

博士論文

チロシンキナーゼ融合遺伝子陽性がんにおける

薬剤耐性化機構とその克服法の解析

(Identification of the drug resistance mechanisms in tyrosine
kinase fusion oncogene positive cancer and the therapeutic
strategies to overcome the resistance)

岡田 康太郎

目次

序論	3
第一章 Alectinib-Lorlatinib 逐次治療後に出現し得る耐性化機構の解明.....	9
第二章 Lorlatinib 耐性 EML4-ALK 重複変異体に対する克服薬の同定	27
第三章 Lorlatinib 初期耐性に関わる制御因子の探索	75
総合討論	97
参考文献	105
謝辞	113

序論

肺がんは世界的に最も死亡者数の多いがん種である。現在、肺がんは組織型による分類がされており、中でも非小細胞肺がんが約 70%を占めている。非小細胞肺がんのうち約 70%で見られる肺腺がんにおいては *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*)などの細胞増殖に関わる膜受容型チロシンキナーゼをコードする遺伝子の異常が原因でがん化が誘導されることが知られている¹。

2007年には Soda らが非小細胞肺がんから、固形がんでは初めて *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*)融合遺伝子を同定し²、現在では非小細胞肺がん患者の 3%-6%で検出されている。このがんは、若年者や非喫煙者で多く見られていることが特徴として挙げられる³⁻⁶。*ALK*は通常胚発生時に脳神経系の細胞に発現し⁷、細胞増殖因子である *ALKALs* が *ALK* の細胞外ドメインに結合することで多量体を形成し、チロシンキナーゼ活性が誘導される⁸。一方で、*ALK* 融合遺伝子陽性肺がんにおいては、融合パートナー遺伝子側のプロモーターを介して恒常的に融合タンパク質が細胞内に発現し、融合パートナータンパク質側の多量体形成ドメインを介して多量体を形成し、恒常的に *ALK* チロシンキナーゼ活性が生じている。現在、融合パートナー遺伝子としては Soda らが発見した *EML4* 遺伝子の他にも *KLC1* 遺伝子や *KIF5B* 遺伝子など、数多く存在する⁹⁻¹²。これら融合パートナータンパク質を介した恒常的な *ALK* の活性化の結果、MEK-ERK、PI3K-AKT、JAK-STAT 経路等の細胞増殖、生存に関わるシグナル伝達経路が恒常的に活性化されがん化を誘導していることが知られており¹³、*ALK* の活性を直接的に抑制することができる *ALK* 阻害薬 (*ALK-Tyrosine Kinase Inhibitor: ALK-TKI*)が従来の化学療法と比較して、顕著に無増悪生存期間 (*Progression Free Survival*、以下 *PFS*)を延長してきた (*Fig. 0-1*)。

現在、第1世代 *ALK* 阻害薬に分類される *Crizotinib* (*PF-02341066*)は *c-MET*、*ROS-1* 等の他のチロシンキナーゼの活性も同時に阻害するマルチキナーゼ阻害薬であり、特に *c-MET* 阻害薬としての開発が進められていた¹⁴。しかしながら、*Profile 1014* 試験¹⁵や *Profile1007* 試験¹⁶等の *ALK* 融合遺伝子陽性肺がん患者を対象とした臨床試験において、従来の化学療法群と比較し、*Crizotinib* 投与群は *PFS* を有意に延長したため、*ALK* 融合遺伝子陽性肺がんに対する治療薬として開発されるに至った (*Profile1014* 試験:*Crizotinib* 10.9 ヶ月、化学療法 7.0 ヶ月、*Profile1007* 試験:*Crizotinib* 7.7 ヶ月、化学療法 3.0 ヶ月)。その後、*Crizotinib* は初回治療において使用されてきたが、1年程度で *Crizotinib* に対して耐性細胞が出現することが臨床で大きな問題となっていた。これら耐性化機構は大きく分けて3つ存在し (*Fig. 0-2*)、最初に発見された *L1196M* 変異や *C1156Y* 変異などの *ALK* キナーゼドメインにおける変異

体の出現、EGFR のような ALK 以外のチロシンキナーゼの活性化 (Bypass 経路の活性化)、ALK 融合遺伝子の増幅が挙げられる¹⁷⁻²¹。第 2 世代 ALK 阻害薬に分類される Alectinib (CH5424802)は国内第 I / II 相試験である AF-001JP 試験において PFS の中央値が未到達と非常に良好な成績であり²²、前臨床段階では Crizotinib 耐性変異体に有効であることが示された²³。また、近年においては 1 次治療における J-ALEX 試験や ALEX 試験のような Crizotinib と Alectinib の直接比較臨床試験も行われ²⁴⁻²⁶、低副作用且つ Alectinib 投与群では Crizotinib 投与群と比較して有意な PFS の延長が見られた (J-ALEX 試験:Alectinib 治療群 34.1 ヶ月、Crizotinib 治療群 10.2 ヶ月、ALEX 試験: Alectinib 治療群 34.9 ヶ月、Crizotinib 治療群 10.9 ヶ月)。そのため、今日では、Alectinib が 1 次治療において広く使用されている。しかしながら、Crizotinib 同様 Alectinib にも治療後数年でがん細胞が耐性化してしまうことが問題となっている²⁷⁻³³。Crizotinib に対する耐性化機構と比較して、ALK キナーゼドメインにおける耐性変異が多く出現することが特徴であり、その割合は約半数にも上る。中でも、1202 番目のグリシンがアルギニンに変異した G1202R 変異や 1171 番目のイソロイシンがアスパラギンに変異した I1171N 変異が高頻度に見出されている³⁴。このように ALK 阻害薬に対する耐性化機構には耐性変異体が数多く関わっており、耐性変異体の克服が急務であった。第 3 世代 ALK 阻害薬 Lorlatinib (PF-06463922)は前臨床段階において従来の ALK 阻害薬耐性変異体に対して強力な抗腫瘍効果を発揮し^{35,36}、臨床試験においても既に他の ALK 阻害薬に耐性となった患者に対して有効性を示した³⁷。そのため、2018 年には我が国や米国を中心として、Lorlatinib は 2 次治療以降の使用が承認されている。また、2019 年現在では、Crizotinib と Lorlatinib の 1 次治療における比較臨床試験 CROWN 試験も継続中である。2016 年に Crizotinib-Lorlatinib 逐次治療の後に耐性化した患者も確認されており³⁸、Lorlatinib に対する耐性化も今後さらに出現することが懸念されたが、その詳細な機構は明らかとなっていなかった。

最近、がん細胞が薬剤に対して耐性を獲得する原因の一つとして Drug Tolerant Persister 細胞 (以下 DTP 細胞)が注目されている^{39,40}。現在では、薬剤処理初期から生き残り、可逆的な抵抗性を有する細胞集団として認知されている。近年、細胞株を用いた研究においては様々ながん腫で DTP 細胞の存在が示唆されており、2010 年には Shurma らにより DTP 細胞の薬剤初期抵抗性のメカニズムに HDAC (Histone deacetylase)や IGF1R (Insulin-like growth factor 1 receptor)が関与することが明らかとされた⁴¹。最近ではこれら因子以外にも BORIS (Brother of the regulator of imprinted sites)などのエピジェネティックな制御に関わる因子や GPX4 (Glutathione peroxidase4)のような細胞内代謝に関わる因子、さらには AXL のような膜

受容体型チロシンキナーゼ等の様々なタンパク質が DTP 細胞薬剤抵抗性の維持に関与していることが見出されている⁴²⁻⁴⁶。しかしながら、これら因子がどのようにして可逆的な薬剤抵抗性や初期の耐性に関わっているか詳細な見解はまだ得られていない。

以上を踏まえて、私は今後の臨床において Alectinib 耐性変異体として高頻度に見出されている G1202R や I1171N 変異を有した患者に Lorlatinib 治療が施される治療戦略が多くなると予想し、Alectinib-Lorlatinib 逐次治療後に出現し得る耐性化機構やそれらに対する克服法を発見すると同時に、そもそもの耐性化細胞の根源である DTP 細胞の初期且つ可逆的な薬剤抵抗性に関わる細胞内経路やその克服法を発見することを目標に研究を行った。*in vitro* における ENU mutagenesis screening や *in vivo* 担がんマウスモデルから G1202R 変異や I1171N 変異の他に ALK キナーゼドメインに変異が蓄積した新規重複変異体を計 14 種同定した。さらにこれら重複変異体の実臨床で使用可能もしくは臨床試験中の ALK 阻害薬に対する感受性を検討したところ、一部の細胞で ALK 阻害薬に対して感受性を示した。新たに蓄積した変異は実臨床や前臨床段階において既知であった変異がそのほとんどを占めていたが、L1256F 変異のみは、全く報告が無い変異であった。L1256F 変異に対する Lorlatinib の感受性を検討したところ、野生型 EML4-ALK を有した細胞と比較して 1000 倍以上もの高度耐性を示した。さらに L1256F 変異体は、第 2 世代 ALK 阻害薬 Alectinib に野生型 EML4-ALK を有する細胞と同程度の感受性が見られた。加えて京都大学奥野博士や荒木博士との共同研究により、L1256F 変異体の Lorlatinib 耐性化機構を Molecular Dynamics シミュレーション (MD シミュレーション) や Massively Parallel Computation of Absolute binding Free Energy 法 (MP-CAFE 法) による結合親和性予測から一部明らかとした。さらに Lorlatinib をはじめ全ての ALK 阻害薬に耐性を示した G1202R + L1196M 重複変異体に対する阻害剤を探索したところ、BCR-ABL 阻害剤である AG-957 やその構造類縁体である Adaphostin が有効であった。

がん研究会有明病院の倫理審査委員会において承認されたプロトコールに基づいて同意が得られた患者さんから頂いた臨床検体より樹立された細胞株 (JFCR-028-3 細胞) を *in vitro* において Lorlatinib 存在下で培養し約 2 ヶ月かけて耐性細胞を樹立した (JFCR-028-3 Lorlatinib Resistant 細胞; LR 細胞)。この細胞の性状を解析したところ、Lorlatinib に対して可逆的な抵抗性を示したことから、これら LR 細胞は DTP 様の性質を有しているものと考えた。所属研究室において構築された約 90 種の薬剤を含む阻害剤ライブラリーを用いて、LR 細胞の Lorlatinib 抵抗性に起因する細胞内経路を探索した。その結果、LR 細胞は Lorlatinib 単剤処理条件下で、高濃度存在下において JFCR-028-3 細胞と比べ、耐性を示した一方で、

Lorlatinib と GSK3 (Glycogen synthase kinase3) α/β キナーゼの阻害剤 LY2090314 との共処理条件で、併用効果を示した。同様の併用効果は Lorlatinib と GSK3 β キナーゼ特異的阻害剤 TWS119 との組み合わせでも確認することができた。また、Lorlatinib と ABL/SFK (Src family kinase)阻害薬 Dasatinib の共処理条件でも併用効果を確認し、他の ABL/SFK 阻害薬 Ponatinib も Lorlatinib との併用効果を示した。即ちこれら LR 細胞の Lorlatinib 抵抗性には GSK3 キナーゼ及び SFK の関与が考えられた。特に、GSK3 キナーゼは未だに分子標的薬耐性及び DTP 細胞における初期抵抗性との関連は報告されていない。

以上のように本研究ではまず、Alectinib-Lorlatinib 逐次治療を起点とした Lorlatinib を用いた治療後に出現する可能性がある耐性化機構を発見した。次に、耐性の根源と考えられている DTP 様の性質を示す細胞の薬剤抵抗性のメカニズムの示唆を見出した。本研究結果は Alectinib-Lorlatinib 逐次治療後の治療戦略やさらなる耐性化を抑制するための治療戦略の可能性の示唆を臨床へ提供するものと考えられる。

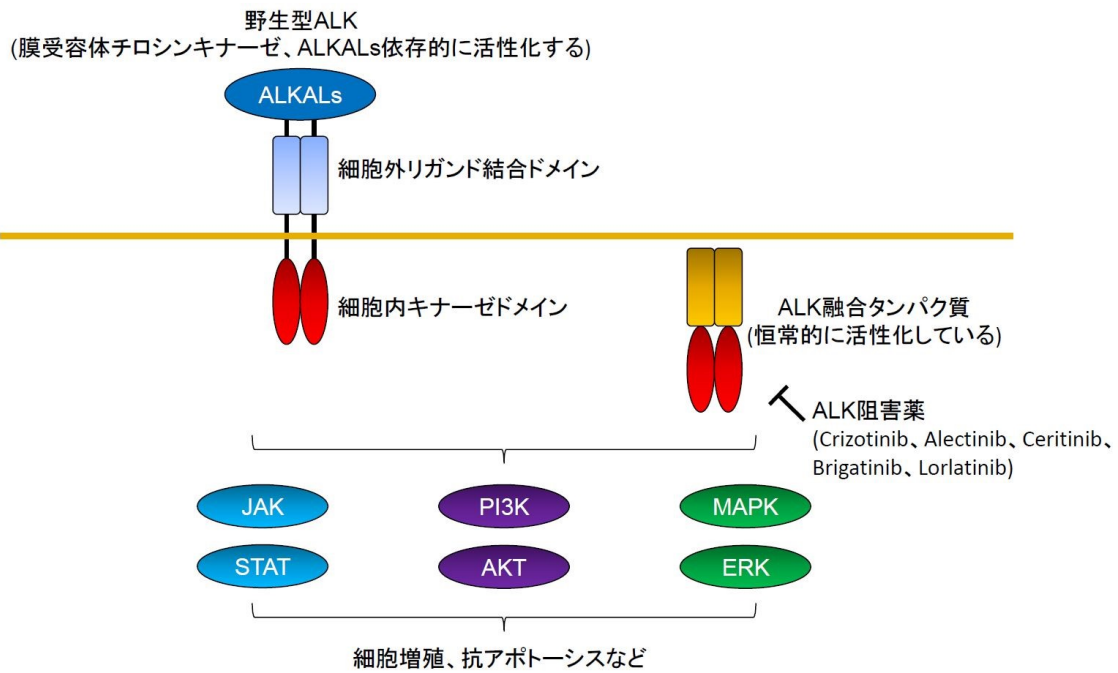


Fig. 0-1 ALK キナーゼの下流シグナル

Anaplastic lymphoma kinase (ALK)を介したシグナル伝達経路の模式図。ALK キナーゼはリガンド (ALKALs)依存的に活性化するが、ALK 融合タンパク質は恒常的に活性化しているため、がん化を誘導する。

(1) ALKキナーゼドメイン
における耐性変異

(2) RTKによるバイパス経路

(3) ALK融合遺伝子の増幅

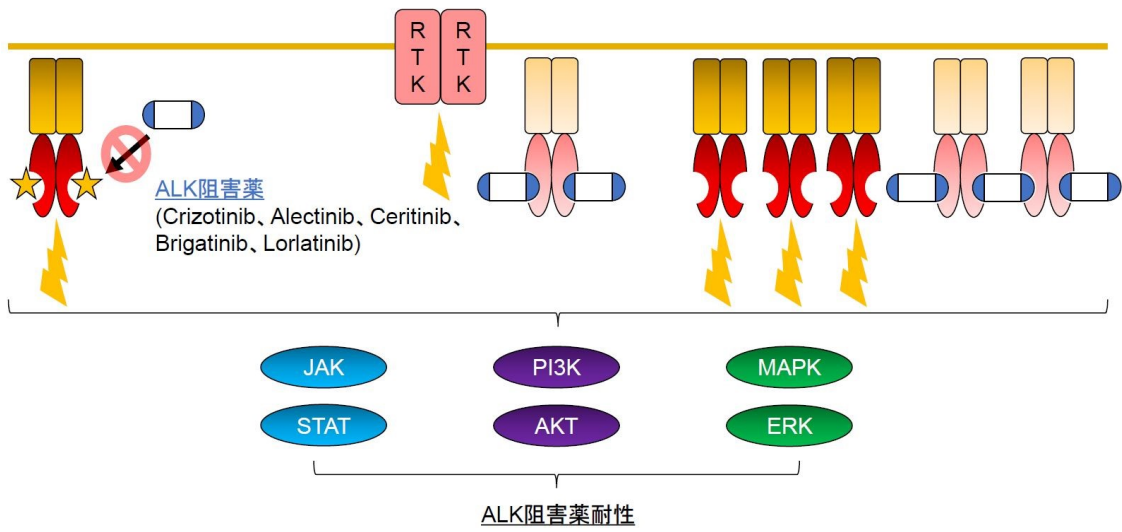


Fig. 0-2 ALK 阻害薬耐性化のメカニズム

- (1) ALK キナーゼドメインにおける変異が原因で薬剤と ALK キナーゼドメインの結合が減弱し、耐性化する。
- (2) ALK 融合タンパク質以外の RTK (Receptor tyrosine kinase、膜受容体型チロシンキナーゼ)が活性化し、耐性化する。
- (3) ALK 融合タンパク質をコードする融合遺伝子が増幅することで耐性化する。

第一章 Alectinib-Lorlatinib 逐次治療後に出現し得る耐性化機構の探索

第一節 目的

これまでに米国を中心に 5 つの ALK 阻害薬 (Crizotinib、Alectinib、Ceritinib、Brigatinib、Lorlatinib) が臨床において使用されている (日本では Brigatinib 以外の 4 剤) が、Lorlatinib 以外の既実臨床で使用されていたいずれの薬剤に対しても ALK キナーゼドメイン内の薬剤結合部位近傍の変異が原因で耐性化細胞が出現している。さらに Lorlatinib の臨床試験が先行していた米国においては 1 例のみ耐性化変異が検出されていた。このため、今後の臨床においても、これまでの ALK 阻害薬同様、Lorlatinib 治療に対する耐性化機構で変異体が多く出現する可能性が考えられた。臨床においては既にチロシンキナーゼ阻害薬による逐次治療が行われている EGFR 変異陽性肺癌において、複数の変異が同時に同一遺伝子上に存在する重複変異が臨床問題となっていた^{47,48}。これらの状況を鑑みて、私は Alectinib-Lorlatinib 逐次治療後に Lorlatinib に対して重複変異を有する耐性化細胞が出現する可能性を考えた。そこで、ENU mutagenesis や *in vivo* 担がんマウスモデルを用いることで Lorlatinib に耐性を示す EML4-ALK 重複変異体を探索することを目的とした。

第二節 材料と方法

細胞培養

以下の細胞は全て 37°C、CO₂ 5% 条件下で培養した。

・ヒト胎児腎細胞 HEK293FT 細胞

D-MEM high glucose (Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose、富士フィルム和光純薬)に終濃度 10%となるように FBS (Fetal bovine serum、CORNING)、1×MEM 非必須アミノ酸溶液 (MEM 非必須アミノ酸溶液 (×100)、富士フィルム和光純薬)、L-Glutamine 20 mM (Sigma)を含有した培地 (以下 D-10 high)を用いた。

・マウス pro-B 細胞由来 Ba/F3 細胞

EML4-ALK を安定発現させた Ba/F3 細胞には D-MEM low glucose (Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose、富士フィルム和光純薬)に終濃度 10%となるように FBS (Fetal Bovine Serum)を含有した培地 (以下 D-10 low)を用いた。

Ba/F3 親株細胞には D-10 low 培地に 0.5 ng/ml となるように IL-3 (Interleukine-3、Invitrogen)を含有した培地 (以下 D-10 low + IL-3)を用いた。

D-10 low 培地、D-10 low + IL-3 培地共に抗生物質として Kanamycin (Meiji Seika Pharma、終濃度 100 µg/ml)を加えた。

また、野生型 EML4-ALK を安定発現する細胞 (以下 Ba/F3-EML4-ALK-WT)や G1202R 変異体を安定発現する Ba/F3 細胞 (Ba/F3-EML4-ALK-G1202R)は、既に所属研究室で樹立されたものを用い、I1171N 変異体を安定発現する Ba/F3 細胞は新たに樹立した。

・EML4-ALK-G1202R 陽性患者臨床検体由来細胞株 JFCR-041-2 細胞

DMEM/F-12、GlutaMAX 培地 (Thermo Fisher Scientific)に 1×STEMPRO hESC SFM (Invitrogen)、1.8% BSA (Bovine Serum Albumin)、8 ng/ml bFGF (BPS Biosciences)、0.1 mM 2-mercaptoethanol、10 µM Y-27632 (LC Laboratories)、1×Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution (ナカライテスク)を含有した培地 (以下 ESC + Y 培地)を用いた。

使用した薬剤

- ・Lorlatinib (PF-06463922、Shanghai Biochempartner)
- ・Crizotinib (PF-02341066、Shanghai Biochempartner)
- ・Brigatinib (AP26113、Shanghai Biochempartner)
- ・Alectinib (CH5424802、ActiveBiochem)
- ・Ceritinib (LDK-378、ActiveBiochem)

EML4-ALK-I1171N 安定発現細胞の作製

・レンチウイルスの作製

トランスフェクションの前日に HEK293FT 細胞を 5×10^6 細胞を播種した。翌日、OPTI-MEM 1.5 ml (Invitrogen) に EML4-ALK-I1171N を有する pLenti6 プラスミド 3 μ g、Virapower 9 μ g (Invitrogen) を混和し、5 分間室温でインキュベート後、この混合液と Lipofectamine mixture (OPTI-MEM 1.5 ml と Lipofectamine 2000 36 μ l (Invitrogen) を混ぜた液) をよく混和し、30 分間室温でインキュベートした。その後、HEK293FT 細胞の培地量を 7 ml に調整し、上述の Mixture 3ml をゆっくりと添加し、37°C、CO₂ 5% 条件下で 7 時間培養した。その後、D-10 high 培地 10 ml で培地交換し、37°C、CO₂ 5% 条件下で 72 時間培養した。72 時間後、感染細胞及び上清を回収し、0.45 μ m セルロースアセテートフィルター (IWAKI) にてろ過し、レンチウイルスを回収した。なお、このウイルスは -80°C で保存が可能だが、凍結融解を繰り返すと感染効率が落ちるため、ウイルスの液は分注して保存しておくといよい。

・Ba/F3 細胞への感染

Ba/F3 親株細胞を 2×10^6 細胞/1 ml で回収し、ポリブレン 3.2 μ g、作製したウイルス溶液 3 ml を加えた。その後、32°C、2000 g、1 時間遠心し、37°C、CO₂ 5% 条件下で 24 時間培養した。培養後、培地を抜き、新しい D-10 low + IL-3 培地 10 ml を加えて、18~24 時間培養した。Blasticidin S 7 μ g/ml を加えた D-10 low + IL-3 培地で培地交換し、1 週間 37°C、CO₂ 5% 条件下で培養した。1 週間後、D-PBS (Phosphate Buffered Saline、和光純薬工業) で 2 回 wash し、D-10 low 培地で一週間 37°C、CO₂ 5% 条件下で培養した。

細胞生存アッセイ

細胞を 2000 cells/well/120 μ L D-10 low 培地で 96 ウェルブラックプレート (Greiner) に 3 連で播種した。第 1 列に培地を 160 μ l 加えた。このウェルは、background の測定のために設置した。その後、細胞を 120 μ l ずつ第 2~第 12 列に播種した。播種したウェルに培地で希釈した薬剤 40 μ L をそれぞれ添加した (Final concentration: 0 nM、0.316 nM、1 nM、3.16 nM、10 nM、31.6 nM、100 nM、316 nM、1000 nM、3160 nM、10000 nM)。薬剤処理後、37°C、CO₂ 5% 条件下で 72 時間培養した。72 時間後、CellTiter-Glo 溶液 (Promega) を 40 μ L ずつ各ウェルに添加し、室温で 10 分間振とうし、Tristar LB 941 Multimode Microplate Reader (BERTHOLD TECHNOLOGIES) を用いて各ウェルの発光量を測定し、Graph Pad Prism version 8.0 (Graphpad software) にて解析し、各細胞の IC₅₀ 値を算出した。

Western Blotting

・ライセートサンプルの調整

細胞ペレットを回収し、on iceにより冷却したD-PBSでwashした後、SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) lysis buffer (1% SDS、10% Glycerol、100 mM Tris-HCl (pH 7.6) (Tris:ナカライテスク、HCl:和光純薬工業))で細胞を溶解後、100°C、6分間加熱し、ライセートサンプルを調製した。

・タンパク質定量

ELISA用マルチウェルプレート(住友ベークライト)の第1列に30 µlずつ純水を加えた。純水を加えたウェルに同量のAlbumin standard (Thermo Scientific、concentration 2 mg/ml)を加え、よく混ぜ、下の列に段階希釈していった (Final concentration: 1 mg/ml、0.5 mg/ml、0.25 mg/ml、0.125 mg/ml、0.0625 mg/ml、0.03125 mg/ml、0.015625 mg/ml、0.0078125 mg/ml)。これら段階希釈したAlbumin standardを第2、3列へ分注した。第4列には純水36 µl、作製したライセートサンプル4 µlを混ぜ、第5、6列へ分注した。以降のウェルに対しても同様に調整していった。その後、BCA protein assay reagent (Thermo Fisher Scientific)を200 µlずつ各測定サンプルが入ったウェルに加え、室温で1分間浸とう後37°C、30分静置した。静置後BCA発光量をMultiskan GOマイクロプレート分光光度計 (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定し、1 µg/µlとなるようにSDS lysis buffer 40 µlと5×SDS sample buffer 10 µl (3%SDS、65 mM Tris-HCl (pH 6.8)、10% glycerol、0.01% bromophenol blue (Aldrich Chem.)、10% 2-mercaptoethanol (ナカライテスク))を加えて希釈した。これらサンプルを100°C、6分間加熱した。

・電気泳動、メンブレンへの転写、抗体との反応条件

調製サンプルをゲル (Extra PAGE ONE Precast Gel 5-20% (ナカライテスク) もしくは Perfect NT Gel 28 well 5-20% (DRC))に分注し、SDS-PAGE (SDS-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis)を行った。泳動中にPVDFメンブレン (Millipore)を室温で1分間、メタノール (和光純薬工業)に浸し、その後トランスファーバッファー (25 mM Tris、192 mM glycine (ナカライテスク)、20%メタノール)に15分間浸し平衡化した。平衡後、ゲルのタンパク質を100 V、90分間電圧をかけることで、PVDFメンブレンへと転写した。5% skim milk (雪印メグミルク) TBST溶液 (25 mM Tris-HCl (pH 7.6)、125 mM NaCl (ナカライテスク)、0.2% Tween 20 (Sigma)) もしくは 5% BSA (ナカライテスク) TBST溶液に転写後のPVDFメンブレンを室温で1時間ブロッキングした後、一次抗体 (5% skim milk もしくは 5% BSA、

0.1% NaN₃ (ナカライテスク)で希釈)へ移し、4°C で 8~24 時間振とうした。1 次抗体処理後のメンブレンを TBST で 4 回 wash した後 (各回とも 10 分間ずつ)、二次抗体に浸し (5% skim milk もしくは 5% BSA で希釈)、室温で 1 時間インキュベートした。2 次抗体処理後のメンブレンを TBST で 4 回 wash した後 (各回とも 10 分間ずつ)、ろ紙でメンブレン上に残存する TBST を除去し、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo)をタンパク質が吸着した側に滴下し、2 分間静置した。静置後、Amersham Imager 600 (GE Healthcare) や LAS 3000 mini (Fujifilm)を用いて化学発光シグナルを検出した。画像処理は Multi Gause ver. 3.0 (Fujifilm)を使用した。

使用した一次抗体、二次抗体、ブロッキング溶液

CST は Cell Signaling Technology、Milli は Millipore を表す。

1 次抗体	購入先	希釈倍率 (1 次抗体)	ブロッキング バッファー (1 次抗体)	2 次抗体	希釈倍率 (2 次抗体)	ブロッキング バッファー (2 次抗体)
pALK (Tyr1604)	CST	1:1000	5% BSA	Rabbit	1:10000	5% BSA
pALK (Tyr1282/83)	CST	1:1000	5% BSA	Rabbit	1:10000	5% BSA
ALK	CST	1:1000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
GAPDH	Milli	1:5000	5% Skim milk	Mouse	1:10000	5% Skim milk

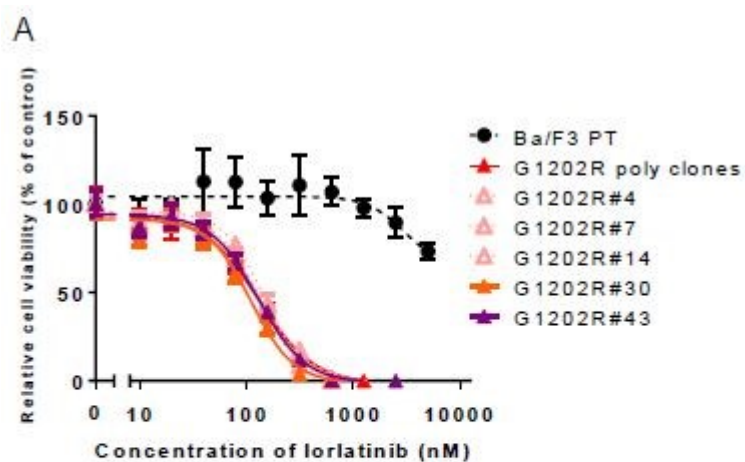
ENU mutagenesis screening

1 × 10⁸ 細胞/100 ml に調整した Ba/F3 細胞に ENU を 100 µg/ml (N-ethyl-N-nitrosourea DMSO で希釈、Sigma)となるように加え、24 時間、37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。その後、D-PBS 50 ml で 2 回 wash し、培地 100 ml を加えて 24 時間、37°C、5%CO₂ 条件下で回復培養した。翌日 5 × 10⁷ 細胞/100 ml に培地で調整し、Lorlatinib もしくは Ceritinib を添加した。その後、1 × 10⁵ 細胞/200 µl/well で 96 ウェルプレートに分注し 37°C、5%CO₂ 条件下で 2~4 週間培養した。その後、生き残った細胞の ALK キナーゼドメインの塩基配列をサンガー法で解析した。

第三節 結果

・ *in vitro* における Lorlatinib 耐性 G1202R 重複変異体の発見

まず、所属研究室において樹立された EML4-ALK-G1202R 変異体を安定的に発現する Ba/F3 細胞を限界希釈法により単一クローン細胞に分けた。次いで、分けたクローン細胞の Lorlatinib に対する感受性を確認後、ENU mutagenesis screening に供するための EML4-ALK-G1202R-Ba/F3 細胞を選定した (Fig. 1-1、以下 G1202R#30、#43)。続いて、G1202R#30、G1202R#43 に対して ENU mutagenesis screening を実施し、Lorlatinib 処理後に生き残った細胞の ALK キナーゼドメインの塩基配列を解析したところ、G1202R 変異の他にさらに ALK キナーゼドメイン内に変異が蓄積した新規 G1202R 重複変異体を計 4 種発見した (G1202R + F1198F、G1202R + L1196M、G1202R + F1174C、G1202R + F1174L)。G1202R + L1198F 重複変異体は Lorlatinib 300、600、1000 nM 条件下で出現し、G1202R + L1196M 重複変異体は 300、1000 nM、G1202R + F1174C/L 重複変異体は 300 nM 存在下でのみ観察された (Fig. 1-2)。つぎにこれら ENU mutagenesis screening から発見された耐性細胞の Lorlatinib に対する感受性を細胞生存アッセイで確認した。その結果、Ba/F3-EML4-ALK-WT の Lorlatinib に対する IC₅₀ 値が 1.8 nM、Ba/F3-EML4-ALK-G1202R の IC₅₀ 値が 54 nM である一方で、G1202R + L1198F は 580 nM、G1202R + L1196M は 1900 nM、G1202R + F1174C は 280 nM、G1202R + F1174L は 190 nM であり、前者 2 つの細胞株と比較して中程度から高度な耐性を示した。次に、Lorlatinib 存在下での ALK の活性化の指標であるリン酸化 ALK (Tyr1604 部位の自己リン酸化)の挙動をウェスタンブロッティング解析により、確認した。Ba/F3-EML4-ALK-WT や Ba/F3-EML4-ALK-G1202R は Lorlatinib の濃度依存的にリン酸化 ALK が減弱した一方で、G1202R + L1198F 重複変異体や G1202R + L1196M 重複変異体は、Lorlatinib 1000 nM という非常に高濃度の条件下においてもリン酸化 ALK のレベルは減弱しなかった。G1202R + F1174C/L 重複変異体のリン酸化 ALK のレベルについては、Lorlatinib の濃度依存的に低下するものの Ba/F3-EML4-ALK-G1202R と比較して、Lorlatinib 1000 nM の高濃度処理条件下においても維持されていた (Fig. 1-3)。



B

Ba/F3 cells	IC ₅₀ (nM)
G1202R poly clones	130
G1202R#4	140
G1202R#7	140
G1202R#14	130
G1202R#30	100
G1202R#43	130

