

博士論文

過剰なチロシンキナーゼ活性を有するがん細胞の
増殖と死の二面性制御機構

小倉 隼人

目次

序論	3
第一章 チロシンキナーゼ阻害剤依存的な生存・増殖を示すがん細胞の特徴	8
第二章 TKI-addicted ながん細胞のシグナル伝達解析	18
第三章 TKI-addicted ながん細胞の再構築	36
第四章 網羅的シグナル解析手法による TKI addiction 制御因子の探索	48
第五章 TKI addiction に関わる細胞内シグナル伝達経路の探索	73
総括	86
参考文献	91
謝辞	97

序論

がんは日本人の死因第一位であり、現在およそ 3 人に 1 人はがんで亡くなっている。日本において肺がんは大腸がんに次ぐ罹患数であり、死亡数は最も多い(国立がん研究センター がん情報サービス)。世界において肺がんは罹患率、死亡率ともに最も多いがん腫であり、非常に予後の悪い疾患である(International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2012)。そのため、世界中で肺がんの有効な治療法の開発が期待されている。手術による切除が不能な進行性もしくは再発肺がんにおいては放射線療法および薬物療法が治療の中心的役割を担い、最近では免疫チェックポイント阻害薬を用いたがん免疫療法も保険適用となっている。薬物療法においては、従来は殺細胞性の化学療法剤の使用が主流であったが、近年ではがん細胞の生存・増殖に欠かせない分子を標的とした分子標的療法が顕著な治療効果を示し、目覚ましい進歩を遂げている。肺がん全体の約 60%を占める肺腺がんにおいては多くの遺伝子異常が報告されており、受容体型チロシンキナーゼ(RTK; Receptor Tyrosine Kinase)である *EGFR* (*Epidermal growth factor receptor*)活性化変異[1]や *ALK* (*Anaplastic lymphoma kinase*)、*ROS1* (*ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase*)等の融合遺伝子[2]–[4]といった様々なドライバーオンコジーン(driver oncogene; がん細胞の生存・増殖に直接的にかかわっている遺伝子)が見出され、それらが治療上有効な分子標的となっている。Driver oncogene を有するがん細胞の生存や増殖は、その driver oncogene 自身に強く依存(oncogene addiction)しており、適切なチロシンキナーゼ阻害薬(TKI; Tyrosine Kinase Inhibitor)の選択によりがん細胞の生存・増殖活性が強く抑制されることで、著名な腫瘍縮小が認められる[5], [6]。

しかしながら、これらのがん分子標的治療を続けていると数年以内にほとんどの症例において薬剤耐性を生じて再発してしまうことが臨床で大きな問題となっている。がん細胞が薬剤耐性を獲得するメカニズムは多岐にわたり、非小細胞肺がんにおいても、キナーゼドメイン内の遺伝子変異[7], [8]や、バイパス経路活性化[9], [10]、遺伝子増幅[11]、薬物排出トランスポーターの過剰発現[12]などを介した薬剤耐性メカニズムが解明されているが、不明なメカニズムも未だ多く存在する(図 1)。薬剤耐性となったがんを克服できるがん分子標的療法を開発するためには、未だ多くの点が明らかになっていない薬剤耐性がん細胞の特性を理解することが重要である。

近年、*ROS1* 融合遺伝子が強力な driver oncogene として肺腺がん患者から見出された。*ROS1* に関しては、1982 年にトリ肉腫ウイルス UR2 の発がん遺伝子 *v-ros* が発見され[13]、その後 1986 年に *c-ros-1* (*ROS1*)の部分配列が同定された[14]–[17]。1990 年には全長

の *ROS1* がヒトの膠芽腫(glioblastoma)細胞株 SW-1088 より同定された[18]。 *ROS1* 遺伝子はヒト成人において腎臓、小脳、末梢神経、消化管などに発現していることが報告されているが、その生理学的機能は不明である[19]。なお、マウス *ROS1* の機能の一つとして、出生後の精巣上体の分化を制御していることが報告されている[20]。また、 *ROS1* 遺伝子は線虫からショウジョウバエ、ヒトまで高度に保存されており、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインから構成される RTK の一種である。ショウジョウバエの *ROS1* ホモログ遺伝子 *sevenless* は R7 光受容細胞で発現しており、R8 光受容細胞で発現する *bride of sevenless* (BOSS) がリガンドとして結合することで RAS や MAPK (mitogen-activated protein kinase) シグナル伝達経路を介して活性化し、紫外光を感知する細胞への分化に寄与している[21], [22]。しかしながら、ヒト *ROS1* において BOSS に相当するホモログは発見されておらず、現在のところヒト *ROS1* は orphan RTK (リガンドが不明な RTK) となっている。

ROS1 融合遺伝子は 1987 年にヒト glioblastoma 細胞株 U118MG より *FIG-ROS1* (Fused-In-Glioblastoma-*ROS1*) として発見され[23]、2001 年に全長配列が同定された[24]。また、非小細胞肺癌患者由来の細胞から *CD74-ROS1* (*Cluster of differentiation 74-ROS1*), *SLC34A2-ROS1* (*Solute carrier family 34 member 2-ROS1*) が発見されている[25]。 *SLC34A2-ROS1* は *SLC34A2* のエクソン 4 と *ROS1* のエクソン 32 もしくは 34 が融合し、 *CD74-ROS1* は *CD74* のエクソン 6 と *ROS1* のエクソン 32 もしくは 34 が融合することで強力な driver oncogene となることが知られている。このように様々ながん腫から様々な *ROS1* 融合遺伝子 variant が見出されているが(図 2)、その細胞内局在(細胞質、細胞膜、核周囲、ゴルジ体等)の規則性は見出されておらず、活性化における二量体化の必要性についても十分に理解されていない[19], [26]。 *ROS1* 融合タンパク質の下流シグナルも *ROS1* 融合遺伝子 variant によって違いはあるとされているものの、多くの *ROS1* 融合遺伝子陽性がん細胞においては、 *ROS1* の自己リン酸化が生じ、アダプタータンパク質である SHP-2 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11) のリン酸化に次いで JAK (janus kinase) /STAT (signal transducer and activator of transcription)、RAS-MAPK /ERK (extracellular signal-regulated kinase)、PI3K (pi3 kinase and phosphatidylinositol-3 kinase)/AKT/mTOR (mechanistic target of rapamycin) などの細胞増殖シグナルが恒常的に活性化している[27]。

ROS1 融合遺伝子陽性肺がんは非小細胞肺癌の 1~2% で認められており、 *CD74-ROS1* variant が最も多く観察されている[4], [28], [29]。また、非小細胞肺癌患者の 3~5% で確認される ALK 融合遺伝子における ALK と *ROS1* は進化生物学的に同じインスリンレセプターファミリーに属している[30]。そのためタンパク質の構造はキナーゼドメイン内にお

いては 64%以上の相同性を有しており、多くの TKI の標的部位となっている ATP 結合部位においては、80%前後の相同性を有している[31]。そのため ALK 融合遺伝子陽性肺がんの治療に有効な分子標的治療薬が、多くの場合 ROS1 融合タンパク質のチロシンキナーゼ活性を効果的に抑制することが *in vitro* および *in vivo* 研究や臨床試験において明らかにされている。現在までに、ALK-TKI である crizotinib (PF-2341066)[32], [33], ceritinib (LDK378)[34], [35], lorlatinib (PF-06463922)[36], entrectinib (RXDX-101)[37]の ROS1 融合遺伝子陽性肺がんに対する有効性が臨床試験において評価されている。それらの中でも crizotinib は ROS1 融合遺伝子陽性非小細胞肺がんの第一選択薬として米国-FDA(Food and Drug Administration)や EU-EMA (European Medicines Agency)において既に承認されており、2017 年 5 月、日本においても本症例の治療薬として初めて承認された。

しかしながら、他の分子標的治療薬と同様に ROS1-TKI に対する獲得耐性は存在する。現在のところ、S1986Y/F [38]、G2032R [39]、D2033N [40]変異が発見、報告されている。私が所属する研究室において、crizotinib に対する強い耐性を示す G2032R 変異型 ROS1 融合遺伝子陽性肺がんに対し、multi target-TKI である cabozantinib (XL184)が有効であることを示した[41]。その知見を踏まえ、所属研究室において cabozantinib に耐性を有する変異型 ROS1 融合遺伝子陽性がん細胞の研究が行われた。ENU (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea)を用いて細胞内ゲノム DNA (deoxyribonucleic acid)にランダムな遺伝子変異を導入し、cabozantinib 処理によるスクリーニングを行うことで、ROS1 融合遺伝子に cabozantinib 耐性変異を有するクローンを得ている。それらの cabozantinib 耐性クローンのうち、ROS1 キナーゼドメイン内に F2004V もしくは F2075C 変異を有する 2 つのクローンにおいては、cabozantinib 存在下で増殖するものの、cabozantinib 非存在下では増殖が止まってしまうという非常に珍しい現象を確認した。

そこで、私はこの2つの変異細胞F2004VおよびF2075C変異細胞の生存・増殖には cabozantinib のような ROS1-TKI が必要であるという仮説を立て、これらの変異細胞の性質を詳しく調べることにした。私の仮説が正しかった場合、これらの変異細胞の生存や増殖を司るメカニズムは従来報告されてきた薬剤耐性がん細胞の生存・増殖メカニズムとは明らかに異なるものである。F2004V および F2075C 変異細胞を研究モデルとして用い、未だ解明されていない新たな薬剤耐性がん細胞の生存・増殖メカニズムを明らかにすることで、薬剤耐性がん細胞に対する新たな治療標的を見出すことを目的に研究を行った。

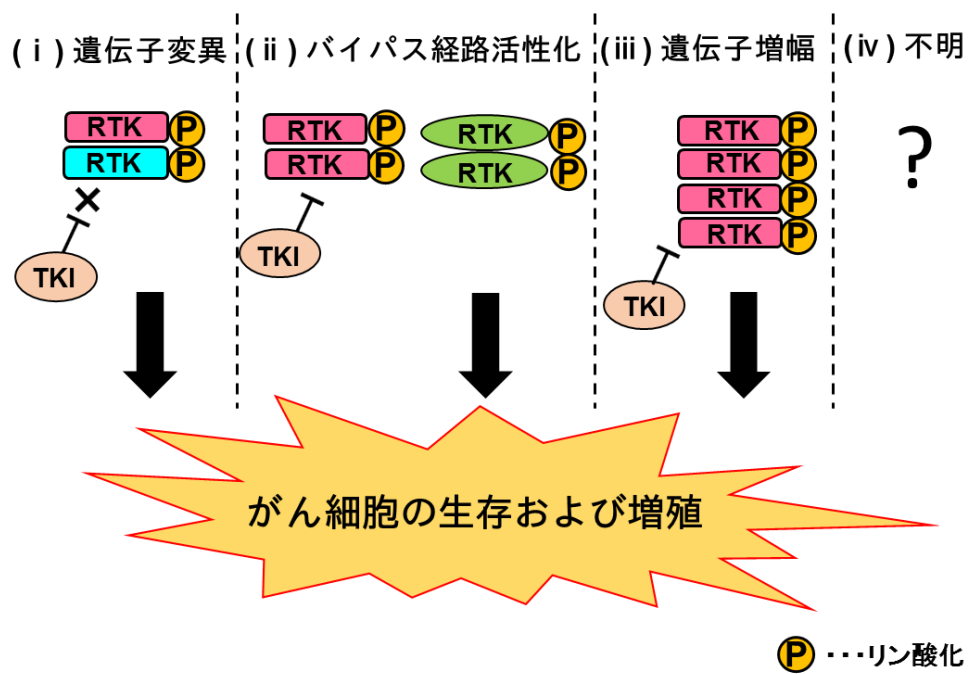


図 1. 薬剤耐性化のメカニズム

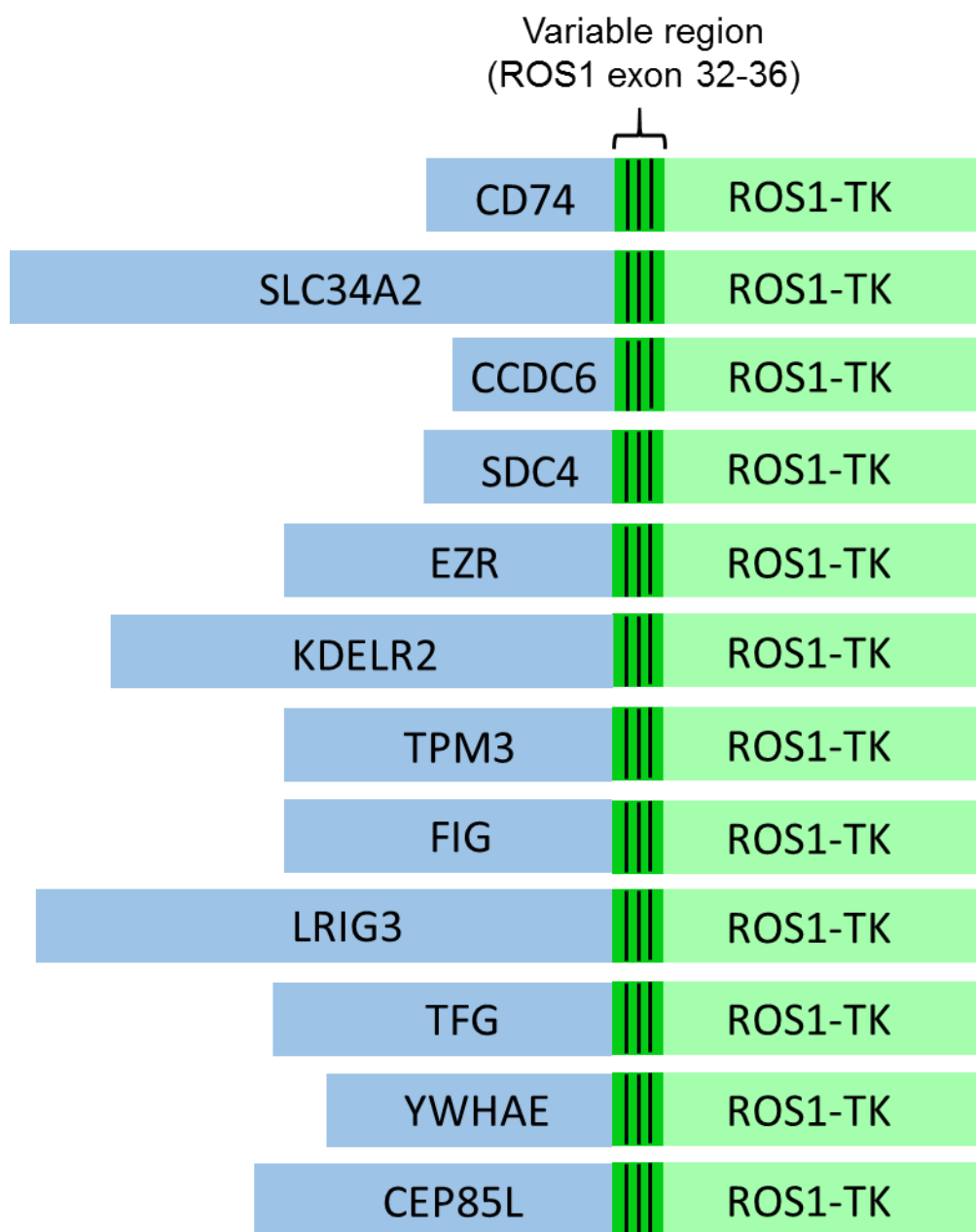


図 2. 現在まで様々ながん腫において報告された *ROS1* 融合遺伝子

第一章 チロシンキナーゼ阻害剤依存的な生存・増殖を示すがん細胞の特徴

1-1. 目的

所属研究室において、G2032R 変異等を有する crizotinib 耐性 *ROS1* 融合遺伝子陽性がん細胞に対して cabozantinib が増殖抑制効果を示すことが明らかにされた[41]。その結果を踏まえ、ENU mutagenesis スクリーニングによる cabozantinib 耐性 *ROS1* 融合遺伝子陽性 Ba/F3 細胞の樹立が試みられ、複数の *ROS1* 融合遺伝子変異クローンが得られた。しかしながら *ROS1* キナーゼドメイン内に F2004V もしくは F2075C の変異を有する 2 つのクローンに関しては cabozantinib 存在下では増殖できるのにも関わらず、同薬剤非存在下では増殖できないことが観察された。

