

論文の内容の要旨

論文題目 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)

氏 名 岡田 康太郎

【研究背景】

肺がんは世界で最も死亡者数の多いがんである。肺がんは組織型による分類がされており、その中でも非小細胞肺がんが全肺がん患者の約 80%を占めている。この非小細胞肺がん患者の約 5%では、*ALK* 融合遺伝子のがんを引き起こす原因遺伝子として見出されている。

ALK 遺伝子は受容体型チロシンキナーゼとして機能する *ALK* (Anaplastic Lymphoma Kinase)タンパク質をコードしている。通常、*ALK* の活性化は厳密に制御されている一方で、上述の *ALK* 融合遺伝子陽性肺がんにおいては *ALK* 遺伝子が染色体逆位等により *EML4* (*Echinoderm Microtubule associated protein Like-4*)遺伝子等の他の遺伝子と融合することで、融合パートナー遺伝子側のプロモーターにより恒常的に発現し、さらに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恒常的に活性化している。そのため、臨床では、*ALK* 融合タンパク質のチロシンキナーゼ活性を阻害する *ALK* 阻害薬が数多く開発、臨床承認されてきた。特に第 2 世代 *ALK* 阻害薬 Alectinib は、第 1 世代 *ALK* 阻害薬 Crizotinib と比べて 2 倍以上の長さの無増悪生存期間を示すといった顕著な抗腫瘍効果が見られたことなどから世界的にも *ALK* 陽性肺がんの初回治療に第一選択薬として使用されている。このように、Alectinib を用いた治療は患者生存期間を大きく延長することに成功したものの、治療後数年で多くの症例で薬剤耐性によるがんの再発が臨床で大きな問題となっている。

これまでに Alectinib に対する薬剤耐性化メカニズムの約半数が *ALK* のチロシンキナーゼドメイン内の Alectinib 結合部位近傍の変異 (2 次変異)であることが明らかとなっており、特に G1202R 変異や I1171N 変異といった変異が高頻度に耐性患者から見出されている。昨年には、これらの変異体を含む多くの耐性変異型 *ALK* に有効とされる第 3 世代 *ALK* 阻害薬 Lorlatinib が我が国において臨床承認された。そのため、Lorlatinib が Alectinib 治療後に使用されることが期待されているものの、Lorlatinib 治療に対するさらなる耐性化機構の出現が懸念されていた。

最近、分子標的薬治療に初期から耐性を示す薬剤初期残存細胞 (Drug-Tolerant Persister 細胞; DTP 細胞)の存在が次の耐性の原因となり得ることが多くの研究グループから報告されているが、薬剤抵抗性を生み出す細胞内分子機構はあまり明らかとなっていない。

本研究は Alectinib-Lorlatinib 逐次治療後に出現し得る G1202R 変異や I1171N 変異陽性細胞の Lorlatinib 耐性化機構及びその克服法を探索することと、ALK 阻害薬耐性の根源として考えられている DTP 様の性質を示す細胞を作製しその性状解析を行い、DTP 様の性質を示す細胞に対して効果的な治療法を探索することを目的とした。

【研究結果】

・ Lorlatinib に耐性を示す重複変異型 EML4-ALK の発見

I1171N 変異や G1202R 変異型 EML4-ALK 融合タンパク質をマウス pro-B 細胞由来の Ba/F3 細胞に導入し変異型 EML4-ALK に依存して増殖する細胞を樹立した。次に、Lorlatinib 耐性変異を探索するために、これら細胞に対して *in vitro* において ENU mutagenesis screening を実施した。ENU mutagenesis screening を施した細胞を Lorlatinib 存在下で培養し、生存し続けたクローン細胞の ALK キナーゼドメインを解析した結果、I1171N 変異や G1202R 変異の他に変異が蓄積した新規重複変異体を計 13 種発見した。

これら ENU mutagenesis screening より得られた重複変異体の Lorlatinib に対する感受性を検討したところ、I1171N 重複変異体は I1171N 単独変異体に比べ、Lorlatinib に対して約 3.7 倍～約 100 倍高い IC₅₀ 値を示し、G1202R 重複変異体も G1202R 単独変異体と比較して、約 3.5 倍～約 35 倍高い IC₅₀ 値を示した。従って、これら ENU mutagenesis screening で見出された重複変異体の多くは実際に Lorlatinib に対して耐性であることが示された。また、実際に重複変異体を再導入した場合でも Lorlatinib に耐性を示すことが分かった。