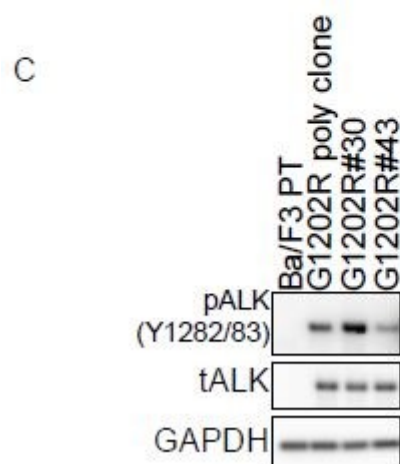


Fig. 1-1 ENUmultiplex screening に供する Ba/F3-EML4-ALK-G1202R 細胞のクローンの選択

A. 選別した各クローン細胞の Lorlatinib への感受性。各クローン細胞を各濃度の Lorlatinib で 72 時間処理後、細胞生存アッセイを行った。

結果は平均 ± SD 値で表示した。

B. A の細胞生存曲線から算出した IC₅₀ 値。

C. クローン細胞の ALK のタンパク質およびリン酸化 ALK の発現確認。

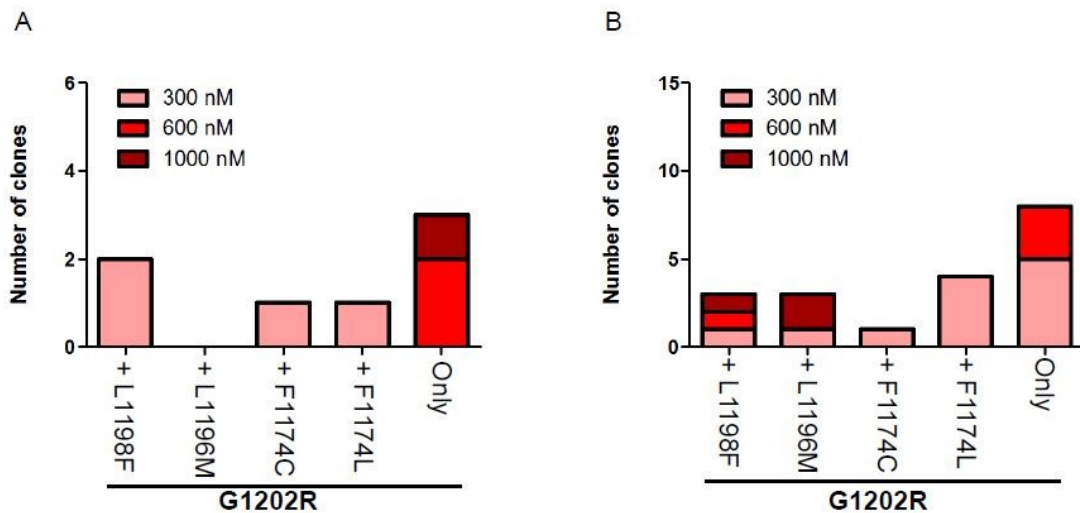


Fig. 1-2 ENU mutagenesis screening から発見した新規 Lorlatinib 耐性 EML4-ALK-G1202R 重複変異体

A. G1202R#30 クローン細胞を ENU mutagenesis screening に供した際に出現した Lorlatinib 耐性クローン細胞の数。

B. G1202R#43 クローン細胞を ENU mutagenesis screening に供した際に出現した Lorlatinib 耐性クローン細胞の数。

+ L1198F は G1202R + L1198F、+ L1196M は G1202R + L1196M、

+ F1174C は G1202R + F1174C、+ F1174L は G1202R + F1174L、

Only は ALK キナーゼドメインに G1202R 変異しか認められなかったことを示している。

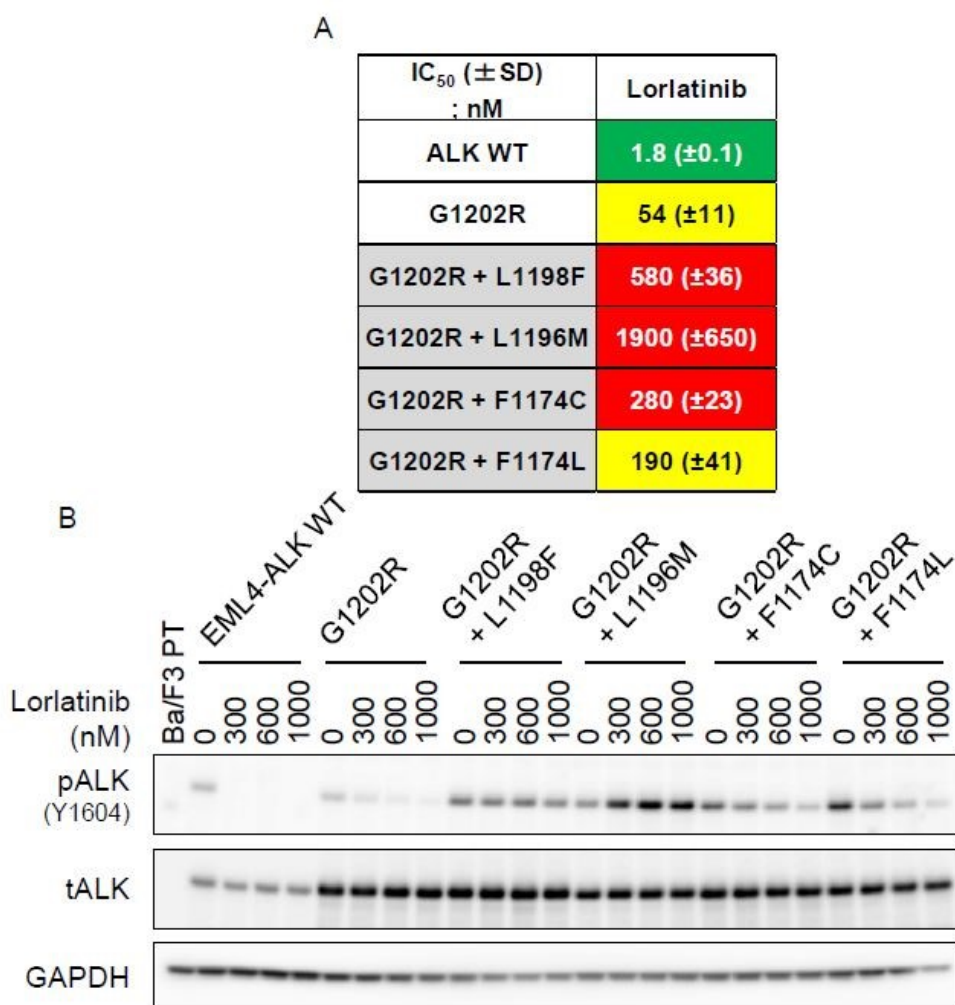


Fig. 1-3 ENUmутagenesis screening から得られた G1202R 重複変異を有するクローン細胞の Lorlatinib 耐性の確認

A. 3 回の細胞生存アッセイから算出した IC₅₀ 値。結果は、3 回分の平均値 ±SD で表示した。各回とも各 ALK 阻害薬を 72 時間処理した。表中の灰色の部分には ENU mutagenesis screening で得られたクローン細胞であることを表し、白色は Ba/F3 細胞に各 EML4-ALK タンパク質を安定的に発現した細胞であることを表している。表中の緑色; IC₅₀ 値が 50 nM 以下、黄色; IC₅₀ 値が 50 nM より大きく 200 nM 未満、赤色; IC₅₀ 値が 200 nM 以上という事を表している。

B. ウェスタンブロットティング解析による Lorlatinib 処理下での ALK の発現量と ALK 自己リン酸化の確認。各濃度の Lorlatinib を 3 時間処理後、タンパク質を抽出し、ALK タンパク質及び ALK の自己リン酸化を検出した。

・ *in vitro* における Lorlatinib 耐性 I1171N 重複変異体の発見

EML4-ALK-G1202R 変異同様、EML4-ALK-I1171N 変異も Alectinib の治療後の耐性化症例として高頻度に見られる変異である。そのため、この変異に対しても Lorlatinib 治療が施される可能性が今後高まると予想し、EML4-ALK-G1202R と同様に ENU mutagenesis screening に供する細胞を選定後 (Fig. 1-4、以下 I1171N#12)、I1171N#12 に対して ENU mutagenesis screening を実施した。その結果 G1202R の場合と同様で、新たな変異が ALK キナーゼドメイン内に蓄積した重複変異体を計 9 種発見した (I1171N + L1198F/H、I1171N + L1196M、I1171N + T1151K、I1171N + C1156Y、I1171N + F1174I/L、I1171N + L1256F、I1171N + G1269A)。I1171N + L1198F 重複変異体は Lorlatinib 300 nM や 600 nM 存在下で出現し、それ以外の I1171N 重複変異体は Lorlatinib 300 nM 存在下でのみ見出された (Fig. 1-5)。また、現在、EML4-ALK-I1171N 変異に対しては Lorlatinib 以外にも第 2 世代 ALK 阻害薬である Ceritinib が臨床的に使用可能である。そこで、Ceritinib に対しても ENU mutagenesis screening を実施したところ、I1171N + L1198F 重複変異体のみが Ceritinib 600 nM 存在下で見出された (Fig. 1-6)。次にこれら耐性重複変異体に対する Lorlatinib の感受性を検討したところ、Ba/F3-EML4-ALK-WT の IC₅₀ 値は 1.2 nM、Ba/F3-EML4-ALK-I1171N の IC₅₀ 値は 60 nM である一方で、I1171N + L1198F 重複変異体は 340 nM、I1171N + L1196M 重複変異体は 320 nM、I1171N + F1174I 重複変異体は 320 nM、I1171N + F1174L 重複変異体は 220 nM、I1171N + L1198H 重複変異体は 670 nM、I1171N + L1256F 重複変異体は 6000 nM、I1171N + G1269A 重複変異体は 470 nM であり、どれも野生型 EML4-ALK を有する細胞や I1171N 単独変異体と比べ、耐性を示した。また、ウェスタンブロッティング解析からも Lorlatinib 600 nM の高濃度処理下で Ba/F3-EML4-ALK-WT や Ba/F3-EML4-ALK-I1171N のリン酸化 ALK が減弱する一方で I1171N 重複変異体のリン酸化レベルは減弱しにくいことが分かった (Fig. 1-7)。

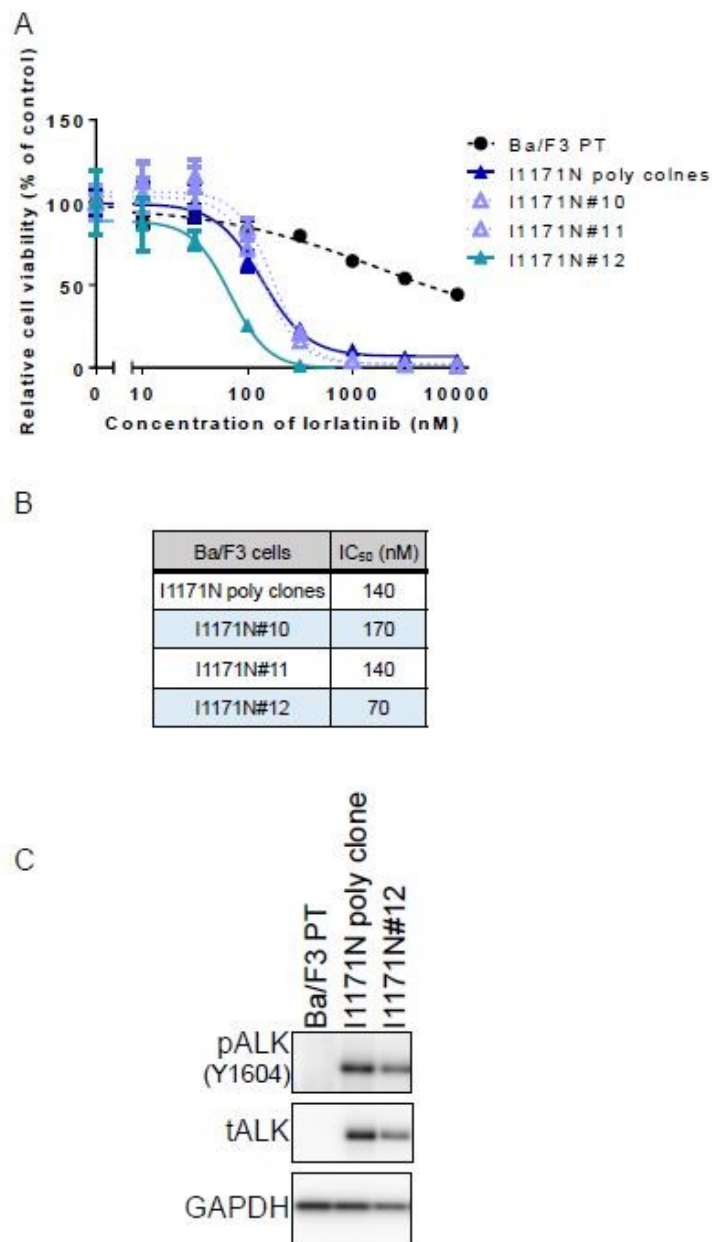


Fig. 1-4 ENUmultiplex screening に供する Ba/F3-EML4-ALK-I1171N 細胞のクローンの選択

A. 選別した各クローン細胞の Lorlatinib への感受性。各クローン細胞を各濃度の Lorlatinib で 72 時間処理後、細胞生存アッセイを行った。

結果は平均 ± SD 値で表示した。

B. A の細胞生存曲線から算出した IC₅₀ 値。

C. クローン細胞の ALK のタンパク質およびリン酸化 ALK の発現確認。

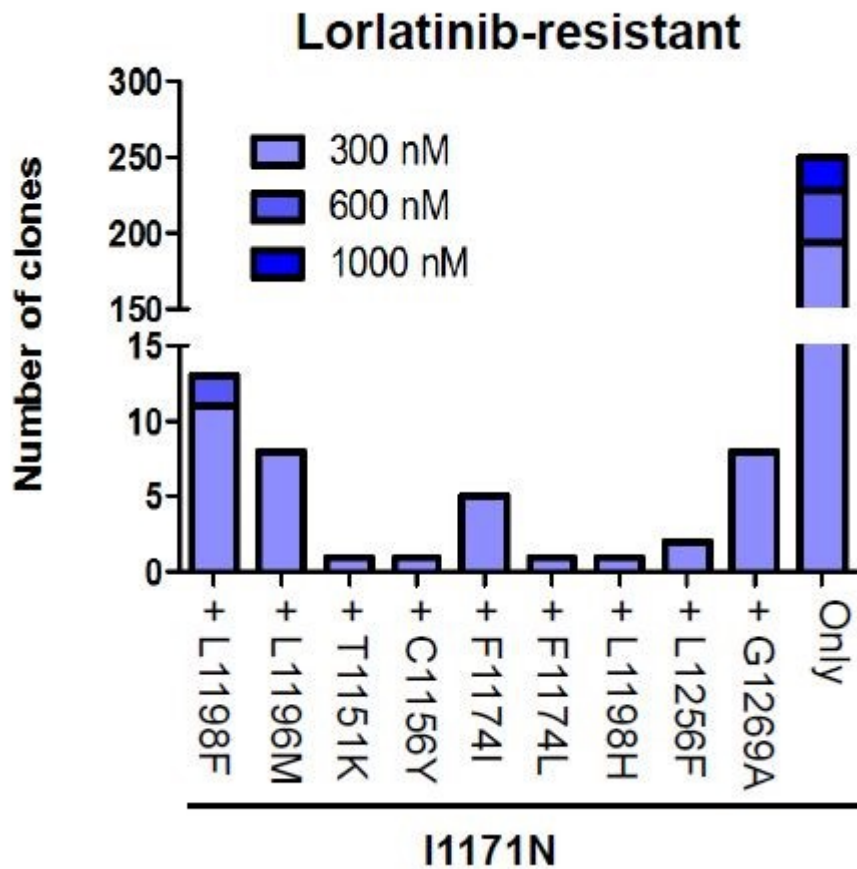


Fig. 1-5 ENU mutagenesis screening から発見した新規 Lorlatinib 耐性 EML4-ALK-I1171N 重複変異体

I1171N#12 クローン細胞を ENU mutagenesis screening に供した際に出現した Lorlatinib 耐性クローン細胞の数。

+ L1198F は I1171N + L1198F を示す。他の重複変異体も同様の表記で示した。また、Only は ALK キナーゼドメインに I1171N 変異しか認められなかったことを示している。

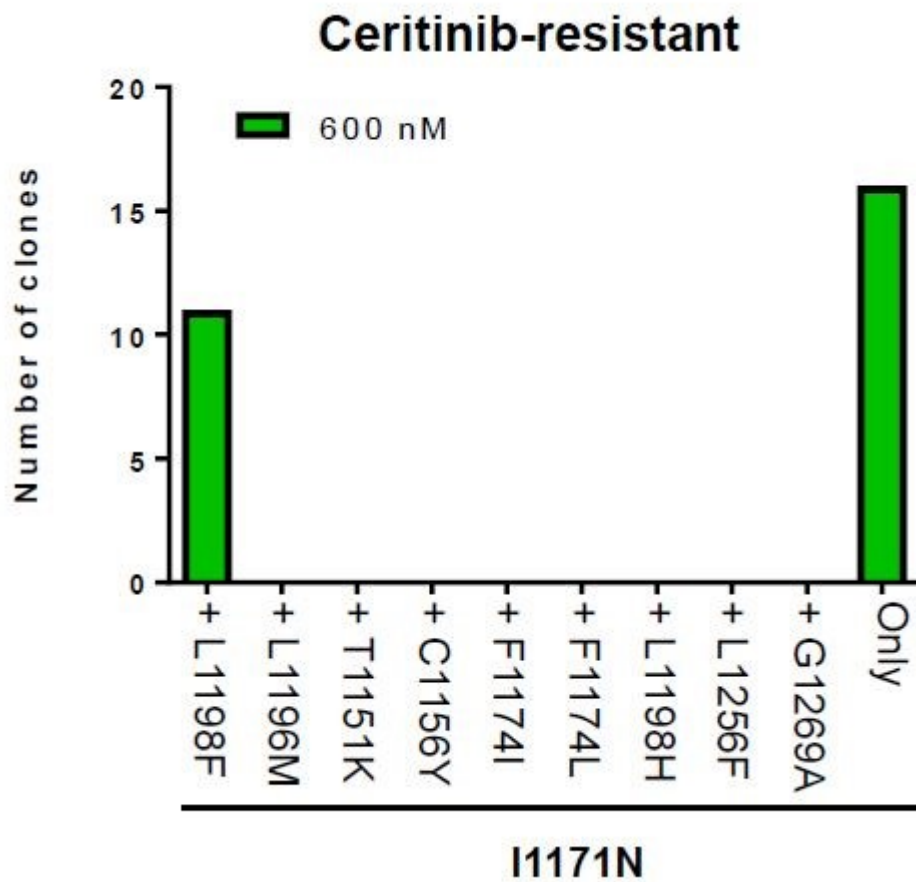


Fig. 1-6 ENU mutagenesis screening から発見した新規 Ceritinib 耐性 EML4-ALK-I1171N 重複変異体

I1171N#12 クローン細胞を ENU mutagenesis screening に供した際に出現した Ceritinib 耐性クローン細胞の数。

表記の方法は Fig. 1-5 と同様である。

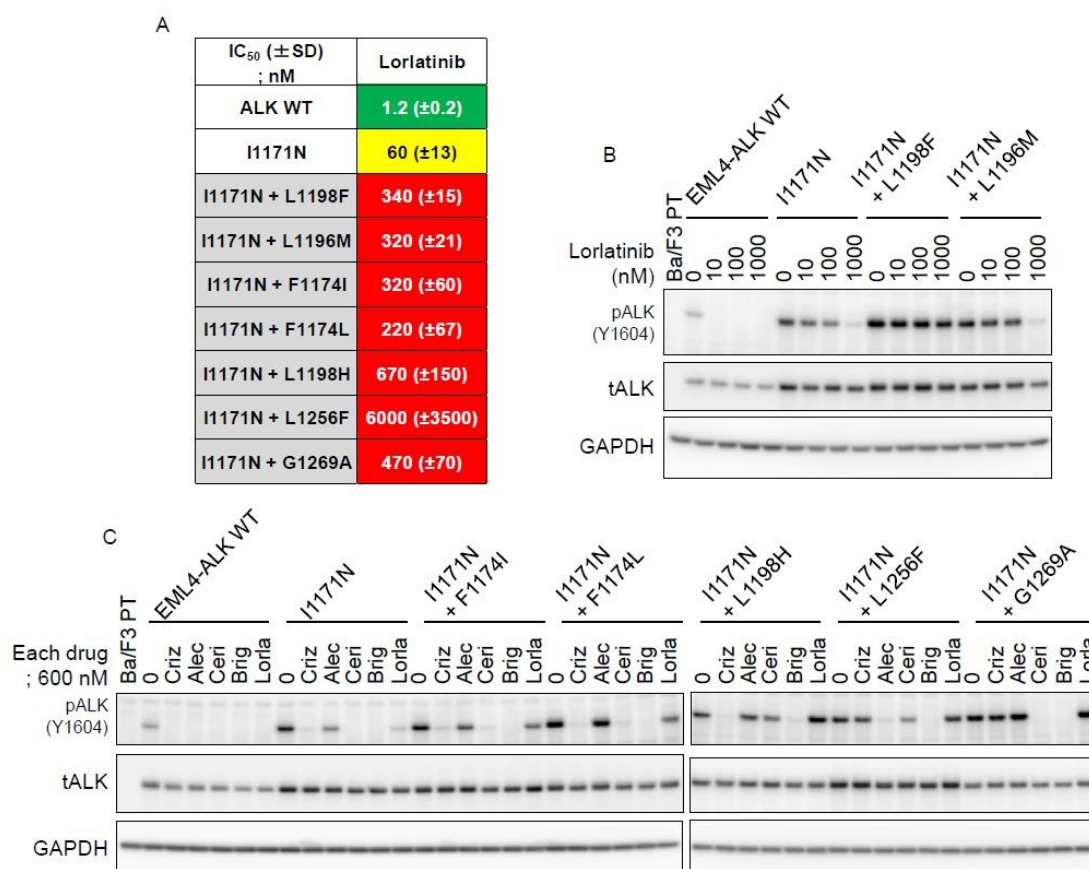


Fig. 1-7 ENUmutagenesis screening から得られた I1171N 重複変異を有するクローン細胞の Lorlatinib 耐性の確認

A. 3 回の細胞生存アッセイから算出した IC₅₀ 値。結果は、3 回分の平均 ± SD で表示した。各回とも Lorlatinib を 72 時間処理した。表中の灰色の部分は ENU mutagenesis screening で得られたクローン細胞であることを表し、白色は Ba/F3 細胞に各 EML4-ALK タンパク質を安定的に発現した細胞であることを表している。表中の緑色; IC₅₀ 値が 50 nM 以下、黄色; IC₅₀ 値が 50 nM より大きく 200 nM 未満、赤色; IC₅₀ 値が 200 nM 以上を表している。

B. ウェスタンブロッティング解析による Lorlatinib 存在下での ALK の発現量と ALK 自己リン酸化量の確認。各濃度の Lorlatinib を 3 時間処理後、タンパク質を抽出し、ALK タンパク質及び ALK の自己リン酸化を検出した。

C. ウェスタンブロッティング解析による各 ALK 阻害薬存在下での ALK の発現及び ALK 自己リン酸化の確認。各濃度の ALK 阻害薬 (Criz; Crizotinib, Alec; Alectinib, Ceri; Ceritinib, Lorla; Lorlatinib, Brig; Brigatinib) を 3 時間処理後、タンパク質を抽出し、ALK タンパク質及び ALK の自己リン酸化を検出した。

・ *in vivo* における G1202R 重複変異体の発見

所属研究室において、*EML4-ALK-G1202R* 変異陽性患者臨床検体由来細胞株 JFCR-041-2 細胞を BALB/c nu-nu マウスに移植し、Lorlatinib 10 mg/kg から投与を開始し、耐性が確認されるごとに投与量を増やし、最終的に 50 mg/kg においても増大する耐性腫瘍が樹立された。この耐性腫瘍の ALK キナーゼドメインをサンガーシーケンス解析したところ、G1202R に G1269A 変異が新たに蓄積した G1202R + G1269A 重複変異を発見した (Fig. 1-8)。

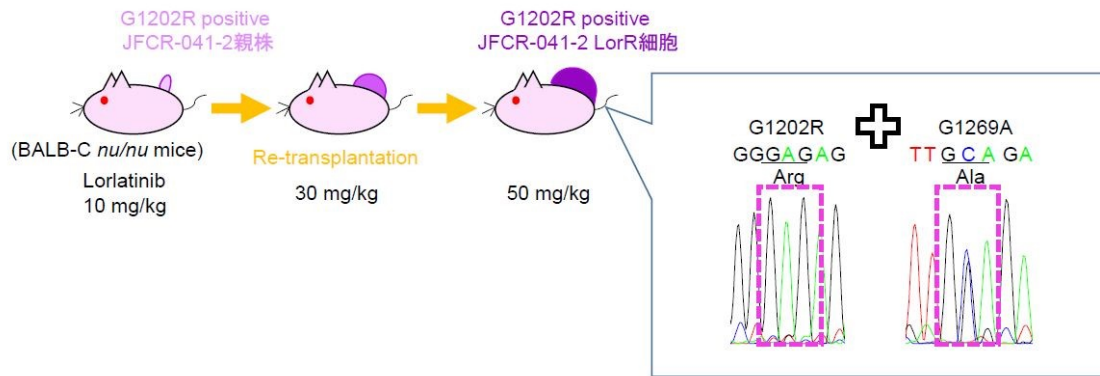


Fig. 1-8 *in vivo* 担がんマウスモデルによる Lorlatinib 耐性重複変異体の探索
in vivo における Lorlatinib 耐性腫瘍の樹立方法の模式図と耐性腫瘍 (LorR 腫瘍細胞)の ALK キナーゼドメインのシーケンス解析の結果を示した。

第四節 まとめと考察

EML4-ALK-G1202R 変異や-I1171N 変異を有する Ba/F3 細胞を用いて、*in vitro* において ENU mutagenesis screening を実施したところ、G1202R 変異体では Lorlatinib に対する、I1171N 変異体では Lorlatinib 及び Ceritinib に対する耐性重複変異体が計 13 種見出された。今回用いた ENU mutagenesis screening は、BCR-ABL 融合遺伝子や CD74-ROS1 融合遺伝子陽性細胞等の薬剤耐性化機構の検索にも広く利用されており⁴⁹⁻⁵¹、その後実際に臨床で出現した変異体も数多く存在する。また、*in vivo* 担がんマウスモデルからも Lorlatinib 重複耐性変異体を発見した。そのため、本研究で見出された耐性重複変異体も今後臨床で出現する可能性が高いと考えられる。つまり、既にチロシンキナーゼ阻害薬による逐次治療が先行している EGFR 変異陽性肺がん同様、ALK 融合遺伝子陽性肺がんにおいても逐次治療が普及した際には重複変異体が臨床で問題となる可能性を示唆していると考えられる。今回、新たに蓄積した変異のほとんどは既に Crizotinib や Ceritinib 等の耐性変異として臨床において見出されているものであった。L1198 部位は ALK キナーゼドメインの N ロープと C ロープを繋ぐヒンジ領域に位置しており⁵²、EGFR の L792 部位と相同的な関係にある⁵³。現時点では、L1198F 単独変異は ALK 融合遺伝子陽性がんで見出されていないが、甲状腺未分化がんにおいてはしばしばみられる変異である^{54,55}。*in vitro* やコンピュータシミュレーションを用いた基礎研究においては、この単独変異は Ceritinib に対して耐性を示すことが分かっているため、本研究において I1171N 単独変異体に対する Ceritinib を用いた ENU mutagenesis から I1171N + L1198F 重複変異が数多く出現したのもそのためかもしれない。また、臨床においては C1156Y + L1198F 重複変異体が Lorlatinib 耐性患者から発見されており、本研究からも G1202R + L1198F 及び I1171N + L1198F 重複耐性変異が見出されたことから将来的に臨床でもこの L1198F 変異を有する重複変異体は比較的多く見られる可能性があると考えられる。また、L1196M を有する重複変異体も本研究で見出された。L1196 部位はキナーゼドメインの最深部に存在する疎水性領域に位置するアミノ酸残基であり、第 1、第 2 世代 EGFR 阻害薬に耐性を示す EGFR-T790M 変異や第 1、第 2 世代 BCR-ABL 阻害薬に耐性を示す BCR-ABL-T315I 変異と相同的な部位にあたる⁵⁶⁻⁵⁹。L1196M 単独変異体は既に数多くの Crizotinib や Alectinib 耐性患者から比較的高頻度に検出されており^{60,61}、今後 L1196M 変異を起点とした重複変異の解析も重要となると考えられる。本研究から見出された G1202R + L1196M 重複変異は最近になり実臨床でも Lorlatinib 耐性や Brigatinib 耐性患者から見出されており、今後臨床でもその患者数は増加するものと予想できることから、この重複耐性変異に対する克服薬の探索は急務である。また、G1269A 重複変異体も G1202R 単独変異体や I1171N 単

独変異体どちらの場合からでも出現する可能性が示唆された。G1269A 単独変異は Crizotinib に耐性を示すことが様々な研究グループから発見されている^{62,63}。また、G1202R+G1269A 重複変異体は基礎研究からも実際の Lorlatinib 耐性患者から見出されているため^{64,65}、この重複耐性変異体に対する克服薬の発見は臨床に大きな影響を与えるものとなると考えられる。本研究において、G1202R 変異や I1171N 変異の他に新たに ALK キナーゼドメイン内に蓄積した変異のほとんどは既に Crizotinib や Ceritinib に対する耐性変異として報告がある変異であった。つまり、これら薬剤による治療後に Lorlatinib を用いても Alectinib 同様重複耐性変異が出現する可能性を示唆していると考えられる。

第二章 Lorlatinib 耐性 EML4-ALK 重複変異体に対する克服薬の探索

第一節 目的

第一章において、数多くの Alectinib-Lorlatinib 逐次治療後に出現し得る重複変異体を発見した。その後、実際に臨床の現場において Lorlatinib 耐性患者から発見された重複変異体も存在したため、これら重複変異体に対する克服薬を探索することを目的とした。本研究では、実臨床で使用が可能である ALK 阻害薬の他に、標的分子が既知である低分子化合物ライブラリーを用いることとした。

第二節 材料と方法

細胞培養

HEK293FT 細胞と Ba/F3 細胞の培養方法は第 1 章と同様であるため、省略する。
また、いずれの細胞も 37°C、CO₂ 5%条件下で培養した。

- ・ マウス繊維芽細胞 NIH3T3

D-MEM low glucose (Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose、富士フィルム和光純薬)に終濃度 10%となるように FBS (Fetal bovine serum)を含有した培地 (以下 D-10 low)を用いた。

- ・ ヒト *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺がん細胞株 H3122、ヒト *BCR-ABL* 融合遺伝子陽性慢性骨髄性白血病由来細胞株 K562

RPMI-1640 培地 (Roswell Park Memorial Institute medium、和光純薬工業)に終濃度 10%となるように FBS (Fetal bovine serum)を含有した培地 (以下 R-10)を用いた。

R-10 培地には抗生物質として 1×ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (100×ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を 1×ペニシリン-ストレプトマイシン溶液に希釈した。富士フィルム和光純薬)を加えた。

使用した薬剤

- ・ Lorlatinib (PF-06463922、Shanghai Biochempartner)
- ・ Crizotinib (PF-02341066、Shanghai Biochempartner)
- ・ Brigatinib (AP26113、Shanghai Biochempartner)
- ・ Alectinib (CH5424802、ActiveBiochem)
- ・ Ceritinib (LDK-378、ActiveBiochem)
- ・ 17-AAG (LC Laboratories)
- ・ AG-957 (Cayman Chemical Company)
- ・ Adaphostin (Sigma)

薬剤スクリーニングに関しては化学療法支援基盤活動より分与いただいた標準阻害剤キット (kit1~4)を使用した。以下標準阻害剤キットに含まれる阻害剤を列記する。なお、灰色の阻害剤は標準阻害剤キットから削除されたものである。

Kit1			Kit3		
Well		Compound	Well		Compound
1-	A	none (DMSO)	1-	A	none (DMSO)