そこで、cabozantinib や他の *ROS1*-チロシンキナーゼ阻害剤(*ROS1*-TKI)の有無による F2004V および F2075C 変異細胞の挙動変化の観察を目的として、cell viability assay、増殖 assay やフローサイトメトリーを用いた解析を実施した。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 細胞培養

いずれの細胞も 37°C, CO₂ 5% インキュベータ内で培養した。

・ CD74-*ROS1* 発現 Ba/F3 細胞(野生型)

培地: D-MEM (Dulbecco's modified Eagle medium, 和光純薬工業) low glucose / 10%FBS (fetal bovine serum) (D-10)

・ CD74-*ROS1* 発現 Ba/F3 細胞(F2004V および F2075C 変異型)

培地: D-10 / 10 nM cabozantinib

F2004V および F2075C 変異細胞に関しては、実験に供する直前に D-10 で 2 回洗浄し、cabozantinib を除去して用いた (以降の章においても同様)。

1-2-2. 使用薬剤

使用薬剤は以下のとおりである。

Crizotinib (ShangHai Biochempartner), cabozantinib (ActiveBiochem), lorlatinib (ActiveBiochem)

以上の薬剤はすべて Dimethyl sulfoxide (DMSO, 和光純薬工業)にて溶解して使用した。

1-2-3. Cell viability assay

細胞を 2000 cells/well/120 μ L D-10 で 96 well black plate (Greiner)に 3 連で播種した。1 列は発光量測定の際の background 測定のため、blank として 160 μ L Medium を添加した。細胞を添加した well に同一培地で希釈した薬剤 40 μ L をそれぞれ添加した（終濃度： 1 μ M, 317 nM, 100 nM, 32 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 0.3 nM, 0.1 nM, 0.03 nM, 0.01 nM, 0.003 nM, 0 nM）。その後 96 well black plate を 37°C, CO₂ 5% インキュベータ内に 72 時間静置した。72 時間経過後、CellTiter-Glo 溶液(Promega Co.)を 40 μ L/well 添加し、室温にて 10 分間振とうした後、Centro LB 941 microplate luminometer (Berhold Technologies)で発光量を測定し、Graph Pad Prism version 5.0 (Graphpad software)を用いて解析した。IC₅₀は Prism の 4 parameter analysis によって算出した。

1-2-4. 増殖 assay

細胞を 2000 cells/well/120 μ L で 96 well black plate に 3 連で播種した。1 列は発光量測定の際の background 測定のため、blank として 160 μ L Medium を添加した。細胞を添加した well に同一培地で希釈した薬剤 40 μ L をそれぞれ添加した（終濃度: 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0 nM）。以上の実験系をそれぞれ 5 系列作成し、37°C, CO₂ 5% インキュベータ内に静置した。0, 24, 48, 72, 96 時間（野生型細胞は 0, 22, 45, 72, 96 時間）経過毎に、各 well に CellTiter-Glo 溶液(Promega Co.)を各 well 40 μ L 添加し、室温にて 10 分間振とうした後、Centro LB 941 microplate luminometer (Berhold Technologies)で発光量を測定した。

1-2-5. フローサイトメトリー

野生型 CD74-ROS1 発現 Ba/F3 細胞を緑色蛍光色素 PKH67 (Sigma)で染色し、F2004V および F2075C 変異細胞を赤色蛍光色素 PKH26 (Sigma)で染色した。染色方法は Sigma 社提供のプロトコールに従った。フローサイトメトリー測定において、scatter plot 上の side scatter (SS)および forward scatter (FS)より生細胞を判別し、生細胞にゲート解析を行い、赤色蛍光および緑色蛍光を発している細胞群の比率を求めた。Cytomics FC500 (Beckman Coulter)を用いて測定し、FlowJo software ver. 7.6.5 (FlowJo, LLC)を用いて解析した。

1-2-6. 統計解析

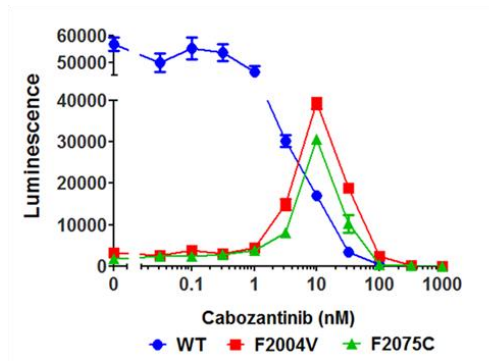
統計解析は Student's *t*-test を用いて検定した。統計学的有意差は*を $p < 0.05$ として表記した。

1-3. 結果

1-3-1. F2004V および F2075C 変異細胞の ROS1-TKI に対する感受性

野生型 CD74-ROS1 発現 Ba/F3 細胞(WT)および ENU mutagenesis スクリーニングにより得られた変異型 CD74-ROS1 F2004V, F2075C 発現 Ba/F3 細胞(F2004V, F2075C 変異細胞)の cabozantinib をはじめとした ROS1-TKI に対する感受性を調べるため、cell viability assay を実施した。その結果、野生型細胞はいずれの ROS1-TKI に対しても濃度依存的な増殖抑制効果によって細胞生存活性が低下していく様子が観察された。Cabozantinib に対する IC50 (50% Inhibitory Concentration)は野生型細胞が 4.4 nM であるのに対し、それぞれ F2004V 変異細胞が 6.4 倍(28.3 nM)、F2075C 変異細胞が 5.7 倍(25.2 nM)の薬剤抵抗性を持っていることが明らかになった。そして、2 つの変異細胞はいずれの ROS1-TKI に対しても低濃度存在下(cabozantinib, crizotinib; 3-10 nM, lorlatinib; 0.03-0.3 nM)でのみ細胞生存活性が維持され、ROS1-TKI 非存在下では細胞生存活性が著しく減少し、生存・増殖できないことが観察された(図 3)。また、増殖 assay によって経時的な増殖活性を観察した結果、野生型細胞は cabozantinib 濃度依存的に増殖活性が抑制される一方、F2004, F2075C いずれの変異細胞においては 10 nM cabozantinib 存在下で細胞が増殖し、cabozantinib 未処理(0 nM), 1, 100 nM 処理では細胞増殖活性の著しい低下が観察された(図 4)。以上の結果から、F2004V および F2075C 変異細胞は ROS1-TKI に強く依存した生存・増殖機構(TKI addiction)を有する薬剤耐性がん細胞であることが示唆された。

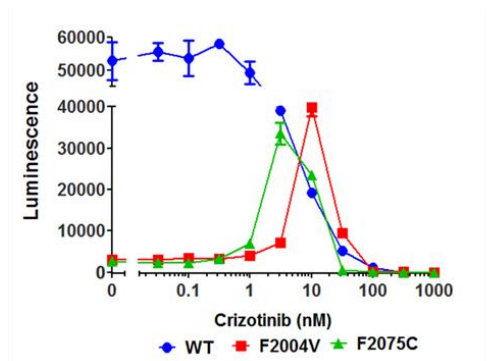
A



	IC50 (nM)
WT	4.4
F2004V	28.3*
F2075C	25.2*

*: Cell viability at 10 nM was regarded as standard.

B



C

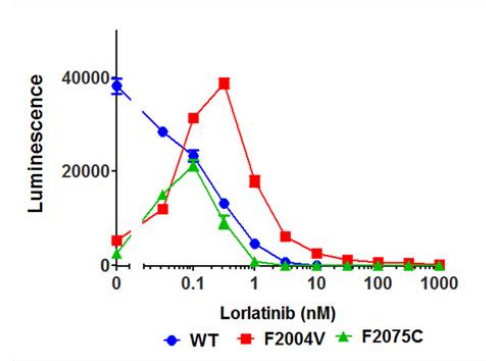


図 3. 野生型(WT)および TKI-addicted な変異細胞(F2004V, F2075C)の各種 ROS1-TKI 処理に伴う生存細胞数

(A) cabozantinib (右にそれぞれの細胞の IC50 を示す), (B) crizotinib, (C) lorlatinib 処理下における各細胞の生存率を CellTiter-Glo によって測定した。縦軸 (Luminescence) は発光量に依存した生存細胞数を示す。

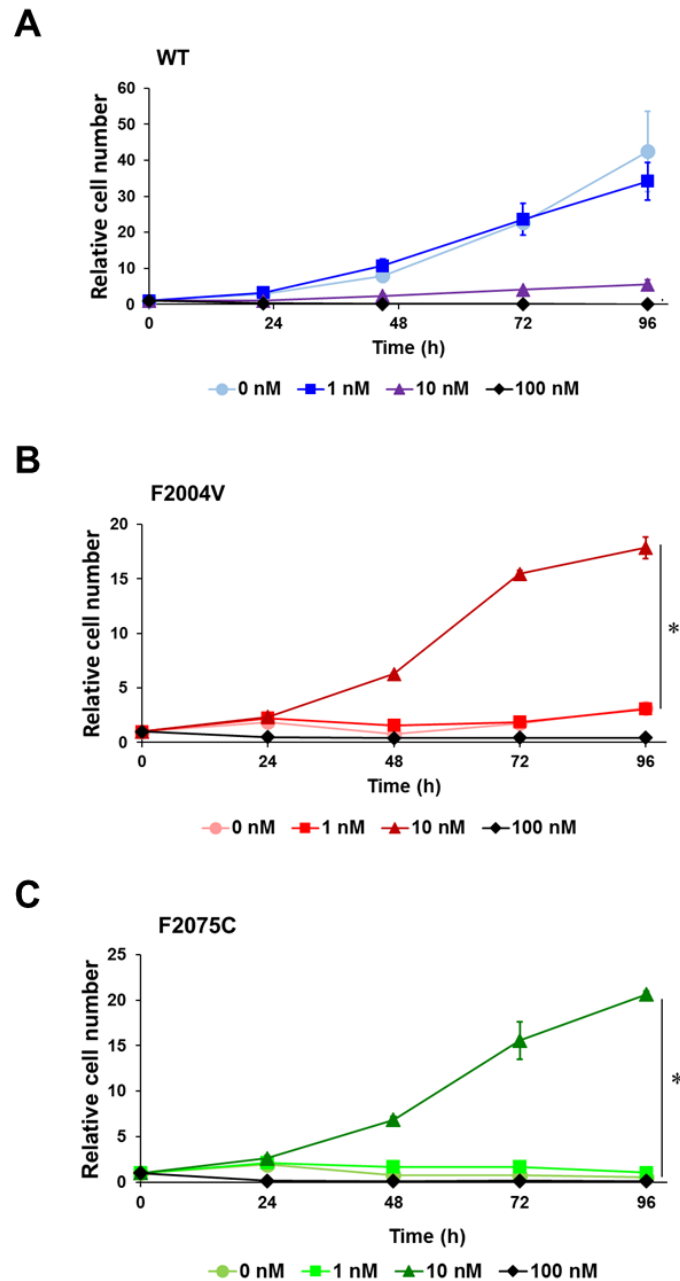


図 4. WT、F2004V および F2075C 変異細胞の cabozantinib 存在下における増殖活性
(A) 野生型細胞 (WT)、(B) F2004V および(C) F2075C 変異細胞の cabozantinib 各濃度
処理下における増殖活性を CellTiter-Glo によって測定した。縦軸 (Relative cell
number) は 0 時間での細胞生存数(CellTiter-Glo による発光強度)を基準とした各時間
での相対細胞生存数を示す。

* $p < 0.05$ (0 nM/10 nM 間)は t 検定により算出した。

1-3-2. Cabozantinib 有無における TKI-addicted な CD74-ROS1 変異細胞および野生型

CD74-ROS1 細胞の優位性評価

1-3-1 の結果を受けて、野生型細胞と F2004V もしくは F2075C 変異細胞が共存する環境における、ROS1-TKI の有無が細胞の生存や増殖に与える影響を観察しようと考えた。野生型細胞を緑色蛍光色素(PKH67) で染色し、その一方で F2004V および F2075C 変異細胞を赤色蛍光色素(PKH26)で染色した。蛍光染色された野生型細胞と F2004V もしくは F2075C 変異細胞のどちらか一方とをそれぞれ等しい細胞数で共培養した。Cabozantinib 10 nM 存在下で共培養する系と cabozantinib 非存在下で共培養する系とを用意し、それぞれの経時的な細胞数の比率変化をフローサイトメトリーにて測定した。Cabozantinib 10 nM 存在下で共培養した系においては、48 時間後には F2004V もしくは F2075C 変異細胞が共培養系内を占有する結果となった。その一方で、cabozantinib 非存在下で共培養した系においては野生型細胞が共培養系内を占有する結果となった(図 5)。

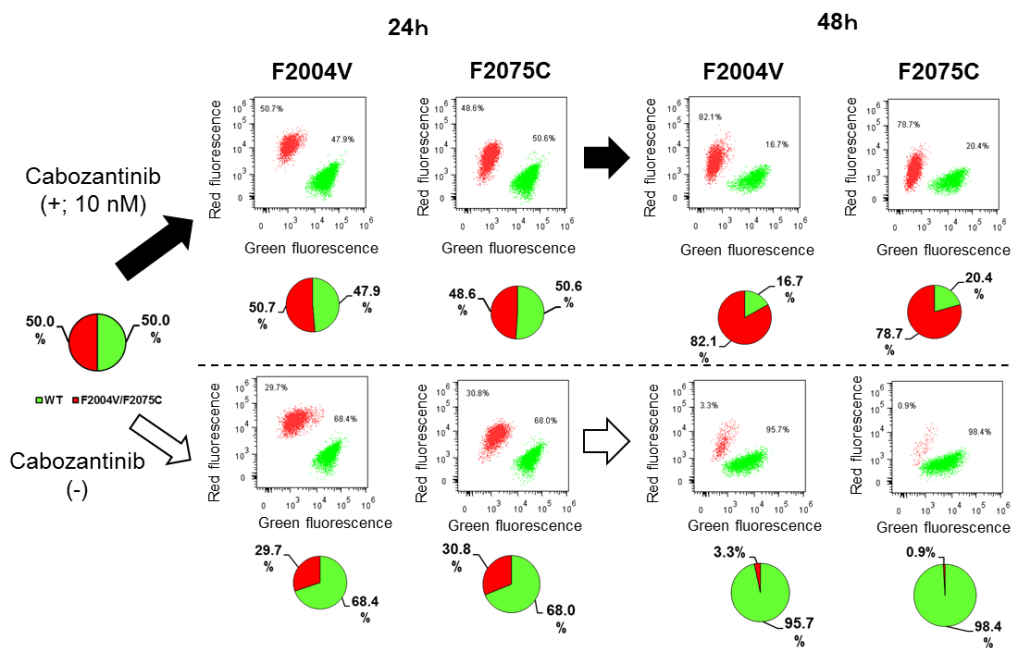


図 5. 野生型 (WT) と TKI-addicted な変異細胞 (F2004V および F2075C) との cabozantinib 有無による存在比率の変化

Cabozantinib 10 nM 処理 (上段) および cabozantinib 除去 (下段) 時の各細胞の存在比率の変化をフローサイトメトリーにて測定した。野生型細胞は緑色蛍光色素 (PKH67)、F2004V および F2075C 変異細胞はそれぞれ赤色蛍光色素 (PKH26) にて染色した。フローサイトメトリーの結果はドットプロットにて示し、各細胞の存在比率を円グラフにて示す。

1-4. 考察

以上の結果から、ROS1 キナーゼドメインに F2004V 変異もしくは F2075C 変異を有する CD74-ROS1 発現細胞は、野生型 CD74-ROS1 発現細胞と比較してやや高い cabozantinib 耐性を有することが明らかとなった。興味深いことに、cabozantinib や他の ROS1-TKI の低濃度存在下においてのみ生存・増殖活性を維持することができ、ROS1-TKI が存在しない状態では生存・増殖できない性質を有する、いわば ROS1-TKI-addicted な性質を有することが明らかとなった。今回見出された 2 つの変異箇所である ROS1 F2004 および F2075 部位は、ALK においては F1174 および F1245 に相当する(図 6)。ALK における F1174 および F1245 変異は、神経芽細胞腫における活性化変異部位であることが知られている[42]。ROS1 の F2075 および ALK の F1174 部位はキナーゼドメイン内 N 末端ローブに位置する α -C ヘリックスの一部であり、ROS1 の F2075 および ALK の F1245 部位はキナーゼドメイン内 C 末端ローブに位置している。それぞれのフェニルアラニン残基には互いに π - π 相互作用がはたらいており、キナーゼの活性化および不活性化状態を調節しているといわれている[43]。これらの部位に遺伝子変異が生じることで相互作用が破綻し、キナーゼドメインが活性化フォームを取りやすくなると考えられている。そのため、今回見出された F2004V および F2075C 変異 CD74-ROS1 においても上記のメカニズムを介した ROS1 活性化変異である可能性が十分に考えられる。ROS1 キナーゼドメインの F2004V および F2075C 変異によって ROS1 キナーゼ活性が非常に高くなり、なんらかのメカニズムを介して細胞の生存・増殖が不可能になることが示唆された。また、ROS1-TKI 低濃度処理によって F2004V および F2075C 変異細胞内の ROS1 活性を部分的に阻害することで、細胞の生存・増殖機能が促進されることが示唆された。