・ Lorlatinib 耐性重複変異型 EML4-ALK に対する克服薬の発見

次にこれら重複変異体に対する耐性克服薬を実臨床で使用されている ALK 阻害薬を中心に探索した。その結果、I1171N + L1198F 重複変異体や G1202R + L1198F 重複変異体は野生型 EML4-ALK を発現する細胞と比較して Crizotinib に対する感受性がほぼ変わらないなど、既に臨床で使用可能な ALK 阻害薬に感受性を示す重複変異体が多く見られた。一方で、G1202R 重複変異体の多くは野生型や G1202R 単独変異体を有する細胞と比較して、ほとんどの ALK 阻害薬に弱耐性から強度耐性を示し、特に G1202R + L1196M 変異体はあらゆる ALK 阻害薬に耐性を示した。

・ Lorlatinib 耐性 EML4-ALK-L1256F 単独変異体とその克服薬の発見

ENU mutagenesis screening で発見した I1171N + L1256F 変異体は、Lorlatinib に対して高度耐性を示したため、L1256F 単独変異体の Lorlatinib 感受性を検討したところ、IC₅₀ 値が 1000 nM 以上と高度耐性を示した。この L1256F 変異体の Lorlatinib 耐性を構造的側面から明らかにするために、京都大学奥野恭史博士らとの共同研究により、Molecular dynamics シミュレーションを用いた解析がなされ、Lorlatinib のフルオロベンゼン基と L1256F 変異体のベンジル基が直接的な立体障害を生じることで、Lorlatinib と ALK との結合親和性が減弱し耐性化に至ることが示された。次に L1256F 変異体に対する克服薬を探索したところ、第 2 世代 ALK 阻害薬 Alectinib に対して、野生型 EML4-ALK を有する細胞と同程度の IC₅₀ 値を示し、高い感受性をもつことが示唆された。

・ EML4-ALK-G1202R + L1196M 重複変異体に対する阻害剤の発見

G1202R + L1196M 重複変異体はすべての ALK 阻害薬に耐性を示した。そこで、化学療法基盤支援活動より分与いただいた、標的分子が既知である SCADS 阻害剤ライブラリーを用いて、G1202R + L1196M 重複変異体に対する阻害薬を探索した。その結果、チロシンキナーゼ BCR-ABL を標的として開発された経緯を持つ阻害剤 AG-957 やその構造類縁体 Adaphostin が、Ba/F3 親株細胞 (IL-3 依存的に生存)、野生型 EML4-ALK 発現 Ba/F3 細胞、G1202R 変異型 EML4-ALK を発現する Ba/F3 細胞と比較して、G1202R +

L1196M 重複変異型 EML4-ALK を導入した Ba/F3 細胞で比較的高い感受性を示した。

・患者臨床検体由来細胞株を用いた Lorlatinib 初期残存細胞の性状解析

ALK 融合遺伝子陽性肺がん患者由来細胞株 JFCR-028-3 を *in vitro* において、Lorlatinib 高濃度存在下で培養し耐性細胞を樹立した (Lorlatinib-Resistant 細胞; LR 細胞)。これら LR 細胞の Lorlatinib に対する感受性を検討したところ、親株である JFCR-028-3 よりも耐性を示した。しかしながら、Lorlatinib 未処理下で培養した後に、同様に Lorlatinib への感受性を検討すると、親株よりは耐性を示すものの、Lorlatinib 処理直後の群と比べて、ややその耐性度が緩和されたことから、これら LR 細胞は DTP 様の性質を示す細胞であると考えた。次に薬剤ライブラリーを用いて、LR 細胞において Lorlatinib 存在下で活性化している経路を推定した結果、Src ファミリーキナーゼ (SFK) 阻害剤 Dasatinib や GSK3 α/β キナーゼ阻害剤 LY2090314 と Lorlatinib との併用効果が見られた。

[まとめ]

本研究から、Alectinib-Lorlatinib 逐次治療後の有効な治療戦略として ALK 阻害薬の再投与や異なる標的分子に対して開発された薬剤を再利用するドラッグリパーパシングが考えられた。

また、耐性化機構の根源として考えられる DTP 細胞の樹立及び性状解析を行った結果、DTP 様の性質を示す細胞の Lorlatinib に対する抵抗性機構において、SFK や GSK3 キナーゼが薬剤標的となりうることを pharmacological な解析から見出した。将来的に耐性出現の芽を摘むための治療戦略という点で、本研究がもたらす JFCR-028-3 を用いた DTP 細胞に関する成果は重要になると考えている。