1-	B	5-FU	1-	B	ABT-702
1-	C	Bestatin	1-	C	Akt Inhibitor IV
1-	D	Bleomycin sulfate	1-	D	Akt Inhibitor VIII, Isozyme-Selective, Akti-1/2
1-	E	Cisplatin	1-	E	Akt Inhibitor XI
1-	F	Methotrexate	1-	F	compound C
1-	G	Mitomycin C	1-	G	ATM/ATR kinase inhibitor
1-	H	Vinblastine sulfate	1-	H	ATM kinase inhibitor
2-	A	Paclitaxel	2-	A	Aurora kinase/cdk inhibitor
2-	B	Flutamide	2-	B	Aurora kinase inhibitor II
2-	C	Daunorubicin, HCl	2-	C	Aurora kinase inhibitor III
2-	D	Doxorubicin, HCl	2-	D	AG957
2-	E	Tamoxifen, citrate	2-	E	LFM-A13
2-	F	Actinomycin D	2-	F	Terreic acid
2-	G	Camptothecin	2-	G	KN-93
2-	H	Aclarubicin	2-	H	KN-62
3-	A	Etoposide (VP-16)	3-	A	Lavendustin C
3-	B	Cytochalasin D	3-	B	Kenpaullone
3-	C	2',5'-dideoxyadenosine	3-	C	purvalanol A
3-	D	AKT inhibitor	3-	D	Olomoucine
3-	E	NL-71-101	3-	E	Alsterpaullone, 2-cyanoethyl
3-	F	AG957	3-	F	Cdk1/2 inhibitor III
3-	G	KN93	3-	G	Cdk2/9 inhibitor
3-	H	Z-VAD-FMK	3-	H	NU6102
4-	A	Kenpaullone	4-	A	Cdk4 inhibitor
4-	B	Purvalanol A	4-	B	NSC625987
4-	C	3-ATA	4-	C	SB218078

4-	D	Olomoucine	4-	D	isogranulatimide
4-	E	TBB	4-	E	Chk2 inhibitor
4-	F	Sulindac sulfide	4-	F	Chk2 inhibitor II
4-	G	Valeryl salicylate	4-	G	Ellagic acid
4-	H	NS-398	4-	H	TBB
5-	A	Sodium salicylate	5-	A	DMAT
5-	B	Theophylline	5-	B	D4476
5-	C	Azacytidine	5-	C	TG003
5-	D	Aphidicolin	5-	D	Diacylglycerol kinase inhibitor II
5-	E	AG1478	5-	E	IC60211
5-	F	Genistein	5-	F	TX-1918
5-	G	Manumycin A	5-	G	BPIQ- II
5-	H	FTI-276	5-	H	AG1478
6-	A	SU1498	6-	A	AG490
6-	B	GGTI-286	6-	B	SU4984
6-	C	Dexamethasone	6-	C	SU5402
6-	D	GSK-3 inhibitor II	6-	D	Flt-3 Inhibitor
6-	E	Scriptaid	6-	E	cFMS Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor
6-	F	Trichostatin A	6-	F	SU6656
6-	G	AG825	6-	G	GSK-3 inhibitor IX
6-	H	Cycloheximide	6-	H	1-Azakenpaullone
7-	A	Lovastatin	7-	A	indirubin-3'-monoxime
7-	B	Radicicol	7-	B	AG825
7-	C	17-AAG	7-	C	AG1024
7-	D	AG1024	7-	D	AGL 2263
7-	E	1400W, HCl	7-	E	BMS-345541

7-	F	AMT, HCl	7-	F	IKK-2 inhibitor VI
7-	G	AG490	7-	G	IRAK-1/4 inhibitor
7-	H	Cucurbitacin I	7-	H	JAK Inhibitor I
8-	A	SP600125	8-	A	JAK3 Inhibitor VI
8-	B	Damnacanthal	8-	B	SP600125
8-	C	PD 98059	8-	C	JNK inhibitor VIII
8-	D	U0126	8-	D	Damnacanthal
8-	E	Fumagillin	8-	E	PP2
8-	F	GM 6001	8-	F	ERK inhibitor II
8-	G	N-Acetyl-L-cysteine	8-	G	PD98059
8-	H	Aminoguanidine, HCl	8-	H	U-0126
9-	A	L-NMMA	9-	A	MEK inhibitor I
9-	B	PD169316	9-	B	SU11274
9-	C	SB 203580	9-	C	ML-7
9-	D	Rapamycin	9-	D	SB202190
9-	E	NU1025	9-	E	SB239063
9-	F	Benzamide	9-	F	AG1296
9-	G	D609	9-	G	SU11652
9-	H	IBMX	9-	H	PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor V
10-	A	Ro-20-1724	10-	A	PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor IV
10-	B	Zaprinast	10-	B	LY-294002
10-	C	AG1296	10-	C	Wortmannin
10-	D	LY294002	10-	D	H-89
10-	E	Wortmannin	10-	E	4-cyano-3-methylisoquinoline
10-	F	H-89, HCl	10-	F	Bisindolymaleimide I, HCl

10-	G	Bisindolymaleimide I, HCl	10-	G	Go7874
10-	H	H-7	10-	H	Rp-8-CPT-cGMPS
11-	A	Staurosporine	11-	A	KT5823
11-	B	cPLA2inhibitor	11-	B	PKR inhibitor
11-	C	OBAAs	11-	C	RAF1 kinase inhibitor I
11-	D	Cantharidin	11-	D	ZM 336372
11-	E	Cytostatin	11-	E	H-1152
11-	F	Cyclosporin A	11-	F	Y-27632
11-	G	FK-506	11-	G	radicol
11-	H	MG-132	11-	H	PP1 analog
12-	A	Lactacystin	12-	A	Syk inhibitor
12-	B	Hydroxyurea	12-	B	SB431542
12-	C	HA1077	12-	C	TGF- β RI kinase inhibitor II
12-	D	Y27632	12-	D	Tpl2 kinase inhibitor
12-	E	PP1 (analog)	12-	E	TrkA inhibitor
12-	F	PP-H	12-	F	VEGFR receptor tyrosine kinase inhibitor II
12-	G	Nocodazole	12-	G	VEGF recptor 2 kinase inhibitor I
12-	H	Dephostatin	12-	H	SU1498
Kit2			Kit4		
Well		Compound	Well		Compound
1-	A	none (DMSO)	2-	A	none (DMSO)
1-	B	Pifithrin-a (cyclic)	2-	B	nilotinib
1-	C	PRIMA-1	2-	C	sorafenib
1-	D	Finasteride	2-	D	temsirolimus
1-	E	Aminoglutethimide	2-	E	lapatinib
1-	F	Formestane	2-	F	imatinib mesylate

1-	G	Mifepristone	2-	G	sunitinib malate
1-	H	TOFA	2-	H	gefitinib
2-	A	Amastatin	3-	A	vorinostat
2-	B	Actinonin	3-	B	erlotinib
2-	C	Oligomycin	3-	C	bortezomib
2-	D	Bafilomycin A1	3-	D	dasatinib
2-	E	HA 14-1	3-	E	everolimus
2-	F	BH3I-1	3-	F	pazopanib
2-	G	LFM-A13	3-	G	CCG-1423
2-	H	Terreic acid	3-	H	PIM1/2 Kinase Inhibitor V
3-	A	E-64d	4-	A	PIM1 Inhibitor II
3-	B	ALLN	4-	B	AY 9944
3-	C	CA-074	4-	C	cyclopamine
3-	D	Pepstatin A	4-	D	Jervine
3-	E	Z-GLF-CMK	4-	E	WP1066
3-	F	RS 102895	4-	F	5,15-DPP
3-	G	SB 328437	4-	G	IWP-2
3-	H	SB 225002	4-	H	IWR-1-endo
4-	A	AMD3100 octahydrochloride	5-	A	FH535
4-	B	NSC95397	5-	B	DAPT
4-	C	SC- $\alpha\alpha\sigma$ 9	5-	C	XAV939
4-	D	Amiloride	5-	D	PJ-34
4-	E	Lidocaine	5-	E	Olaparib
4-	F	Monensin	5-	F	chlorpromazine hydrochloride
4-	G	Ouabain	5-	G	desipramine hydrochloride
4-	H	Sanguinarine	5-	H	brefeldin A

5-	A	Glibenclamide	6-	A	anisomycin
5-	B	Dequalinium	6-	B	thalidomide
5-	C	Diazoxide	6-	C	lenalidomide
5-	D	Valinomycin	6-	D	tretinoin
5-	E	Nigericin	6-	E	tamibarotene
5-	F	Diltiazem	6-	F	temozolomide
5-	G	Nifedipine	6-	G	crizotinib
5-	H	Verapamil	6-	H	Torkinib
6-	A	PGP-4008	7-	A	orlistat
6-	B	Fumitremorgin C	7-	B	MDV3100
6-	C	A23187	7-	C	PAC-1
6-	D	Ionomycin	7-	D	ABT-737
6-	E	Thapsigargin	7-	E	UNC0638
6-	F	t-Butylhydroquinone (BHQ)	7-	F	BIX01294
6-	G	N-phenylanthranilic acid	7-	G	S2101 (LSD1 inhibitor II)
6-	H	DIDS	7-	H	AMI-1
7-	A	SB 218078	8-	A	C646
7-	B	Debromohymenialdisine (DBH)	8-	B	SIRT1 inhibitor III
7-	C	Rotenone	8-	C	Tenovin-6
7-	D	Antimycin A1	8-	D	PCI-34051
7-	E	Leptomycin B*	8-	E	(+)-JQ1
7-	F	R59022	8-	F	TMPyP4
7-	G	Dioctanoylglycol	8-	G	BSI-201 (Iniparib)
7-	H	RHC80267	8-	H	ABT-888 (Veliparib)
8-	A	Xanthohumol	9-	A	AG014699 (Rucaparib)
8-	B	C75	9-	B	MK-4827 (Niraparib)

8-	C	Cerulenin	9-	C	ENMD-2076
8-	D	Tunicamycin	9-	D	MLN8237
8-	E	Deoxynojirimycin	9-	E	YM155
8-	F	Swainsonine	9-	F	OSU-03012
8-	G	LY 83583	9-	G	OSI-906
8-	H	ODQ	9-	H	PF-04217903
9-	A	Anacardic acid	10-	A	Decitabine
9-	B	Chetomin	10-	B	Vandetanib
9-	C	Dimethyloxalylglycine	10-	C	Axitinib
9-	D	HR22C16	10-	D	Vemurafenib
9-	E	Monastrol	10-	E	Ruxolitinib
9-	F	Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)	10-	F	Vismodegib
9-	G	ETYA	10-	G	Gant61
9-	H	Baicalein	10-	H	PD173074
10-	A	Nutlin-3	11-	A	A83-01
10-	B	MDM2 inhibitor	11-	B	BIO
10-	C	Phenelzine	11-	C	TWS119
10-	D	Deprenyl	11-	D	CT99021
10-	E	Decylubiquinone	11-	E	LY2157299
10-	F	Ro 5-4864	11-	F	SD208
10-	G	Lonidamine	11-	G	LDN193189
10-	H	ML-7	11-	H	Thiazovivin
11-	A	Benzylguanine			
11-	B	DFMO			
11-	C	KT 5823			
11-	D	Rp-8-CPT-cGMPS			

11-	E	MK 886
11-	F	Clofibrate
11-	G	BADGE
11-	H	Troglitazone
12-	A	AZT
12-	B	Nalidixic acid
12-	C	a-Amanitin
12-	D	MST-312
12-	E	b-Rubromycin
12-	F	SB 431542
12-	G	N1,N12-Diethylspermine (BESpm)
12-	H	Fumonisin B1

EML4-ALK 重複変異安定発現細胞の作製

- ・ EML4-ALK をコードするレンチウイルスプラスミドの作製

所属研究室で構築された pENTR-EML4-ALK-WT (野生型)を鋳型として G1202 部位を R1202 に置換したプライマーを用いて PCR (Polymerase chain reaction)を実施した。その後、37°C、1 時間条件下で Dpn I を用いて鋳型のプラスミドを分解後、One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen)に形質転換した。翌日、形質転換されたコロニーをピックアップし、カナマイシンによりセレクションを行った。その後、増えた大腸菌を EndoFree Plasmid Mini Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。この精製後の pENTR-EML4-ALK-G1202R プラスミドを再度鋳型として用いて以下のプラスミドを用いて、pENTR-EML4-ALK-G1202R 重複変異プラスミドを作製した (G1202R+F1174C 重複変異以外。詳細は以下に記載している)。その後、各種 pENTR プラスミド 75 µg 分と plenti6.3destination ベクター 75 µg 分をよく混和し、さらに TE バッファーも加え全体の容量を 4µl とした。この溶液に LR clonase enzyme mix 0.5µl を混ぜ、室温で 5-12 時間静置した。静置後、Proteinase K 0.5 µl (Invitrogen)を加え、LR clonase を失活させた。これを Stbl3 competent cell (Invitrogen)に形質転換し、生じたコロニーをピックアップ後、アンピシリンによりセレクションを行った。セレクション後、EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)を用いて大容量のレンチウイルスプラ

スミドを得た。なお、I1171N 重複変異に関しては所属研究室で構築された plenti6-EML4-ALK-I1171N プラスミドを、G1202R + F1174C 重複変異については所属研究室で構築された plenti6-EML4-ALK-F1174C プラスミドを L1256F 単独変異に関しては plenti6.3-EML4-ALK-WT プラスミドを鋳型として以下のプライマーを用いて PCR を実施後、クローニングを行った。

次ページに PCR 反応の条件と使用したプライマーの配列を記す。

-PCR 反応の組成表-

PCR の組成	(μ l)
10 \times PCR Buffer for KOD-plus-Neo	5
2 mM dNTPs	5
25 mM MgSO ₄	3
Primer mix (終濃度 10 μ M)	1
Distilled water	34
KOD-plus-Neo	1
鋳型プラスミド (50 ng 以下)	1

-PCR 反応のサイクル-

Temperature	Time (秒)	Cycle
95°C	480	$\times 1$
95°C	20	$\times 14$
55°C、57°C、62°C	60	
68°C	300	
68°C	900	$\times 1$
4°C	∞	$\times 1$

-使用したプライマー-

Primer	Sequence
G1202R F-primer	5'GGAGAGACCTCAAGTCCTTC3'
G1202R R-primer	5'GAAGGACTTGAGGTCTCTCC3'
L1198F F-primer	5'TCCTGCTGGAGTTCATGGCG3'
L1198F R-primer	5'CGCCATGAACTCCAGCAGGA3'
L1196M F-primer	5'CATCCTGATGGAGCTCATGG3'
L1196M R-primer	5'CCATGAGCTCCATCAGGATG3'
F1174L F-primer	5'CAGCAAACCTCAACCACCAG3'
F1174L R-primer	5'CTGGTGGTTGAGTTTGCTG3'
G1269A F-primer	5'GATTGCAGACTTCGGGATGG3'
G1269A R-primer	5'CCATCCCGAAGTCTGCAATC3'
L1256F F-primer	5'CTGCTTCTTGACCTGTCCAGG3'
L1256F R-primer	5'CCTGGACAGGTCAAGAAGCAG3'

- ・レンチウイルスの作製

第1章と同様のため、省略する。

- ・Ba/F3 細胞への感染

第1章と同様のため、省略する。

- ・H3122 細胞、NIH3T3 細胞への感染

前日に 2×10^4 細胞/2 ml (6 ウェルプレート) で細胞を播種し、その後、さらに1日 37°C、CO₂ 5%条件下で培養した。培養後、R-10 培地 2 ml、ポリブレン 3.2 µg、作製したウイルス溶液 1 ml を加えた。その後、37°C、CO₂ 5%条件下で 24~48 時間培養した。培養後、培地を抜き、新しい R-10 培地 2 ml を加えて、18~24 時間回復培養した。Blasticidin S 7 µg/ml を加えた R-10 培地で培地交換し、1 週間 37°C、CO₂ 5%条件下で培養した。

細胞生存アッセイ

第1章と同様のため、省略する。

薬剤スクリーニング

DMSO により 200 µM もしくは 20 µM に希釈した標準阻害剤キットの薬剤を 1 µl ずつ 96 ウェルプレートの各ウェルに分注した後、Ba/F3 親株細胞、Ba/F3-EML4-ALK-WT、Ba/F3-EML4-ALK-G1202R、Ba/F3-EML4-ALK-G1202R + L1196M#50 (EML4-ALK-G1202R + L1196M を安定的に発現した Ba/F3 細胞からクローニングした株。これについては以降に詳細に記述してある。) を 199 µl ずつ分注した。その後、37°C、5%CO₂ 条件下で 72 時間培養した。72 時間後 Centro LB 941 microplate luminometer (Berhold Technologies) を用いて各ウェルの発光量を測定し、DMSO 処理したウェルをコントロールとして、各薬剤条件における相対的な細胞生存率を算出した。なお、各薬剤の終濃度は 100 nM もしくは 1000 nM とした。

Western Blotting

第1章と同様のため、省略する。次ページに使用した抗体を記す。

-使用した一次抗体、二次抗体、ブロッキング溶液-

CST は Cell Signaling Technology、Milli は Millipore を表す。

1次抗体	購入先	希釈倍率 (1次抗体)	ブロッキング バッファー (1次抗体)	2次抗体	希釈倍率 (2次抗体)	ブロッキング バッファー (2次抗体)
pALK (Tyr1604)	CST	1:1000	5% BSA	Rabbit	1:10000	5% BSA
pALK (Tyr1282/83)	CST	1:1000	5% BSA	Rabbit	1:10000	5% BSA
ALK	CST	1:1000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
pERK (T202/Y204)	CST	1:2000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
ERK	CST	1:2000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
pAKT (S473)	CST	1:1000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
AKT	CST	1:1000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
pS6 (S240/244)	CST	1:3000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
S6	CST	1:2000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
GAPDH	Milli	1:5000	5% Skim milk	Mouse	1:10000	5% Skim milk

第三節 結果

・ Lorlatinib 耐性重複変異体に対する ALK 阻害薬再感受性化の発見

現在米国を中心に臨床承認されている 5 つの ALK 阻害薬に対する各重複変異体の薬剤感受性を細胞生存アッセイにより確認した。その結果、G1202R + L1198F 重複変異体の Crizotinib に対する IC₅₀ 値が 61 nM であり、Ba/F3-EML4-ALK-WT の IC₅₀ 値である 34 nM と比較するとやや耐性をしめしたものの、Ba/F3-EML4-ALK-G1202R の IC₅₀ 値である 180 nM と比べると感受性化していた。また、ウェスタンブロット解析からも同様の傾向を確認することができ、Ba/F3-EML4-ALK-G1202R や G1202R + L1196M、G1202R + F1174C/L の ALK のリン酸化レベルは Crizotinib 高濃度存在下でも維持されていた一方で、Ba/F3-EML4-ALK-WT や G1202R + L1198F 重複変異体は Crizotinib 濃度依存的に ALK のリン酸化が減弱していた。しかしながら、G1202R + F1174C/L 重複変異体や G1202R + F1196M 重複変異体は全ての ALK 阻害薬に耐性を示し、特に後者の重複変異体に関しては、単独変異体と比較し、いずれの ALK 阻害薬にも高い耐性を示した (Fig. 2-1)。

I1171N 重複変異体の各 ALK 阻害薬に対する感受性を検討したところ、Crizotinib に対する I1171N + L1198F 重複変異体の IC₅₀ 値が 21 nM であり、Ba/F3-EML4-ALK-WT と同程度の感受性を示した。さらに I1171N + G1269A 重複変異体は Ceritinib に対する IC₅₀ 値が 14 nM、Brigatinib に対する IC₅₀ 値が 7.1 nM であり、これら阻害薬に感受性を示す Ba/F3-EML4-ALK-WT の IC₅₀ 値とあまり変わらなかった。また、Ba/F3-EML4-ALK-I1171N の Alectinib に対する IC₅₀ 値が 600 nM であり高度耐性を示した一方で、興味深いことに I1171N + L1256F 重複変異体の IC₅₀ 値は 73 nM と感受性化の傾向を示した。しかしながら、I1171N + F1174I/L や I1171N + L1198H 重複変異体については各 ALK 阻害薬に中程度から高度耐性を示した (Fig. 2-2)。これら細胞生存アッセイで得られた傾向はウェスタンブロット解析からも確認できた (Fig. 1-7)。

A

IC ₅₀ (±SD) ; nM	Crizotinib	Alectinib	Ceritinib	Brigatinib
ALK WT	34 (±1.4)	23 (±1.4)	6.6 (±5.1)	4.6 (±0.3)
G1202R	180 (±45)	990 (±180)	120 (±26)	50 (±9.4)
G1202R + L1198F	61 (±7.9)	1400 (±210)	3100 (±930)	430 (±210)
G1202R + L1196M	430 (±90)	1500 (±500)	940 (±69)	350 (±79)
G1202R + F1174C	370 (±43)	1400 (±310)	420 (±90)	220 (±18)
G1202R + F1174L	490 (±89)	2300 (±150)	590 (±120)	200 (±25)

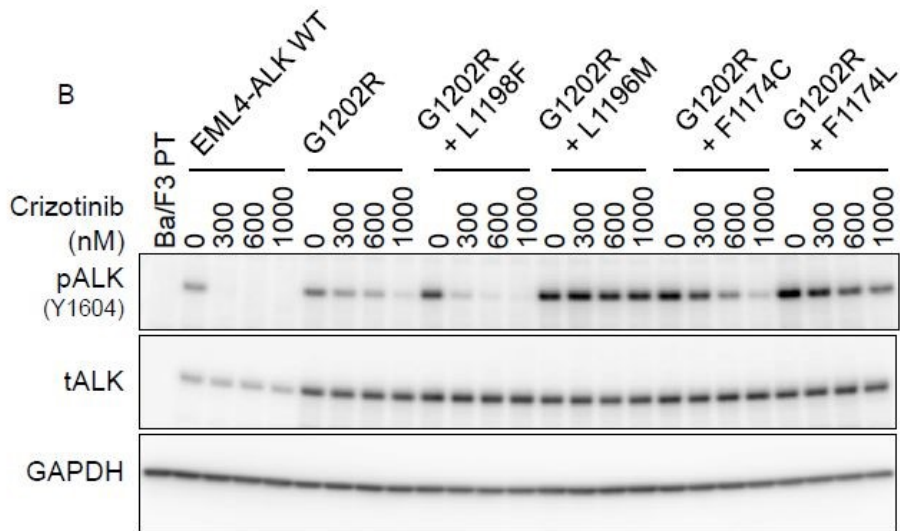


Fig. 2-1 ENU mutagenesis screening から得られた G1202R 重複変異を有するクローン細胞の各 ALK 阻害薬への感受性の確認

A. 3 回の細胞生存アッセイから算出した IC₅₀ 値。結果は、3 回分の平均値 ±SD で表示した。各回とも各 ALK 阻害薬を 72 時間処理した。表中の灰色の部分には ENU mutagenesis screening で得られたクローン細胞であることを表し、白色は Ba/F3 細胞に各 EML4-ALK タンパク質を安定的に発現した細胞であることを表している。表中の緑色; IC₅₀ 値が 50 nM 以下、黄色; IC₅₀ 値が 50 nM より大きく 200 nM 未満、赤色; IC₅₀ 値が 200 nM 以上を表している。

B. ウェスタンブロットング解析による Crizotinib 存在下での ALK の発現量と ALK 自己リン酸化の確認。各濃度の Crizotinib を 3 時間処理後、タンパク質を抽出し、ALK タンパク質もしくは ALK の自己リン酸化を検出した。

IC ₅₀ (±SD) ; nM	Crizotinib	Alectinib	Ceritinib	Brigatinib
ALK WT	28 (±12)	9.8 (±2.6)	4.5 (±2.1)	2.9 (±0.6)
I1171N	140 (±59)	400 (±69)	18 (±6.9)	20 (±1.5)
I1171N + L1198F	21 (±4.8)	660 (±110)	520 (±120)	49 (±3.9)
I1171N + L1196M	350 (±17)	370 (±41)	11 (±0.8)	32 (±6.1)
I1171N + F1174I	350 (±60)	1300 (±60)	140 (±7.1)	110 (±13)
I1171N + F1174L	440 (±140)	1600 (±500)	160 (±53)	100 (±6.8)
I1171N + L1198H	160 (±30)	1600 (±420)	540 (±22)	140 (±24)
I1171N + L1256F	560 (±53)	73 (±5.4)	400 (±71)	42 (±6.3)
I1171N + G1269A	670 (±38)	1100 (±95)	14 (±2.9)	7.1(±0.4)

Fig. 2-2 ENUmultiplication screening から得られた I1171N 重複変異を有するクローン細胞の各 ALK 阻害薬への感受性の確認

3回の細胞生存アッセイから算出した IC₅₀ 値。結果は、3回分の平均値 ± SD で表示した。各回とも各 ALK 阻害薬を 72 時間処理した。表中の灰色の部分は ENU mutagenesis screening で得られたクローン細胞であることを表し、白色は Ba/F3 細胞に各 EML4-ALK タンパク質を安定的に発現した細胞であることを表している。表中の緑色; IC₅₀ 値が 50 nM 以下、黄色; IC₅₀ 値が 50 nM より大きく 200 nM 未満、赤色; IC₅₀ 値が 200 nM 以上を表している。

各重複変異クローンの ALK 阻害薬存在下での ALK の自己リン酸化の挙動は Fig. 1-7 に掲載している。

・ EML4-ALK 重複変異体の再構築

ENU mutagenesis screening は第一章で述べたように、ランダムに変異を導入できる手法として、BCR-ABL 融合タンパク質や CD74-ROS1 融合タンパク質等のキナーゼドメインにおける薬剤耐性変異の探索にも広く利用されている。しかしながら、ランダムに変異を導入するため、今回私が ENU mutagenesis screening から見出した細胞の Lorlatinib に対する耐性は、ALK のキナーゼドメインにおける変異に依存していない可能性があった。さらに、サンガーシーケンス解析により耐性変異を検出しているため、新たに ALK キナーゼドメインに蓄積した変異と元から存在した G1202R、I1171N 変異が同一染色体上に存在しておらず個々の変異体が共存した結果、Lorlatinib に耐性化を示した可能性も考えられた。これら二つの可能性を否定するため、今回見出された重複変異体の一部、特に将来的に臨床に出現する可能性が高いと考えられる G1202R + L1198F、I1171N + L1198F、G1202R + L1196M、I1171N + L1196M、G1202R + F1174C、G1202R + F1174L 重複変異体を再度構築し、各 ALK 阻害薬に対する感受性を確認した (G1202R + F1174L は既に Ceritinib 耐性患者から検出されていたため、F1174 部位の重複変異体も作製した)。その結果、いずれの重複変異体も EML4-ALK-WT を有する細胞や EML4-ALK-G1202R 単独変異体、EML4-ALK-I1171N 単独変異体よりも Lorlatinib に耐性を示した (EML4-ALK-WT を有する Ba/F3 細胞の IC₅₀ 値=2.0 nM もしくは 1.9 nM、EML4-ALK-G1202R を有する Ba/F3 細胞の IC₅₀ 値=74 nM、G1202R + L1198F 重複変異体の IC₅₀ 値=370 nM、G1202R + L1196M 重複変異体の IC₅₀ 値=1400 nM、G1202R + L1174C 重複変異体の IC₅₀ 値=300 nM、G1202R + F1174L 重複変異体の IC₅₀ 値=100 nM、EML4-ALK-I1171N を有する Ba/F3 細胞の IC₅₀ 値=81 nM、I1171N + L1198F 重複変異体の IC₅₀ 値=240 nM、I1171N + L1196M 重複変異体の IC₅₀ 値=360 nM)。一方で、G1202R + L1198F 重複変異体や I1171N + L1198F 重複変異体は各々の単独変異体よりも Crizotinib に感受性を示し、その IC₅₀ 値は EML4-ALK-WT を有する細胞とほぼ同程度であった (EML4-ALK-WT を有する Ba/F3 細胞の IC₅₀ 値=35 nM もしくは 45 nM、EML4-ALK-G1202R を有する Ba/F3 細胞の IC₅₀ 値=260 nM、EML4-ALK-I1171N を有する Ba/F3 細胞の IC₅₀ 値=220 nM、EML4-ALK-G1202R + L1198F 重複変異体の IC₅₀ 値=47 nM、I1171N + L1198F 重複変異体の IC₅₀ 値=19 nM)。さらに I1171N + L1196M 重複変異体は Ceritinib や Brigatinib に対して EML4-ALK-I1171N を有する細胞とほぼ同程度の IC₅₀ 値を示し、感受性であった (Ceritinib; EML4-ALK-WT を有する Ba/F3 細胞の IC₅₀ 値=10 nM、EML4-ALK-I1171N を有する Ba/F3 細胞の IC₅₀ 値=36 nM、I1171N + L1196M 重複変異体の IC₅₀ 値=21 nM、Brigatinib; EML4-ALK-WT を有する Ba/F3 細胞の IC₅₀ 値=5.4 nM、EML4-ALK-I1171N を有する Ba/F3 細胞の IC₅₀ 値=28 nM、I1171N + L1196M

重複変異体の IC₅₀ 値=31 nM) (Fig. 2-3、Fig. 2-4)。また、細胞生存アッセイの結果より EML4-ALK-WT を有する Ba/F3 細胞や G1202R 単独変異体、I1171N 単独変異体が死滅する ALK 阻害薬の濃度条件下での重複変異体のリン酸化 ALK のレベルをウェスタンブロット解析により検討したところ、いずれの条件でもそのレベルは維持されていた (Fig. 2-5、Fig. 2-6)。

次に *in vivo* において見出された重複変異体 G1202R + G1269A に対する克服薬を探索した。JFCR-041-2 親株細胞 (以下 JFCR-041-2PT 細胞) と *in vivo* で取得した Lorlatinib に耐性を示す腫瘍細胞 (以下 JFCR-041-2-LorR 細胞) の各 ALK 阻害薬に対する薬剤感受性をウェスタンブロット解析によって確認した。その結果、Crizotinib、Alectinib、Ceritinib 処理下では ALK のリン酸化レベルや ALK の下流因子である ERK や S6 タンパク質のリン酸化レベルは減弱しなかった。さらに、Lorlatinib 存在下では、JFCR-041-2LorR 細胞の ALK やその下流因子のリン酸化レベルはやや減弱傾向にあったが、JFCR-041-2PT 細胞と比較すると、その耐性は維持されていた。しかしながら、Brigatinib に対しては G1202R 単独変異体を有する JFCR-041-2PT 細胞とほぼ同程度の挙動を示した (Fig. 2-7)。また、*in vivo* において、JFCR-041-2PT 細胞を移植した Lorlatinib 投与群では Lorlatinib が腫瘍の増大を抑制し、有効性を示す一方で、JFCR-041-2-LorR 細胞を移植した Lorlatinib 投与群では、腫瘍の増大傾向が見られた。一方で、JFCR-041-2PT 細胞もしくは JFCR-041-2-LorR 細胞を移植した群共に Brigatinib により腫瘍の増大が抑制される傾向となった (Fig. 2-8)。次に Ba/F3 細胞に EML4-ALK-G1202R + G1269A 重複変異体を安定的に発現させ、各 ALK 阻害薬への感受性を検討した。Lorlatinib に対して Ba/F3-EML4-ALK-G1202R が示した IC₅₀ 値である 69 nM と比較して G1202R + G1269A 重複変異体の IC₅₀ 値は 700 nM であり、約 10 倍高い耐性を示した (Fig. 2-9)。一方で、Brigatinib に対しては両細胞ともほぼ変わらない IC₅₀ 値を示し、Brigatinib 濃度依存的にリン酸化 ALK の減弱も見られた (Fig. 2-10)。

IC ₅₀ (±SD) ; nM	Crizotinib	Alectinib	Ceritinib	Brigatinib	Lorlatinib
ALK WT	35 (±3.1)	15 (±1.6)	7.6 (±2.3)	3.8 (±1.2)	2 (±0.2)
G1202R	260 (±24)	580 (±38)	150 (±8.5)	55 (±1.9)	74 (±5.6)
G1202R + L1198F	47 (±7.9)	420 (±47)	620 (±260)	290 (±55)	370 (±67)
G1202R + L1196M	370 (±37)	880 (±4)	690 (±200)	320 (±64)	1400 (±190)
G1202R + F1174C	320 (±25)	700 (±46)	280 (±31)	180 (±12)	300 (±24)
G1202R + F1174L	200 (±33)	560 (±82)	260 (±29)	160 (±34)	110 (±24)

Fig. 2-3 G1202R 重複変異を再導入した Ba/F3 細胞の各 ALK 阻害薬への感受性の確認

3回の細胞生存アッセイから算出した IC₅₀ 値。結果は、3回分の平均値 ±SD で表示した。各回とも各 ALK 阻害薬を 72 時間処理した。表中の緑色; IC₅₀ 値が 50 nM 以下、黄色; IC₅₀ 値が 50 nM より大きく 200 nM 未満、赤色; IC₅₀ 値が 200 nM 以上を表している。

IC ₅₀ (±SD) ; nM	Crizotinib	Alectinib	Ceritinib	Brigatinib	Lorlatinib
ALK WT	45 (±13)	17 (±6.1)	10 (±1.2)	5.4 (±0.9)	1.9 (±0.1)
I1171N	220 (±44)	600 (±290)	36 (±2.1)	28 (±1.2)	81 (±4)
I1171N + L1198F	19 (±8.4)	750 (±180)	660 (±190)	43 (±20)	240 (±63)
I117N + L1196M	460 (±160)	460 (±180)	21 (±2.6)	31 (±9.9)	360 (±22)