TKI-addicted な F2004V もしくは F2075C 変異細胞と、そのような性質を示さない野生型細胞とを共培養した実験により、ROS1-TKI による治療が野生型細胞の増殖を抑制する一方で、ROS1-TKI-addicted な変異型細胞の増殖を促進させるという結果が得られた。この実験系は患者体内における腫瘍内不均一性 (ITH; IntraTumor Heterogeneity)を模している。腫瘍内に様々な性質を持つクローンが共存している ITH という概念において、がん分子標的療法における ROS1-TKI の投与が腫瘍内の野生型 ROS1 発現クローンを駆逐する一方で、ROS1-TKI-addicted なクローンの増殖を促進させ、最終的にがんが増悪してしまうことが考えられる。

臨床現場においてこのような ROS1-TKI-addicted ながんの存在はいまだ報告されていない。しかしながら本研究結果から、このような TKI-addicted な性質を有するがん細胞の増

殖と死とを制御する二面的な制御機構を解析することで、薬剤耐性がんを克服する新たな治療法の開発を行う上で非常に重要な知見が得られることが期待される。

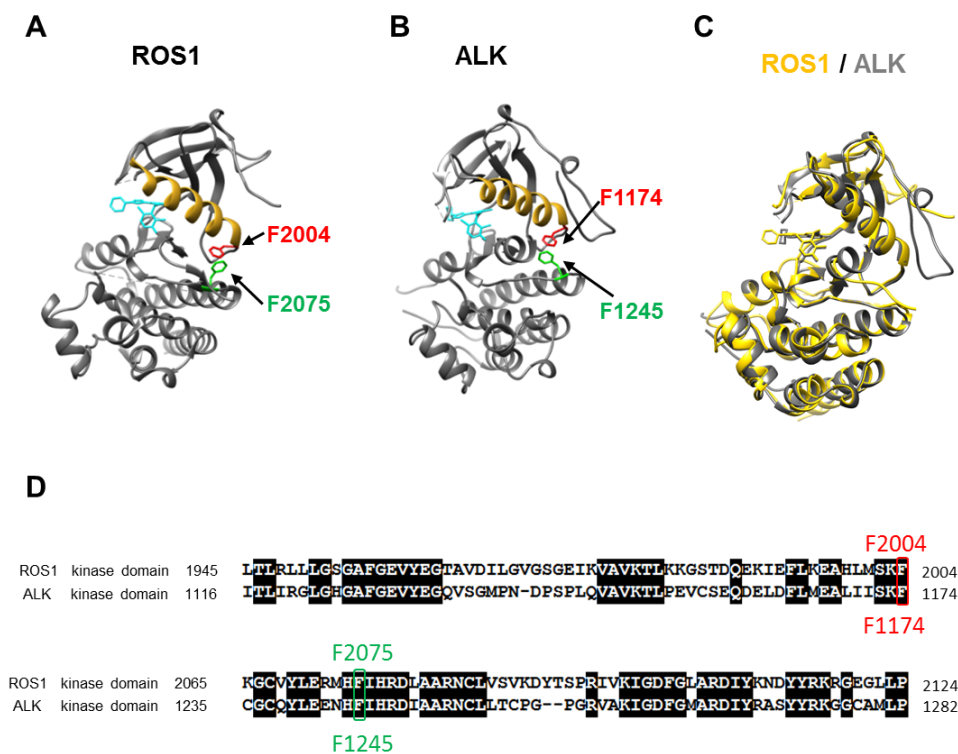


図 6. ROS1 および ALK キナーゼドメインの立体構造

(A) ROS1 (PDB: 3ZBF)および(B) ALK (PDB: 2XP2)の結晶構造に基づいた ROS1 F2004V および F2075C 変異箇所とそれらに相当する ALK F1174 および F1245 変異箇所の図示。チロシンキナーゼの活性化にとって重要な役割を担っている α -C ヘリックス部位を黄色、両者に共通する阻害剤である crizotinib を水色、変異箇所のアミノ酸残基をそれぞれ赤色および緑色に着色して示す。(C) ROS1 および ALK キナーゼドメインの立体構造を重ね合わせた図。ROS1 は黄色、ALK は灰色で示す。すべての結晶構造は UCSF Chimera software を用いて作成した。(D) ROS1 と ALK のキナーゼドメインのアライメント。ROS1-F2004 および ALK-F1174 を赤色で示し、ROS1-F2075 および ALK-F1245 を緑色で示す。

第二章 TKI-addicted ながん細胞のシグナル伝達解析

2-1. 目的

TKI-addicted な CD74-ROS1 陽性 Ba/F3 細胞である F2004V および F2075C 変異細胞の ROS1-TKI 有無による細胞内シグナル変化を観察することを目的として、ウェスタンブロット、フローサイトメトリー、定量的逆転写 PCR (Polymerase Chain Reaction)を用いた解析を行った。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 細胞培養

第一章と同様である。

2-2-2. 使用薬剤

使用薬剤は以下のとおりである。第一章で使用した薬剤に関して、溶媒を省略する。Crizotinib, cabozantinib, cycloheximide (CHX, ナカライテスク), rotenone (Cayman Chemical) CHX は MilliQ 水にて溶解し、Rotenone は DMSO にて溶解して使用した。

2-2-3. ウェスタンブロット

細胞ペレットを回収し、D-PBS(-) (PBS <Phosphate Buffered Saline>, 和光純薬工業)で洗浄した後、SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) lysis buffer^{*1}に懸濁し、100°C にて 5 分間加熱した。加熱したサンプルを 30 秒間 vortex して lysate を調製した。それぞれの lysate は BCA protein assay reagent (Thermo Fisher Scientific)を用い、製造元提供のプロトコールに従って定量(標準試料として reagent kit に付属の BSA <Bovine Serum Albumin>を使用し、BCA 発光強度は 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、同一タンパク濃度となるように SDS lysis buffer にて希釈した。希釈サンプルにそれぞれ 5×SDS sample buffer^{*2}を添加し、100°C にて 5 分間加熱した。

上記の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>)にアプライし、SDS-PAGE (SDS-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis)を行った。あらかじめ methanol (和光純薬工業)でコンディショニングし、Transfer buffer^{*3}にて平衡化した PVDF membrane (メンブレン, Millipore)に SDS-PAGE 後のゲル中のタンパク質を転写した。メンブレンを 5% skim milk (雪印メグミルク) TBST^{*4}溶液もしくは 2% BSA (ナカライテスク)TBST 溶液で室温にて 1 時間ブロッキング(表 M1)した後、適当な一次抗体溶液(5% BSA, 0.1% NaN₃<ナカライテスク>で希釈)(表 M1)に浸し、

4°C にて一晩振とうした。一次抗体反応後のメンブレンを TBST で洗浄した後、適当な二次抗体溶液(表 M1)に浸し、室温にて 1 時間振とうした。二次抗体反応後のメンブレンを TBST で洗浄した後、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo)にて処理し、LAS 3000 mini (Fujifilm)もしくは Amersham Imager 600 (GE Healthcare)を用いて化学発光シグナルを検出した。

画像処理は Photoshop software ver. 7.0 (Adobe)もしくは Multi Gause ver. 3.0 (Fujifilm)を使用した。シグナル強度の定量は Multi Gause ver. 3.0 を使用した。

*1: SDS lysis buffer

1% SDS (ナカライテスク), 10% glycerol (和光純薬工業), 100 mM Tris-HCl (pH 7.6) (Tris; Tris (hydroxymethyl)aminomethane <ナカライテスク>, HCl <和光純薬工業>)

*2: 5×SDS sample buffer

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)

*3: Transfer buffer

25 mM Tris, 192 mM glycine (ナカライテスク), 20%メタノール, MilliQ 水

*4: TBST (Tris-buffered saline with Tween20)

25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 125 mM NaCl (ナカライテスク), 0.2% Tween 20 (Sigma)

表 M1 使用した一次抗体、二次抗体、ブロッキング溶液(第二章)

1 st Antibody	入手先	Blocking buffer (TBST で溶解)	2 nd Antibody (1% BSA で希釈)
pROS1 (Tyr2274)	Cell Signaling Technology	2% BSA	Rabbit
ROS1 (D4D6)	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Rabbit
pERK (Tyr202/204)	Cell Signaling Technology	2% BSA	Rabbit
ERK	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Rabbit
pSTAT3 (Tyr705)	Cell Signaling Technology	2% BSA	Rabbit
STAT3 (79D7)	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Rabbit
Caspase-8 (D35G2)	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Rabbit
Cleaved-caspase-8 (D5B2)	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Rabbit
Caspase-9 (C9)	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Mouse
PARP	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Rabbit
BIM	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Rabbit
MCL-1 (D35A5)	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Rabbit
GAPDH	Millipore	5% skim milk	Mouse
β -actin	Sigma	5% skim milk	Mouse

2-2-4. フローサイトメトリー

フローサイトメトリーに供する細胞を回収し、Alexa Fluor 488 Annexin-V/Dead Cell Apoptosis Kit (Thermo Fischer Scientific)付属の染色用試薬を添加して室温、暗所にて 15 分間静置し、染色した。染色されたサンプルを同 Kit 付属の buffer にて懸濁し、フローサイトメトリーに供した。フローサイトメトリー測定において、scatter plot 上の SS および FS より細胞を判別し、ゲート解析により夾雑物由来の plot を排除してアポトーシス誘導された細胞群の比率を求めた。Cytomics FC500 を用いて測定し、FlowJo software ver. 7.6.5 を用いて解析した。

2-2-5. 定量的逆転写 PCR

測定に供する細胞を回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)にて RNA (ribonucleic acid)を抽出した。抽出した RNA から Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)を用いて cDNA 合成を行った。以上の過程はすべて製造元提供のプロトコールに従って行われた。合成された cDNA、目的とする遺伝子を増幅するためのプライマー^{*5}、FastStart Essential DNA Green Master (Roche)を混和し、LightCycler96 (Roche)を用いて表 M2 の条件の下、測定した。それぞれのサンプルは 3 連で測定され、平均値と標準偏差(SD, Standard Deviation)を求めた。野生型 CD74-ROS1 発現 Ba/F3 細胞由来の cDNA を標準試料として検量線を作成し、その検量線を用いて各サンプルの定量を行った。

*5: *ROS1*: 5'-TGGAGAAATCAAAGTAGCAGTGA-3' (forward),
5'-CATCAGATGTGCCTCCTTCA-3' (reverse)
GAPDH: 5'-CGSCTTCAACAGCAACTCCCCTTCC-3' (forward),
5'-TGGGTGGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT-3' (reverse).

PCR 条件は表 M2 に示す。

表 M2 定量的逆転写 PCR 条件

Step	Cycles	Temperature	Time
1	1	95° C	10:00
2	45	95° C	00:15
		60° C	01:00
3	1	95° C	00:10
		65° C	01:00
		97° C	00:01
4	1	37° C	00:30

2-2-6. 統計解析

統計解析は Student's *t*-test を用いて検定した。統計学的有意差は*を $p < 0.05$ として表記した。

2-3. 結果

2-3-1. ROS1-TKI 除去時における F2004V, F2075C 変異細胞内タンパク質の経時的变化

ROS1-TKI 除去後、F2004V および F2075C 変異細胞内の ROS1 活性やその下流のシグナル伝達経路の変動を調べるため、ウェスタンブロットによる解析を行った。10 nM cabozantinib 存在下で培養している F2004V および F2075C 変異細胞から cabozantinib を除去し、経時的なタンパク質変化を観察したところ、2 つの TKI-addicted な変異細胞において、CD74-ROS1 タンパク質の過剰な活性化と発現上昇が認められた。また、ROS1 シグナル伝達経路の下流因子として知られる ERK や STAT3 の過剰なリン酸化による活性化も認められた(図 7)。このような CD74-ROS1 やその下流の生存・増殖因子の過剰活性化が生じる一方で、アポトーシス関連因子である caspase-8 や PARP の切断によるアポトーシス誘導も観察された。その際、ミトコンドリア依存的なアポトーシスにより活性化される因子である caspase-9 切断の有無も観察したが、caspase-9 の切断による活性化は認められなかった。

フローサイトメトリーによるアポトーシスアッセイの結果においても、薬剤除去 48 時間後にはほぼすべての細胞がアポトーシスの誘導によって細胞死を生じていることが明らかになった(図 8)。

Cabozantinib や crizotinib の 0, 0.1, 1, 10, 100 nM 存在下における細胞内シグナル変化をウェスタンブロットにて観察したところ、前章において F2004V および F2075C 変異の生存・増殖促進が確認された 10 nM においてのみ、24 時間 PARP の切断が抑制されていることを確認した(図 9)。その際、CD74-ROS1 の発現量及びリン酸化体発現量はともに ROS1-TKI 未処理の野生型細胞と同レベルであった。

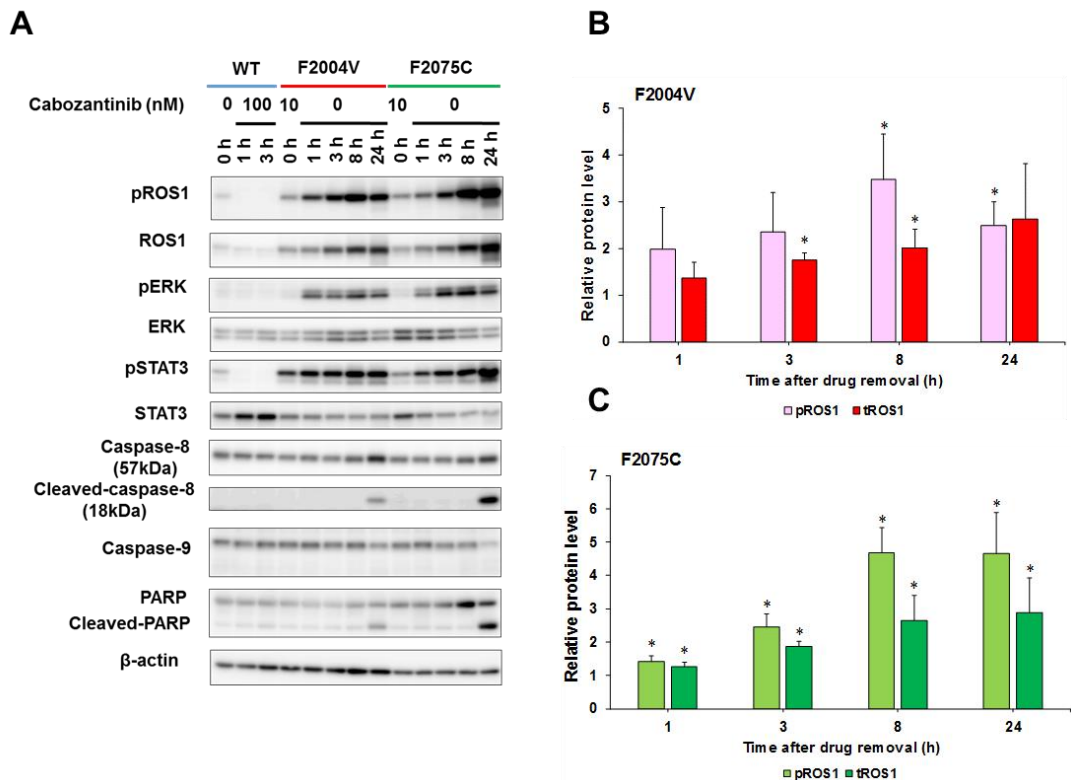


図 7. Cabozantinib 除去による CD74-ROS1、下流シグナルおよびアポトーシスシグナルの解析

(A) 野生型 CD74-ROS1 細胞 (WT) の未処理および 100 nM cabozantinib 処理サンプル、F2004V および F2075C 変異細胞の 10 nM cabozantinib 処理 (培養条件と同様) および除去サンプルをウェスタンブロットにより解析した。(B, C) Cabozantinib 除去時の F2004V (B) および F2075C (C) 変異細胞の CD74-ROS1 発現レベル (tROS1) およびリン酸化レベル (pROS1) をウェスタンブロットによるバンドを定量化して示した。それぞれの値は独立した 3 回の実験 (そのうち図 7A の結果を含む) によって得られた 0 時間での定量値を基準とした各時間の相対値である (平均値±SD)。

