。ウェスタンブロットリングおよびリアルタイム PCR により、ABC-11/CHR における HGF タンパクおよび mRNA の発現上昇を認めました。更に、培養液中の HGF 濃度も有意に上昇しており (ELISA 法)、癌細胞自ら HGF を分泌していることが明らかとなりました。

以上の結果より、本耐性株 ABC-11/CHR は HGF の自己分泌により MET を活性化し、アレクチニブに対する耐性を獲得したものと考えました。

5. クリゾチニブによるアレクチニブ耐性の克服

前述の結果を受けて第一世代 ALK 阻害薬であるクリゾチニブの効果を検証しました。クリゾチニブはもとも MET 阻害剤として創薬された薬剤でした。開発途中で EML4-ALK 融合遺伝子の発見という大きな出来事があり、クリゾチニブは ALK もターゲットとすることが判明したことから、開発の方針が ALK 阻

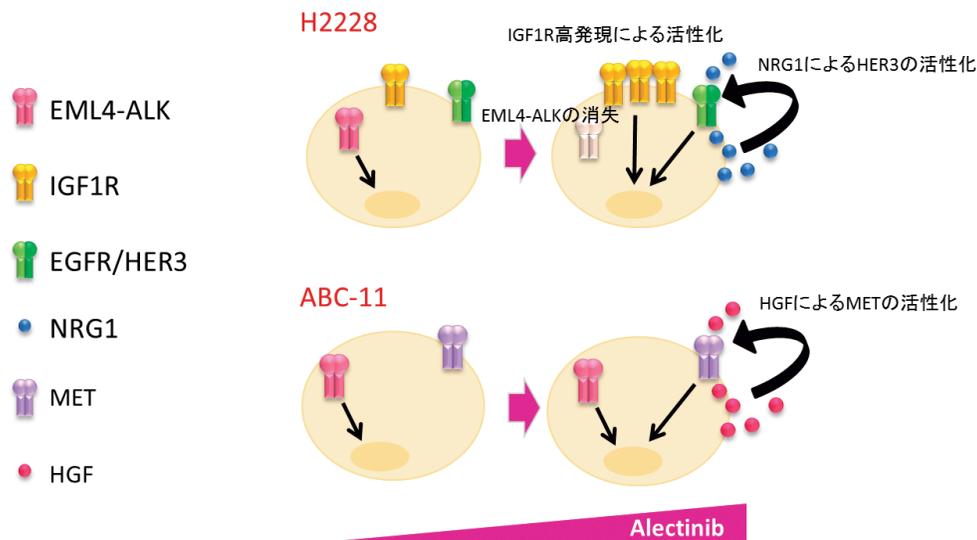


図 アレクチニブの耐性メカニズム

害剤となったという経緯があります。ABC-11/CHR に対し、MET および ALK 両者を抑えるクリゾチニブの効果を検証したところ、単剤で ABC-11/CHR の増殖をしっかりと抑制することができました。マウス皮下腫瘍モデルにおいてもクリゾチニブは ABC-11/CHR の腫瘍増大を有意に抑制しました。

以上の結果から、HGF 自己分泌による MET 活性化を耐性機序とするアレクチニブ耐性肺癌に対し、MET/ALK 阻害剤であるクリゾチニブの有効性が示唆されました。

6. アレクチニブ耐性患者検体における検証

本成果の論文を執筆している最中に、EML4-ALK 融合遺伝子陽性の進行非小細胞肺癌と診断された患者検体を解析する機会に恵まれました。免疫染色法によりアレクチニブ耐性化前後における HGF 発現の変化を比較したところ、アレクチニブ治療前では HGF の発現は認められませんでした。アレクチニブ治療後に再燃を時点での検体では HGF の高い発現が認められました。ようやく入手することができた1つの症例で基礎データと一致する結果が得られたことにとっても驚き、興奮しました。それと同時に、これまで自身が証明してきた基礎データが間違いではなく、確かに実臨床でも起こりうる現象であることが確認できたことに安堵しました。幸いにも臨床検体の解析を加え、一つの論文として発表することができました。

研究成果の意義

アレクチニブは、国内第Ⅱ相試験で高い奏効率を示し⁵⁾、さらに第一世代のクリゾチニブとの比較試験（J-ALEX 試験）では有意に無増悪生存期間を延長したことから、2016年12月には日本肺癌学会ガイドラインにおいて「Ⅳ期の ALK 陽性肺癌における一次治療としてアレクチニブ単剤で行うよう勧められる（推奨グレードA）」と改訂されました。これによって、アレクチニブの耐性に関する見識はさらに重要性を増し、現在世界で非常に注目度の高い研究内容となっています。今回、私達は二つのアレクチニブ耐性機構を発見し、これを克服しうる治療を提案することができました。この研究結果をもとに、ALK 融合遺伝子陽性肺癌におけるアレクチニブ耐性後のクリゾチニブの有効性を検討する第二相試験が現在進行中です⁶⁾。本試験の結果は、ALK 肺癌の生存期間の延長、さらには根治を目指した新たな治療ストラテジーの提案に繋がるものと考えます。

謝 辞

末筆になりましたが、他の研究室に身を置くことをご承諾くださいました千堂年昭教授、際限なく研究の場を与えてくださった谷本光音教授、楽しく研究することを教えてくださった木浦勝行教授、その他本研究を通じて知り合うことのできたすべての方々に、心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省：平成27年人口動態統計月報年計（概数）.
- 2) Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, et al. : Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* (2007) 448, 561-566.
- 3) Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, Kodama T, Kobayashi T, Fukami TA, Oikawa N, Tsukuda T, Ishii N, Aoki Y : CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer Cell* (2011) 19, 679-690.
- 4) Isozaki H, Yasugi M, Takigawa N, Hotta K, Ichihara E, Taniguchi A, Toyooka S, Hashida S, Sendo T, Tanimoto M, Kiura K : A new human lung adenocarcinoma cell line harboring the EML4-ALK fusion gene. *Jpn J Clin Oncol* (2014) 44, 963-968.
- 5) Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, Hida T, Yamamoto N, Yoshioka H, Harada M, Ohe Y, Nogami N, et al. : CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study) : a single-arm, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol* (2013) 14, 590-598.
- 6) Isozaki H, Hotta K, Ichihara E, Takigawa N, Ohashi K, Kubo T, Ninomiya T, Ninomiya K, Oda N, Yoshioka H, Ichikawa H, Inoue M, et al. : Protocol Design for the Bench to Bed Trial in Alectinib-Refractory Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Harboring the EML4-ALK Fusion Gene (ALRIGHT/OLCSG1405). *Clin Lung Cancer* (2016) 17, 602-605.

平成29年1月4日受稿
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1
電話：086-235-7227 FAX：086-232-8226
E-mail：h.isozaki@okayama-u.ac.jp