Fig. 2-4 I1171N 重複変異を再導入した Ba/F3 細胞の各 ALK 阻害薬への感受性の確認
 3 回の細胞生存アッセイから算出した IC₅₀ 値。結果は、3 回分の平均値 ± SD で表示した。各回とも各 ALK 阻害薬を 72 時間処理した。表中の緑色; IC₅₀ 値が 50 nM 以下、黄色; IC₅₀ 値が 50 nM より大きく 200 nM 未満、赤色; IC₅₀ 値が 200 nM 以上を表している。

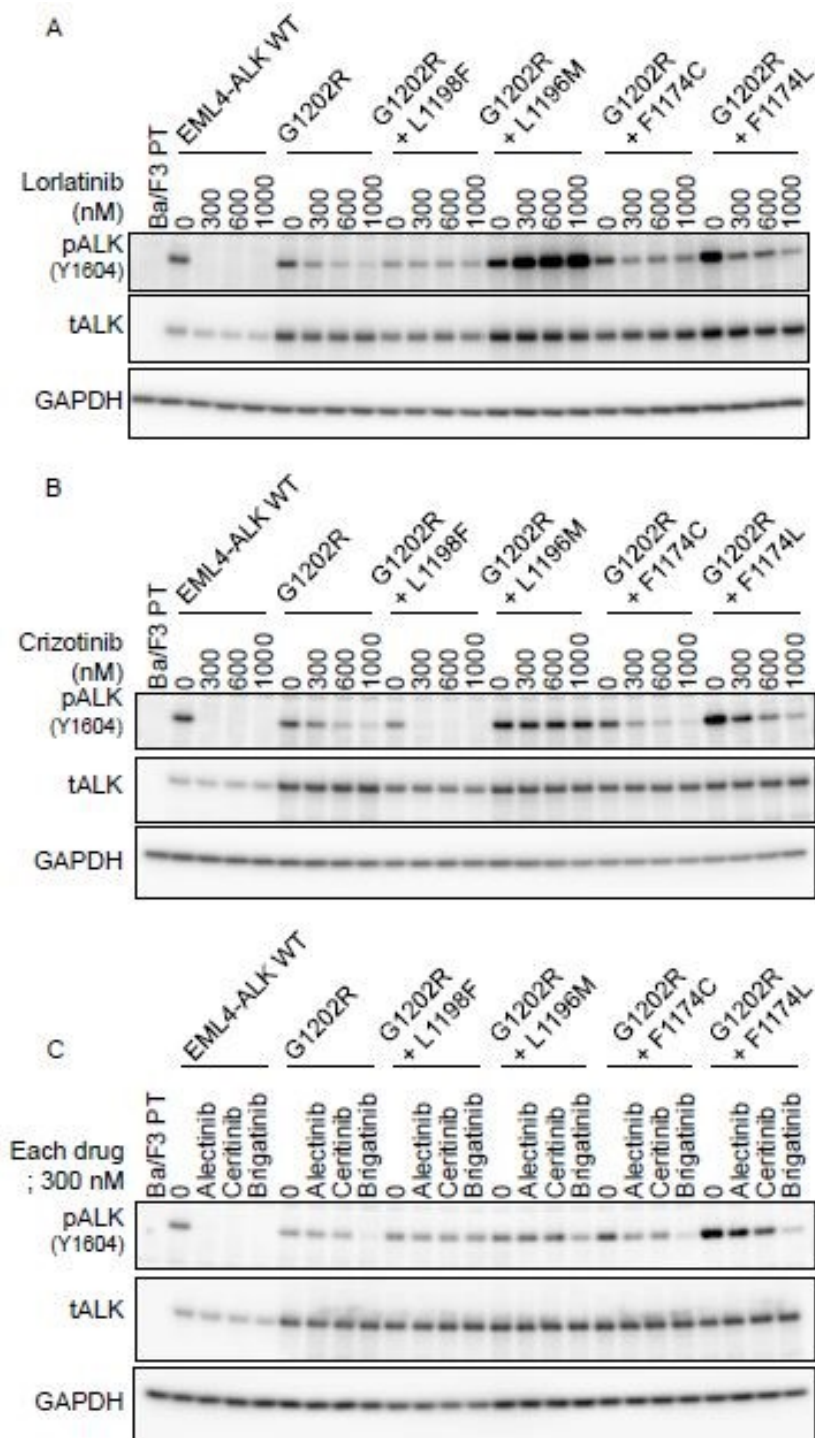


Fig. 2-5 G1202R 重複変異を再導入した Ba/F3 細胞の各 ALK 阻害薬存在下での ALK 自己リン酸化の確認

ウェスタンブロッティング解析による A. Lorlatinib、B. Crizotinib、C. その他 ALK 阻害薬処理下での ALK の発現量及び ALK 自己リン酸化量の確認。各濃度の ALK 阻害薬を 3 時間処理後、タンパク質を抽出し、ALK タンパク質と ALK の自己リン酸化を検出した。

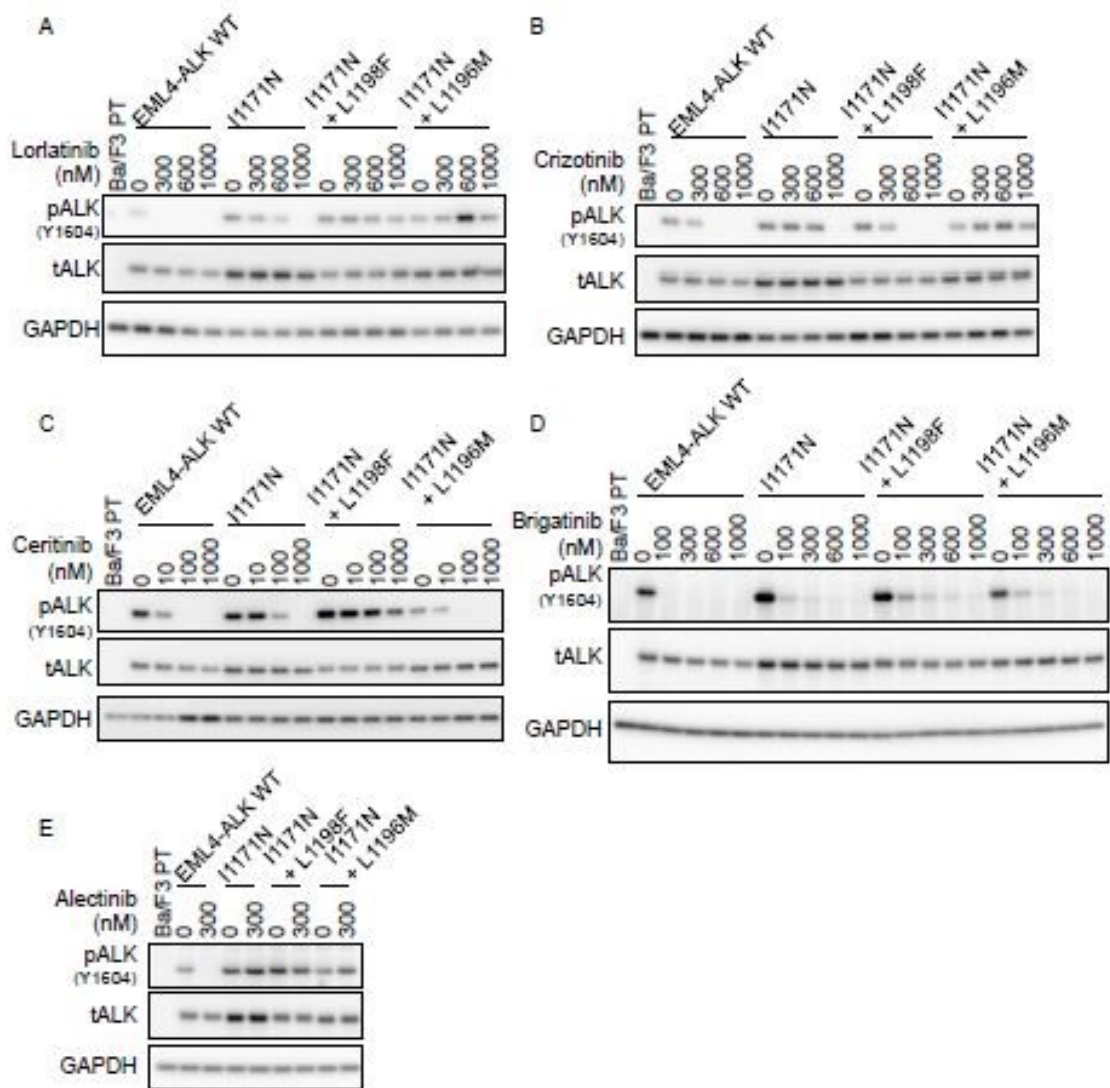


Fig. 2-6 I1171N 重複変異を再導入した Ba/F3 細胞の各 ALK 阻害薬存在下での ALK 自己リン酸化の確認

ウェスタンブロッティング解析による A. Lorlatinib、B. Crizotinib、C. Ceritinib、D. Brigatinib、E. Alectinib 存在下での ALK 自己リン酸化の確認。各細胞に各濃度の ALK 阻害薬を 3 時間処理後、タンパク質を抽出し ALK タンパク質及び ALK の自己リン酸化を検出した。

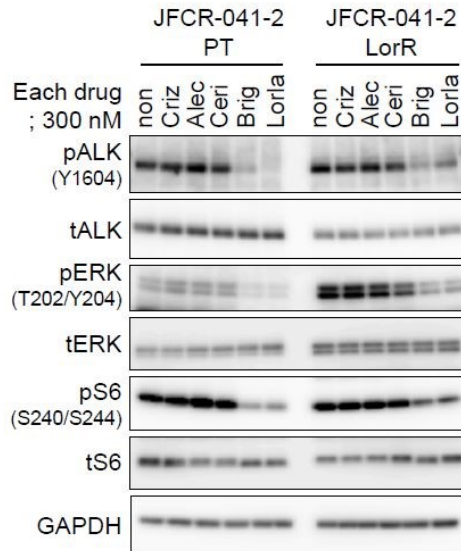


Fig. 2-7 G1202R 変異陽性 JFCR-041-2PT 細胞と G1202R + G1269A 重複変異陽性 JFCR-041-2LorR 細胞における各 ALK 阻害薬存在下での ALK の自己リン酸化とその下流シグナルのリン酸化の挙動の確認

ウェスタンブロッティング解析による JFCR-041-2PT 腫瘍細胞及び JFCR-041-2LorR 腫瘍細胞における各 ALK 阻害薬(Criz; Crizotinib、Alec; Alectinib、Ceri; Ceritinib、Brig; Brigatinib もしくは Lorla; Lorlatinib)存在下での ALK の発現量、ALK 自己リン酸化及び ALK 下流シグナルの確認。各細胞に各 ALK 阻害薬 300 nM を 6 時間処理後、タンパク質を抽出し、図のタンパク質を検出した。

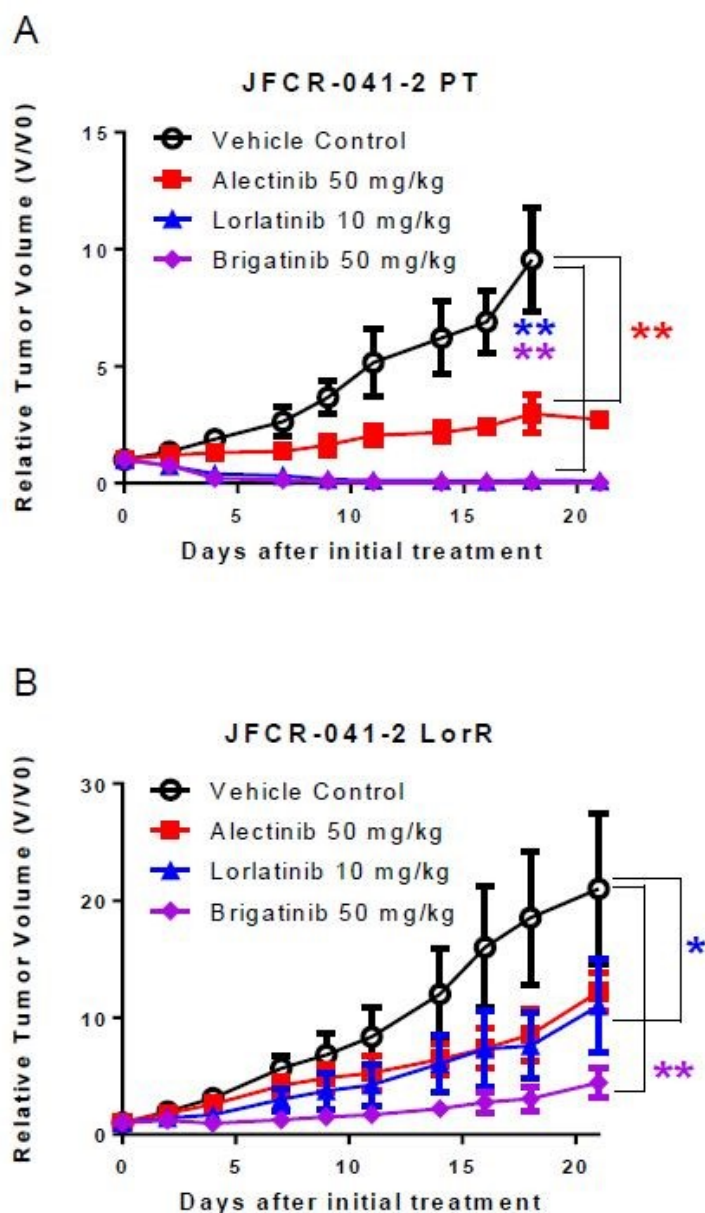


Fig. 2-8 *in vivo* における G1202R 変異陽性 JFCR-041-2PT 腫瘍細胞と G1202R + G1269A 重複変異陽性 JFCR-041-2-LorR 腫瘍細胞に対する Lorlatinib もしくは Brigatinib の抗腫瘍効果の検討

A. JFCR-041-2PT 腫瘍細胞もしくは B. JFCR-041-2-LorR 腫瘍細胞をマウスに皮下移植し、Alectinib、Lorlatinib もしくは Brigatinib による治療を行った。

各群で6匹のマウスを使用し、結果は、平均 ± SD で表示した。

A. において19日目、B. において21日目に Mann-Whitney U 検定 (**P<0.01、*P<0.05) により統計的有意差をとった。

A

IC ₅₀ (±SD) ; nM	Lorlatinib
ALK WT	1 (±0.2)
G1202R	69 (±14)
G1202R + G1269A	700 (±210)

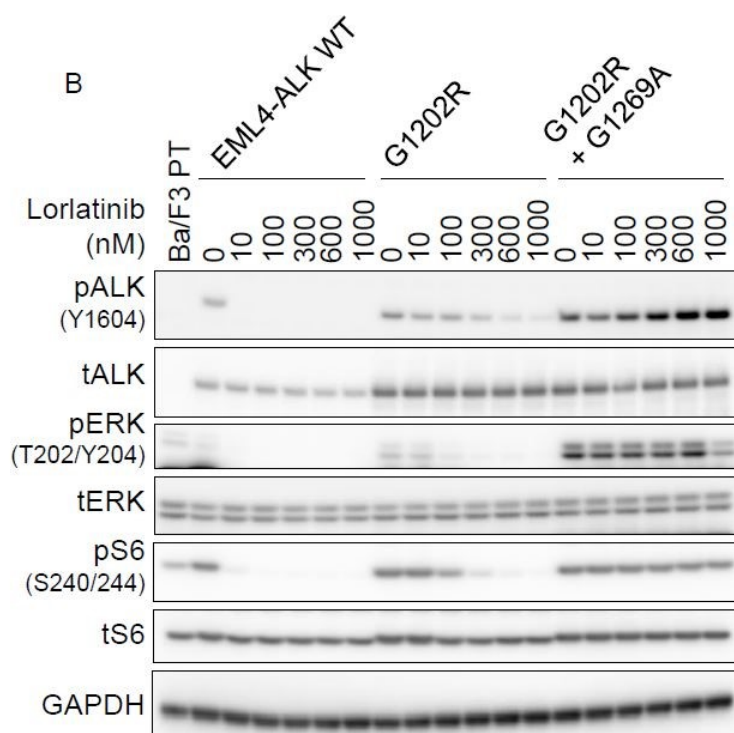


Fig. 2-9 G1202R + G1269A 重複変異体を再導入した Ba/F3 細胞の Lorlatinib 耐性の確認

A. 3回の細胞生存アッセイから算出した IC₅₀ 値。結果は、3回分の平均 ± SD で表示した。各回とも Lorlatinib を 72 時間処理した。表中の緑色; IC₅₀ 値が 50 nM 以下、黄色; IC₅₀ 値が 50 nM より大きく 200 nM 未満、赤色; IC₅₀ 値が 200 nM 以上を表している。

B. ウェスタンブロッティング解析による各種 Ba/F3 細胞における Lorlatinib 処理下での ALK の発現量、ALK 自己リン酸化量及びその下流シグナルのリン酸化の挙動の確認。各濃度の Lorlatinib を 3 時間処理後、タンパク質を抽出し、図のタンパク質を検出した。

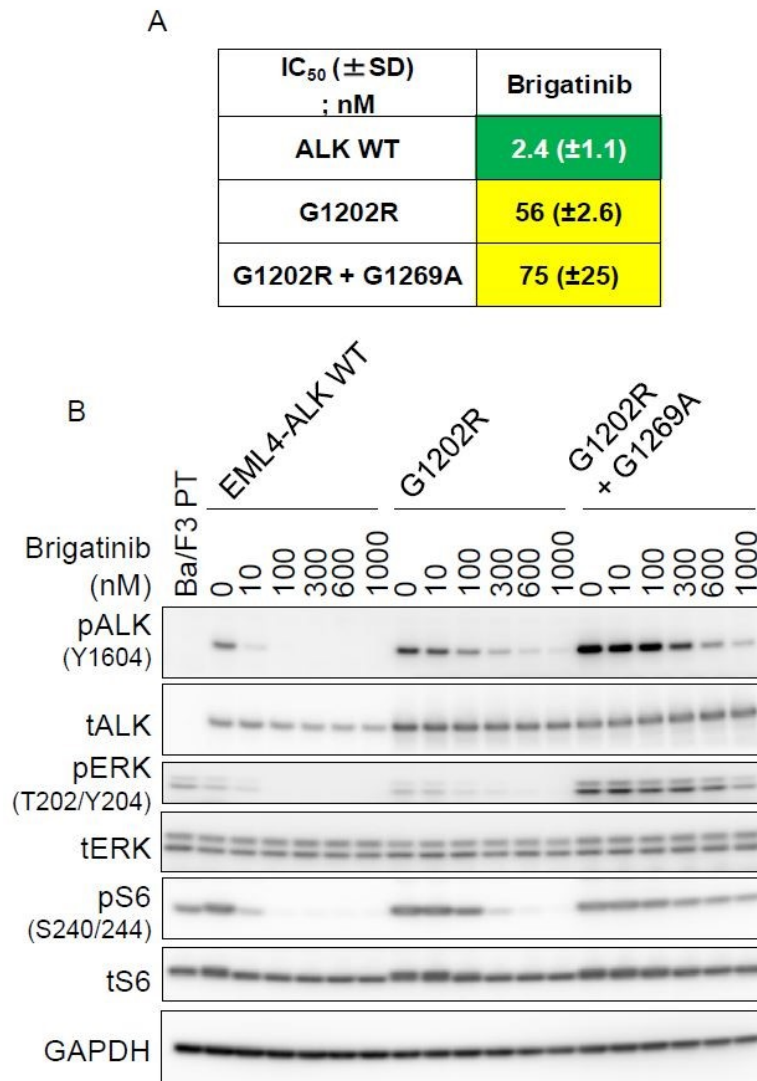


Fig. 2-10 G1202R + G1269A 重複変異体を再導入した Ba/F3 細胞の Brigatinib 感受性の確認

A. 3 回の細胞生存アッセイから算出した IC₅₀ 値。結果は、3 回分の平均 ± SD で表示した。各回とも Brigatinib を 72 時間処理した。表中の緑色; IC₅₀ 値が 50 nM 以下、黄色; IC₅₀ 値が 50 nM より大きく 200 nM 未満、赤色; IC₅₀ 値が 200 nM 以上を表している。

B. ウェスタンブロッティング解析による各種 Ba/F3 細胞における Brigatinib 処理下での ALK の発現量、ALK 自己リン酸化量及びその下流シグナルのリン酸化の挙動の確認。各濃度の Brigatinib を 3 時間処理後、タンパク質を抽出し、図のタンパク質を検出した。

・ Lorlatinib 耐性 L1256F 単独変異の発見

第一章で述べたように今回発見した EML4-ALK 重複変異体の新たに ALK キナーゼドメインに蓄積した変異は既に臨床や基礎研究レベルで ALK 阻害薬耐性変異として発見されていた変異がほとんどであった。しかしながら、L1256F 変異だけは未だに報告が無い変異であった。次に L1256F 重複変異や L1256F 単独変異の性状を解析した。EML4-ALK-L1256F 単独変異や EML4-ALK-I1171N + L1256F 重複変異を安定的に発現する Ba/F3 細胞を新たに構築し、各 ALK 阻害薬に対する薬剤感受性を解析したところ、I1171N + L1256F 重複変異体のみならず、L1256F 単独変異体までも Lorlatinib に対して高度な耐性を示した (野生型 EML4-ALK を有する Ba/F3 細胞の IC₅₀ 値=1.3 nM、I1171N 単独変異体の IC₅₀ 値=71 nM、I1171N + L1256F 重複変異体の IC₅₀ 値=4094 nM、L1256F 単独変異体の IC₅₀ 値=5740 nM)。Ba/F3-EML4-ALK-I1171N は Alectinib 耐性変異として出現している通り高度な耐性を示す一方で (IC₅₀ 値=291 nM)、L1256F 単独・重複変異体は Alectinib に対し高い感受性を示した (野生型 EML4-ALK を有する細胞の IC₅₀ 値=6.4 nM、L1256F 単独変異体の IC₅₀ 値=1.9 nM、I1171N+L1256F 重複変異体の IC₅₀ 値=22.7 nM) (Fig. 2-11)。前述のように、L1256F 単独変異体及び I1171N + L1256F 重複変異体はこれまでに ALK 耐性変異変異体として報告がされていない。そのため、次にヒト *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌細胞においてもこれまで同様、Lorlatinib に耐性を示し得るのか解析することにした。まず、ヒト *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌細胞株 H3122 に EML4-ALK-WT (野生型)、EML4-ALK-I1171N、-I1171N + L1256F、-L1256F 変異体をそれぞれ安定的に発現させた。次に限界希釈法によりクローン細胞を取得した (H3122-EML4-ALK-L1256F#12、#18、#20、H3122-EML4-ALK-I1171N + L1256F#12、#25、H3122-EML4-ALK-I1171N#14、#16)。その後、これら細胞の Lorlatinib 及び Alectinib に対する薬剤感受性を細胞生存アッセイにより確認したところ、Lorlatinib 処理下において H3122 親株細胞や H3122-EML4-ALK-WT、-I1171N 変異体と比較して H3122-EML4-ALK-L1256F 変異体や H3122-EML4-ALK-I1171N + L1256F 重複変異体の細胞生存率が維持されており、耐性化していた。一方で、Alectinib 処理下においては H3122-EML4-ALK-L1256F 変異体や H3122-EML4-ALK-I1171N+L1256F 重複変異体は H3122 親株細胞と同程度の細胞生存率を示した (Fig. 2-12、Fig. 2-13)。また、ウェスタンブロット解析からも細胞増殖アッセイと同じ傾向を確認した (Fig. 2-14)。次に NIH3T3 細胞を用いたコロニーフォーメーションアッセイにて足場非依存性増殖能を評価することで確認した。その結果、NIH3T3 親株細胞は寒天培地上でコロニーを形成できない一方で、EML4-ALK-L1256F 単独変異体を安定的に発現させた NIH3T3 細胞、EML4-ALK-WT を安定発現させた NIH3T3 細胞ともに

寒天培地上でコロニーを形成した (Fig. 2-15)。最後に、この L1256F 単独変異体がどのように Lorlatinib に耐性を示すのか、京都大学の奥野恭史博士、荒木望嗣博士との共同研究により MD シミュレーションを用いて解析を行った。その結果、Lorlatinib のフルオロベンゼン基と F1256 のベンジル基が立体障害を生じることで Lorlatinib と周囲のアミノ酸残基とのファンデルワールス相互作用が低下し、結果的に ALK キナーゼドメインと Lorlatinib との結合親和性が減弱することで、耐性化する様子が見られた (Fig. 2-16)。

A

IC ₅₀ (±SD) ; nM	Lorlatinib	Alectinib	Crizotinib	Ceritinib	Brigatinib
ALK WT	1.3 (±0.2)	6.4 (±0.5)	18 (±4.5)	4.3 (±1.0)	2.9 (±0.3)
I1171N	71 (±9.2)	291 (±24)	121 (±17.8)	17 (±0.6)	23 (±0.8)
L1256F	5740 (±2757)	1.9 (±0.6)	319 (±80.3)	169 (±64)	17 (±5.8)
I1171N + L1256F	4094 (±965)	22.7 (±3.2)	286 (±42.7)	124 (±29)	15 (±4.3)

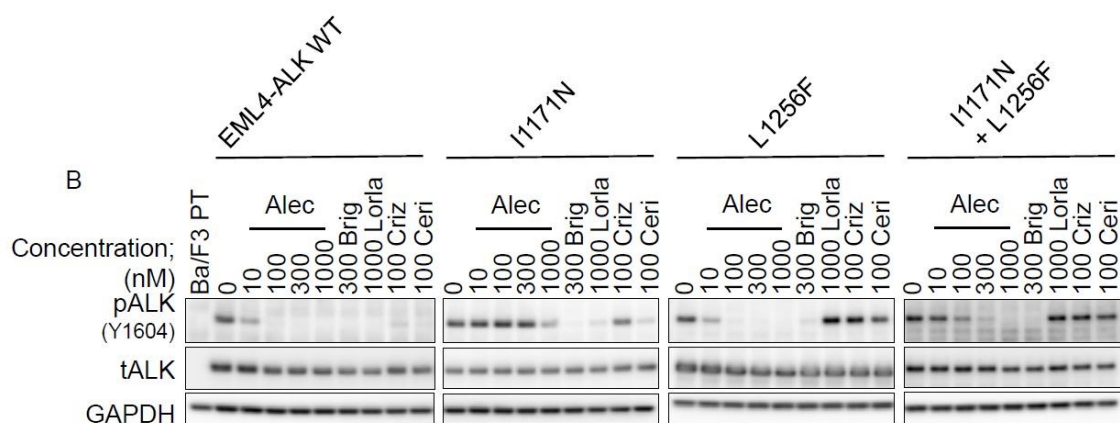


Fig. 2-11 I1171N + L1256F 重複変異体もしくは L1256F 単独変異体を導入した Ba/F3 細胞の各 ALK 阻害薬への感受性の確認

A. 3 回の細胞生存アッセイから算出した IC₅₀ 値。結果は、3 回分の平均値 ± SD で表示した。各回とも各 ALK 阻害薬を 72 時間処理した。表中の緑色; IC₅₀ 値が 50 nM 以下、黄色; IC₅₀ 値が 50 nM より大きく 200 nM 未満、赤色; IC₅₀ 値が 200 nM 以上を表している。

B. ウェスタンブロッティング解析による各 ALK 阻害薬処理下での ALK の発現量と ALK 自己リン酸化の確認。各濃度の ALK 阻害薬を 3 時間処理後、タンパク質を抽出し、ALK タンパク質もしくは ALK の自己リン酸化を検出した。

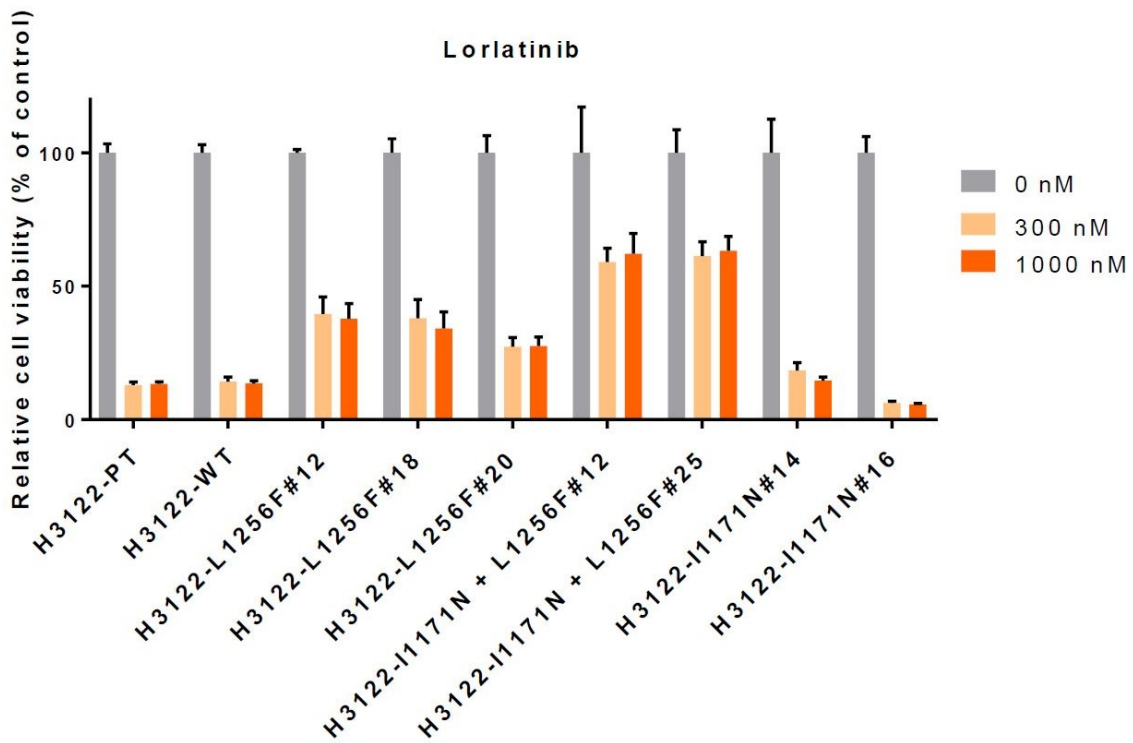


Fig. 2-12 I1171N + L1256F 重複変異体もしくは L12546F 単独変異体を導入したヒト *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性 H3122 細胞の Lorlatinib への感受性の確認

Lorlatinib 300 nM もしくは 1000 nM 72 時間処理における薬剤未処理の条件をコントロールとしたときの各 H3122 細胞の細胞生存率を算出した。

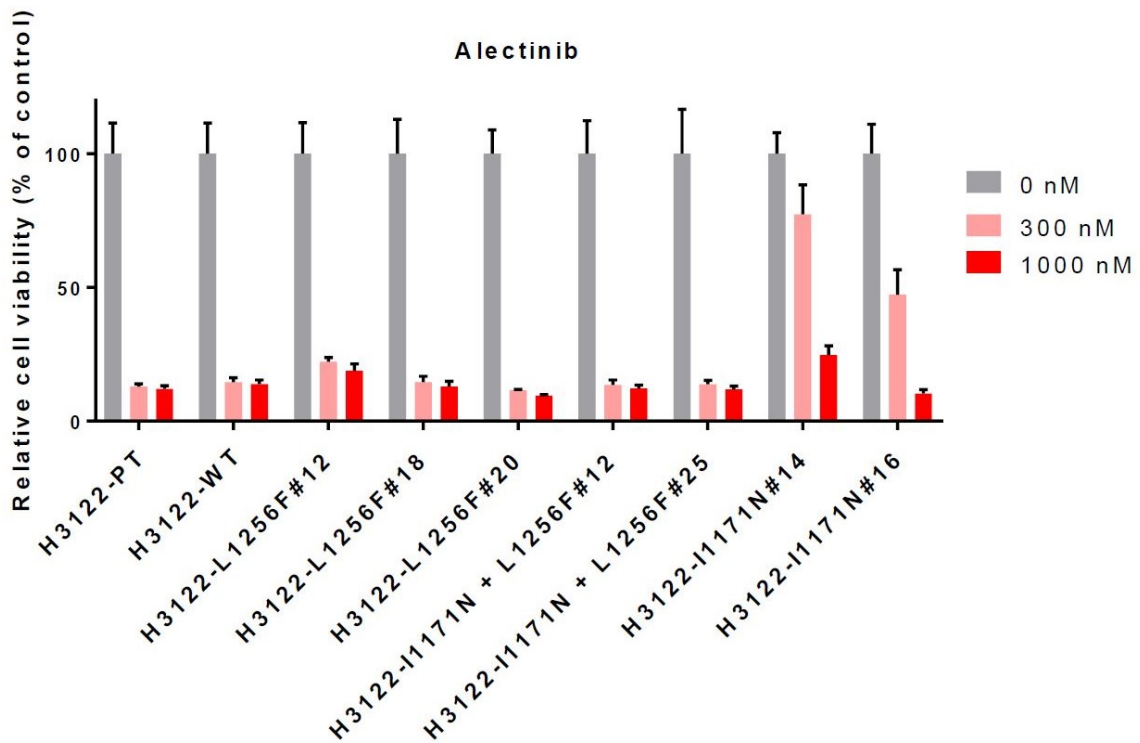


Fig. 2-13 I1171N + L1256F 重複変異体もしくは L12546F 単独変異体を導入したヒト *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性 H3122 細胞の Alectinib への感受性の確認