* $p < 0.05$ は t 検定により算出した (0 時間での値<相対値 1>との比較)。

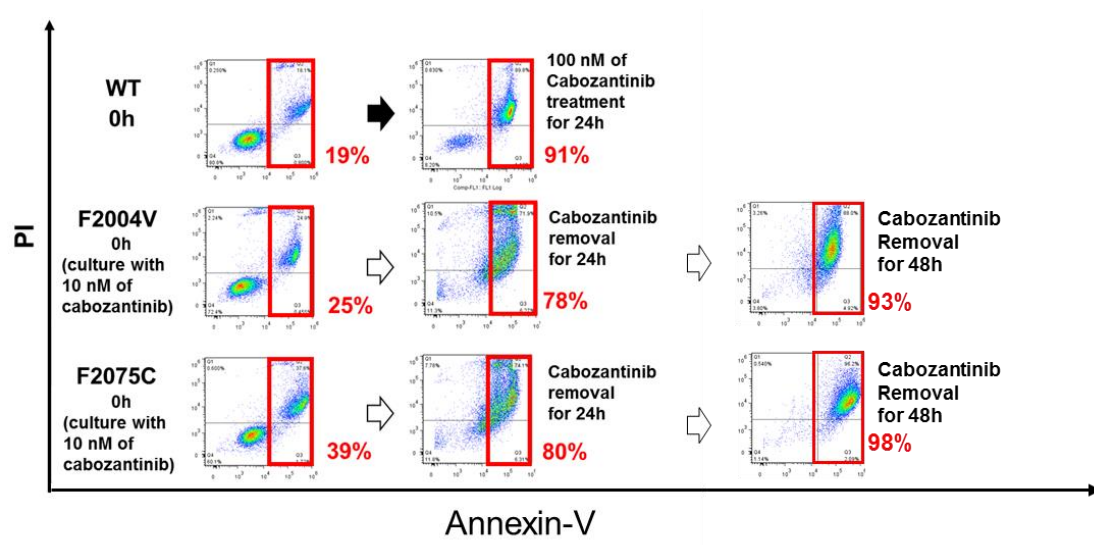
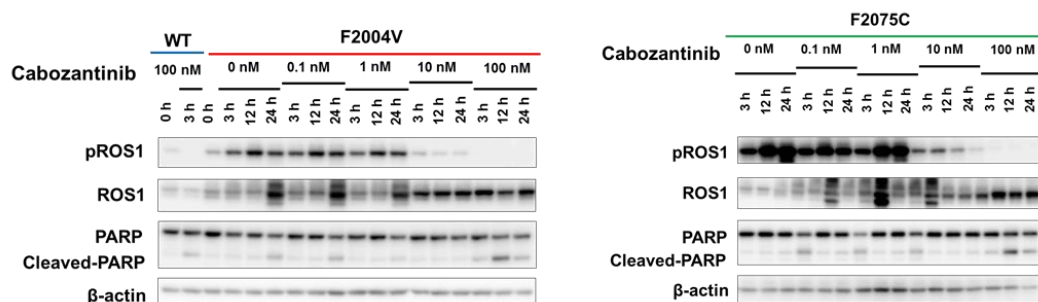


図 8. Cabozantinib 除去によるアポトーシスの誘導

100 nM cabozantinib 処理の野生型細胞 (WT)および cabozantinib 除去時における F2004V および F2075C 変異細胞のアポトーシス細胞群をフローサイトメトリーによって測定した。Alexa Fluor 488 Annexin-V/Dead Cell Apoptosis Kit によって細胞を Annexin-V および Propidium Iodide (PI)で染色した。アポトーシス陽性細胞群の比率を赤字で示した。

A



B

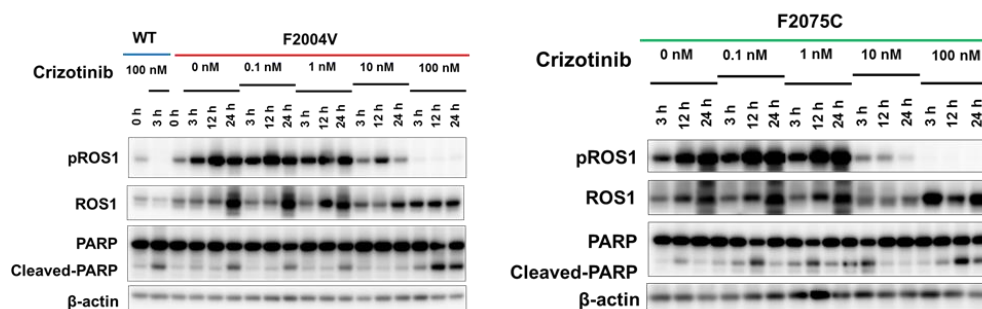


図 9. 低濃度 ROS1-TKI 処理による TKI-addicted な CD74-ROS1 変異細胞のアポトーシス抑制

野生型 CD74-ROS1 細胞 (WT)の未処理および 100 nM ROS1-TKI

(A; cabozantinib, B; crizotinib)処理サンプル、F2004V および F2075C 変異細胞の各濃度での ROS1-TKI (A; cabozantinib, B; crizotinib)処理サンプルをウェスタンブロットにより解析した。

2-3-2. ROS1-TKI 除去による CD74-ROS1-mRNA 転写量変化

ROS1-TKI 除去による CD74-ROS1 発現量の過剰な増加に対する *ROS1* 転写活性の影響を観察するため、*ROS1* の mRNA 量を定量的逆転写 PCR により測定した。10 nM cabozantinib 存在下での F2004V および F2075C 変異細胞はいずれも cabozantinib 未処理の野生型細胞と同等量の mRNA を発現していることが観察された。その一方で、薬剤除去時の F2004V および F2075C 変異細胞内 *ROS1*-mRNA 量は、有意な上昇を示すことが明らかとなった(図 10)。

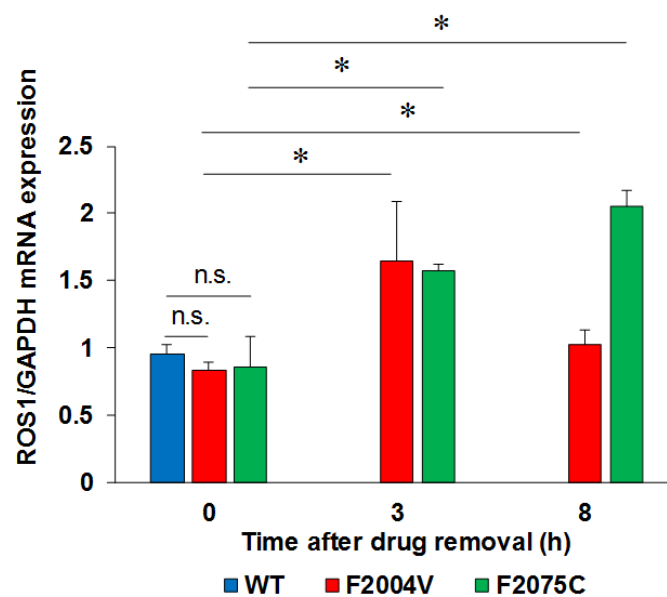


図 10. Cabozantinib 除去による CD74-ROS1 転写量変化

未処理の野生型細胞(WT)および cabozantinib 除去時の F2004V, F2075C 変異細胞における CD74-ROS1 の mRNA 発現レベルを定量的逆転写 PCR にて定量化して示した。それぞれの値は 3 回の測定によって得られた各時間における *GAPDH* mRNA 量を基準とした ROS1 mRNA 量の相対値である (平均値±SD)。

* $p < 0.05$ および n.s. (not significance; $p \geq 0.05$)は t 検定により算出した。

2-3-3. ROS1-TKI 除去による CD74-ROS1 タンパク質分解速度変化

CD74-ROS1 タンパク質の過剰な発現上昇がタンパク質安定性に与える影響を調べるため、タンパク質合成阻害剤 CHX を用いたタンパク質分解速度変化を解析した。F2004V および F2075C 変異細胞に 100 μ M CHX を 3 時間前処理し、cabozantinib を 10 nM 添加した系と除去した系に分け、CHX 存在下での経時的な CD74-ROS1 タンパク質の変化を観察した。その結果、10 nM cabozantinib 存在下の F2004V, F2075C 変異細胞に比べ、cabozantinib 非存在下での CD74-ROS1 タンパク質の分解が抑制されたことを認めた(図 11)。

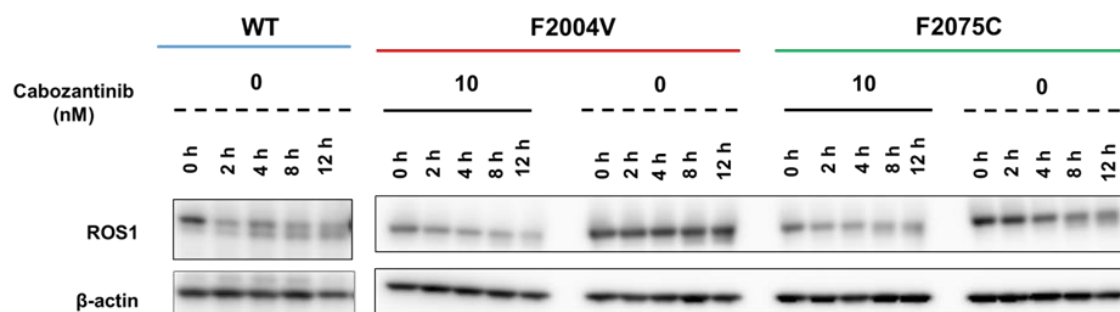


図 11. Cabozantinib 有無による CD74-ROS1 タンパク質分解速度変化

Cabozantinib 未処理の野生型 (WT)細胞および cabozantinib 10 nM 処理もしくは除去した F2004V および F2075C 変異細胞をウェスタンブロットにより解析した。それぞれのサンプルに対して 100 μ M のシクロヘキシミドによる処理を行った。F2004V および F2075C 変異細胞の cabozantinib 除去サンプルにおいては、cabozantinib 除去 3 時間前にシクロヘキシミドを前処理した。

2-3-4. ROS1 シグナルの過剰活性化による細胞死とシグナル遮断による細胞死との違い

Driver oncogene を有するがん細胞において、TKI によって MEK/ERK シグナル伝達経路が強く阻害されることで BIM (BCL2 like 11) の上昇が誘導されることが報告されている [44]–[46]。BIM のような BH3 ドメイン含有タンパク質は BAX (Bcl-2 like protein 7) や BAK (Bcl-2 like protein 4) を活性化し、ミトコンドリアからの cytochrome *c* 放出を促すことが知られている [47]。アポトーシス誘導因子である cytochrome *c* は caspase-9 や Apaf-1 (apoptotic activating factor-1) と相互作用を生じ、アポトソームと呼ばれる複合体を形成することで、caspase-3 活性化を介したミトコンドリア依存的なアポトーシスを誘導する [48] (図 12)。

これらの知見から、CD74-ROS1 発現細胞においても高濃度の ROS1-TKI 処理によりミトコンドリア依存的なアポトーシスの誘導が生じると考えられる。その一方で、ROS1-TKI 非存在下での F2004V および F2075C 変異細胞の細胞死には caspase-9 の寄与は認められなかった。したがって、ROS1 シグナルの過剰活性化による細胞死メカニズムと、ROS1 シグナルを強力に阻害することによる細胞死メカニズムには相違があると考えられる。そこで、F2004V および F2075C 変異細胞に高濃度の cabozantinib を処理し、その際のミトコンドリア誘導性アポトーシス関連因子の挙動やミトコンドリア膜電位の状態を観察した。

野生型細胞、F2004V および F2075C 変異細胞にそれぞれ 1 μ M の cabozantinib を処理し、経時的なタンパク質の変化をウェスタンブロットによって観察した。いずれの細胞も、高濃度 cabozantinib 処理によって ROS1 の活性化が強く抑制されるとともに、BIM の発現上昇、アポトーシス抑制因子である MCL-1 [49] の発現減少が認められるとともに、caspase-9 切断による活性化も観察された (図 13)。

ミトコンドリア依存的なアポトーシスが生じる際、ミトコンドリア膜は脱分極している [50]。そのため、ミトコンドリア膜電位の変化によって蛍光を発する試薬である JC-1 にて各細胞を染色し、1 μ M の cabozantinib 処理による各細胞のミトコンドリア膜電位の様子をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、F2004V および F2075C 変異細胞は 1 μ M の cabozantinib 処理によってミトコンドリア膜の脱分極が生じていることが明らかとなった。その一方で、cabozantinib 除去によるアポトーシス誘導時において、ミトコンドリア膜の脱分極は観察されなかった (図 14)。

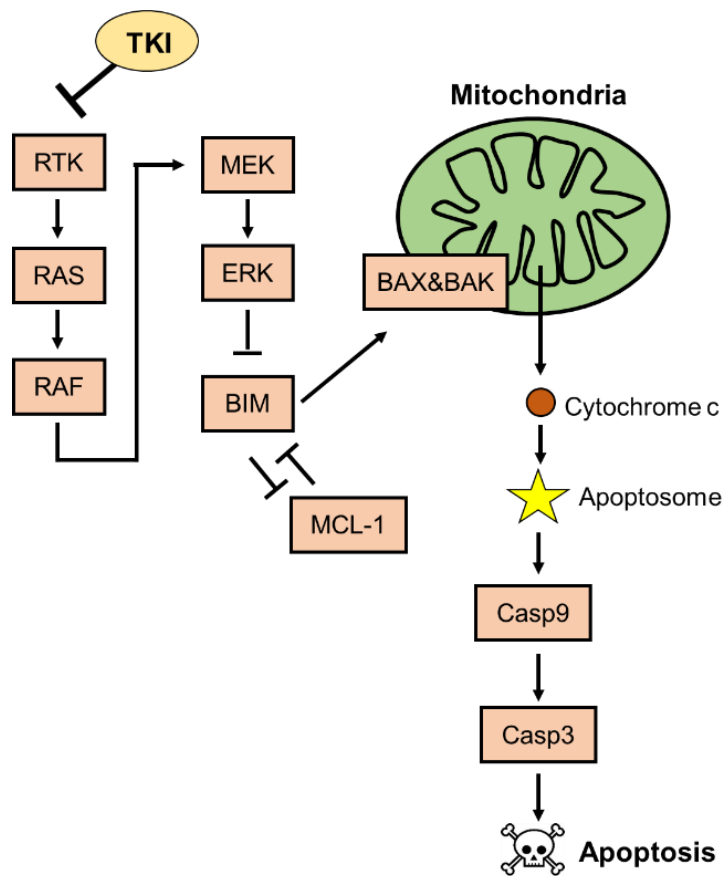


図 12. 高濃度 TKI 処理によるミトコンドリア依存性アポトーシスの誘導

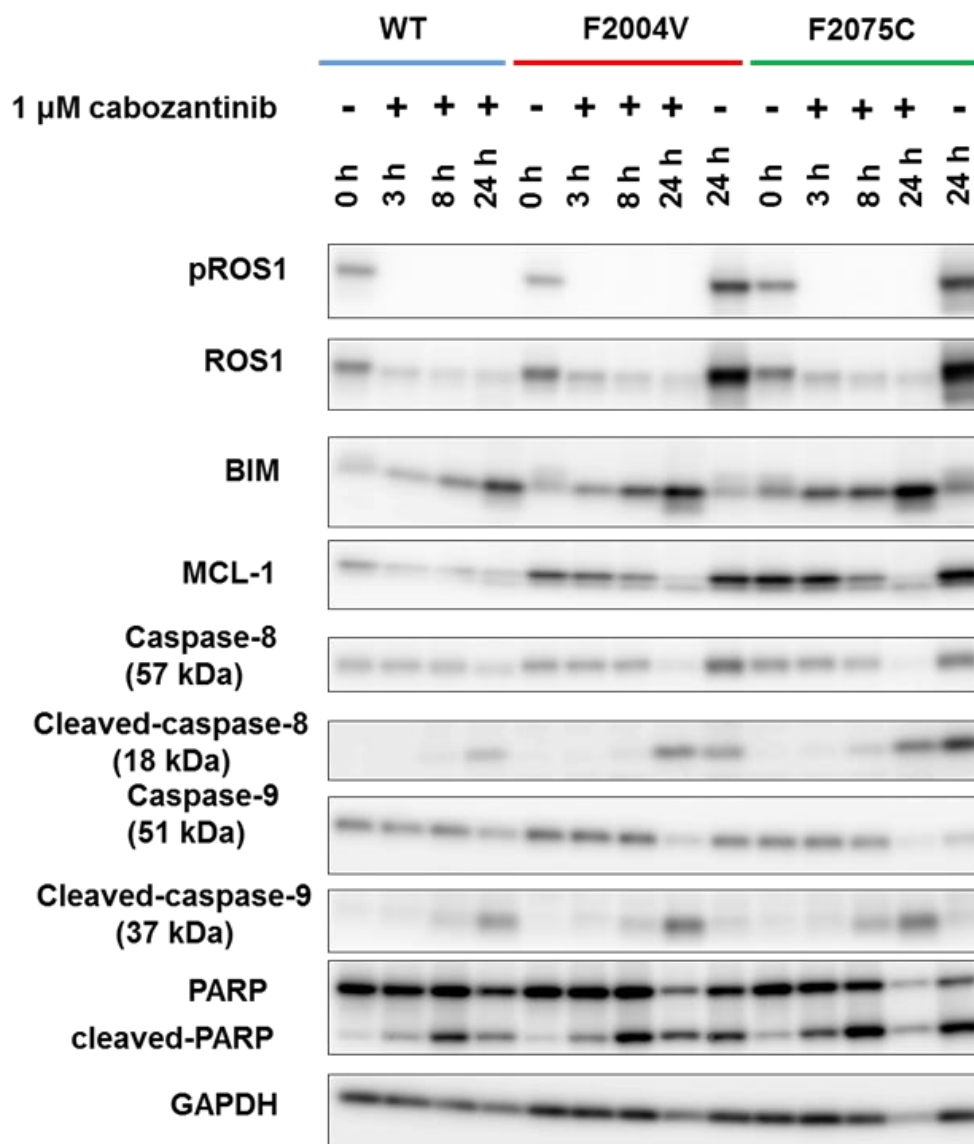


図 13. 高濃度 cabozantinib 処理および除去によるアポトーシス誘導機構の違い
1 μ M cabozantinib 処理の野生型 (WT)細胞、F2004V および F2075C 変異細胞をウェスタンブロットにより解析した。

A

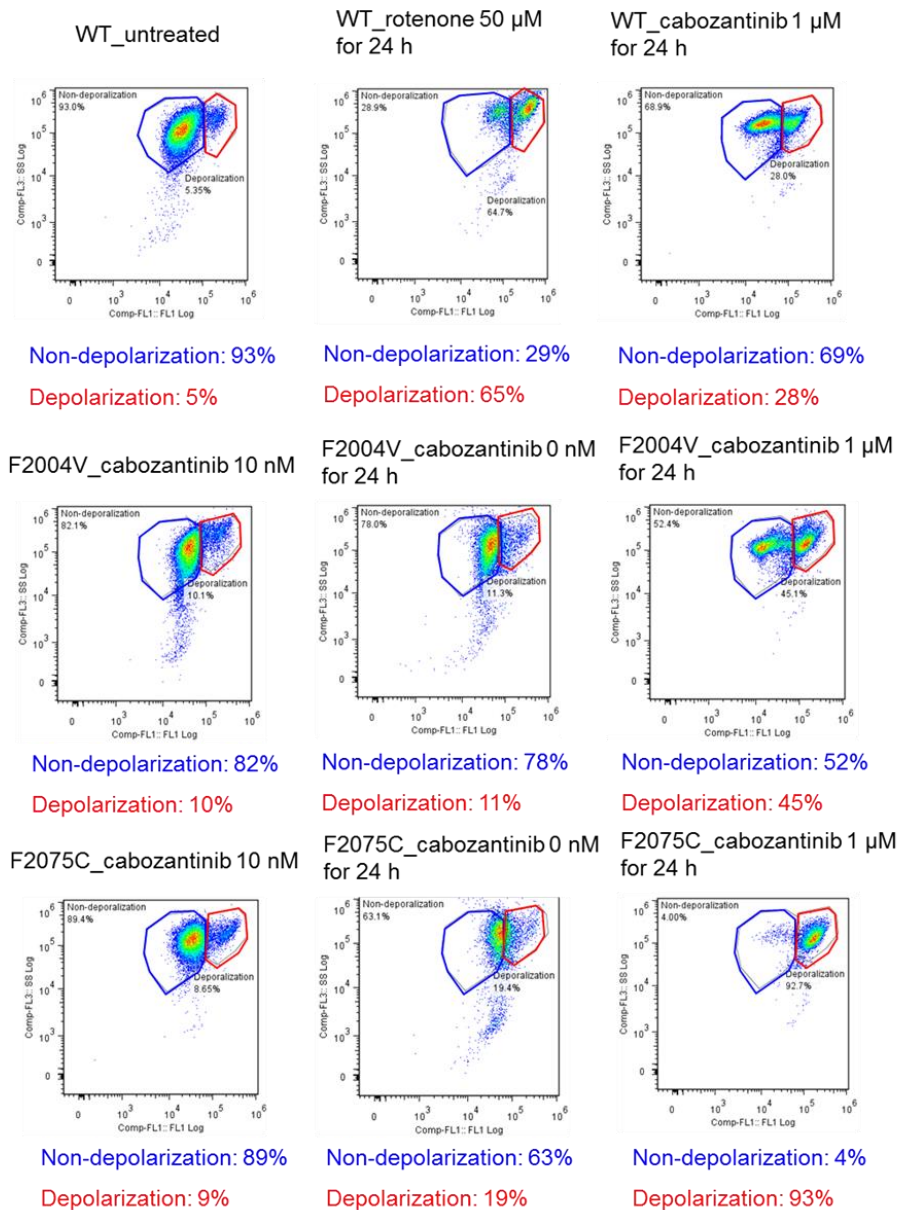


図 14. 高濃度 cabozantinib 処理によるミトコンドリア膜電位の脱分極

1 μ M cabozantinib 処理の野生型 (WT)細胞、F2004V および F2075C 変異細胞をミトコンドリア膜電位検出試薬 JC-1 によって染色し、フローサイトメトリーにてミトコンドリア膜電位の脱分極が誘導された細胞群を測定した。ロテノンはミトコンドリア電子伝達系阻害剤であり、ポジティブコントロールとして使用した。(A)フローサイトメトリーの density plot (n=1; representative)

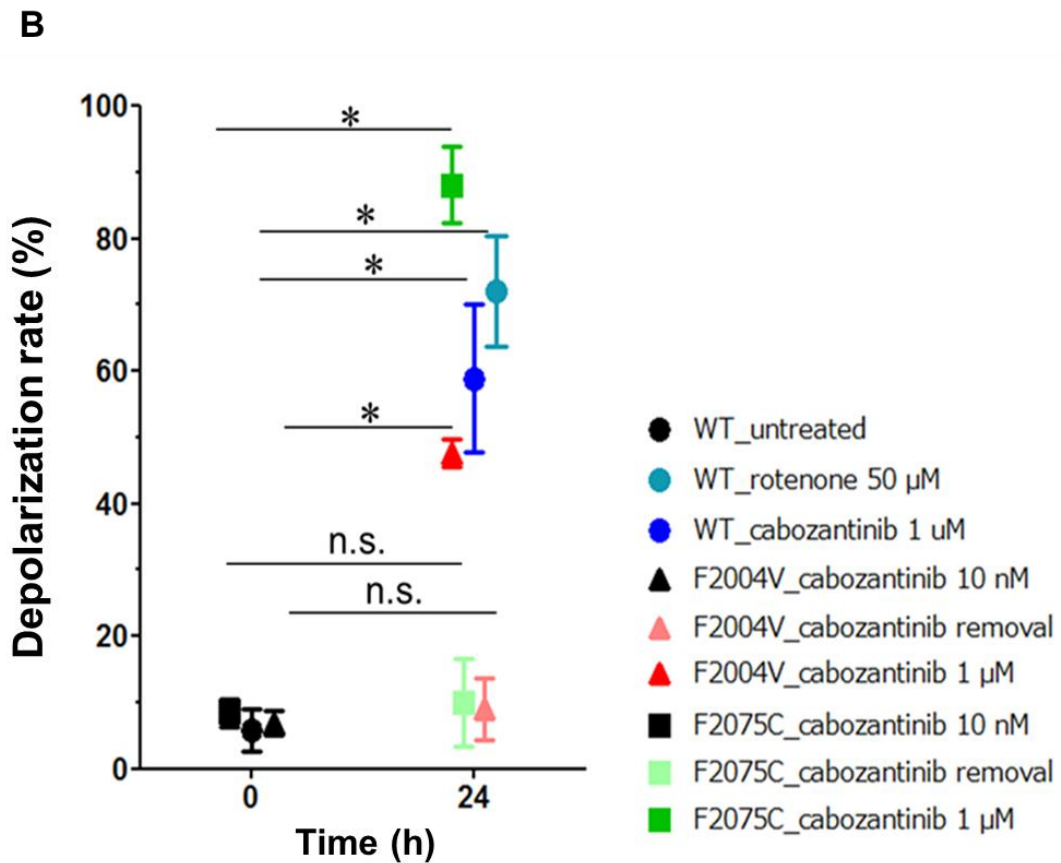


図 14. 高濃度 cabozantinib 処理によるミトコンドリア膜電位の脱分極（続き）

(B)独立した 3 回の実験によって得られたミトコンドリア膜電位の脱分極が生じた細胞数の比率 (平均値 \pm SD)。

* $p < 0.05$ および n.s. (not significance; $p \geq 0.05$)は t 検定により算出した。

2-4. 考察

以上の結果から、TKI-addicted な変異細胞である F2004V および F2075C 変異細胞は、ROS1-TKI 非存在下において CD74-ROS1 タンパク質の過剰な発現増加と活性化を生じていることが明らかとなった。それと同時に下流生存・増殖シグナル伝達経路の過剰活性化を生じるとともに、興味深いことにアポトーシスシグナルの活性化およびアポトーシスの誘導も認められた。さらにこれらの変異細胞における過剰な ROS1 シグナルによるアポトーシスには caspase-9 の寄与は認められず、caspase-8 の活性化が大きく貢献していることが示唆された。

定量的逆転写 PCR を用いた ROS1 mRNA 定量実験の結果から、ROS1-TKI 除去によって TKI-addicted な変異細胞中の CD74-ROS1 mRNA 量が増加していることを観察した。これは ROS1-TKI 非存在下において発生する過剰な ROS1 シグナルによって、転写活性増加に寄与する PI3K/AKT をはじめとする様々なシグナル経路の活性化により、転写活性化が生じることによるものと推察される。しかしながら本実験ではレンチウイルスベクターを用いて CMV プロモーターの下で CD74-ROS1 融合遺伝子を過剰発現させた細胞を用いているため、TKI addiction に特異的な現象であるかどうかについてはヒト腫瘍由来の細胞等を用いて今後検討する必要がある。

ROS1-TKI 有無によるタンパク質安定性の変化を調べた結果、ROS1-TKI 非存在下において F2004V および F2075C 変異細胞内では CD74-ROS1 に関わるタンパク質分解系の抑制が生じていることが示唆された。この結果から、ROS1-TKI 除去による過剰な ROS1 シグナルが、下流のシグナル伝達経路である PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達経路を活性化することで CD74-ROS1 タンパク質合成が促進され、細胞内に CD74-ROS1 タンパク質を蓄積させていることが考えられる。これらの異常な CD74-ROS1 タンパク質の蓄積と活性化が様々な細胞内イベントに作用し、その中のアポトーシスシグナル伝達経路を強く活性化させることで、アポトーシス誘導による細胞死に至ることが考えられる。

ミトコンドリア依存性アポトーシス関連因子の解析やミトコンドリア膜電位の観察により、F2004V および F2075C 変異細胞は野生型細胞と同様に高濃度の ROS1-TKI 処理によってミトコンドリア依存性アポトーシスが誘導されることが示唆された。過剰な ROS1 シグナルによる F2004V および F2075C 変異細胞には caspase-8 依存的なアポトーシスが関与していることから、ROS1 シグナルの過剰活性化による細胞死メカニズムと、ROS1 シグナルを強力に阻害することによる細胞死メカニズムには相違があることが明らかとなった。これらのメカニズムの相違点を利用し、driver oncogene シグナル伝達経路を特異的に活性化させることで細胞死を誘導するといったような、新たな治療戦略も期待できる。

第三章 TKI-addicted ながん細胞の再構築

3-1. 目的

前章までの研究により、ENU mutagenesis スクリーニングによって得られた F2004V および F2075C 変異細胞は、ROS1-TKI 非存在下において過剰な ROS1 シグナルによってアポトーシスが誘導されることを観察した。ENU mutagenesis 法は ENU によって細胞内 DNA 中の塩基にランダムなアルキル化を誘導することによって遺伝子変異を誘発する手法である [51]。そのため、今回 ENU mutagenesis スクリーニングによって得られた F2004V および F2075C 変異細胞は CD74-ROS1 以外の遺伝子に変異が入っている可能性がある。前章までの研究によって観察された過剰な ROS1 シグナルによるアポトーシスが CD74-ROS1 の変異に特異的な現象であることの確認を目的として、レンチウイルスベクターを用いた変異型 CD74-ROS1 の過剰発現細胞を樹立することとした。また、そのような人為的に作製された変異型 CD74-ROS1 の過剰発現細胞の性質を詳細に調べるため、cell viability assay、ウェスタンブロットおよびフローサイトメトリーを用いたアポトーシスアッセイを用いた解析を実施した。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 細胞培養

いずれの細胞も 37°C, CO₂ 5% インキュベータ内で培養した。

- 293FT 細胞(Invitrogen)

培地: D-MEM high glucose, 10% Tet system approved FBS (Clontech), 0.1 mM Non-Essential Amino Acids, 6 mM L-glutamine (293FT 用 D-10)

- Doxycycline (DOX)誘導性 CD74-ROS1 WT (野生型) + CD74-ROS1 WT 発現 Ba/F3 細胞 (WT + dox-inducible CD74-ROS1 WT)

培地: D-MEM low glucose / 10% Tet system approved FBS (Tet 用 D-10)

- DOX 誘導性 CD74-ROS1 WT + CD74-ROS1 WT 発現 Ba/F3 細胞 (WT + dox-inducible CD74-ROS1 F2075C)

培地: Tet 用 D-10

- Reconstructed F2075C

培地: Tet 用 D-10

3-2-2. 使用薬剤

使用薬剤は以下のとおりである。前章までに使用した薬剤に関して、溶媒の記載は省略する。

Crizotinib, cabozantinib, lorlatinib, doxycycline hyclate (DOX, ナカライテスク)

Doxycycline hyclate は MilliQ 水にて溶解して使用した。

3-2-3. レンチウイルス作製

WT CD74-ROS1 導入 pEN_TTmcs (Addgene #23755) (所属研究室により作製; Spe I および Xba I 部位でのクローニング)を鋳型として、QuickChange II Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent)を用いて F2075C CD74-ROS1 導入 pSLIK-Neo を PCR^{*8}(表 M3)によって作成、増幅した。PCR 産物をゲル電気泳動^{*9}した後、GFX PCR DNA and Gel Band purification Kit (GE Healthcare)を用いて製造元プロトコールに従ってゲル抽出し、エタノール沈殿によって F2075C CD74-ROS1 導入 pEN_TTmcs を精製した。その後、このプラスミドを DH5 α competent cell (タカラバイオ)に形質転換^{*10}した。形質転換された大腸菌のコロニーを採取し、LB 培地(10 μ g/mL gentamycin <ナカライテスク>含有)にて培養し、増殖した大腸菌から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて製造元提供のプロトコールに従ってプラスミドを抽出した。WT/F2075C CD74-ROS1 導入 pEN_TTmcs と pSLIK-Neo (Addgene #25735)を LR 反応^{*11}によって組み換えを行い、WT/F2075C CD74-ROS1 導入 pSLIK-Neo を作製した。

それぞれのプラスミドを Stbl3 competent cell (Invitrogen)に形質転換^{*10}した。形質転換された大腸菌のコロニーを採取し、LB 培地(100 μ g/mL ampicillin <和光純薬工業>含有)にて培養し、増殖した大腸菌から EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)を用いて製造元提供のプロトコールに従ってプラスミドを抽出した。