Alectinib 300 nM もしくは 1000 nM 72 時間処理における薬剤未処理の条件をコントロールとしたときの各 H3122 細胞の細胞生存率を算出した。

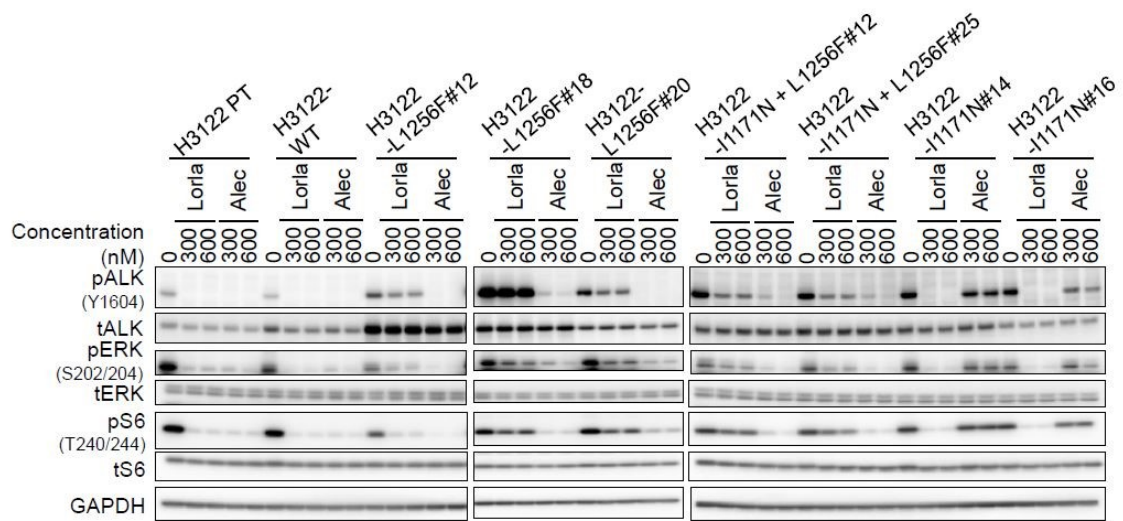


Fig. 2-14 Lorlatinib、Alectinib 処理条件下での I1171N + L1256F 重複変異体もしくは L12546F 単独変異体を導入した H3122 細胞の ALK シグナルの挙動の確認

ウェスタンブロッティング解析による各種 H3122 細胞における Lorlatinib もしくは Alectinib 処理下での ALK の発現量と ALK 自己リン酸化量及び ALK 下流シグナルのリン酸化の確認。各細胞に各濃度の ALK 阻害薬を 6 時間処理後、タンパク質を抽出し、図のタンパク質を検出した。

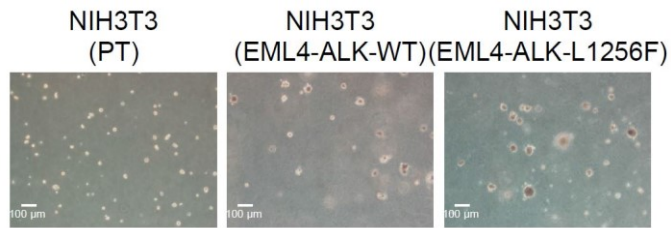


Fig. 2-15 EML4-ALK-L1256F 単独変異体の足場非依存的増殖能の有無の検討
 ソフトアガーコロニーフォーメーションアッセイでの検討。左; NIH3T3 細胞親株、中; NIH3T3 細胞に野生型 EML4-ALK を安定的に発現した株、右; NIH3T3 細胞に EML4-ALK-L1256F 単独変異体を安定的に発現した株。スケールバーは 100 μm を表す。

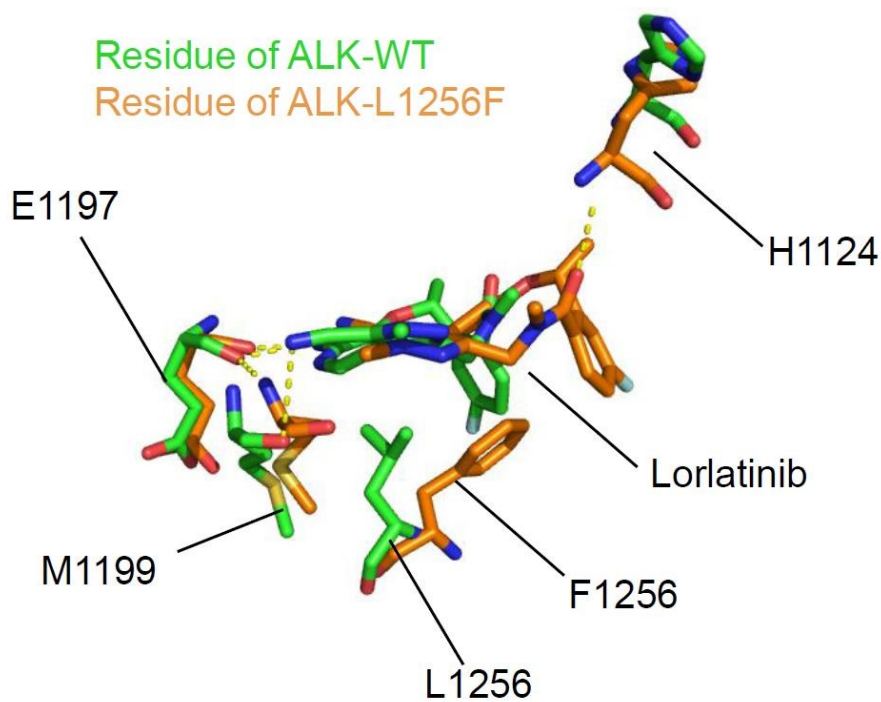


Fig. 2-16 MD (Molecular Dynamics) シミュレーションを用いた EML4-ALK-L1256F 単独変異体の Lorlatinib 耐性化機構の予測

50 ns のシミュレーションを 5 回行った際の平均化構造を示した。緑色が野生型 ALK のキナーゼドメインと Lorlatinib との構造、オレンジ色が L1256F 変異体のキナーゼドメインと Lorlatinib との構造。

・全ての ALK 阻害薬に耐性を示す EML4-ALK-G1202R + L1196M 重複変異体に対する阻害薬の発見

これまでの解析から EML4-ALK-G1202R + L1196M 重複変異体は全ての ALK 阻害薬に耐性を示すことが分かった。この重複変異体はその後臨床試験中であった Lorlatinib に対する耐性変異として実臨床にも出現していたことから、この変異体は将来的に臨床の現場で問題になると予測した。そのため、次に化学療法基盤支援活動より分与いただいた標準阻害剤ライブラリーを用いて G1202R + L1196M 重複変異体に阻害効果を示す薬剤を探索した。その結果、驚いたことに BCR-ABL 阻害剤として開発された経緯をもつ AG-957 処理時に、Ba/F3 親株細胞、Ba/F3-EML4-ALK-WT、Ba/F3-EML4-AL-G1202R の生存率と比較して、G1202R + L1196M 重複変異体の生存率が減少した (Fig. 2-17)。G1202R + L1196M 重複変異体は上述のように全ての ALK 阻害薬に耐性を示したため、今回の G1202R + L1196M 重複変異体が EML4-ALK 依存的な増殖を示しているのか、また、今回の AG-957 の感受性は ALK の活性を直接的に AG-957 が抑制しているのか確証がないと考えた。そこで、G1202R + L1196M 重複変異体から限界希釈法により複数の EML4-ALK-G1202R + L1196M を有するクローンを得た。

EML4-ALK は複数のバリエーションが存在しているが、今回 Ba/F3 細胞に安定発現させているものはバリエーション 1 であった。EML4-ALK バリエーション 1 は HSP90 (Heat shock protein 90) に安定的な立体構造を維持されているため、EML4-ALK バリエーション 1 を有する細胞では HSP90 阻害剤に対し感受性を示すことがこれまでの研究から明らかとなっている⁶⁶。そのような理由から、もし今回得られたクローン細胞も EML4-ALK に依存した細胞増殖をしているのなら、HSP90 阻害剤に感受性を示すと仮説を立て、細胞生存アッセイを実施した。その結果、今回得られたクローン細胞はいずれも HSP90 阻害剤である 17-AAG に対して Ba/F3-EML4-ALK-WT や Ba/F3-EML4-ALK-G1202R とほぼ同程度の薬剤感受性を示したことから、これらクローン細胞は EML4-ALK-G1202R + L1196M 重複変異依存的な細胞増殖をしていることが分かった (Fig. 2-18)。以降最も 17-AAG に感受性が高かったクローン細胞である G1202R + L1196M 重複変異体#50 を以降の解析に用いることにした (以後 G1202R + L1196M#50 を G1202R + L1196M 重複変異体#50 と表記する)。詳細に G1202R + L1196M 重複変異体#50 に対する薬剤感受性を評価したところ、Ba/F3-EML4-ALK-WT や Ba/F3-EML4-ALK-G1202R の示す IC₅₀ 値と比較して、G1202R + L1196M 重複変異体#50 の IC₅₀ 値は約半分であった。さらに AG-957 の構造類縁体である Adaphostin (Fig. 2-19)についても同様に検討したところ、AG-957 と同様の傾向を示した (Fig. 2-20)。次にこれら薬剤が EML4-ALK を

直接的に阻害しているのか確認するため、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、これら薬剤の濃度依存的に ALK 自身のリン酸化やその下流因子である AKT、S6 タンパク質のリン酸化レベルが抑制されていた (Fig. 2-21)。しかしながら、現在日常診療で用いられている BCR-ABL 阻害薬である Imatinib、Dasatinib、Ponatinib に対して、*BCR-ABL* 陽性 K562 細胞が感受性を示す濃度領域でも G1202R + L1196M 重複変異体#50 は感受性を示さなかった (Fig. 2-22、Fig. 2-23、Fig. 2-24)。

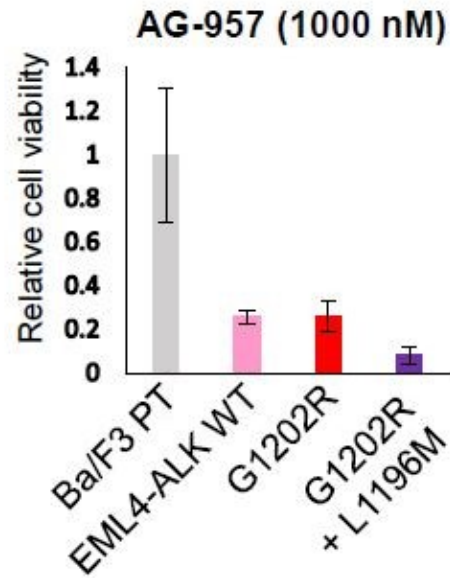


Fig.2-17 AG-957 に対する G1202R + L1196M 重複変異体の感受性の確認

A. AG-957 1000 nM 72 時間処理条件下での Ba/F3 親株細胞をコントロールとしたときの Ba/F3-EML4-ALK-WT、Ba/F3-EML4-ALK-G1202R、Ba/F3-EML4-ALK-G1202R + L1196M 重複変異体の細胞生存率を算出した。

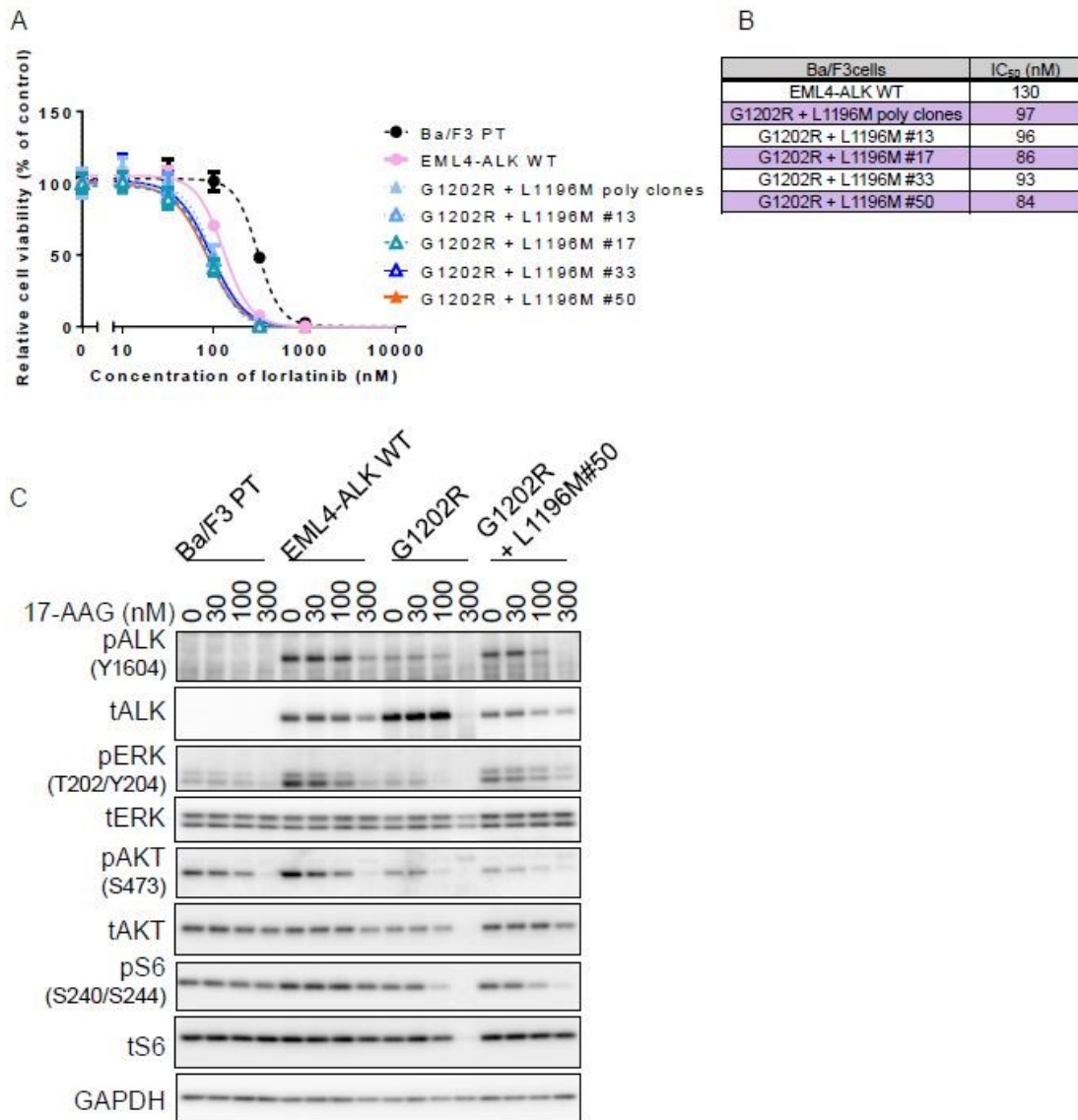


Fig. 2-18 Ba/F3-EML4-ALK-G1202R + L1196M 細胞のクローンの選択

A. 選別した各クローン細胞の 17-AAG への生存曲線を示した。各クローン細胞を各濃度の 17-AAG で 72 時間処理後、細胞生存アッセイを行った。結果は、平均 ± SD 値で表示した。

B. A の細胞生存曲線から算出した IC₅₀ 値。

C. EML4-ALK-G1202R + L1196M 重複変異体#50 の 17-AAG 存在下での ALK の発現量と ALK の自己リン酸化量及び ALK の下流シグナルの挙動を確認した。

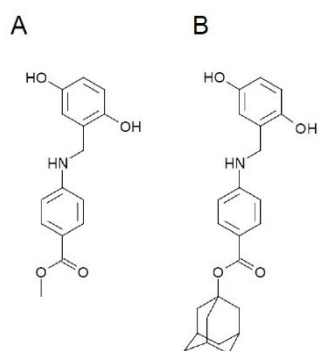


Fig. 2-19 BCR-ABL 阻害剤 AG-957 及び Adaphostin の構造

A. AG-957 の構造。

B. Adaphostin の構造。

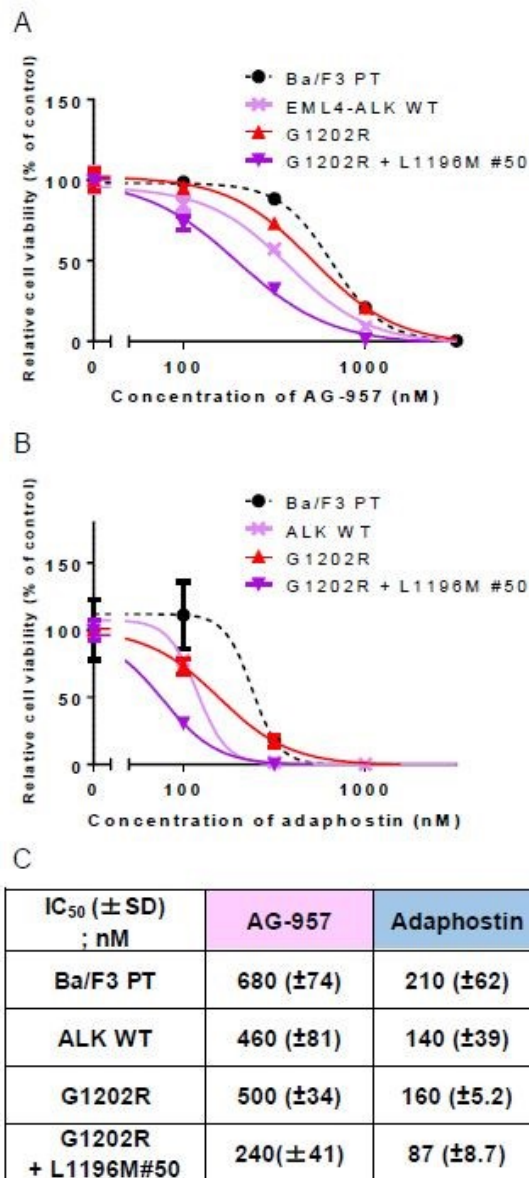


Fig. 2-20 Ba/F3-EML4-ALK-G1202R + L1196M 重複変異体#50 の AG-957 及び Adaphostin への感受性の確認

A. 各 Ba/F3 細胞の AG-957 への生存曲線を示した。各濃度の AG-957 で 72 時間処理後、細胞生存アッセイを行った。結果は、平均 ± SD 値で表示した。

B. 各 Ba/F3 細胞の Adaphostin への生存曲線を示した。各濃度の Adaphostin で 72 時間処理後、細胞生存アッセイを行った。結果は、平均 ± SD 値で表示した。

C. 3 回分の細胞生存アッセイから算出した IC₅₀ 値。結果は、平均 ± SD で表示した。

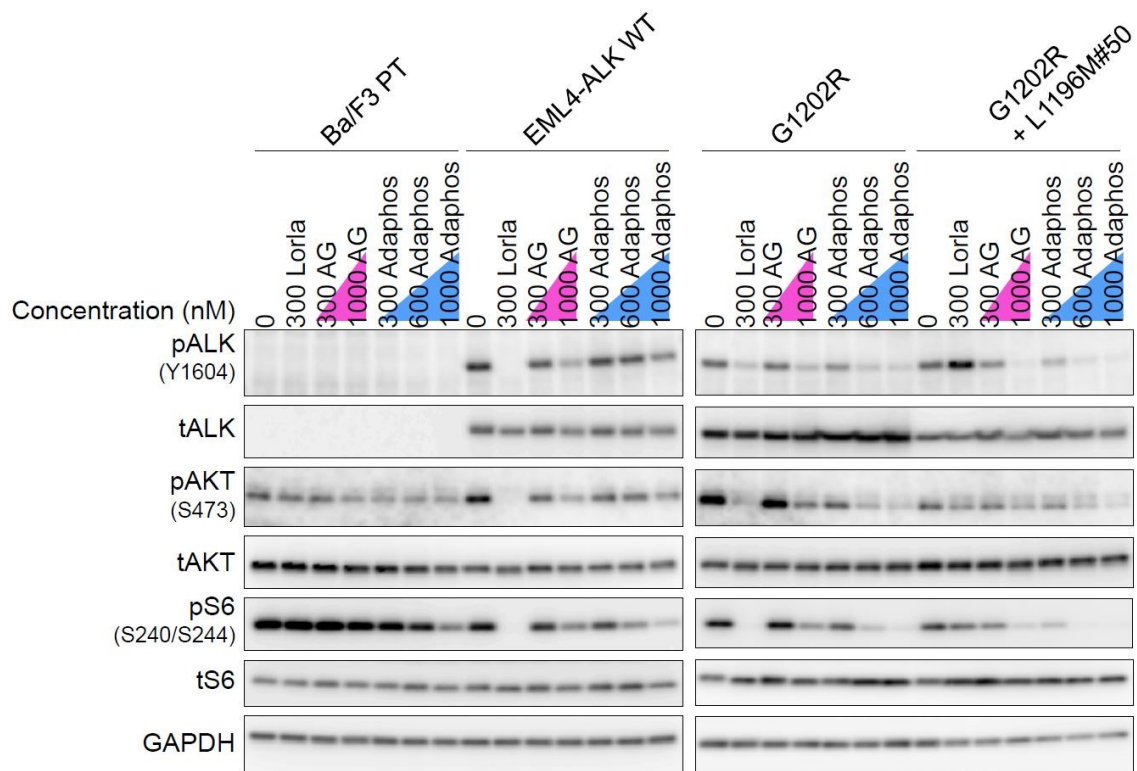
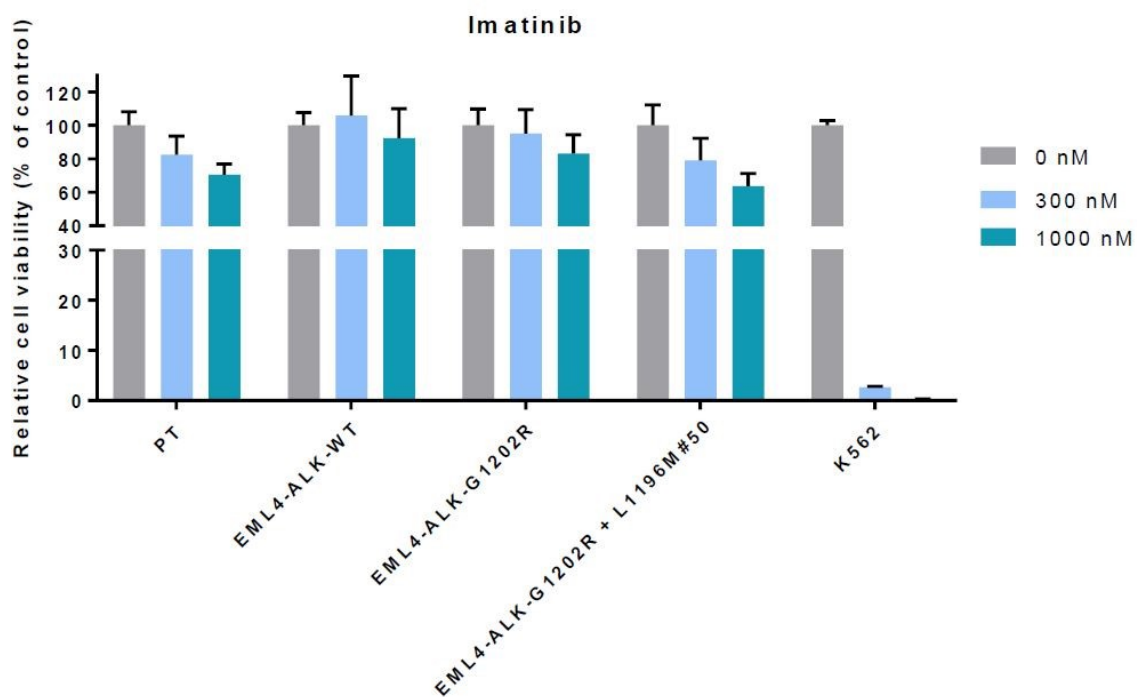


Fig. 2-21 Ba/F3-EML4-ALK-G1202R + L1196M 重複変異体#50 の AG-957 及び Adaphostin 処理下における ALK シグナルの挙動

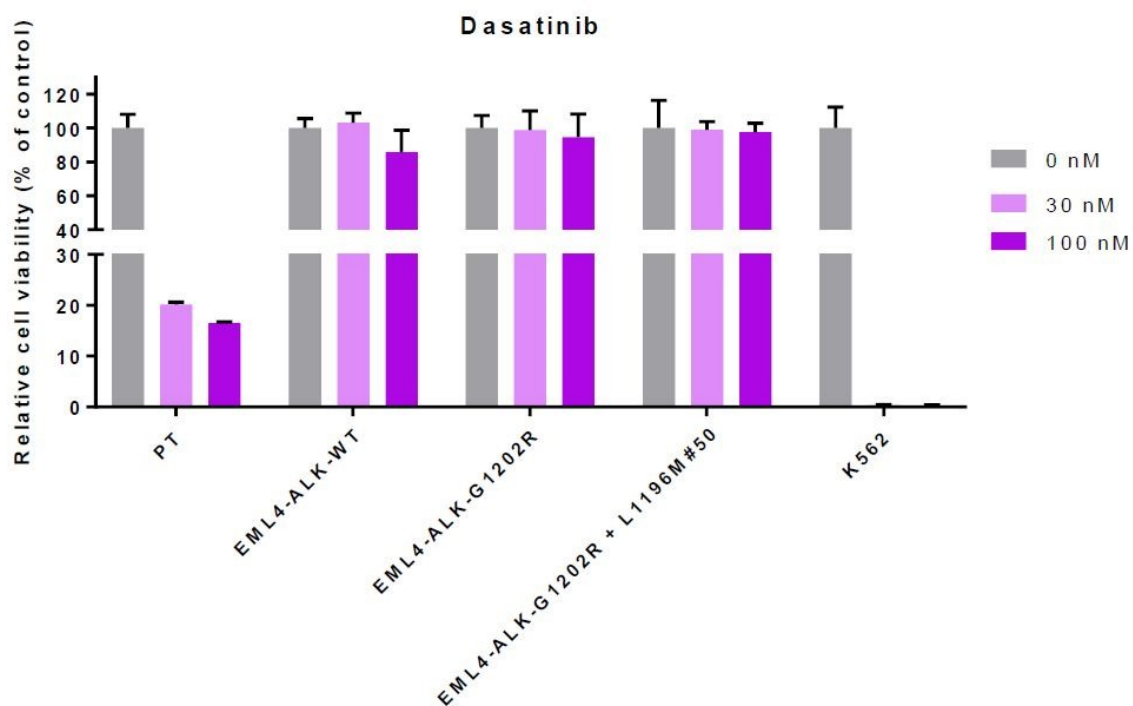
ウェスタンブロッティング解析による各種 Ba/F3 細胞における AG957 や Adaphostin 処理下での ALK の発現量、ALK 自己リン酸化量及び ALK 下流シグナルのリン酸化の確認。各濃度の AG-957 または Adaphostin を 3 時間処理後、タンパク質を抽出し、図のタンパク質を検出した。



Ba/F3 cells

Fig. 2-22 G1202R + L1196M 重複変異体#50 に対する BCR-ABL 阻害薬への感受性の確認

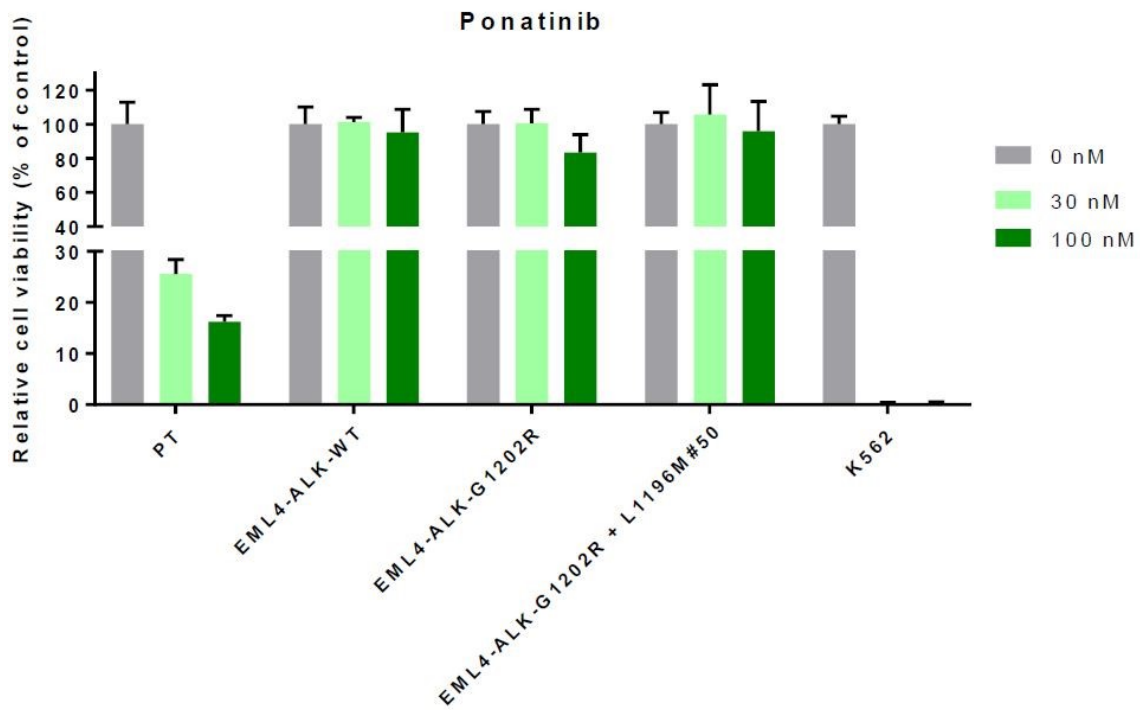
Imatinib 300 nM もしくは 1000 nM 72 時間処理における薬剤未処理の条件をコントロールとしたときの各 Ba/F3 細胞もしくは *BCR-ABL* 陽性 K562 細胞の比較細胞生存率を算出した。



Ba/F3 cells

Fig. 2-23 G1202R + L1196M 重複変異体#50 に対する BCR-ABL 阻害薬への感受性の確認

Dasatinib 30 nM もしくは 100 nM 72 時間処理における薬剤未処理の条件をコントロールとしたときの各 Ba/F3 細胞もしくは K562 細胞の比較細胞生存率を算出した。



Ba/F3 cells

Fig. 2-24 G1202R + L1196M 重複変異体#50 に対する BCR-ABL 阻害薬への感受性の確認

Ponatinib 30 nM もしくは 100 nM 72 時間処理における薬剤未処理の条件をコントロールとしたときの各 Ba/F3 細胞もしくは *BCR-ABL* 陽性 K562 細胞の比較細胞生存率を算出した。

第四節 まとめと考察

ENU mutagenesis screening で出現した Lorlatinib 耐性細胞や EML4-ALK 重複変異体を再構成した細胞を用いて、各種 ALK 阻害薬に対する薬剤感受性を検討した。その結果、G1202R + L1198F、I1171N + L1198F 重複変異体ともに各々の単独変異体と比較して第一世代 ALK 阻害薬である Crizotinib に感受性化した。臨床においても Lorlatinib 耐性変異として出現した EML4-ALK-C1156Y + L1198F 重複変異を有する腫瘍が Crizotinib 再投与により、縮小する現象が見出されており、この重複変異体は細胞株レベルでも Crizotinib に対して感受性を示すことが分かっている。つまり、L1198F 重複変異体は Crizotinib に感受性を示す可能性が高いことが本研究やこれまでの研究を統合的に考えることで分かってきた。近年、他の研究グループから MD シミュレーションを用いた *in silico* 解析により、G1202R + L1198F 重複変異体の Crizotinib 感受性化の原因が明らかにされている。G1202 はキナーゼドメイン内の Crizotinib 結合部位の入り口に位置しており、この部分がアルギニンへと変異することで、入り口を塞ぐような構造となり、Crizotinib と ALK キナーゼドメインとの結合親和性が減弱する。しかしながら、そこに L1198F 変異が同時に生じることで、間接的に入り口の立体構造が open なコンフォメーションへと変化すると同時に、F1198、K1150、さらには R1202 と π 電子を介した電気的な相互作用を形成することでアフィニティーが上昇し、感受性化へ繋がるのが明らかとなっている⁶⁷。L1198F 単独変異体でも F1198 と Crizotinib との π 電子対による相互作用が形成されることから、未だに I1171N + L1198F 重複変異体の Crizotinib 感受性化は *in silico* 解析されてはいないが、L1198F 単独変異体や G1202R + L1198F 重複変異体と同様の現象が起きている可能性が考えられる。