それぞれのプラスミドを 3 μ g 採取し、9 μ g Virapower (Invitrogen)、1.5 mL OPTI-MEM (Invitrogen)を混和し、5 分間室温にて培養した。この混合液と lipofectamine mix. (36 μ L Lipofectamine 2000 <Invitrogen>, 1.5 mL OPTI-MEM の混合液)を混和し、20 分間室温にて培養した。あらかじめトリプシン処理した 293FT 細胞 5×10^6 cells/293FT 用 D-10 7 mL に混合液を添加し、混和した後に 37°C, CO₂ 5% インキュベータ(バイオセーフティレベル 2)内で 7 時間培養した。7 時間後、14 mL 293FT 用 D-10 に培地交換し、同インキュベータ内で 48~72 時間培養した。48~72 時間経過後、感染された細胞を培地ごと回収し、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、目的レンチウイルスを回収した。

*8: 使用プライマーおよび反応 buffer (F2075C 変異導入)

・使用プライマー

5'-GAACGGATGCATTGCATTCACAGGGATCTGG-3' (forward),

5'-CCAGATCCCTGTGAATGCAATGCATCCGTTC-3' (reverse)

・反応 buffer

KOD plus neo (東洋紡) 0.4 μ L, KOD buffer (東洋紡) 2 μ L, 25 mM MgSO₄ (東洋紡) 1.6 μ L, 2 mM dNTPs (東洋紡) 2 μ L, 10 μ M プライマー(forward/reverse) 各 1.5 μ L, template DNA 20 μ g を混和し、MilliQ 水で 20 μ L とした。

PCR 条件は表 M3 に示す。

表 M3 PCR 条件(F2075C 変異導入)

Step	Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	08:00
2	14	95°C	00:30
		55°C	01:00
		68°C	06:00
3	1	68°C	05:00
4	1	4°C	∞

*9: ゲル電気泳動

1 % agarose (和光純薬工業)/TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM 酢酸<和光純薬工業>, 1 μ M EDTA<和光純薬工業>, MilliQ 水) with EtBr (Roche)のゲルを作成し、そこに 10 \times loading buffer (タカラバイオ)を添加したサンプルをアプライし、50V で約 30 分間泳動した。

*10: 形質転換

DH5 α : 製造元プロトコールに従って形質転換し、10 μ g/mL gentamycin 含有 LB 寒天培地 (Beckton, Dickinson)にて 37°C インキュベータ内で大腸菌を培養した。

Stbl3: 製造元プロトコールに従って形質転換し、100 μ g/mL ampicillin 含有 LB 寒天培地にて 37°C インキュベータ内で大腸菌を培養した。

*11: LR 反応

150 μ g WT CD74-ROS1 導入 pENTT_mcs と 150 μ g pSLIK-Neo、1 μ L LR clonase enzyme mix (Invitrogen)を混和し、TE buffer (QIAGEN)で 4 μ L とした。調製した混合液を室温にて 1 時間静置した後、1 μ L Proteinase K (Invitrogen)を添加し、37°C にて 10 分間培養して LR 反応物を作製した。

3-2-4. WT + dox-inducible CD74-ROS1 WT/F2075C 樹立

野生型 CD74-ROS1 発現 Ba/F3 細胞 2×10^6 cells/Tet 用 D-10 1 mL に 4 mg/mL ポリブレン 8 μ L と WT CD74-ROS1 導入 pSLIK-neo もしくは F2075C CD74-ROS1 導入 pSLIK-neo 導入レンチウイルス液を添加し、2200 g で 32°C にて 1 時間遠心分離した。その後 Tet 用 D-10 6 mL を添加し、37°C, CO₂ 5% インキュベータ(バイオセーフティレベル 2)内で 24 時間培養した後、Tet 用 D-10 10 mL に培地交換した。これらの細胞を継代しつつ、750 μ g/mL G418 (Gibco)を約 10 日間処理し、目的プラスミドが導入された細胞を選択した。

3-2-5. 限界希釈法によるクローン単離

3-2-4 により樹立された WT + dox-inducible CD74-ROS1 WT もしくは WT + dox-inducible CD74-ROS1 F2075C をそれぞれ 0.3 cells, 1 cells /well/200 μ L Tet 用 D-10 となるよう希釈し、各密度につき 3 枚の 96 well plate に播種し、37°C, CO₂ 5% インキュベータ内で 7~10 日間培養した。単一クローンから増殖している細胞を目視にて選択し、WT + dox-inducible CD74-ROS1 WT から 96 クローン、WT + dox-inducible CD74-ROS1 F2075C から 93 クローンを採取した。

3-2-6. Cell viability assay

第一章と同様の方法で行った。

3-2-7. 増殖 assay

第一章と同様の方法で行った。

3-2-8. ウェスタンブロット

第二章と同様の方法で行った。使用した抗体やブロッキング溶液についても第二章で示したものと同一である。

3-2-9. フローサイトメトリー

第二章と同様の方法で行った。

3-2-10. 統計解析

第一章と同様の方法で行った。

3-3. 結果

3-3-1. ドキシサイクリン (DOX) 誘導型レンチウイルスベクターを用いた F2075C 変異細胞の樹立

DOX 添加により厳密な発現制御が可能なレンチウイルスベクターである pSLIK ベクターに野生型(WT) *CD74-ROS1* と変異型 *CD74-ROS1* F2075C をそれぞれ組み込み、それらのベクターを野生型 *CD74-ROS1* 発現 Ba/F3 細胞へ遺伝子導入し、目的遺伝子の発現をウェスタンブロット解析により確認した後、それぞれの遺伝子導入細胞を限界希釈法によりクローン単離した(図 15)。DOX 誘導性 *CD74-ROS1* WT ベクターを導入した細胞を WT +dox-inducible *CD74-ROS1* WT とし、DOX 誘導性 *CD74-ROS1* F2075C ベクターを導入した細胞を WT +dox-inducible *CD74-ROS1* F2075C として以降の研究に用いた。

それぞれの樹立細胞のクローンについて、DOX 添加して目的の遺伝子を発現させた上で、cabozantinib 0 (未処理)、3、100 nM 処理における各クローンの細胞生存率を cell viability assay により測定した。その結果、WT +dox-inducible *CD74-ROS1* WT においては cabozantinib 3 nM 処理によって増殖が促進されるクローンは見出されなかったが、WT +dox-inducible *CD74-ROS1* F2075C においては cabozantinib 3 nM 処理によって増殖が促進されるいくつかのクローンが見出された(図 16)。

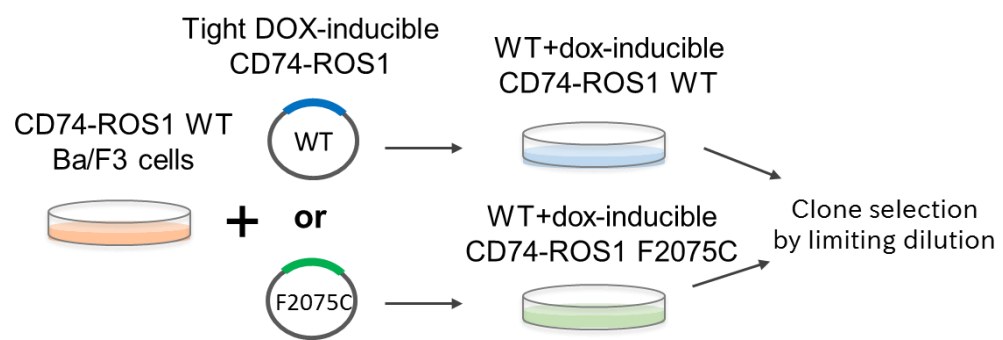


図 15. ドキシサイクリン (DOX)誘導性ベクターを用いた CD74-ROS1 過剰発現細胞の樹立

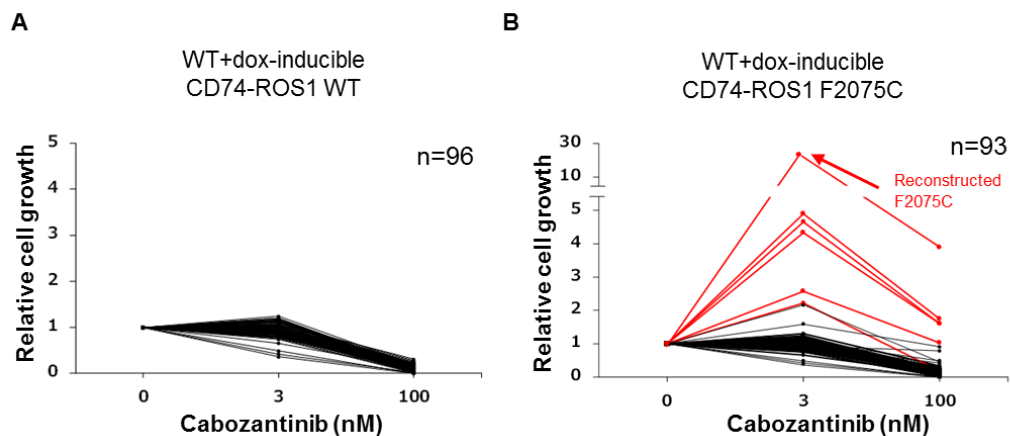


図 16. CD74-ROS1 過剰発現細胞の cabozantinib に依存した細胞増殖活性

(A) WT+dox-inducible CD74-ROS1 WT および (B) WT+dox-inducible CD74-ROS1 F2075C を限界希釈法によりクローン単離した後、1 $\mu\text{g/mL}$ DOX 添加によって目的遺伝子の発現を誘導した上で、各濃度 cabozantinib 処理下における生存細胞数を CellTiter-Glo により測定した。縦軸 (Relative cell growth) は cabozantinib 未処理における各クローンの増殖活性を基準として、各濃度 cabozantinib 処理下における相対細胞増殖活性を示す。(B)において、顕著に 3 nM cabozantinib 存在下での細胞増殖活性を示した 6 クローンを赤色で示し、もっとも細胞増殖活性の高かったクローンを reconstructed F2075C としてその後の解析・評価に用いた。

3-3-2. 再構成 F2075C 変異細胞 (Reconstructed F2075C) を用いた TKI addiction の再現

3-3-1.の実験から得られた TKI-addicted な WT +dox-inducible CD74-ROS1 F2075C クローンの内、最も顕著な ROS1-TKI 依存的増殖を示すクローンを reconstructed F2075C とし、この細胞が前章までの研究で明らかにされた TKI addiction の性質を有しているかを検討した。

ROS1-TKI である cabozantinib, crizotinib, lorlatinib が reconstructed F2075C の生存・増殖にどのように影響するかを、cell viability assay により検討した。DOX 未添加により F2075C 変異 *CD74-ROS1* 遺伝子の発現を抑制した reconstructed F2075C は、野生型 CD74-ROS1 発現細胞と同様に ROS1-TKI 濃度依存的な細胞増殖抑制効果を示した。しかしその一方で、1 $\mu\text{g/mL}$ DOX 添加によって F2075C 変異 *CD74-ROS1* 遺伝子が発現誘導された reconstructed F2075C においては、低濃度の cabozantinib, crizotinib, lorlatinib 存在下において細胞の生存および増殖が促進され、逆にこれらの ROS1-TKI 非存在下では細胞増殖が著しく阻害される様子が観察された(図 17A-C)。ウェスタンブロットにより、DOX 添加時の reconstructed F2075C は ROS1-TKI 非存在下において時間依存的な CD74-ROS1 の過剰な発現および活性化を示し、caspase-8 依存的なアポトーシスが誘導されることが観察された。そして、10 nM cabozantinib 処理後 24 時間後には過剰な ROS1 シグナルは部分的に抑制され、同時に caspase-8 依存的なアポトーシス誘導も抑制されることを観察した(図 17D)。

Cabozantinib 0 (未処理)、1、10、100nM 処理における reconstructed F2075C (DOX 未処理/1 $\mu\text{g/mL}$ 処理)の経時的な増殖活性を観察したところ、DOX 未添加の reconstructed F2075C では cabozantinib 処理濃度に依存して細胞の増殖活性が抑制されるが、1 $\mu\text{g/mL}$ DOX 添加の reconstructed F2075C は 10 nM cabozantinib 処理された条件において細胞の増殖が促進されるが、cabozantinib 0 (未処理)、1、100 nM 処理では細胞の増殖活性が著しく抑制されていることが明らかとなった(図 18)。

1 $\mu\text{g/mL}$ DOX 添加によって CD74-ROS1 F2075C が発現された reconstructed F2075C を 10 nM cabozantinib 存在下で 7 日間培養して十分に馴化した後、1 $\mu\text{g/mL}$ DOX 存在下で cabozantinib を 48 時間除去した細胞と DOX 非存在下で cabozantinib を 48 時間除去した細胞とをフローサイトメトリーを用いたアポトーシスアッセイによって評価した。DOX および cabozantinib が添加されていない reconstructed F2075C のアポトーシス誘導はほとんど観察されないが、DOX 添加の上 cabozantinib 非存在下で培養された reconstructed F2075C においてはアポトーシスの誘導が観察された(図 19)。

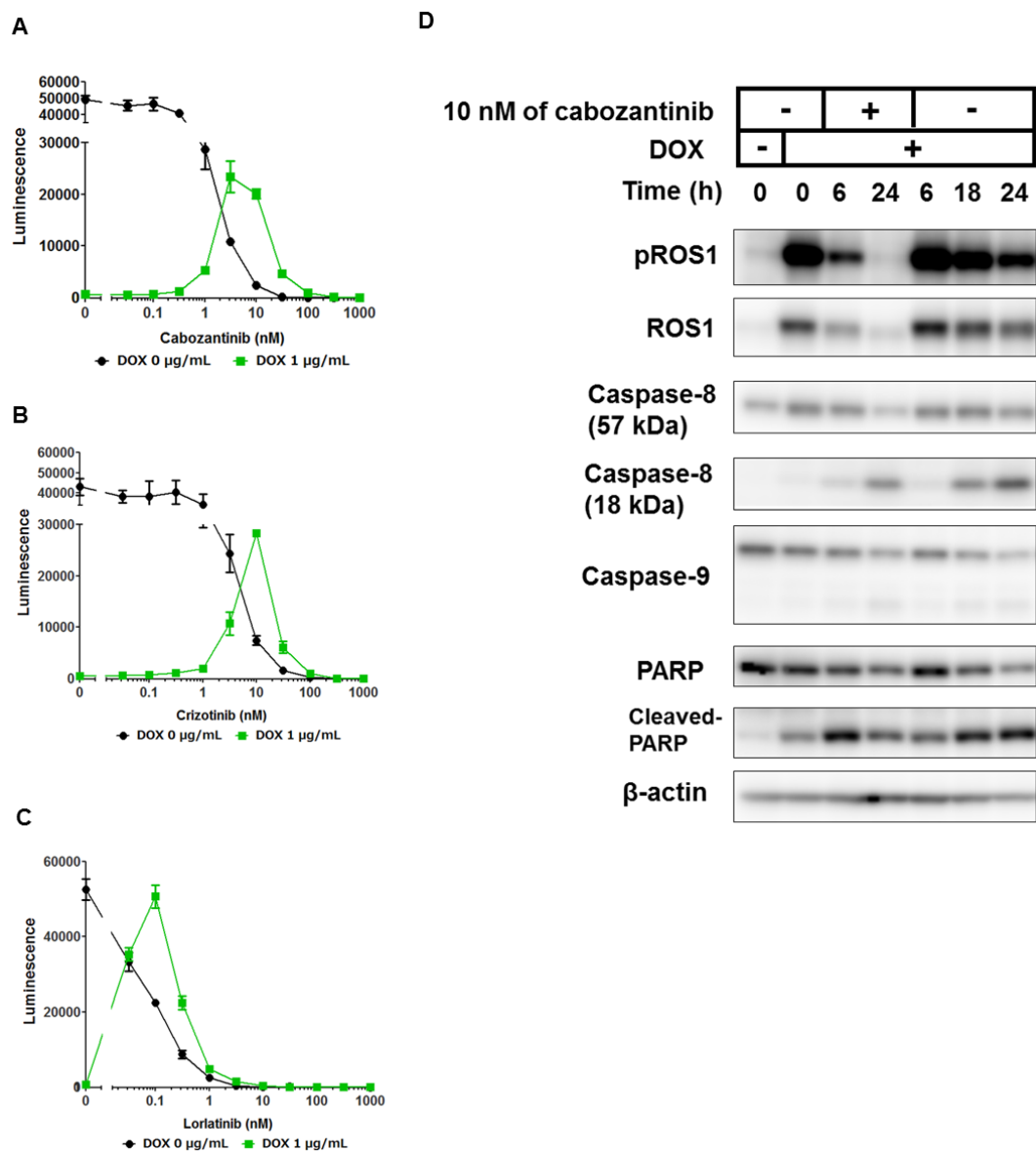
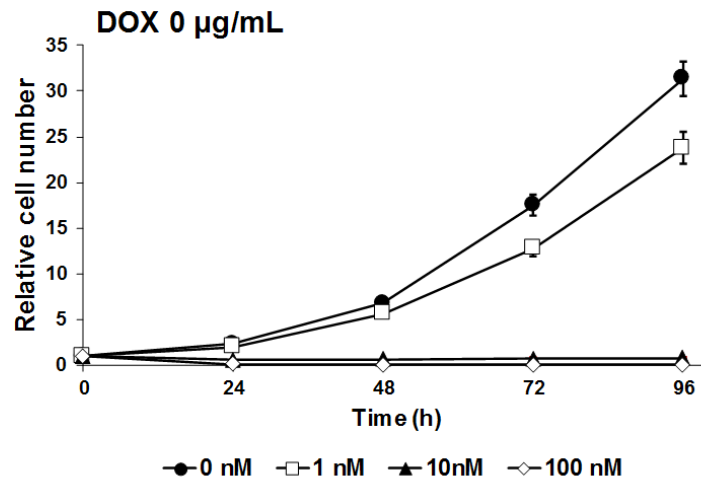