Lorlatinib は第 1、第 2 世代 ALK 阻害薬に対する耐性変異体への克服薬として開発された経緯がある。今回、初めてこの薬剤に対して耐性を示す単独変異体を発見した (L1256F 単独変異体)。L1256 残基は ALK キナーゼドメインの立体構造維持に重要な C-spine を構成するアミノ酸のひとつであるとともに、薬剤結合部位近傍に位置しているため、しばしば ALK 阻害薬との結合に重要であることが示唆されている^{68,69}。Ba/F3 細胞だけでなく H3122 細胞を用いた検討からも、実際に Lorlatinib 耐性を示し得る可能性が示唆された。さらに他の研究グループからも細胞株レベルの検討ではあるが、L1256F 重複変異体が Lorlatinib 耐性変異として見出されていることからその可能性は高いと思われる。しかしながら、L1256F 単独変異体、重複変異体共に第 2 世代 ALK 阻害薬 Alectinib に高い感受性を示したことから今後の臨床において、Alectinib-Lorlatinib 逐次治療後に再度 Alectinib 治療が有効となる場合があると考えられる。

G1202R + G1269A 重複変異体や I1171N + G1269A 重複変異体は Lorlatinib に対して耐性を示す一方で、G1202R + G1269A 重複変異体には Brigatinib が、I1171N + G1269A 重複変異体に対しては Ceritinib や Brigatinib が有効性を示した。G1269A 単独変異体は Crizotinib のフルオロベンゼン基と立体障害を生じることで、耐性化することが知られている。Lorlatinib は Crizotinib の基本骨格を環状にした化合物であり、Crizotinib 同様フルオロベンゼン基を有している。そのため、G1202R + G1269 重複変異体や I1171N + G1269A 重複変異体ではフルオロベンゼン基と立体障害を生じることで耐性化していると予測できる。しかしながら、Ceritinib や Brigatinib はフルオロベンゼン基を有していないため、これら重複変異体と立体障害を生じないため、感受性化を付与することができると考えられる。

現状では、G1202R 単独変異体に対しては、Brigatinib が克服薬として考えられている一方で、実臨床においては Brigatinib 耐性後の一部の患者から G1202R 単独変異が検出されている⁷⁰。そのため、G1202R 変異体が Brigatinib に感受性を示すのか、耐性を示すのか現在議論が分かれている。そのため、本研究で G1202R 単独変異体とほぼ同じ Brigatinib 感受性を示した G1202R + G1269A 重複変異体も今後臨床において Brigatinib 耐性後の患者からも検出される可能性があり、この重複変異体に関しては、本研究では Brigatinib が最も克服薬として考えられる一方で今後もさらなる克服薬を探索していく必要がある。

I1171N+L1196M と G1202R+L1196M 重複変異体に関しては、前者は Ceritinib や Brigatinib に感受性を示す一方で、後者はあらゆる ALK 阻害薬に耐性を示した。L1196M 変異は ALK キナーゼドメイン内の薬剤結合部位の最深部に位置する。そのため、G1202R + L1196M 重複変異体のキナーゼドメインの薬剤結合部位は著しく狭くなっている可能性が高い。一方で、本研究からある種の BCR-ABL 阻害剤として開発された AG-957 や Adaphostin がこの重複変異体に有効性を示すことが分かった。AG-957 やその構造類縁体である Adaphostin は Tyrophostin 系の薬剤であることが分かっている。この Tyrophostin は 1989 年に初めて Gazit A.らにより開発され、チロシンキナーゼの基質タンパク質のチロシン残基近傍の構造と類似していることが明らかとなっている^{71,72}。Tyrophostin 系化合物である AG-957 や Adaphostin は BCR-ABL に対して ATP 競合的ではなく基質競合的にその機能を抑制することが明らかとなっている^{73,74}。そのため、これら薬剤は BCR-ABL のキナーゼドメインの ATP 結合部位ではなく、基質結合部位に結合すると考えられている。今回、ATP 競合型 BCR-ABL 阻害薬に対して G1202R + L1196M 重複変異体は感受性を示さなかったことから、AG-957 や Adaphostin は ALK キナーゼドメインの基質結合部位に結合している可能性が考えられる。本研究では、EML4-ALK-WT や G1202R 変異体を有する細胞と比較して、G1202R+L1196M

変異体にこれら薬剤が有効であった。これは、G1202R 変異体が L1196M 変異を新たに蓄積する過程で ATP 結合部位やその近傍の薬剤結合部位の立体構造を変化させるほかにも、基質結合部位の立体構造までも変化させていることを示唆しているのかもしれない。

第三章 Lorlatinib 初期耐性に関わる制御因子の探索

第一節 目的

これまでの研究により、様々な Alectinib-Lorlatinib 逐次治療耐性 EML4-ALK 重複変異体及び単独耐性変異体を同定し、それらに対する克服法の示唆を発見してきた。これら結果は患者生存期間をさらに延長するような治療戦略のヒントを提供してくれる一方で、依然として根治の難しさを表しているといえる。そこで、現在薬剤耐性化の根源であると考えられている DTP (Drug-Tolerant Persister)細胞に注目し、その性状解析を行うことで、DTP 細胞の分子標的薬抵抗性のメカニズムの解明を目的に研究を行った。なお、DTP 細胞は薬剤処理という選択圧によって大多数の細胞が死滅する中で一部生き残る「薬剤初期抵抗性」と薬剤未処理時では抵抗性が減弱する「可逆的な薬剤抵抗性」をもつ細胞集団として考えられている。一方で、完全な薬剤耐性化を示す細胞は変異により、不可逆的な薬剤抵抗性を示す細胞集団として定義されている。

第二節 材料と方法

細胞培養

いずれの細胞も 37°C、CO₂ 5% 条件下で培養した。

- *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性患者臨床検体由来細胞株 JFCR-028-3 細胞

RPMI-1640 培地 (Roswell Park Memorial Institute medium、和光純薬工業) と Hams F-12 培地 (L-グルタミン含有、ナカライテスク) を 250 ml ずつ等量混和し、終濃度 15% となるように FBS (Fetal bovine serum) と 1 mol/l-HEPES Buffer Solution 10 ml、1×Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution (ナカライテスク) を含有した培地 (以下 RP/F-12) を用いた。

- *TPM3-NTRK1* 融合遺伝子陽性大腸がん由来細胞株 KM12

D-MEM low glucose (Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose、富士フイルム和光純薬) に終濃度 10% となるように FBS (Fetal bovine serum) を含有した培地 (以下 D-10 low) を用いた。

使用した薬剤

- Lorlatinib (PF-06463922、Shanghai Biochempartner)
- Entrectinib (RXDX-101、Adooq Bioscience)
- LY2090314 (Adooq Bioscience)
- TWS-119 (GSK-3 β Inhibitor VII、Santa Cruz Biotechnology)
- Ponatinib (AP24534、selleck)
- Dasatinib (Selleck)
- BGJ-398 (Shanghai Biochempartner)

薬剤ライブラリーは所属研究室で構築された薬剤ライブラリーを用いた。以下、薬剤ライブラリーに含まれる薬剤を記す。

-所属研究室で構築された薬剤ライブラリー-

Well	Compound	溶媒	購入先
12-A	Ganetespib	DMSO	Adooq Bioscience
12-B	Dabrafenib	DMSO	Adooq Bioscience
12-C	BEZ235	DMSO	Adooq Bioscience
12-D	RO5126766	DMSO	Adooq Bioscience
12-E	Cobimetinib	DMSO	Adooq Bioscience
12-F	Trametinib	DMSO	Adooq Bioscience

12-G	SCH772984	DMSO	Adooq Bioscience
12-H	BVD-523	DMSO	Adooq Bioscience
11-A	GDC0068	DMSO	Adooq Bioscience
11-B	ABT263	DMSO	Adooq Bioscience
11-C	Obatoclax	DMSO	Adooq Bioscience
11-D	ABT199	DMSO	Adooq Bioscience
11-E	Decitabine	DMSO	Adooq Bioscience
11-F	Azacitidine	DMSO	Adooq Bioscience
11-G	Vorinostat	DMSO	Adooq Bioscience
11-H	Panobinostat	DMSO	Adooq Bioscience
10-A	Quisinostat	DMSO	ShangHai Biochempartner
10-B	Tazemetostat	DMSO	Adooq Bioscience
10-C	(+)-JQ-1	DMSO	ShangHai Biochempartner
10-D	Sotrastaurin	DMSO	Adooq Bioscience
10-E	Nutlin-3	DMSO	Adooq Bioscience
10-F	RO5045337	DMSO	Adooq Bioscience
10-G	Ruxolitinib	DMSO	Adooq Bioscience
10-H	Tofacitinib	DMSO	Adooq Bioscience
9-A	Palbociclib	water	Adooq Bioscience
9-B	Ribociclib	DMSO	Adooq Bioscience
9-C	Alisertib	DMSO	Adooq Bioscience
9-D	Tozasertib	DMSO	Adooq Bioscience
9-E	RO4929097	DMSO	Adooq Bioscience
9-F	LY411575	DMSO	Adooq Bioscience
9-G	LY2090314	DMSO	Adooq Bioscience
9-H	Tideglusib	DMSO	Adooq Bioscience
8-A	Olaparib	DMSO	ShangHai Biochempartner
8-B	Ibrutinib	DMSO	Adooq Bioscience
8-C	Erismodegib	DMSO	ShangHai Biochempartner
8-D	Vismodegib	DMSO	Adooq Bioscience
8-E	Bortezomib	DMSO	Adooq Bioscience
8-F	Carfilzomib	DMSO	Adooq Bioscience
8-G	Niclosamide	DMSO	ShangHai Biochempartner
8-H	OSI906	DMSO	Adooq Bioscience
7-A	5-FU	DMSO	Adooq Bioscience

7-B	SN-38	DMSO	Adooq Bioscience
7-C	SHP099	DMSO	ShangHai Biochempartner
7-D	Regorafenib	DMSO	Adooq Bioscience
7-E	G007-LK	DMSO	ShangHai Biochempartner
7-F	LY2409881	DMSO	Adooq Bioscience
7-G	Entrectinib	DMSO	Adooq Bioscience
7-H	Dovitinib	DMSO	Adooq Bioscience
6-A	MGCD-265	DMSO	Adooq Bioscience
6-B	Galunisertib	DMSO	Adooq Bioscience
6-C	Linifanib	DMSO	Adooq Bioscience
6-D	AZD3463	DMSO	BioVision
6-E	AZD5363	DMSO	Adooq Bioscience
6-F	AUY922	DMSO	ShangHai Biochempartner
6-G	R428	DMSO	ShangHai Biochempartner
6-H	RXDX105	DMSO	ShangHai Biochempartner
5-A	Crizotinib	DMSO	ShangHai Biochempartner
5-B	Ceritinib	DMSO	ActiveBiochem
5-C	Alectinib	DMSO	ActiveBiochem
5-D	TAE684	DMSO	ChemieTek
5-E	AP26113	EtOH	ShangHai Biochempartner
5-F	Lorlatinib	DMSO	ActiveBiochem
5-G	ASP3026	DMSO	ChemieTek
5-H	XL184	DMSO	ActiveBiochem
4-A	Vandetanib	DMSO	ShangHai Biochempartner
4-B	E7080	DMSO	Selleck
4-C	CEP701	DMSO	Calbiochem
4-D	Foretinib	DMSO	Adooq Bioscience
4-E	Afatinib	DMSO	ChemieTek
4-F	Erlotinib	DMSO	LC laboratories
4-G	Gefitinib	DMSO	LC laboratories
4-H	Lapatinib	DMSO	LC laboratories
3-A	Osimertinib	DMSO	Selleck
3-B	PHA665752	DMSO	Tocris Bioscience
3-C	AEW541	DMSO	ActiveBiochem
3-D	Sorafenib	DMSO	Selleck

3-E	Sunitinib	DMSO	Selleck
3-F	BIBF1120	DMSO	Selleck
3-G	CH5183284	DMSO	ActiveBiochem
3-H	BGJ398	DMSO	ShangHai Biochempartner
2-A	Ponatinib	DMSO	Selleck
2-B	Imatinib	DMSO	LC laboratories
2-C	17-AAG	DMSO	LC laboratories
2-D	GDC0941	DMSO	LC laboratories
2-E	Rapamycin	DMSO	AG Scientific
2-F	Everolimus	DMSO	Chem Scene
2-G	PP242	DMSO	Adooq Bioscience
2-H	SB218078	DMSO	Tocris Bioscience
1-A	Dasatinib	DMSO	Selleck
1-B	FH-535	DMSO	Adooq Bioscience
1-C	Tipifarnib	DMSO	Adooq Bioscience
1-D	L-OHP	DMSO	wako
1-E	DMSO		
1-F	DMSO		

in vitro における薬剤耐性細胞の樹立

KM12 細胞は Entrectinib 300 nM~600 nM 存在下で約 2 か月間培養し、生き残った細胞のコロニーを顕微鏡で確認しながら直接 p200 チップを使ってコロニーを物理的にディッシュの底から剥がした。その後剥がしたコロニーを吸い取り、12 ウェルマルチプレートに移した。ウェル中の細胞が増殖するまで 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。その後、NTRK1 のキナーゼドメインの塩基配列をサンガー法で解析した (以降 KM12-ER (Entrectinib resistant) 細胞と表記する)。

JFCR-028-3 細胞は Lorlatinib 300 nM~1000 nM もしくは 1000 nM~3000 nM 存在下で約 2 ヶ月培養し、生き残ったバルクの状態の細胞集団を各種解析に供した (以降 JFCR-028-3LR (Lorlatinib resistant)細胞と表記する)。

細胞生存アッセイ

第1章と同様のため、省略する。

薬剤スクリーニング

薬剤ライブラリーを実施する前日に JFCR-028-3 細胞、JFCR-028-3 LR 細胞を 2000 細胞 /99 μ l/well (96 ウェルブラックプレート)分注し、18~24 時間、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。翌日、Lorlatinib 200 nM を含有した培地もしくは DMSO を含有した培地を 100 μ l ずつ分注した。その後、20 μ M に希釈した所属研究室で構築された阻害剤ライブラリーを 1 μ l ずつ 96 ウェルプレートの各ウェルに分注した後 37°C、5%CO₂ 条件下で 72 時間培養した。72 時間後 Tristar LB 941 Multimode Microplate Reader (BERTHOLD TECHNOLOGIES)を用いて各ウェルの発光量を測定し、DMSO のみを処理したウェルをコントロールとして、各薬剤条件における相対的な細胞生存率を算出した。なお Lorlatinib の終濃度、阻害剤ライブラリーに含まれる各薬剤の終濃度ともに 100 nM となっている。

Western Blotting

第1章と同様のため、省略する。

次ページに使用した一次抗体、二次抗体、ブロッキング溶液を記す。

-使用した一次抗体、二次抗体、ブロッキング溶液-

CST は Cell Signaling Technology、Milli は Millipore を表す。

1 次抗体	購入先	希釈倍率 (1 次抗体)	ブロッキング バッファー (1 次抗体)	2 次抗体	希釈倍率 (2 次抗体)	ブロッキング バッファー (2 次抗体)
pNTRK1 (Tyr674/Tyr675)	CST	1:1000	5% BSA	Rabbit	1:10000	5% BSA
NTRK1	CST	1:1000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
pALK (Tyr1604)	CST	1:1000	5% BSA	Rabbit	1:10000	5% BSA
ALK	CST	1:1000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
pERK (T202/Y204)	CST	1:2000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
ERK	CST	1:2000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
pAKT (S473)	CST	1:1000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
AKT	CST	1:1000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
pS6 (S240/244)	CST	1:3000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
S6	CST	1:2000	5% Skim milk	Rabbit	1:10000	5% Skim milk
GAPDH	Milli	1:5000	5% Skim milk	Mouse	1:10000	5% Skim milk

Phospho-RTK (Receptor tyrosine kinase)アレイ

Proteome Profiler Human Phospho Antibody Array Kit (R&D Systems)を使用した。

今回は 10 cm Dish に対する各 Buffer の容量を記載する。

まず細胞を冷やした D-PBS 5ml で 2 回 wash した。その後、キットに付属している Lysis Buffer 17 ml (Lysis Buffer 17 10ml に対して cOmplete Mini、EDTA-free、(Roche)1 錠と PhosSTOP (Roche) 1 錠を事前に加えておく)を添加した。セルスクレーパーを用いて細胞を集め、チューブに回収した。次に on ice で 30 分間静置し、14000 g、4°C、5 分間遠心した。上清のみを新しいチューブへ回収した。なおこの時点で-80°Cに回収したライセートサンプルを保存することができる。次に、Kit に付属している 4 ウェルマルチディッシュへ Array Buffer 1 2ml を加え、そこに Array 用のメンブレンを浸し、室温で 1 時間浸振とうし、平衡化した。平衡化の間にウェスタンブロッティングの項と同様の手法で回収したライセートサンプルのタンパク質定量を行い、300 µg、前容量を Lysis Buffer 17 を加えることで

1.5 ml に調整した。平衡化後、アスピレーターで 4 ウェルマルチディッシュの Array Buffer1 を除き、300 μ g/1.5 ml に調整したライセートサンプルを直接各ウェルに添加し、4°C で 18-24 時間ゆっくり振とうした。翌日、実験前に 25×Wash Buffer 20 ml を water 480 ml と 5×Array Buffer2 2 ml を water 8 ml にそれぞれ加えておいた。Wash Buffer 20 ml を 10 cm dish へ添加して、そこに先述のメンブレンを浸した。その後、Wash Buffer 10 ml で 3 回 wash した。次に、ろ紙の上にメンブレンを置いて水気を取った。4 ウェルマルチディッシュに Anti-Phospho-Tyrosine-HRP Detection Antibody (1×Array Buffer2 10 ml に Antibody 2 μ l 加えた) を添加した。そこにメンブレンを浸し、室温で 120 分間振とうした。先程と同じ 10 cm dish に Wash Buffer 20 ml 加え、さらにメンブレンを置き室温、10 分間で 3 回 Wash した。その後、メンブレンをろ紙に置いて水気を取った。最後に Chemi Reagent1 と Chemi Reagent2 を同容量混和した。混和した Chemi Reagent Mixture をメンブレンに滴下し、室温で 1 分間静置し、ウェスタンブロッティングと同様に化学発光シグナルを測定した。

第三節 結果

・Lorlatinib 初期耐性細胞の樹立

ALK 融合遺伝子遺伝子と同様に恒常的なチロシンキナーゼ活性を有する融合タンパク質をコードする *TPM3-NTRK1* 融合遺伝子陽性大腸がん細胞株 KM12 に対し、NTRK 阻害薬の 1 つである Entrectinib を *in vitro* において高濃度で処理したところ、約 2 か月かけて初期薬剤処理時から生き残り続ける細胞株を樹立した (KM12 ER 細胞)。この KM12 ER 細胞の NTRK1 キナーゼドメインを解析したところ、EML4-ALK-G1202R 変異と相同的な TPM3-NTRK1-G595R 変異が蓄積し、Entrectinib に対し耐性を示した (Fig. 3-1)。実際に私自身でも Entrectinib に初期耐性を示した細胞から獲得耐性変異体が出現し得る可能性を確認したことから⁷⁵、*ALK* 融合遺伝子陽性肺がんにおいても DTP 細胞が出現するのではないかと考えた。がん研究会がん研有明病院の倫理審査委員会において承認されたプロトコールに基づいて同意が得られた患者から頂いた臨床検体より樹立された JFCR-028-3 細胞株に対して *in vitro* において Lorlatinib 存在下で培養し初期から Lorlatinib に対し抵抗性を示す細胞集団を樹立した (Fig. 3-2)。これら細胞を JFCR-028-3 LR 細胞と名付け、以降の解析に用いることにした (名の由来については Fig. 3-2 を参照)。次にこれら JFCR-028-3 LR 細胞の各 ALK 阻害薬に対する感受性を検討したところ、全ての薬剤に対し、JFCR-028-3 細胞と比較して高度耐性を示した。また、この LR 細胞の特徴として Lorlatinib 非存在下で培養を続けると Lorlatinib に対する耐性が減弱することから DTP 様の性質を示す細胞の特徴の一つである可逆的な薬剤抵抗性も有しており、この JFCR-028-3 LR 細胞は DTP 様の性質を有している可能性を考えた (Fig.3-3)。なお、全長の *EML4-ALK* 融合遺伝子の塩基配列をサンガーシーケンス解析したところ、変異は確認されなかった。

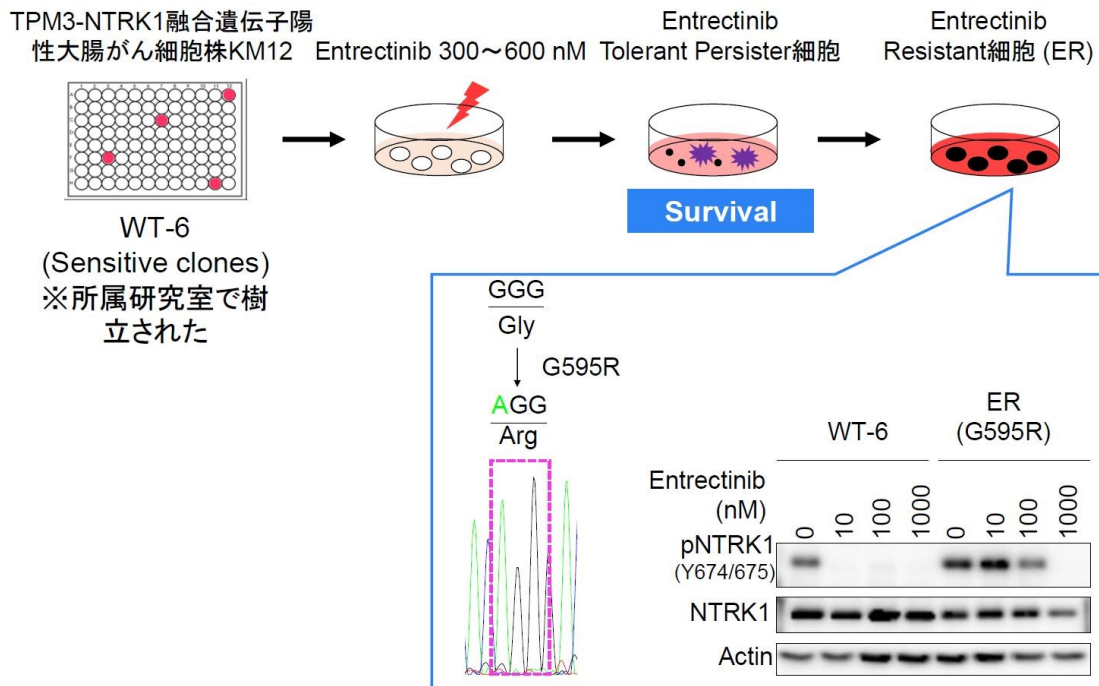


Fig. 3-1 大腸がん細胞株 KM12 由来 DTP 様細胞の樹立

KM12細胞由来DTP様細胞の樹立と Entrectinib 耐性 (ER) 細胞の樹立の流れを示した。Entrectinib 300 nM 処理下で約 1 ヶ月培養し、その後 Entrectinib 600 nM 処理下で約 1 ヶ月培養し ER 細胞を樹立した。

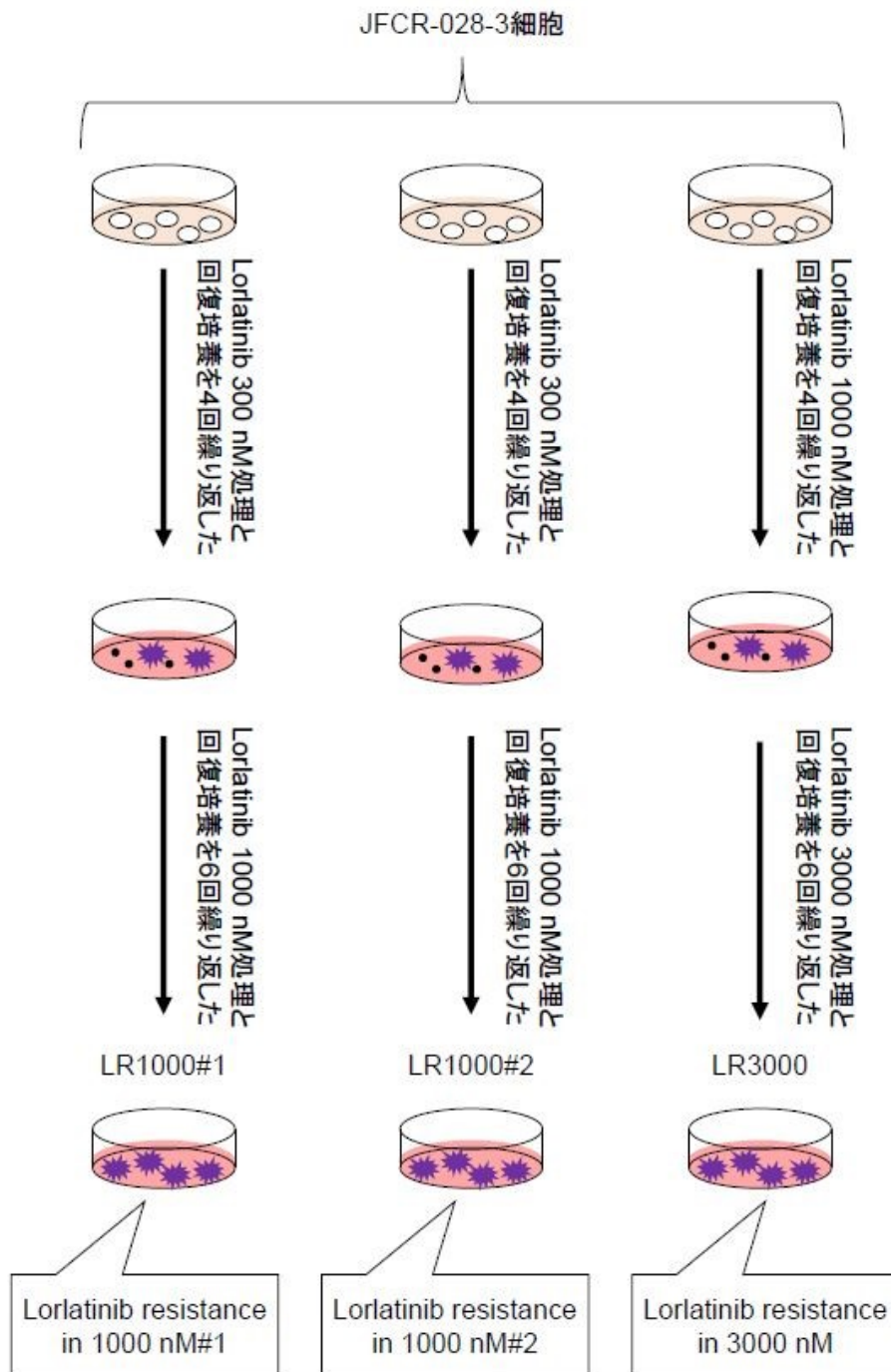


Fig. 3-2 JFCR-028-3LR (Lorlatinib-resistant)細胞の樹立

*in vitro*におけるJFCR-028-3LR細胞の樹立の流れを示した。1週間Lorlatinib 300 nMもしくは1000 nM処理下で培養し、その後、1週間Lorlatinib無添加の培地で回復培養する工程を4回行った。その後、Lorlatinib 1000 nMもしくは3000 nM存在下で1週間培養し、その後、1週間回復培養する工程を6回繰り返し、LR細胞を樹立した。

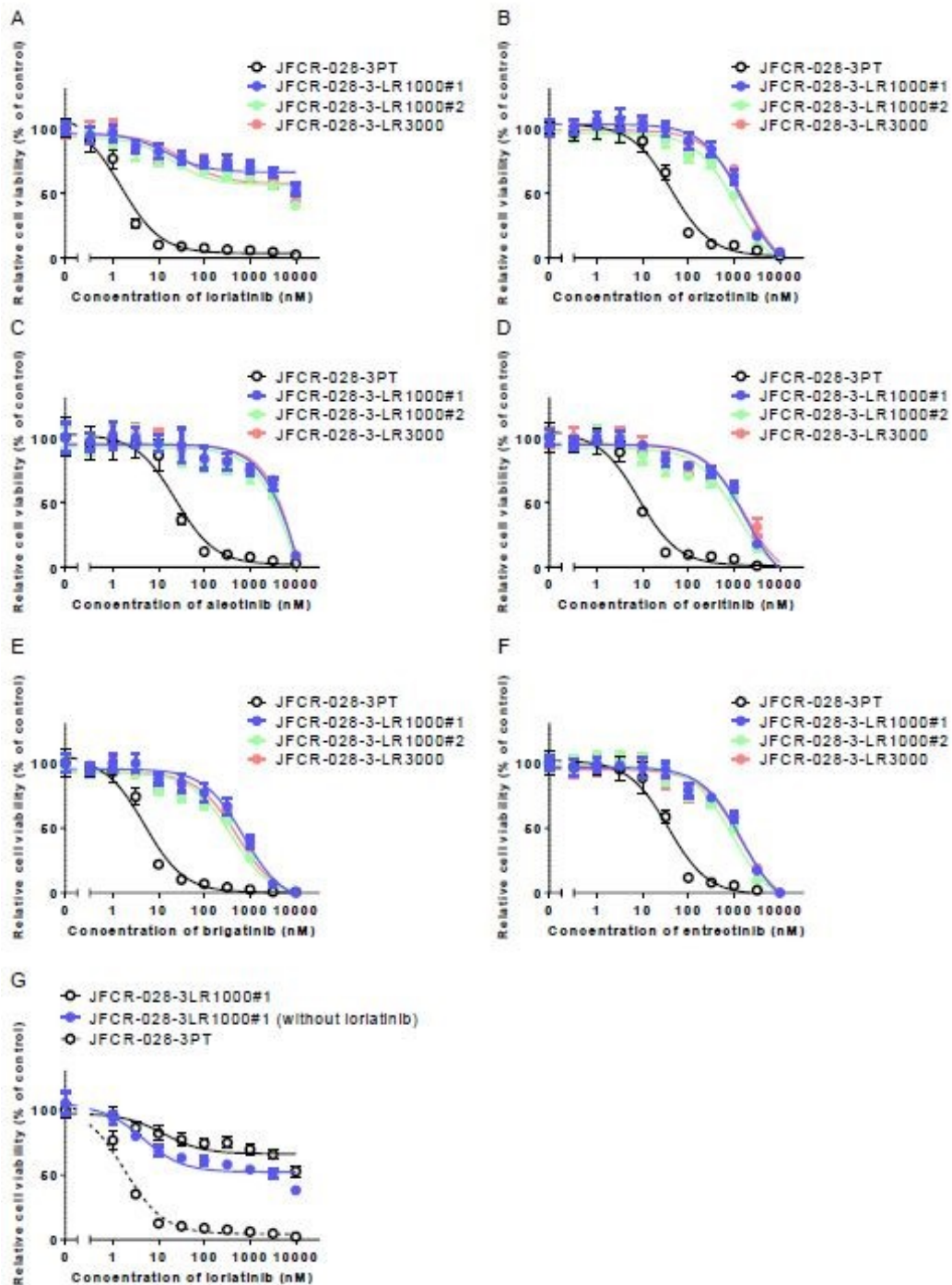


Fig. 3-3 ALK 阻害薬に対する各 JFCR-028-3LR 細胞の感受性の確認

各 JFCR-028-3 細胞の ALK 阻害薬 (A. Lorlatinib、B. Crizotinib、C. Alectinib、D. Ceritinib、E. Brigatinib、F. Entrectinib)に対する薬剤感受性の違いと JFCR-028-3LR1000#1 細胞の Lorlatinib 非存在下での培養後の Lorlatinib に対する薬剤感受性 (G)を示した。各細胞を各濃度の ALK 阻害薬で 72 時間処理後、細胞生存アッセイを行った。結果は、平均 ± SD 値で表示した。