図 17. Reconstructed F2075C の各種 ROS1-TKI 処理に伴う生存細胞数および細胞生存シグナル伝達機構

(A) cabozantinib, (B) crizotinib, (C) lorlatinib 処理下における各細胞の生存率を CellTiter-Glo によって測定した。縦軸 (Luminescence) は発光量に依存した生存細胞数を示す。

(D) DOX 未添加/添加処理における reconstructed F2075C の cabozantinib 有無による ROS1 シグナル強度とアポトーシス誘導機構をウェスタンブロットにより解析した。DOX(+)のサンプルはあらかじめ 24 h の 1 μ g/mL DOX 前処理を施した。

A



B

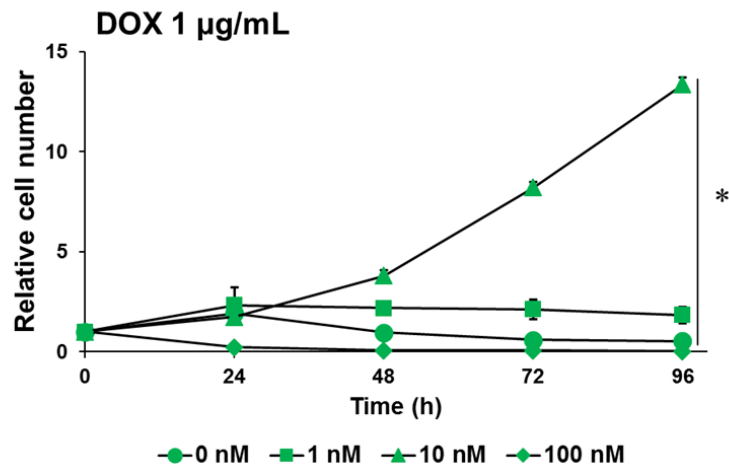


図 18. Reconstructed F2075C の cabozantinib 存在下における増殖活性

(A) DOX 未処理および(B) 1 µg/mL DOX 添加時 Reconstructed F2075C の cabozantinib 各濃度処理下における増殖活性を CellTiter-Glo によって測定した。縦軸 (Relative cell number) は 0 時間での細胞生存数 (CellTiter-Glo による発光強度) を基準とした各時間での相対細胞生存数を示す。

* $p < 0.05$ (0 nM/10 nM 間)は t 検定により算出した。

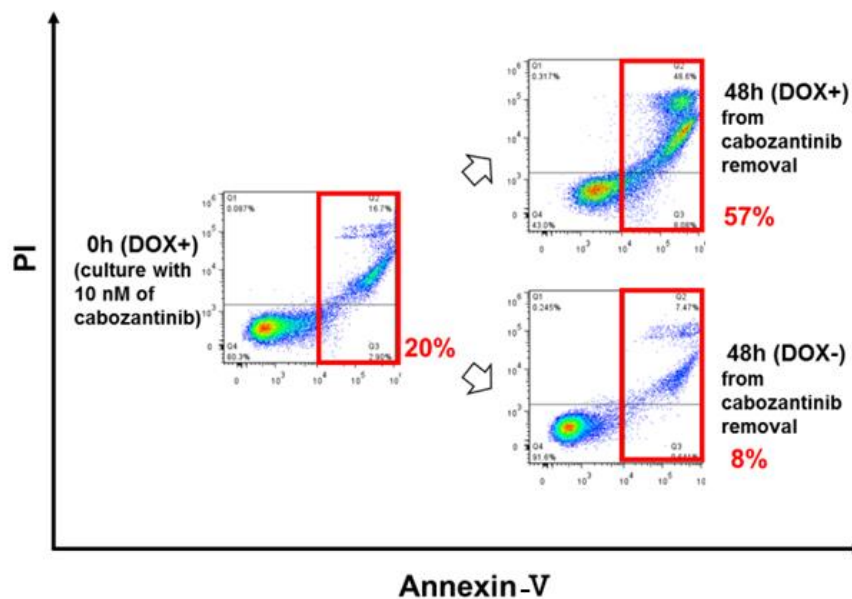


図 19. DOX 誘導性 CD74-ROS1 F2075C 発現によるアポトーシスの制御

1 $\mu\text{g/mL}$ DOX 添加によって CD74-ROS1 F2075C 発現を誘導した reconstructed F2075C を 10 nM cabozantinib 存在下で 7 日間培養 (左)し、1 $\mu\text{g/mL}$ DOX 存在下で cabozantinib を 48 時間除去 (右上)および DOX 非存在下で cabozantinib を 48 時間除去 (右下)した Reconstructed F2075C のアポトーシス細胞群をフローサイトメトリーによって測定した。Alexa Fluor 488 Annexin-V/Dead Cell Apoptosis Kit によって細胞を Annexin-V および Propidium Iodide (PI)で染色した。アポトーシス陽性細胞群の比率を赤字で示した。

3-4. 考察

以上の実験により、TKI addiction の性質を有する変異型 CD74-ROS1 発現 Ba/F3 細胞の樹立に成功した。野生型 CD74-ROS1 を恒常的に発現している状態から DOX 添加を条件とした変異型 CD74-ROS1 F2075C の発現制御を行うことで、細胞内の ROS1 シグナル強度を制御することができ、1 $\mu\text{g/mL}$ DOX 添加による F2075C 変異型 CD74-ROS1 過剰発現をトリガーとした過剰な ROS1 シグナルによるアポトーシス誘導を観察することができた。このようなアポトーシス誘導は低濃度 ROS1-TKI 処理によって抑制することが可能であり、その点も ENU mutagenesis で得られた TKI-addicted な CD74-ROS1 変異細胞と同様であった。その一方で、DOX 添加時の reconstructed F2075C は cabozantinib 処理によってリン酸化 CD74-ROS1 タンパク質のみならず、CD74-ROS1 タンパク質全体の量が減少することを観察した。これは、DOX 添加によって F2075C 変異型 CD74-ROS1 タンパク質が細胞内に蓄積することにより、タンパク質分解に関わるシグナル伝達経路が活性化されたものと推察される。図 17D の結果より、cabozantinib 非存在下においては、タンパク質分解系と同様に PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達経路等のタンパク質合成シグナルも活性化されているため、CD74-ROS1 タンパク質の顕著な減少は認められなかったと考えられる。その一方で 10 nM cabozantinib 存在下においては、ROS1 のリン酸化が抑制されて ROS1 シグナルが抑制されることでタンパク質合成シグナルもやや抑制されている上、分解速度も亢進しているため、タンパク質の合成と分解の均衡が崩れ、CD74-ROS1 タンパク質の減少が観察されたものと思われる。この cabozantinib 処理の有無による CD74-ROS1 タンパク質分解速度の差異は第二章図 11 で示した結果と一致している。

また、WT +dox-inducible CD74-ROS1 WT においては、TKI-addicted なクローンが得られなかった点も興味深い。この結果は、アポトーシスを誘導するほど強力な ROS1 シグナルは単純な CD74-ROS1 の発現量のみならず、第一章で示したような活性化変異と思われる変異型 CD74-ROS1 由来の過剰な ROS1 シグナルも必要であることを示唆している。

他のグループでは、未分化大細胞型リンパ腫(ALCL; anaplastic large cell lymphoma)細胞株において、細胞質内の野生型 NPM-ALK が遺伝子増幅を介して蓄積することにより過剰な ALK シグナルが発生し、細胞死が誘導されるという報告がなされている[52]。それとは異なり、本研究では活性化変異と思われる遺伝子変異も過剰なチロシンキナーゼシグナルを発生させることを示した。また、今回用いた DOX 誘導性ベクターを利用することで、ROS1 融合遺伝子陽性細胞株(HCC78 等)や ROS1 陽性肺がん患者の臨床検体由来細胞株から TKI-addicted な細胞株の樹立が期待できる。この DOX 誘導性ベクターは DOX 添加量に依存した遺伝子発現が可能とされている[53]。この特性を利用し、再構築された臨床検体由来の TKI-addicted な細胞株の増殖にとって最適なチロシンキナーゼシグナル量の閾値を定量的に求めることができれば、より臨床的意義に富む知見が得られるだろう。

第四章 網羅的シグナル解析手法による TKI addiction 制御因子の探索

4-1. 目的

前章までの結果から、TKI-addicted な CD74-ROS1 変異細胞は野生型 CD74-ROS1 細胞とは異なるシグナル伝達経路を介することによってアポトーシスを誘導していることが予想された。ROS1-TKI 除去時に TKI-addicted な F2004V および F2075C 変異細胞内で活性化しているシグナル伝達経路を探索するため、cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析や質量分析計を用いたリン酸化プロテオミクス(リン酸化プロテオーム解析)を実施し、遺伝子発現レベルおよびリン酸化による翻訳後修飾レベルでの網羅的シグナル解析を行った。その結果によって推定された ROS1 基質候補およびアポトーシス誘導因子と思われるタンパク質に対してウェスタンブロットや *in vitro* kinase assay を実施し、TKI addiction 制御因子の同定を試みた。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 細胞培養

いずれの細胞も 37°C, CO₂ 5% インキュベータ内で培養した。使用培地は第一章および第二章と同様である。

- ・ CD74-ROS1 発現 Ba/F3 細胞(野生型, F2004V および F2075C 変異型)

4-2-2. 使用薬剤

使用薬剤は以下のとおりである。溶媒は前章までと同一である。

Cabozantinib

4-2-3. cDNA マイクロアレイ

RNA 抽出、cDNA 合成は第二章で行った方法と同様である。cDNA マイクロアレイは Medical & Biological Laboratories 社へ委託した。マイクロアレイチップは SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8×60K Microarray Kit <G4852A> (Agilent Technologies)を使用した。得られたマイクロアレイデータは GeneSpring GX (Agilent Technologies)によって以下の条件で処理され、その後の解析に使用した。

チップ間補正(Normalization): Percentile=75

ベースライン補正: Baseline to median of all sample

Fold change cut-off: 1.0→GSEA に使用 / 2.0→IPA に使用

4-2-4. GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)

4-2-3 によって得られたデータ(詳細は 4-3-1 に記述)を GSEA に供した[54]。Molecular Signature Database (MSigDB)が公開している遺伝子セットのうち、Hallmark signature を選択した。GSEA に供した遺伝子発現変動データのうち、特定の遺伝子セットに登録されている遺伝子が多いほど enrich され、NES (Normalized Enrichment Score)が上昇する。

4-2-5. IPA (Ingenuity Pathway Analysis)

4-2-3 によって得られたデータ(詳細は 4-3-1 に記述)を IPA (www.ingenuity.com)に供した。IPA の canonical pathway analysis を実施し、統計学的に有意な活性化を示したシグナル伝達経路を探索した。

4-2-6. リン酸化プロテオーム解析

リン酸化プロテオーム解析に供する細胞を回収し、Adachi. J.らが実施した方法に従ってトリプシン消化、IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) 法によるリン酸化ペプチド濃縮を行った[55]。濃縮されたリン酸化ペプチドはそれぞれのサンプルについて異なる種類の Tandem Mass Tag (TMT, Thermo Fisher Scientific)で標識した。標識方法は製造元提供のプロトコールに従ったが、プロトコール記載の 1/10 量を使用した。TMT 標識されたサンプルを 1 つに混和し、トリフルオロ酢酸(和光純薬工業)で酸性化した。その後、サンプルをオクタデシル-カチオン交換 StageTip (C18-SCX StageTip)[56], [57]に通液し、リン酸化ペプチドのトラップと脱塩処理を行った。Adachi. J.らが実施した方法に従って StageTip に 7 種類の buffer をそれぞれ通液し、酸性度と塩濃度によって 7 種類の画分に抽出した[55]。遠心濃縮機によって 7 種類の画分の溶媒を除去し、20%トリフルオロ酢酸/2%アセトニトリル(HPLC グレード)水溶液(HPLC グレード)に再溶解し、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC/MS/MS)に供し、以下の条件で分析した。

使用 LC: UltiMate 3000 Nano LC system (Thermo Fisher Scientific)

使用 MS: Q Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific)

使用カラム: 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 プロテオームリサーチプロジェクトが作製した。Reverse-phase material ReproSil-Pur C18-AQ, 1.9 μ m resin (Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen, ドイツ) をフューズドシリカカラム (カラム長 300 mm \times 内径 75 μ m) に 60°C にて封入した。

移動相 A: 0.1%トリフルオロ酢酸/2%アセトニトリル(HPLC グレード: 関東化学)水溶液 (HPLC グレード精製水: 関東化学)

移動相 B: 0.1%トリフルオロ酢酸/90%アセトニトリル(HPLC グレード)水溶液(HPLC グレード精製水)

流速: 280 nL/min

グラジエント条件: A:B = 95:5 → A:B = 70:30 (85 min.)