・ JFCR-028-3 LR 細胞の Lorlatinib 抵抗性に関わる細胞内経路の探索

まず、Lorlatinib 存在下における JFCR-028-3 LR 細胞の ALK 自身やその下流因子のリン酸化レベルをウェスタンブロットにより解析したところ、Lorlatinib 存在下では ALK のリン酸化レベルが減弱している一方で、ALK 下流因子である ERK や AKT のリン酸化レベルは減弱するものの JFCR-028-3 細胞と比較して、維持されていた (Fig. 3-4)。そのため、Lorlatinib 初期耐性に関わる ALK 以外の活性化因子の関与を考え、所属研究室で構築された約 90 種の薬剤を有するライブラリーを用いて Lorlatinib と併用効果を示す薬剤を探索した。その結果、GSK3 α/β キナーゼ阻害剤である LY2090314 とマルチチロシンキナーゼ阻害薬 Dasatinib が Lorlatinib との併用効果を示した (Fig. 3-5)。その後、GSK3 β 特異的阻害剤である TWS-119 も加えて詳細に細胞生存アッセイを実施したところ、阻害剤ライブラリーの結果と同様に LY2090314、TWS-119、Dasatinib と Lorlatinib との併用効果が見られた (Fig. 3-6 及び Fig. 3-7)。先述のとおり、Dasatinib は多数のチロシンキナーゼの活性を阻害するため、次に phospho-RTK (Receptor tyrosine kinase)アレイにより、Lorlatinib 存在下で ERK や AKT 経路を起動させているチロシンキナーゼを探索した。その結果、FGFR1 や RET 受容体が Lorlatinib 存在下で活性化している可能性が示唆された (Fig. 3-8)。次にこれら受容体の活性を抑制する阻害薬と Lorlatinib との併用効果を細胞生存アッセイにより確認したところ、Ponatinib 以外は併用効果を示さなかった (Fig. 3-9、Fig. 3-10)。

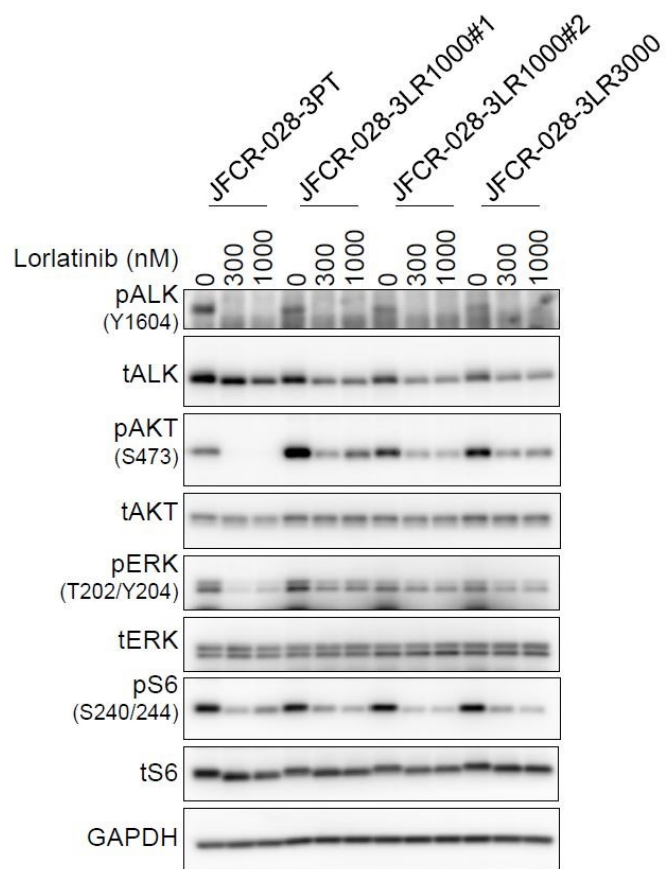


Fig. 3-4 JFCR-028-3LR 細胞の Lorlatinib 存在下における ALK シグナルの挙動

ウェスタンブロッティング解析による各種 JFCR-028-3 細胞における Lorlatinib 存在下での ALK の発現量、ALK の自己リン酸化量及び ALK の下流シグナルのリン酸化量を確認した。各濃度の Lorlatinib を 6 時間処理後、タンパク質を抽出し、図のタンパク質を検出した。

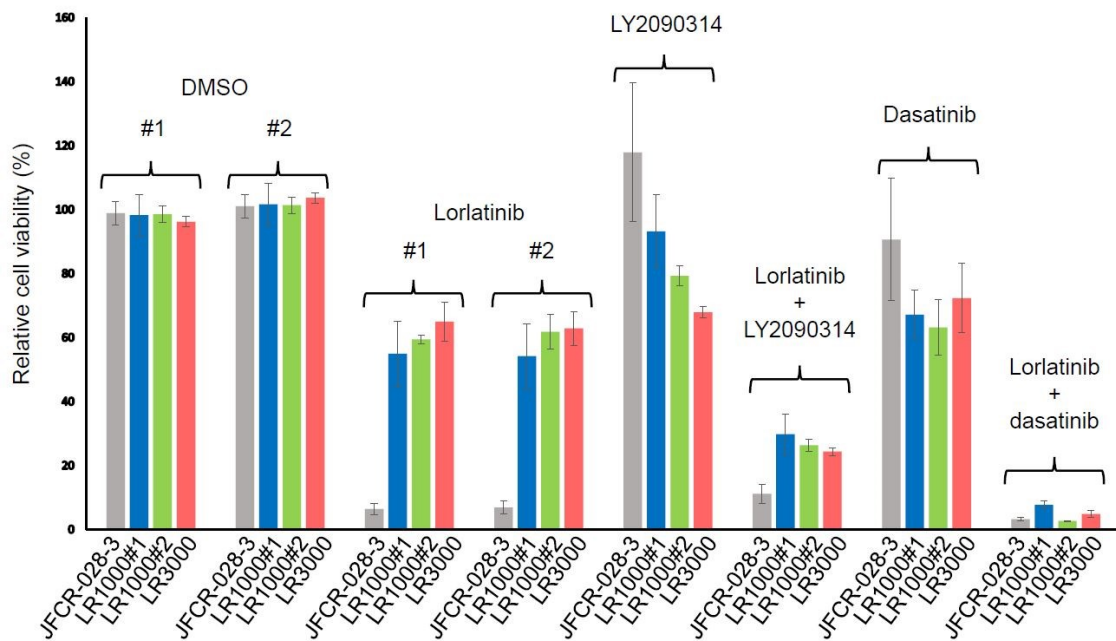


Fig. 3-5 JFCR-028-3LR 細胞に対して Lorlatinib との併用効果を示す薬剤の探索

Lorlatinib 100 nM 及び阻害剤ライブラリーに含まれる各薬剤 100 nM を単独もしくは併用条件で 72 時間処理後、各細胞に DMSO のみを処理した際の細胞生存率を 100%としたときの各条件下での生存率を比較した。結果は、3 回分の平均値 ± SD で示した。

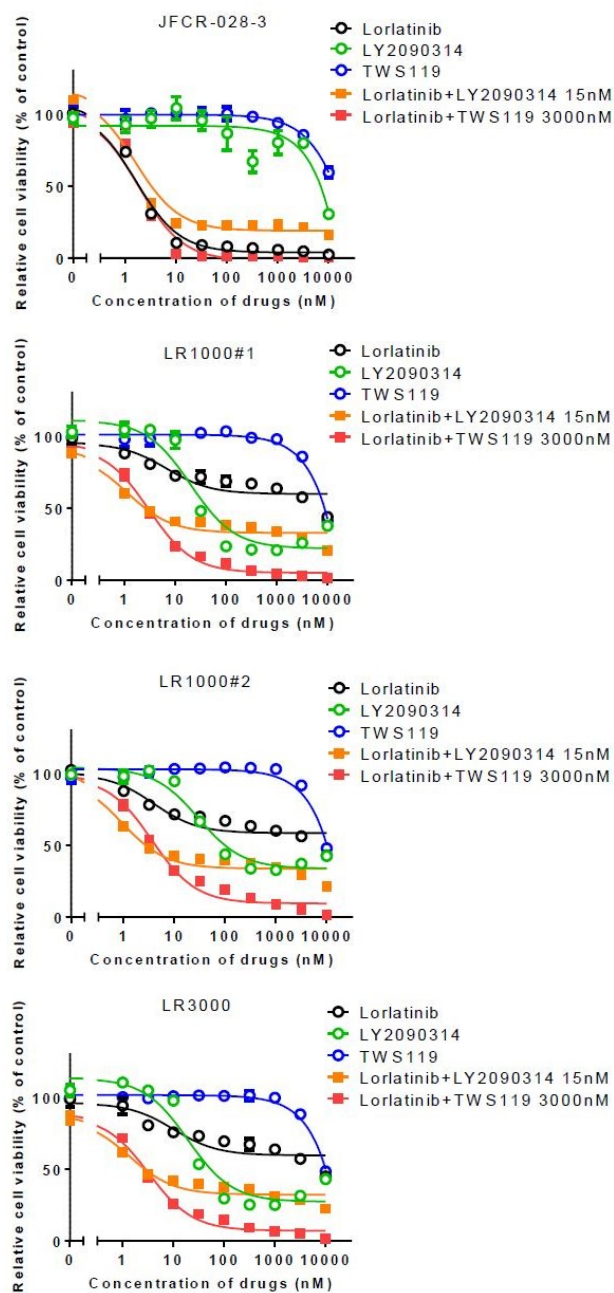


Fig. 3-6 Lorlatinib と GSK3 キナーゼ阻害薬の併用処理に対する各 JFCR-028-3LR 細胞の感受性の確認

各 JFCR-028-3 細胞の Lorlatinib 単剤処理、LY2090314 単剤処理、TWS119 単剤処理、Lorlatinib 及び LY2090314 15 nM の併用処理、Lorlatinib 及び TWS-119 3000 nM の併用処理への生存曲線を示した。

各濃度の阻害薬で 72 時間処理後、細胞生存アッセイを行った。結果は、平均 ± SD 値で表示した。

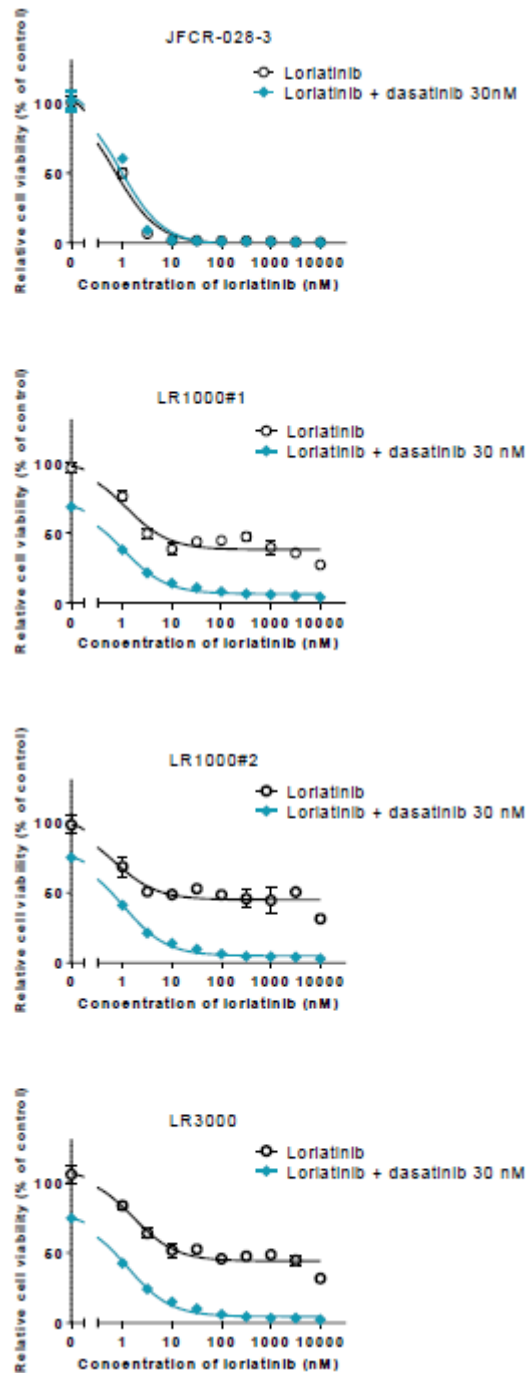


Fig. 3-7 Lorlatinib と Dasatinib の併用処理に対する各 JFCR-028-3LR 細胞の感受性の確認

各 JFCR-028-3 細胞の Lorlatinib 単剤処理または Lorlatinib 及び Dasatinib 30 nM の併用処理への生存曲線を示した。

各細胞を各濃度の阻害薬で 72 時間処理後、細胞生存アッセイを行った。結果は、平均 ± SD 値で表示した。

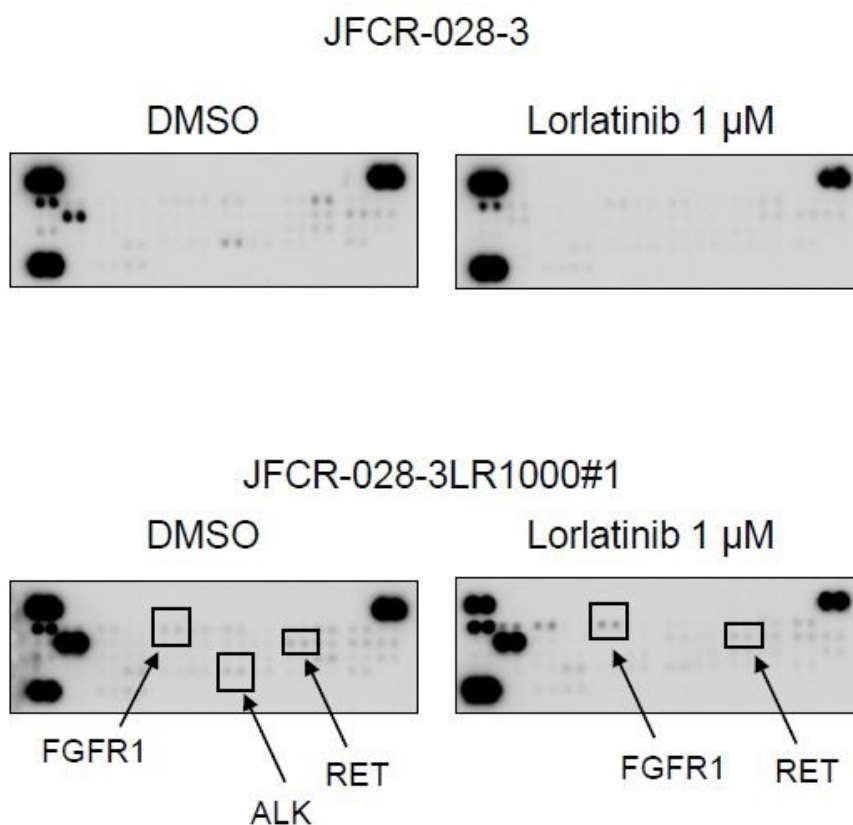


Fig. 3-8 JFCR-028-3 細胞及び JFCR-028-3LR#1 細胞における Lorlatinib 非存在下もしくは存在下における RTK (膜受容体型チロシンキナーゼ) のリン酸化の挙動の確認

JFCR-028-3 細胞 (上段) および JFCR-028-3LR#1 細胞 (下段) の Lorlatinib 未処理条件 (DMSO 処理) もしくは Lorlatinib 100 nM 処理条件下における膜受容体型チロシンキナーゼのリン酸化のプロファイルを示す。DMSO および Lorlatinib 100 nM を 24 時間処理後、phospho-RTK アレイを実施した。

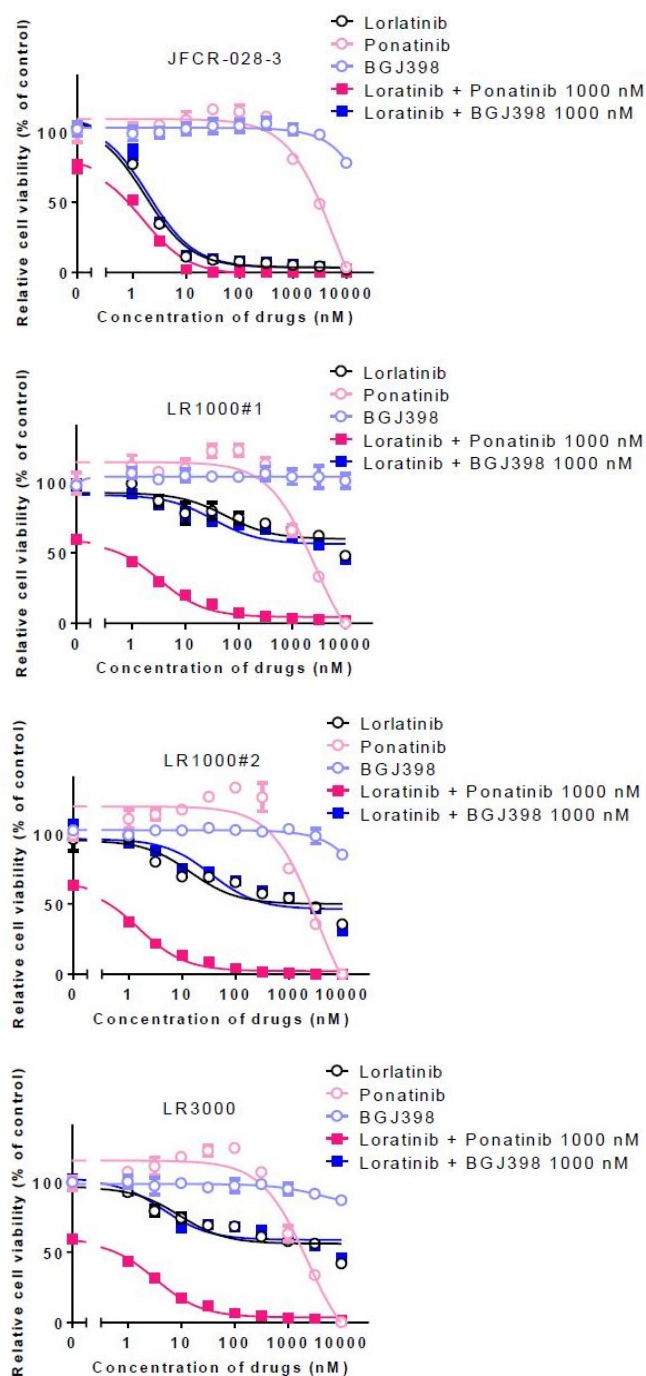


Fig. 3-9 Lorlatinib と FGFR 阻害薬 (Ponatinib、BGJ398)の併用処理に対する各 JFCR-028-3LR 細胞の感受性の確認

各 JFCR-028-3 細胞の Lorlatinib 単剤処理、Ponatinib 単剤処理、BGJ398 単剤処理、Lorlatinib 及び Ponatinib 1000 nM または Lorlatinib 及び BGJ398 1000 nM の併用処理への生存曲線を示した。

各濃度の阻害薬で 72 時間処理後、細胞生存アッセイを行った。

結果は、平均 ± SD 値で表示した。

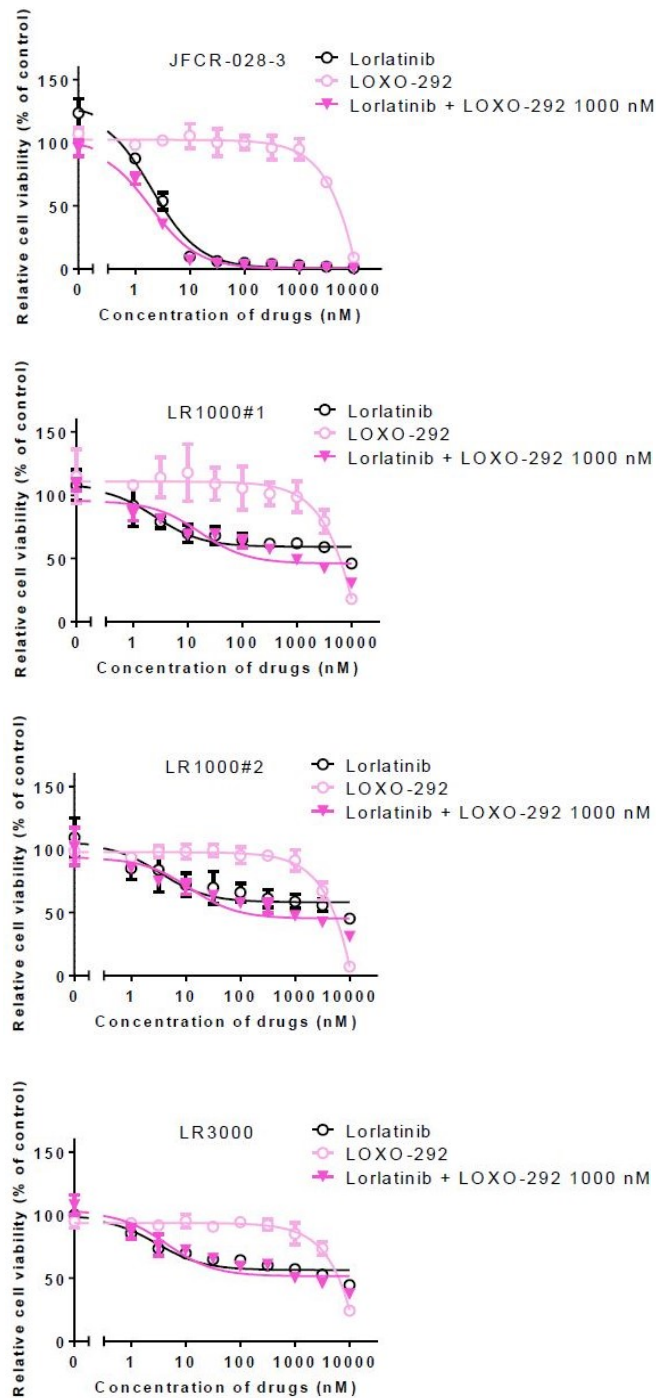


Fig. 3-10 Lorlatinib と RET 阻害薬 (LOXO-292)の併用処理に対する各 JFCR-028-3LR 細胞の感受性の確認

各 JFCR-028-3 細胞の Lorlatinib 単剤処理、LOXO-292 単剤処理または Lorlatinib 及び LOXO-292 1000 nM への生存曲線を示した。各細胞を各濃度の阻害薬で 72 時間処理後、細胞生存アッセイを行った。結果は、平均 ± SD 値で表示した。

第四節 まとめと考察

本研究では、薬剤耐性化機構の根源と考えられている DTP 細胞の薬剤抵抗性機構を付与する細胞内経路を解析した。まず、*TPM3-NTRK1* 融合遺伝子陽性大腸がん細胞株 KM12 を用いて *in vitro* において Entrectinib 処理時に大多数の細胞が死滅する中で生き残り続ける DTP 様の性質を示す細胞を取得した。次に NTRK 阻害薬 Entrectinib を *in vitro* において処理し続け、最終的に NTRK1 のキナーゼドメイン内に G595R が生じており、実際に Entrectinib に耐性を示すことを確認した。つまり、KM12 細胞においても DTP 様の性質を示す細胞が次の耐性の根源となり得ることを示唆しているものと考えられる。今回私が見出した大腸がん細胞株以外にも肝がん細胞株等でも DTP 細胞の存在は確認されている⁷⁶。次に *in vitro* において、患者臨床検体由来細胞株 JFCR-028-3 細胞に対して Lorlatinib 処理を行ったところ、大多数の細胞が死滅する中で、一部の細胞が生き残った。この細胞を Lorlatinib 非存在下で培養したところ、Lorlatinib に対する薬剤耐性が減弱した。なお、この樹立した LR 細胞の *EML4-ALK* 融合遺伝子における変異を確認したところ、変異は確認されなかったことからこれら細胞集団は DTP 様の性質を示すものと考えられた。Lorlatinib 存在下ではこれら LR 細胞の ERK や AKT 等の細胞生存や恒常性に関わる因子のリン酸化が若干ながら JFCR-028-3 細胞よりも維持されていたことから、ERK や AKT を介した細胞内経路が LR 細胞の Lorlatinib 初期耐性に関与していることが予想された。そこで、これら因子がどのようなタンパク質に制御されているのかを阻害剤ライブラリーや phospho-RTK アレイを用いて探索したが、確実な証拠を得ることはできなかった。しかしながら、そのヒントは得られたと考えている。Dasatinib や Ponatinib はマルチチロシンキナーゼ阻害薬であり、その薬剤標的は数多存在する。しかしながら、両者は過去の報告から非受容体型チロシンキナーゼに属する Src ファミリーキナーゼ (SFK) を阻害することが知られており^{77,78}、phospho-RTK アレイやその後の細胞生存アッセイにより、主要な膜受容体型チロシンキナーゼの関与が認められなかったことから SFK が初期耐性に関わっている可能性はあると考えられる。

また、阻害剤ライブラリーにより、多様な細胞内の恒常性を維持する GSK3 α/β キナーゼの機能を抑制する LY2090314 が Lorlatinib との併用効果を示し、細胞生存アッセイにおいては GSK3 β 特異的阻害剤である TWS-119 も Lorlatinib との併用効果を示したことから、Lorlatinib 処理条件下における LR 細胞の薬剤初期耐性には SFK 以外にも GSK3 キナーゼも関与している可能性が考えられる。GSK3 キナーゼは通常 AKT 等のキナーゼにより下方制御されている⁷⁹。Lorlatinib 存在下における AKT のリン酸化の挙動もそのレベルが維持されているとはいえ、抑制傾向にあった。その影響により、AKT による GSK3 キナーゼの抑制制御が外

れた結果 GSK3 キナーゼが活性化することができ、依存性が上がった可能性がある。しかしながら、今回可能性の1つとして浮上してきた LR 細胞の Lorlatinib 初期耐性に SFK や GSK3 キナーゼが真に関与しているのかはもちろんのこと、それが真だった場合、これら因子が並列的に機能しているのか直列的に機能しているのか今後のさらなる解析が必要である。

総合討論

ALK 阻害薬の開発は 2010 年代の初めごろから盛んになっており、2019 年現在では米国を中心に 5 剤 (日本では 4 剤) が日常臨床で用いられている。しかしながら、従来の抗がん剤同様に ALK 阻害薬においても薬剤耐性化が臨床上大きな問題となっている。これまでは各 ALK 阻害薬が初回治療に用いられた場合に対する耐性化機構として ALK 単独変異体を中心に解析が進められてきた。現在では、これら知見を踏まえ、耐性克服のために ALK 阻害薬を順に使っていく逐次治療が確立されてきた。特に近年では初回治療に第 2 世代 ALK 阻害薬 Alectinib、2 次治療以降に第 3 世代 ALK 阻害薬 Lorlatinib を用いた逐次治療が期待されているが、その後の耐性化腫瘍の出現も懸念されていた。私は Alectinib 治療に対する耐性化機構として最も臨床で見られる EML4-ALK-G1202R 変異体や-I1171N 変異体に Lorlatinib 治療が施される機会が今後増加すると予測し、その後の耐性化機構を ENU mutagenesis screening 等で探索した。その結果、計 13 種の新規重複変異体を発見するに至った。EGFR 変異陽性肺がんでも逐次治療に対する重複変異による耐性化機構は見られており、第 1、第 2 世代 EGFR 阻害薬に強力な耐性を示す EGFR-T790M 変異体に対する克服薬として使用される第 3 世代 EGFR 阻害薬 Osimertinib を用いた治療後に T790M+C797S 重複変異体が発見することが知られている。ALK においては新たに蓄積した変異のほとんどは既知の変異であった。これは、他の変異体を起点とした場合でも同様に既知の変異の組み合わせで Lorlatinib に耐性を示す場合があることを示唆していると考えられる。

先述の EGFR-T790M + C797S 重複変異陽性肺がんに対しては ALK 阻害薬として開発された Brigatinib が有効であり、EGFR 抗体 Cetuximab との併用処理によりさらなる相乗効果が生まれることが所属研究室の先行研究から分かっている⁸⁰。このように EGFR 重複変異体に対しては今のところ、Drug-repurposing が期待されている一方で、本研究で私が解析したところによると Alectinib-Lorlatinib 逐次治療後に出現し得る EML4-ALK 重複変異体については Lorlatinib 以前に開発された ALK 阻害薬が再度有効となる場合があることが分かった。中でも、I1171N+L1256F 重複変異体の Alectinib 感受性化は大変興味深い。EML4-ALK-I1171N 変異体は Alectinib に強力な耐性を示し、臨床においては G1202R 変異体の次に多く見られているが、新たに L1256F 変異が生じることで Alectinib に感受性を示すことが分かった。この Alectinib 再感受性は、Alectinib のベンゾカルバノール構造と F1256 のベンジル基との π 電子を介した相互作用が上昇することで生じている可能性も鹿児島大学の石川岳志博士との共同研究から得ている。

本研究から変異が新たに付加され、重複変異体ことで、Lorlatinib に強力な耐性を示す一

方で、他の阻害剤に脆弱性を示す可能性が示唆された。現在臨床では、がん遺伝子パネル検査が受けられるようになったことで、ALK のキナーゼドメイン内の薬剤耐性変異を検索できるようになった。本研究結果とがん遺伝子パネル検査を組み合わせることで、Alectinib-Lorlatinib 逐次治療後の適切な治療戦略を得られる場合があるのではないだろうか。しかしながら、これまでの研究により、がん組織はヘテロな細胞集団であると考えられている。つまり、採取したがん組織の箇所により薬剤耐性変異が検出されない可能性もあり得るため、従来のバイオプシーや近年注目されているリキッドバイオプシー等を組み合わせ、各種手法を駆使してがん組織を採取、解析することは課題であると考えられる。

一方で、本研究においては全ての ALK 阻害薬に耐性を示した重複変異体も見られた。特に G1202R + F1174C/L、I1171N + F1174I/L などの F1174 部位の重複変異体に関しては、いずれの ALK 阻害薬に対して中～高程度の耐性が見られた。F1174 部位の変異は ALK 陽性神経膠芽腫の直接的な原因因子であることが明らかとなっており、F1174L 変異型 EML4-ALK はすでに Crizotinib に対して耐性を示すことが明らかとなっている⁸¹⁻⁸³。通常 ALK のキナーゼドメインは不活性化型の立体構造となっている。この際、Y1278 と C1097 が水素結合を介して、Y1278 と Y1096 が π 電子を介して電気的に結合している。その影響により、F1174、F1245、F1271 が立体的に接近することで、これら三者が π 電子を介して電気的な相互作用を介して強固に結合している (F-core の形成) (Fig. 4-1)。これにより、不活性化の立体構造が維持されているが、F1174 部位がロイシンなどの環状構造をもたないアミノ酸残基へと置換することで、F-core が形成できなくなり、活性化の立体構造へと変化することが MD シミュレーションから明らかとなっている⁸⁴。他の研究グループからは F1174L 変異は ATP への親和性が上昇しており、その結果として、ATP 競合型の阻害薬である Crizotinib に耐性を示すことが明らかとなっている⁸⁵。また、同様の研究グループから I1171N 変異体についても ATP との結合能が野生型よりも上昇していることが明らかとされている。これらを統合的に考えると、今回発見した I1171N + F1174I/L 重複変異体の ATP への親和性は野生型や I1171N 単独変異体と比べ上昇していると推察できる。この理由で、あらゆる ALK 阻害薬に耐性を示したのかもしれない。また、G1202R + F1174C/L 重複変異に関しても、これまで述べたように、G1202R 変異の強力な薬剤耐性能と F1174 部位の ATP 結合能の上昇が組み合わせることで、あらゆる ALK 阻害薬に耐性を示したことが考えられる。G1202R + L1196M 重複変異体もあらゆる ALK 阻害薬に耐性を示したが、こちらは薬剤結合部位最深部に存在する L1196 残基と入り口に存在する G1202 残基が同時に変異を起こし、薬剤結合部位のポケット構造が狭隘な空間となった結果、Lorlatinib が ALK キナーゼドメインと結合しにくく

なり、耐性化した可能性が考えられる。今回、これらのような重複変異体に対する克服薬は発見することができなかったが、そのヒントは AG-957 や Adaphostin という他のキナーゼを標的とした薬剤が G1202R + L1196M 重複変異体に有効であった知見から得られたと考えている。今回見出した G1202R + L1196M 重複変異体の特異的有効性は恐らく ATP 結合部位ではなく、基質結合部位に AG-957 や Adaphostin が結合することで成り立っていることが考えられる。つまり、従来のような ALK 阻害薬の様に ATP 競合型ではなく、ALK の他の部位を標的とした阻害剤開発が重要となってくるのではないだろうか。実際に *BCR-ABL* 陽性慢性骨髄性白血病に対して ATP 競合的に阻害するのではなく、*BCR-ABL* のキナーゼドメイン内に存在するミリストイル・ポケットに結合することで不活性化型の立体構造へと変化させるアロステリック阻害剤 Asciminib (NOV1501 もしくは ABL001) と ABL 阻害薬との併用療法が現在、臨床試験中であり、期待が高まっている^{86,87} (Fig. 4-2)。さらには *EGFR* 変異陽性肺癌に対しても ATP 結合部位近傍を標的とせず、不活性化構造の重複変異型 *EGFR* タンパク質にのみ結合するアロステリック阻害剤 EAI045 が開発され、*EGFR* 抗体との併用効果が見られており、期待されている⁸⁸ (Fig. 4-3)。ALK 阻害薬の逐次治療後に出現し得る重複変異体に対しても従来の ALK 阻害薬とは異なる作用機序のアロステリック阻害剤の開発が耐性克服の糸口となるのではないだろうか。しかしながら、それにはコンピュータシミュレーションによる ALK 融合タンパク質全体の立体構造予測が必要不可欠である。現在、薬剤と標的タンパク質の共結晶構造の情報を出発点として、親和性や結合様式は予測されている。そのため、共結晶構造の情報がないタンパク質と薬剤では予測ができないのである。そのため、コンピュータ上で、薬剤と標的タンパク質の結合親和性予測がもし可能となれば、上述のようなアロステリック阻害剤の開発も加速するだろう。また、さらなる克服案としては、融合パートナータンパク質側を標的とした薬剤開発も重要となるのかもしれない。融合パートナータンパク質の立体構造や分子生物学的特性を解析することで、その立体的脆弱性を見出し、そこに結合することで、結果的に ALK 融合タンパク質の多量体化を阻害できる薬剤の開発も期待できるのではないだろうか。

何故 ALK 阻害薬に耐性を示す集団が出現するのだろうか。現在、薬剤に耐性を示す細胞集団は DTP (Drug-Tolerant Persister) 細胞が根源であるという見解が 2010 年前半から広まっている。現在、DTP 細胞の抑制が腫瘍組織の完全克服に繋がると考えられ、様々な研究グループからそのドラッグナブルな標的分子や細胞内経路が報告されている。私も本研究から *NTRK1* 融合遺伝子陽性がんや *ALK* 融合遺伝子陽性がんから分子標的薬処理時に DTP 様の性質を示す細胞が出現し、次の更なる獲得耐性へとつながる可能性を得た。その際に *EML4-*

ALK 融合遺伝子陽性がん DTP 様の性質を示す細胞内で寄与しているメカニズムの一端として SFK や GSK3 キナーゼの関与が考えられた。特に GSK3 キナーゼに関しては、未だがん細胞の薬剤初期残存機構や薬剤耐性機構との関連は報告されていない。現在、GSK3 キナーゼは AKT 等により、下方制御を受けていることが分かっている。これら知見から、DTP 様の性質を示す細胞内では野生型の EML4-*ALK* タンパク質の機能が *ALK* 阻害薬により抑制された結果、AKT などのシグナル伝達経路が抑制され、GSK3 キナーゼが活性化状態となることで初期耐性を付与することができ、次の薬剤非存在下までがん細胞が耐え忍ぶことが可能となり、これが可逆的な抵抗性の表現型へとつながっていると推察している。そのため、真に GSK3 キナーゼが DTP 様の性質を示す細胞の初期耐性、可逆的な治療抵抗性に関わっていた場合、*ALK* 阻害薬と GSK3 キナーゼ阻害剤の併用療法が *ALK* 融合遺伝子陽性肺がん根治の可能性を秘めていると考えられ、今後、より詳細な解析が重要となると考えられる。

本研究では重要な Limitation が 3 つ存在すると考えられる。1 つ目は Alectinib-Lorlatinib 逐次治療に対する耐性化機構を探索する際に用いた ENU mutagenesis screening にある。この screening はグアニンからシトシンへの置換やグアニンからアデニンへの置換が低頻度でしか起こらないなどのバイアスが存在することが、先行研究から分かっている⁸⁹。つまり、今回、見出した重複変異体以外にも Lorlatinib に対して耐性を示す重複変異体が今後臨床で出現する可能性がある。2 つ目は今回 Lorlatinib 耐性化機構として耐性変異だけを確認したことにある。これまでに様々な膜受容体型チロシンキナーゼや薬剤排出トランスポーター等のタンパク質が *ALK* 阻害薬耐性に関わっていることが明らかとなっている⁹⁰⁻⁹⁷。また、他のグループからは Lorlatinib 耐性化機構の 1 つとして膜受容体 ERBB ファミリーの活性化なども報告されており、今後の臨床においても *ALK* キナーゼドメインに変異を伴わない耐性化機構も今後探索していかなければならないだろう。最後の Limitation は、DTP 細胞の一般性を検証できなかった点である。理論的には GSK3 キナーゼが *ALK* によるシグナルと逆行していることが考えられるが、他の *ALK* 融合遺伝子陽性肺がん細胞株を複数検討し、普遍性を確認しなければならない。また、現在腫瘍組織は様々な種の細胞が混ざり合ったヘテロな集団であると考えられている。今回用いた JFCR-028-3 細胞は *in vitro* において培養が可能となった株化細胞であるため、腫瘍組織のヘテロな性質を反映していない可能性がある。そのため、今回の DTP 様の性質を示す細胞が実際の腫瘍組織から出現しうる DTP 様細胞を反映しているとは断定ができない。そのため、今後、*in vivo* においても JFCR-028-3 細胞や他の細胞株を用いて DTP 様細胞を作製する、もしくは実際の患者から治療途中の検体を頂き、

DTP 様細胞の性質を解析していく必要があると考えている。

本研究で、私は今後 *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌に対して臨床で比較的広く用いられる可能性がある *Alectinib-Lorlatinib* 逐次治療に対する耐性重複変異体とその克服法を一部発見することに成功した。現在臨床では *Lorlatinib* 耐性重複変異体が数例報告されており、その中には私が実際に発見した重複変異体もあり、実際にこれまでに開発された *ALK* 阻害薬を用いることで腫瘍が一度退縮した例もある⁹⁸⁻¹⁰²。

本研究成果が臨床へとフィードバックされ、*ALK* 融合遺伝子陽性肺癌と闘っている患者のさらなる生存期間の延長に繋がるきっかけとなることを期待している。

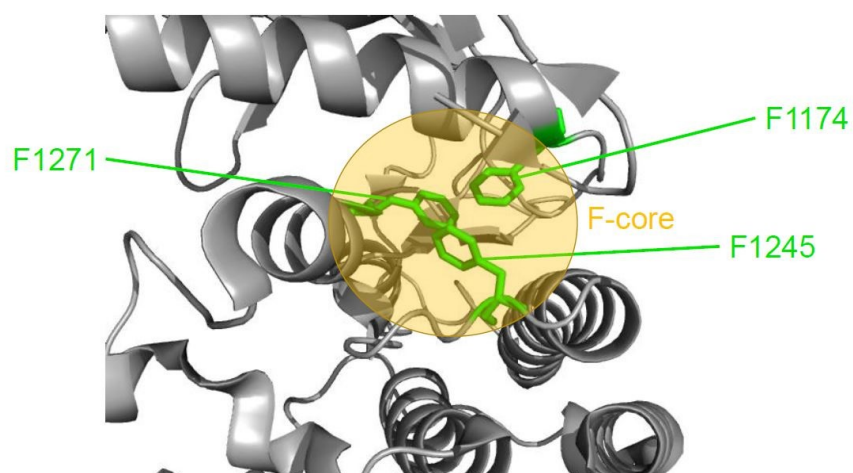


Fig. 4-1 F-core の形成

ALK キナーゼドメインにおける F1174、F1245、F1271 が形成する F-core を示す。

PDB ID; 3LCS を用いて作製した。

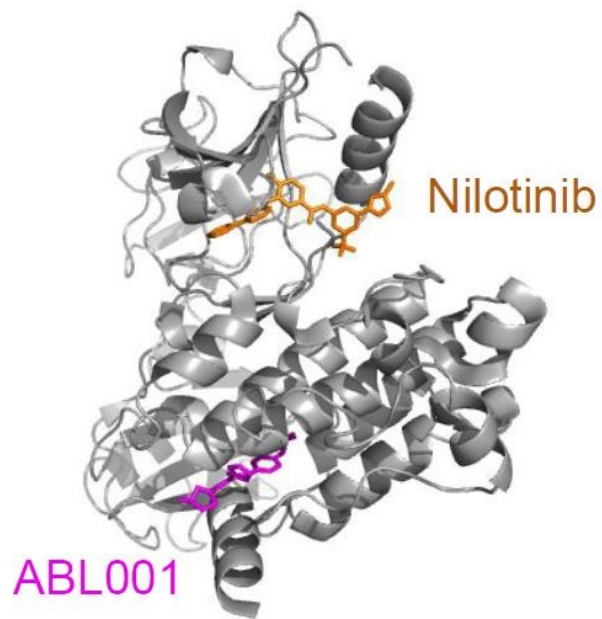


Fig. 4-2 ABL キナーゼドメインにおける ABL001 および Nilotinib の位置

ABL キナーゼドメインとアロステリック阻害剤 ABL001 (紫)と ATP 競合型 BCR-ABL 阻害薬 Nilotinib (オレンジ)を示す。
PDB ID; 5M04 を用いて作製した。

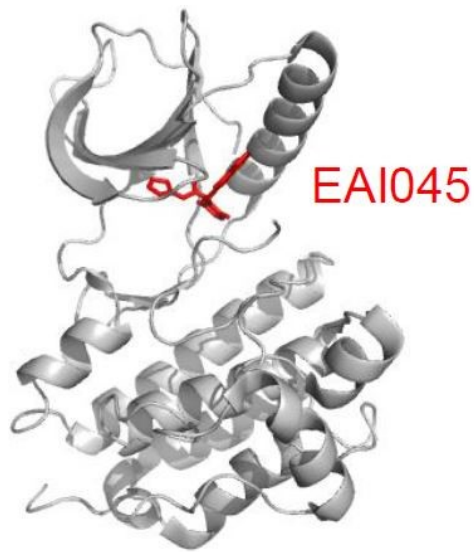


Fig. 4-3 EGFR キナーゼドメインにおける EAI045 の位置

EGFR キナーゼドメインとアロステリック阻害剤 EAI045 (赤)を示した。
PDB ID; 5ZWJ を用いて作製した。

参考文献

- 1 Kohno, T. *et al.* Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* **4**, 156-164, doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2014.11.11 (2015).
- 2 Soda, M. *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **448**, 561-566, doi:10.1038/nature05945 (2007).
- 3 Koivunen, J. P. *et al.* EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 4275-4283, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0168 (2008).
- 4 Wong, D. W. *et al.* The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* **115**, 1723-1733, doi:10.1002/cncr.24181 (2009).
- 5 Shaw, A. T. *et al.* Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* **27**, 4247-4253, doi:10.1200/JCO.2009.22.6993 (2009).
- 6 Shinmura, K. *et al.* EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* **61**, 163-169, doi:10.1016/j.lungcan.2007.12.013 (2008).
- 7 Yao, S. *et al.* Anaplastic lymphoma kinase is required for neurogenesis in the developing central nervous system of zebrafish. *PLoS One* **8**, e63757, doi:10.1371/journal.pone.0063757 (2013).
- 8 Fadeev, A. *et al.* ALKALs are in vivo ligands for ALK family receptor tyrosine kinases in the neural crest and derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E630-E638, doi:10.1073/pnas.1719137115 (2018).
- 9 Togashi, Y. *et al.* KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. *PLoS One* **7**, e31323, doi:10.1371/journal.pone.0031323 (2012).
- 10 Takeuchi, K. *et al.* KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 3143-3149, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3248 (2009).
- 11 Hou, X., Xu, H. & Chen, L. SRBD1-ALK, a Novel ALK Fusion Gene Identified in an Adenocarcinoma Patient by Next-Generation Sequencing. *J Thorac Oncol* **14**, e72-e73, doi:10.1016/j.jtho.2018.11.027 (2019).
- 12 Feng, T. *et al.* The clinical responses of TNIP2-ALK fusion variants to crizotinib in ALK-rearranged lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* **137**, 19-22, doi:10.1016/j.lungcan.2019.08.032 (2019).
- 13 Shaw, A. T. & Solomon, B. Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. *Clin Cancer Res* **17**, 2081-2086, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1591 (2011).
- 14 Zou, H. Y. *et al.* An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms.

- Cancer Res* **67**, 4408-4417, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4443 (2007).
- 15 Solomon, B. J. *et al.* First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* **371**, 2167-2177, doi:10.1056/NEJMoa1408440 (2014).
- 16 Shaw, A. T. *et al.* Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* **368**, 2385-2394, doi:10.1056/NEJMoa1214886 (2013).
- 17 Choi, Y. L. *et al.* EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med* **363**, 1734-1739, doi:10.1056/NEJMoa1007478 (2010).
- 18 Sasaki, T. *et al.* A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res* **71**, 6051-6060, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1340 (2011).
- 19 Taniguchi, H. *et al.* Amphiregulin triggered epidermal growth factor receptor activation confers in vivo crizotinib-resistance of EML4-ALK lung cancer and circumvention by epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Sci* **108**, 53-60, doi:10.1111/cas.13111 (2017).
- 20 Katayama, R. *et al.* Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci Transl Med* **4**, 120ra117, doi:10.1126/scitranslmed.3003316 (2012).
- 21 Katayama, R. *et al.* Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7535-7540, doi:10.1073/pnas.1019559108 (2011).
- 22 Tamura, T. *et al.* Three-Year Follow-Up of an Alectinib Phase I/II Study in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: AF-001JP. *J Clin Oncol* **35**, 1515-1521, doi:10.1200/JCO.2016.70.5749 (2017).
- 23 Sakamoto, H. *et al.* CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer Cell* **19**, 679-690, doi:10.1016/j.ccr.2011.04.004 (2011).
- 24 Hida, T. *et al.* Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet* **390**, 29-39, doi:10.1016/S0140-6736(17)30565-2 (2017).
- 25 Peters, S. *et al.* Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **377**, 829-838, doi:10.1056/NEJMoa1704795 (2017).
- 26 Camidge, D. R. *et al.* Updated Efficacy and Safety Data and Impact of the EML4-ALK Fusion Variant on the Efficacy of Alectinib in Untreated ALK-Positive Advanced Non-Small Cell Lung Cancer in the Global Phase III ALEX Study. *J Thorac Oncol* **14**, 1233-1243, doi:10.1016/j.jtho.2019.03.007 (2019).
- 27 Makimoto, G. *et al.* Rapid Acquisition of Alectinib Resistance in ALK-Positive Lung Cancer With High Tumor Mutation Burden. *J Thorac Oncol* **14**, 2009-2018, doi:10.1016/j.jtho.2019.07.017 (2019).
- 28 Ou, S. H. *et al.* ALK F1174V mutation confers sensitivity while ALK I1171 mutation confers resistance to alectinib. The importance of serial biopsy post progression. *Lung Cancer* **91**, 70-72,

- doi:10.1016/j.lungcan.2015.09.006 (2016).
- 29 Dagogo-Jack, I. *et al.* Tracking the Evolution of Resistance to ALK Tyrosine Kinase Inhibitors through Longitudinal Analysis of Circulating Tumor DNA. *JCO Precis Oncol* **2018**, doi:10.1200/PO.17.00160 (2018).
- 30 Johnson, A. C. *et al.* Identification of I1171N resistance mutation in ALK-positive non-small-cell lung cancer tumor sample and circulating tumor DNA. *Lung Cancer* **99**, 38-40, doi:10.1016/j.lungcan.2016.06.010 (2016).
- 31 Ou, S. H. *et al.* I1171 missense mutation (particularly I1171N) is a common resistance mutation in ALK-positive NSCLC patients who have progressive disease while on alectinib and is sensitive to ceritinib. *Lung Cancer* **88**, 231-234, doi:10.1016/j.lungcan.2015.02.005 (2015).
- 32 Ou, S. H. *et al.* Identification of a novel HIP1-ALK fusion variant in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) and discovery of ALK I1171 (I1171N/S) mutations in two ALK-rearranged NSCLC patients with resistance to Alectinib. *J Thorac Oncol* **9**, 1821-1825, doi:10.1097/JTO.0000000000000368 (2014).
- 33 Ignatius Ou, S. H. *et al.* Next-generation sequencing reveals a Novel NSCLC ALK F1174V mutation and confirms ALK G1202R mutation confers high-level resistance to alectinib (CH5424802/RO5424802) in ALK-rearranged NSCLC patients who progressed on crizotinib. *J Thorac Oncol* **9**, 549-553, doi:10.1097/JTO.0000000000000094 (2014).
- 34 Gainor, J. F. *et al.* Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov* **6**, 1118-1133, doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0596 (2016).
- 35 Johnson, T. W. *et al.* Discovery of (10R)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H-8,4-(m etheno)pyrazolo[4,3-h][2,5,11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broad-spectrum potency against ALK-resistant mutations. *J Med Chem* **57**, 4720-4744, doi:10.1021/jm500261q (2014).
- 36 Zou, H. Y. *et al.* PF-06463922, an ALK/ROS1 Inhibitor, Overcomes Resistance to First and Second Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models. *Cancer Cell* **28**, 70-81, doi:10.1016/j.ccell.2015.05.010 (2015).
- 37 Solomon, B. J. *et al.* Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study. *Lancet Oncol* **19**, 1654-1667, doi:10.1016/S1470-2045(18)30649-1 (2018).
- 38 Shaw, A. T. *et al.* Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F. *N Engl J Med* **374**, 54-61, doi:10.1056/NEJMoa1508887 (2016).
- 39 Vallette, F. M. *et al.* Dormant, quiescent, tolerant and persister cells: Four synonyms for the same

- target in cancer. *Biochem Pharmacol* **162**, 169-176, doi:10.1016/j.bcp.2018.11.004 (2019).
- 40 Hata, A. N. *et al.* Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nat Med* **22**, 262-269, doi:10.1038/nm.4040 (2016).
- 41 Sharma, S. V. *et al.* A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* **141**, 69-80, doi:10.1016/j.cell.2010.02.027 (2010).
- 42 Debruyne, D. N. *et al.* BORIS promotes chromatin regulatory interactions in treatment-resistant cancer cells. *Nature* **572**, 676-680, doi:10.1038/s41586-019-1472-0 (2019).
- 43 Taniguchi, H. *et al.* AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and advances the emergence of tolerant cells. *Nat Commun* **10**, 259, doi:10.1038/s41467-018-08074-0 (2019).
- 44 Hangauer, M. J. *et al.* Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature* **551**, 247-250, doi:10.1038/nature24297 (2017).
- 45 Shah, K. N. *et al.* Aurora kinase A drives the evolution of resistance to third-generation EGFR inhibitors in lung cancer. *Nat Med* **25**, 111-118, doi:10.1038/s41591-018-0264-7 (2019).
- 46 Jin, Y. *et al.* Distinct co-acquired alterations and genomic evolution during TKI treatment in non-small-cell lung cancer patients with or without acquired T790M mutation. *Oncogene*, doi:10.1038/s41388-019-1104-z (2019).
- 47 Arulananda, S. *et al.* Combination Osimertinib and Gefitinib in C797S and T790M EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* **12**, 1728-1732, doi:10.1016/j.jtho.2017.08.006 (2017).
- 48 Lee, J. S., Hur, J. Y., Kim, H. J., Lee, K. Y. & Kim, W. S. A Case of Concurrent De Novo C797S and L858R EGFR Mutation Detected in Stage IA Non-Small Cell Lung Cancer Patient. *J Thorac Oncol* **12**, e179-e181, doi:10.1016/j.jtho.2017.07.016 (2017).
- 49 Bradeen, H. A. *et al.* Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations. *Blood* **108**, 2332-2338, doi:10.1182/blood-2006-02-004580 (2006).
- 50 Tiedt, R. *et al.* A drug resistance screen using a selective MET inhibitor reveals a spectrum of mutations that partially overlap with activating mutations found in cancer patients. *Cancer Res* **71**, 5255-5264, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4433 (2011).
- 51 Katayama, R. *et al.* Cabozantinib overcomes crizotinib resistance in ROS1 fusion-positive cancer. *Clin Cancer Res* **21**, 166-174, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1385 (2015).
- 52 Li, J. *et al.* L1198F Mutation Resensitizes Crizotinib to ALK by Altering the Conformation of Inhibitor and ATP Binding Sites. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18030482 (2017).
- 53 Ou, S. I. *et al.* Emergence of novel and dominant acquired EGFR solvent-front mutations at Gly796 (G796S/R) together with C797S/R and L792F/H mutations in one EGFR (L858R/T790M) NSCLC patient who progressed on osimertinib. *Lung Cancer* **108**, 228-231, doi:10.1016/j.lungcan.2017.04.003 (2017).

- 54 Guan, J. *et al.* Anaplastic lymphoma kinase L1198F and G1201E mutations identified in anaplastic thyroid cancer patients are not ligand-independent. *Oncotarget* **8**, 11566-11578, doi:10.18632/oncotarget.14141 (2017).
- 55 Murugan, A. K. & Xing, M. Anaplastic thyroid cancers harbor novel oncogenic mutations of the ALK gene. *Cancer Res* **71**, 4403-4411, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4041 (2011).
- 56 Branford, S. *et al.* High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* **99**, 3472-3475, doi:10.1182/blood.v99.9.3472 (2002).
- 57 Miething, C. *et al.* The Bcr-Abl mutations T315I and Y253H do not confer a growth advantage in the absence of imatinib. *Leukemia* **20**, 650-657, doi:10.1038/sj.leu.2404151 (2006).
- 58 Pao, W. *et al.* Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* **2**, e73, doi:10.1371/journal.pmed.0020073 (2005).
- 59 Janne, P. A. Challenges of detecting EGFR T790M in gefitinib/erlotinib-resistant tumours. *Lung Cancer* **60 Suppl 2**, S3-9, doi:10.1016/S0169-5002(08)70099-0 (2008).
- 60 Makuuchi, Y. *et al.* A case of ALK-rearranged non-small cell lung cancer that responded to ceritinib after development of resistance to alectinib. *Oncotarget* **9**, 23315-23319, doi:10.18632/oncotarget.25143 (2018).
- 61 Fukuda, K. *et al.* Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is a Mechanism of ALK Inhibitor Resistance in Lung Cancer Independent of ALK Mutation Status. *Cancer Res* **79**, 1658-1670, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2052 (2019).
- 62 Doebele, R. C. *et al.* Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **18**, 1472-1482, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2906 (2012).
- 63 Nagasundaram, N., Wilson Alphonse, C. R., Samuel Gnana, P. V. & Rajaretinam, R. K. Molecular Dynamics Validation of Crizotinib Resistance to ALK Mutations (L1196M and G1269A) and Identification of Specific Inhibitors. *J Cell Biochem* **118**, 3462-3471, doi:10.1002/jcb.26004 (2017).
- 64 Yoda, S. *et al.* Sequential ALK Inhibitors Can Select for Lorlatinib-Resistant Compound ALK Mutations in ALK-Positive Lung Cancer. *Cancer Discov* **8**, 714-729, doi:10.1158/2159-8290.CD-17-1256 (2018).
- 65 Redaelli, S. *et al.* Lorlatinib Treatment Elicits Multiple On- and Off-Target Mechanisms of Resistance in ALK-Driven Cancer. *Cancer Res* **78**, 6866-6880, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1867 (2018).
- 66 Richards, M. W. *et al.* Crystal structure of EML1 reveals the basis for Hsp90 dependence of

- oncogenic EML4-ALK by disruption of an atypical beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 5195-5200, doi:10.1073/pnas.1322892111 (2014).
- 67 Chuang, Y. C., Huang, B. Y., Chang, H. W. & Yang, C. N. Molecular Modeling of ALK L1198F and/or G1202R Mutations to Determine Differential Crizotinib Sensitivity. *Sci Rep* **9**, 11390, doi:10.1038/s41598-019-46825-1 (2019).
- 68 Roskoski, R., Jr. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors in the treatment of ALK-driven lung cancers. *Pharmacol Res* **117**, 343-356, doi:10.1016/j.phrs.2017.01.007 (2017).
- 69 Sun, H. Y. & Ji, F. Q. A molecular dynamics investigation on the crizotinib resistance mechanism of C1156Y mutation in ALK. *Biochem Biophys Res Commun* **423**, 319-324, doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.120 (2012).
- 70 Lin, J. J. *et al.* Brigatinib in Patients With Alectinib-Refractory ALK-Positive NSCLC. *J Thorac Oncol* **13**, 1530-1538, doi:10.1016/j.jtho.2018.06.005 (2018).
- 71 Gazit, A., Yaish, P., Gilon, C. & Levitzki, A. Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* **32**, 2344-2352, doi:10.1021/jm00130a020 (1989).
- 72 Kaur, G. *et al.* Tyrphostin induced growth inhibition: correlation with effect on p210bcr-abl autokinase activity in K562 chronic myelogenous leukemia. *Anticancer Drugs* **5**, 213-222 (1994).
- 73 Kaur, G. & Sausville, E. A. Altered physical state of p210bcr-abl in tyrphostin AG957-treated K562 cells. *Anticancer Drugs* **7**, 815-824, doi:10.1097/00001813-199611000-00001 (1996).
- 74 Chandra, J. *et al.* Adaphostin-induced oxidative stress overcomes BCR/ABL mutation-dependent and -independent imatinib resistance. *Blood* **107**, 2501-2506, doi:10.1182/blood-2005-07-2966 (2006).
- 75 Fuse, M. J. *et al.* Mechanisms of Resistance to NTRK Inhibitors and Therapeutic Strategies in NTRK1-Rearranged Cancers. *Mol Cancer Ther* **16**, 2130-2143, doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0909 (2017).
- 76 Wang, L., Yang, Q., Peng, S. & Liu, X. The combination of the glycolysis inhibitor 2-DG and sorafenib can be effective against sorafenib-tolerant persister cancer cells. *Onco Targets Ther* **12**, 5359-5373, doi:10.2147/OTT.S212465 (2019).
- 77 Qian, X. L. *et al.* Dasatinib inhibits c-src phosphorylation and prevents the proliferation of Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) cells which overexpress Syndecan-Binding Protein (SDCBP). *PLoS One* **12**, e0171169, doi:10.1371/journal.pone.0171169 (2017).
- 78 Xiao, J. *et al.* Dasatinib enhances antitumor activity of paclitaxel in ovarian cancer through Src signaling. *Mol Med Rep* **12**, 3249-3256, doi:10.3892/mmr.2015.3784 (2015).
- 79 Maurer, U., Preiss, F., Brauns-Schubert, P., Schlicher, L. & Charvet, C. GSK-3 - at the crossroads of cell death and survival. *J Cell Sci* **127**, 1369-1378, doi:10.1242/jcs.138057 (2014).
- 80 Uchibori, K. *et al.* Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *Nat Commun* **8**, 14768,

- doi:10.1038/ncomms14768 (2017).
- 81 Ono, S., Saito, T., Terui, K., Yoshida, H. & Enomoto, H. Generation of conditional ALK F1174L mutant mouse models for the study of neuroblastoma pathogenesis. *Genesis* **57**, e23323, doi:10.1002/dvg.23323 (2019).
- 82 De Brouwer, S. *et al.* Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res* **16**, 4353-4362, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2660 (2010).
- 83 Sasaki, T. *et al.* The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. *Cancer Res* **70**, 10038-10043, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2956 (2010).
- 84 Jiang, C. H. *et al.* Molecular Modeling for Structural Insights Concerning the Activation Mechanisms of F1174L and R1275Q Mutations on Anaplastic Lymphoma Kinase. *Molecules* **23**, doi:10.3390/molecules23071610 (2018).
- 85 Bresler, S. C. *et al.* ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer Cell* **26**, 682-694, doi:10.1016/j.ccell.2014.09.019 (2014).
- 86 Schoepfer, J. *et al.* Discovery of Asciminib (ABL001), an Allosteric Inhibitor of the Tyrosine Kinase Activity of BCR-ABL1. *J Med Chem* **61**, 8120-8135, doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01040 (2018).
- 87 Wylie, A. A. *et al.* The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of BCR-ABL1. *Nature* **543**, 733-737, doi:10.1038/nature21702 (2017).
- 88 Jia, Y. *et al.* Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors. *Nature* **534**, 129-132, doi:10.1038/nature17960 (2016).
- 89 Bauer, D. C., McMorran, B. J., Foote, S. J. & Burgio, G. Genome-wide analysis of chemically induced mutations in mouse in phenotype-driven screens. *BMC Genomics* **16**, 866, doi:10.1186/s12864-015-2073-4 (2015).
- 90 Tani, T. *et al.* Activation of EGFR Bypass Signaling by TGFalpha Overexpression Induces Acquired Resistance to Alectinib in ALK-Translocated Lung Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* **15**, 162-171, doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0084 (2016).
- 91 Dong, X., Fernandez-Salas, E., Li, E. & Wang, S. Elucidation of Resistance Mechanisms to Second-Generation ALK Inhibitors Alectinib and Ceritinib in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Neoplasia* **18**, 162-171, doi:10.1016/j.neo.2016.02.001 (2016).
- 92 Lovly, C. M. *et al.* Rationale for co-targeting IGF-1R and ALK in ALK fusion-positive lung cancer. *Nat Med* **20**, 1027-1034, doi:10.1038/nm.3667 (2014).
- 93 Tsuji, T. *et al.* Alectinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancer by Dual Salvage Signaling in a Clinically Paired Resistance Model. *Mol Cancer Res* **17**, 212-224, doi:10.1158/1541-

- 7786.MCR-18-0325 (2019).
- 94 Crystal, A. S. *et al.* Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science* **346**, 1480-1486, doi:10.1126/science.1254721 (2014).
- 95 Choi, S. H. *et al.* Multiple receptor tyrosine kinase activation related to ALK inhibitor resistance in lung cancer cells with ALK rearrangement. *Oncotarget* **8**, 58771-58780, doi:10.18632/oncotarget.17680 (2017).
- 96 Dardaai, L. *et al.* SHP2 inhibition restores sensitivity in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer resistant to ALK inhibitors. *Nat Med* **24**, 512-517, doi:10.1038/nm.4497 (2018).
- 97 Yun, M. R. *et al.* Targeting YAP to overcome acquired resistance to ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. *EMBO Mol Med*, e10581, doi:10.15252/emmm.201910581 (2019).
- 98 Dagogo-Jack, I. *et al.* Treatment with Next-Generation ALK Inhibitors Fuels Plasma ALK Mutation Diversity. *Clin Cancer Res* **25**, 6662-6670, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1436 (2019).
- 99 Pailler, E. *et al.* Acquired Resistance Mutations to ALK Inhibitors Identified by Single Circulating Tumor Cell Sequencing in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **25**, 6671-6682, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1176 (2019).
- 100 Recondo, G. *et al.* Diverse Resistance Mechanisms to the Third-Generation ALK Inhibitor Lorlatinib in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1104 (2019).
- 101 Lin, J. J., Riely, G. J. & Shaw, A. T. Targeting ALK: Precision Medicine Takes on Drug Resistance. *Cancer Discov* **7**, 137-155, doi:10.1158/2159-8290.CD-16-1123 (2017).
- 102 Sharma, G. G. *et al.* A Compound L1196M/G1202R ALK Mutation in a Patient with ALK-Positive Lung Cancer with Acquired Resistance to Brigatinib Also Confers Primary Resistance to Lorlatinib. *J Thorac Oncol* **14**, e257-e259, doi:10.1016/j.jtho.2019.06.028 (2019).

謝辞

まず、本研究において、さらなるがん治療の発展のために臨床検体を提供していただいた患者様とそこご家族に心より感謝致します。

本研究は公益財団法人がん研究会がん化学療法センター所長 藤田直也教授のご指導、ご鞭撻のもと行わせていただきました。素晴らしい研究環境を恵んでいただいたとともに研究者としてあるべき姿を常に教えていただきました。厚く御礼申し上げます。

5年間という非常に長い間熱い指導をしていただきました公益財団法人がん研究会がん化学療法センター基礎研究部部長 片山量平博士には大変お世話になりました。片山先生には研究に対する姿勢、結果の解釈、後輩育成など本当にたくさんのことを教えていただきました。深く感謝申し上げます。

公益財団法人がん研究会がん研有明病院呼吸器内科 内堀健医長には5年間生活面から研究面までお世話になりました。内堀先生には今後社会人として生きていく上で大切なことを1から教えていただきました。「迷ったらやっつけ」を心に刻み研究に励んでいきます。心より感謝申し上げます。

公益財団法人がん研究会がん化学療法センター前所長 吉田光昭博士には発表会のみならず廊下でも熱いディスカッションをしていただきました。吉田先生の結果に対する解釈は非常に勉強になりました。深く感謝致します。

公益財団法人がん研究会がん化学療法センター基礎研究部の皆さまには実験手技のご指導などを懇切丁寧にしていただきました。深く感謝申し上げます。

京都大学医学研究科 奥野恭史教授、荒木望嗣特任准教授、鹿児島大学工学部 石川岳志博士にはスパコン京を用いたコンピュータシミュレーションにおいて多大なご協力を頂きました。厚く御礼申し上げます。

最後に、非常に長い時間研究に専念させてくれた家族、友人達に感謝申し上げます。皆様のおかげで非常に充実した研究生活を送ることができました。ありがとうございました。