得られた MS 生データは MaxQuant software ver. 1.5.1.2 (Andromeda)を用いてピークの検出、同定および定量を行った[58]。リン酸化ペプチド同定において、参照データベースとして UniProt human database 内のヒト ROS1 データを UniProt mouse database に統合して使用した。

MaxQuant により処理したリン酸化プロテオミクスデータは Perseus software ver. 1.5.0.15 (Andromeda)を用いて解析した(詳細は 4-3-2 に記述)(図 20)。なお、サンプル調製およびデータ解析は私が実施し、LC/MS/MS 分析は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 プロテオームリサーチプロジェクトに実施していただいた。

4-2-7. 免疫沈降法

細胞のペレットを回収し、IP 用 lysis buffer^{*12}に懸濁した。懸濁液を 4°C, 16,000 g, 15 min. で遠心分離し、上清を回収し、lysate とした。Lysate は 2-2-3 に示した方法と同様に BCA protein assay により定量し、同一タンパク濃度となるように IP 用 lysis buffer にて希釈した。その後、適当な抗体^{*13}(negative control として mouse IgG を使用)を添加し、4°C にて 1 時間反応させ、Protein G Mag Sepharose (GE Healthcare)を添加して 4°C にて一晩中マイクロチューブローター上で攪拌した。攪拌後、IP 用 lysis buffer で 4 回洗浄し、PBS で 1 回洗浄した。マグネットスタンドを用いてビーズと上清を分離し、ビーズに 2×SDS sample buffer (5×SDS sample buffer を IP 用 lysis buffer にて 2.5 倍希釈)を添加し、100°C にて 5 分間加熱した。マグネットスタンドを用いて上清を回収し、ウェスタンブロットに供した。Input は抗体反応前の lysate とし、ウェスタンブロットに供した。

*12: IP 用 lysis buffer

20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂ (ナカライテスク), 0.2% Triton-X (Sigma), 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (和光純薬工業), PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Roche), Complete mini protease inhibitor cocktail (Roche), MilliQ 水

*13: 使用抗体

ROS1 (69D6) (Cell Signaling Technologies), phospho-tyrosine (4G10) (Millipore)

4-2-8. ウェスタンブロット

第二章と同様の方法で行った。本章で新たに使用した抗体やブロッキング溶液については表 M4 に示す。

表 M4 使用した一次抗体、二次抗体、ブロッキング溶液(第四章)

1 st Antibody	入手先	Blocking buffer (TBST で溶解)	2 nd Antibody (1% BSA で希釈)
FAF1	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Rabbit

4-2-9. *in vitro* kinase assay

0.5 µg ヒト FAF1 (Abcam)および 0.1µg ヒト ROS1 (Carna Biosciences)を kinase buffer^{*14} 中で 30°C, 1 時間反応させた。反応後、5×SDS sample buffer を添加し、100°C にて 5 分間煮沸した。その後サンプルを Extra PAGE ONE Precast Gel 5-20%にアプライし、SDS-PAGE した。その後、ゲルを Coomassie brilliant blue (CBB, ナカライテスク)にて染色した。染色したゲルを乾燥し、イメージングプレート(Fujifilm)にて ³²P 由来の放射線を感じ、Typhoon9410 (GE Healthcare)にて autoradiograph をスキャンした。画像処理は Photoshop software ver. 7.0 を用いた。

*14: kinase buffer

20 µM Adenosine 5'-Triphosphate (ATP, Sigma), 2.5 µCi [γ -³²P] ATP (Perkin Elmer), 250 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM β -glycerophosphate (Sigma), 1 mM Na₃VO₄ (和光純薬工業), 100 mM MgCl₂, Complete mini protease inhibitor cocktail, MilliQ 水

4-2-10. 統計解析

GSEA データにおいて、NES, NOM p-value, FDR (False Discovery Rate) q-value は GSEA software 内で算出された。IPA データにおいて、p-value は Fisher の正確確率検定により算出された。リン酸化プロテオーム解析において実施した 2 群間 t 検定は Perseus によって行い、n=2 の分析における p-value、および Benjamini-Hochberg false difference rate (BH-FDR)を算出した。5%-BH-FDR を、統計学的有意差を判断する際の閾値とした。

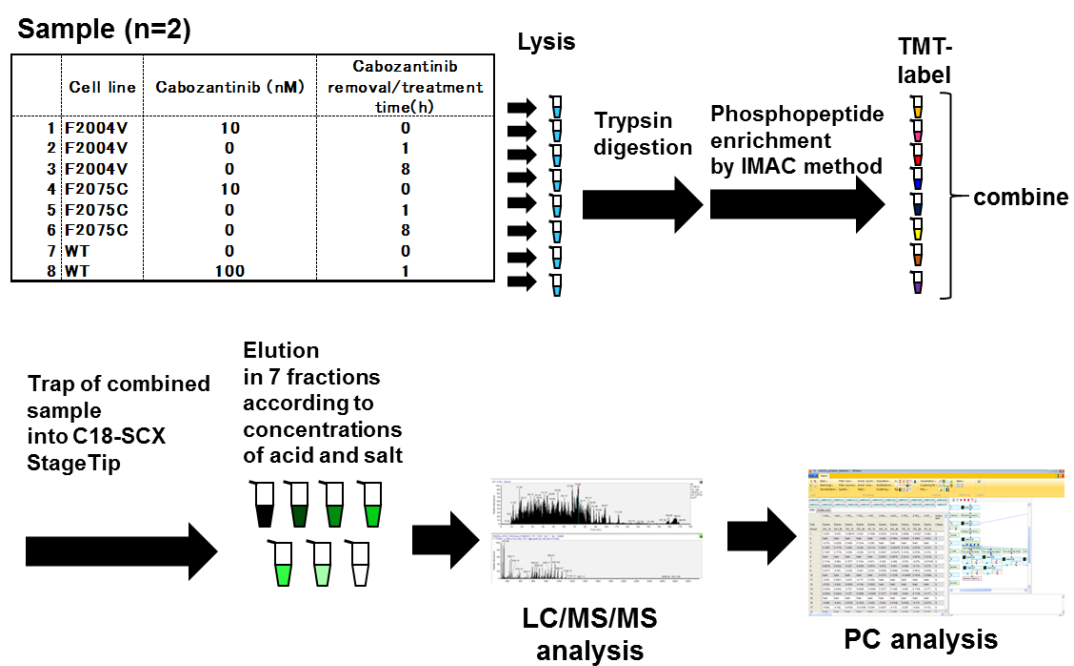


図 20. リン酸化プロテオミクス概略図

4-3. 結果

4-3-1. cDNA マイクロアレイを用いた TKI-addicted な CD74-ROS1 変異細胞の遺伝子発現解析

Cabozantinib 非存在下における F2004V および F2075C 変異細胞内の遺伝子発現変化を観察するため、cDNA マイクロアレイ解析を用いた。F2004V および F2075C 変異細胞の cabozantinib 除去後 0 (10 nM cabozantinib 存在下で培養)、3、8 時間の細胞と、対照として野生型細胞の 100 nM cabozantinib 処理後 0 (未処理)、3 時間の細胞を用意し、それぞれ mRNA 抽出、cDNA 合成を経た後、cDNA マイクロアレイに供した。得られたマイクロアレイデータを GeneSpring によりデータ処理し、F2004V および F2075C 変異細胞においては同細胞の 0 時間サンプルを基準とした遺伝子発現変動(cabozantinib removal for 3 or 8 h/ 10 nM cabozantinib)をデータとして用い、野生型細胞においても 0 時間サンプルとの遺伝子発現変動(100 nM cabozantinib treated for 1 h / untreated)をデータとして用いた。これらのデータを GSEA および IPA にて解析した。

すべての遺伝子発現変動データを元に GSEA を行った(表 1, 2, 3)。その結果、cabozantinib 除去後 8 時間の F2004V と cabozantinib 除去後 3 時間の F2075C は ROS1 シグナルの下流増殖因子である JAK/STAT シグナルや、細胞死受容体シグナル伝達経路として知られる TNF- α (Tumor necrosis factor- α)シグナル、そしてアポトーシスシグナルに関連する遺伝子が有意に変動していることが明らかとなった(図 21)。

GSEA の結果を受けて、cabozantinib 除去後 8 時間の F2004V と cabozantinib 除去後 3 時間の F2075C のデータ内における 2 倍以上の発現変動を示す遺伝子データを抽出し、IPA を行った。IPA による解析においても両方で大きく変動する遺伝子群は類似しており、JAK/STAT シグナル伝達経路や、細胞死受容体シグナル伝達経路に関する遺伝子群の統計的有意な変動が確認された(図 22)。

表 1. Cabozantinib 除去後 3 時間および 8 時間における F2004V 変異細胞の
遺伝子発現解析 (GSEA)

F2004V(3h)

RANK BY NES	NAME	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	HALLMARK E2F TARGETS	2.145365	<0.001	<0.001
2	HALLMARK CHOLESTEROL HOMEOSTASIS	1.963288	<0.001	<0.001
3	HALLMARK G2M CHECKPOINT	1.796513	<0.001	0.002
4	HALLMARK MTORC1 SIGNALING	1.751866	<0.001	0.003
5	HALLMARK MYC TARGETS V1	1.684294	<0.001	0.006
6	HALLMARK ANDROGEN RESPONSE	1.649961	<0.001	0.008
7	HALLMARK FATTY ACID METABOLISM	1.610151	<0.001	0.012
8	HALLMARK BILE ACID METABOLISM	1.551202	0.004	0.021
9	HALLMARK OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	1.545065	0.001	0.020
10	HALLMARK DNA REPAIR	1.492843	0.002	0.032
11	HALLMARK ESTROGEN RESPONSE EARLY	1.489960	<0.001	0.030
12	HALLMARK GLYCOLYSIS	1.461102	0.003	0.041
13	HALLMARK ESTROGEN RESPONSE LATE	1.460653	0.003	0.038
14	HALLMARK SPERMATOGENESIS	1.397692	0.024	0.071
15	HALLMARK PEROXISOME	1.394683	0.020	0.069
16	HALLMARK WNT BETA CATENIN SIGNALING	1.390898	0.059	0.067
17	HALLMARK PROTEIN SECRETION	1.369447	0.039	0.081
18	HALLMARK MYC TARGETS V2	1.367566	0.057	0.079
19	HALLMARK HEME METABOLISM	1.365968	0.019	0.075
20	HALLMARK HEDGEHOG SIGNALING	1.332055	0.107	0.101

F2004V(8h)

RANK BY NES	NAME	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	HALLMARK INTERFERON ALPHA RESPONSE	2.819569	<0.001	<0.001
2	HALLMARK INTERFERON GAMMA RESPONSE	2.773727	<0.001	<0.001
3	HALLMARK TNFA SIGNALING VIA NFKB	2.232543	<0.001	0.001
4	HALLMARK INFLAMMATORY RESPONSE	2.139107	<0.001	0.001
5	HALLMARK ALLOGRAFT REJECTION	2.053204	<0.001	0.003
6	HALLMARK IL6 JAK STAT3 SIGNALING	2.037708	0.001	0.003
7	HALLMARK IL2 STAT5 SIGNALING	1.952876	<0.001	0.007
8	HALLMARK APICAL SURFACE	1.888313	0.017	0.012
9	HALLMARK APOPTOSIS	1.879055	<0.001	0.012
10	HALLMARK KRAS SIGNALING UP	1.752157	0.002	0.027
11	HALLMARK EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION	1.738744	0.003	0.027
12	HALLMARK COMPLEMENT	1.658772	<0.001	0.044
13	HALLMARK COAGULATION	1.658090	0.015	0.041
14	HALLMARK NOTCH SIGNALING	1.537862	0.087	0.089
15	HALLMARK PROTEIN SECRETION	1.454684	0.049	0.144
16	HALLMARK HYPOXIA	1.445942	0.029	0.143
17	HALLMARK TGF BETA SIGNALING	1.433058	0.087	0.146
18	HALLMARK P53 PATHWAY	1.425989	0.026	0.145
19	HALLMARK MYOGENESIS	1.389598	0.058	0.171
20	HALLMARK CHOLESTEROL HOMEOSTASIS	1.297062	0.163	0.285

表 2. Cabozantinib 除去後 3 時間および 8 時間における F2075C 変異細胞の
遺伝子発現解析 (GSEA)

F2075C(3h)

RANK BY NES	NAME	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	HALLMARK INTERFERON ALPHA RESPONSE	2.774610	<0.001	<0.001
2	HALLMARK INTERFERON GAMMA RESPONSE	2.748226	<0.001	<0.001
3	HALLMARK TNFA SIGNALING VIA NFKB	2.561196	<0.001	<0.001
4	HALLMARK IL6 JAK STAT3 SIGNALING	2.375755	<0.001	<0.001
5	HALLMARK ALLOGRAFT REJECTION	2.302658	<0.001	<0.001
6	HALLMARK INFLAMMATORY RESPONSE	2.302212	<0.001	<0.001
7	HALLMARK IL2 STAT5 SIGNALING	2.211400	<0.001	<0.001
8	HALLMARK APOPTOSIS	2.168560	<0.001	<0.001
9	HALLMARK COMPLEMENT	1.962476	<0.001	<0.001
10	HALLMARK MTORC1 SIGNALING	1.948615	<0.001	<0.001
11	HALLMARK UNFOLDED PROTEIN RESPONSE	1.924703	<0.001	<0.001
12	HALLMARK EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION	1.872227	<0.001	<0.001
13	HALLMARK MYC TARGETS V2	1.846575	<0.001	<0.001
14	HALLMARK CHOLESTEROL HOMEOSTASIS	1.812731	<0.001	<0.001
15	HALLMARK KRAS SIGNALING UP	1.806451	<0.001	<0.001
16	HALLMARK MYC TARGETS V1	1.770664	<0.001	0.001
17	HALLMARK APICAL SURFACE	1.720970	<0.001	0.001
18	HALLMARK COAGULATION	1.716065	<0.001	0.001
19	HALLMARK PROTEIN SECRETION	1.664023	0.001	0.003
20	HALLMARK HYPOXIA	1.640381	<0.001	0.004

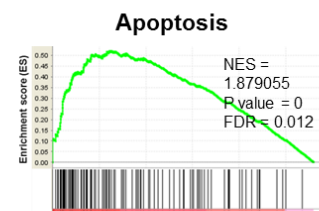
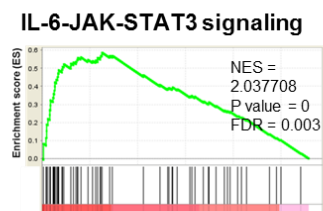
F2075C(8h)

RANK BY NES	NAME	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	HALLMARK TNFA SIGNALING VIA NFKB	3.402923	<0.001	<0.001
2	HALLMARK INFLAMMATORY RESPONSE	2.737851	<0.001	0.003
3	HALLMARK INTERFERON GAMMA RESPONSE	2.576710	<0.001	0.004
4	HALLMARK IL2 STAT5 SIGNALING	2.527820	<0.001	0.005
5	HALLMARK IL6 JAK STAT3 SIGNALING	2.466074	0.001	0.006
6	HALLMARK EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION	2.343180	<0.001	0.010
7	HALLMARK ALLOGRAFT REJECTION	2.183569	<0.001	0.024
8	HALLMARK HYPOXIA	2.118103	0.003	0.030
9	HALLMARK MYC TARGETS V2	2.101723	0.010	0.029
10	HALLMARK KRAS SIGNALING UP	2.093649	<0.001	0.028
11	HALLMARK KRAS SIGNALING DN	1.879191	0.015	0.072
12	HALLMARK APOPTOSIS	1.831579	0.013	0.083
13	HALLMARK COMPLEMENT	1.776703	0.019	0.099
14	HALLMARK MTORC1 SIGNALING	1.736014	0.008	0.109
15	HALLMARK INTERFERON ALPHA RESPONSE	1.729047	0.046	0.105
16	HALLMARK ESTROGEN RESPONSE EARLY	1.711212	0.023	0.106
17	HALLMARK TGF BETA SIGNALING	1.703391	0.061	0.104
18	HALLMARK APICAL SURFACE	1.703087	0.069	0.098
19	HALLMARK COAGULATION	1.699379	0.040	0.095
20	HALLMARK UNFOLDED PROTEIN RESPONSE	1.615198	0.052	0.127

表 3. 100 nM cabozantinib 3 時間処理における野生型 (WT) CD74-ROS1 細胞の
遺伝子発現解析(GSEA)

RANK BY NES	NAME	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	HALLMARK HYPOXIA	2.388979	<0.001	<0.001
2	HALLMARK HEME METABOLISM	2.261985	<0.001	0.002
3	HALLMARK PROTEIN SECRETION	1.869841	0.001	0.039
4	HALLMARK E2F TARGETS	1.842726	0.001	0.037
5	HALLMARK BILE ACID METABOLISM	1.816426	0.011	0.036
6	HALLMARK SPERMATOGENESIS	1.815076	0.007	0.030
7	HALLMARK G2M CHECKPOINT	1.759414	0.001	0.039
8	HALLMARK P53 PATHWAY	1.757984	<0.001	0.035
9	HALLMARK MTOTIC SPINDLE	1.614023	0.008	0.085
10	HALLMARK UV RESPONSE DN	1.592330	0.021	0.087
11	HALLMARK APOPTOSIS	1.497062	0.044	0.147
12	HALLMARK FATTY ACID METABOLISM	1.466693	0.045	0.163
13	HALLMARK PEROXISOME	1.357831	0.093	0.287
14	HALLMARK OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	1.351278	0.077	0.277
15	HALLMARK XENOBIOTIC METABOLISM	1.205865	0.217	0.549
16	HALLMARK ADIPOGENESIS	1.187799	0.216	0.558
17	HALLMARK CHOLESTEROL HOMEOSTASIS	1.166552	0.277	0.579
18	HALLMARK GLYCOLYSIS	1.085465	0.356	0.760
19	HALLMARK ESTROGEN RESPONSE LATE	0.993520	0.505	0.980
20	HALLMARK ESTROGEN RESPONSE EARLY	0.976328	0.521	0.981

F2004V(8h)



F2075C(3h)

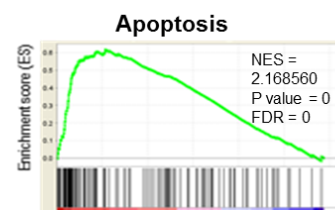
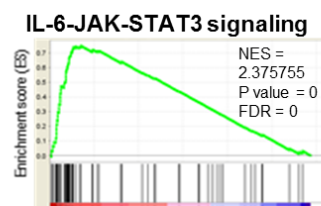
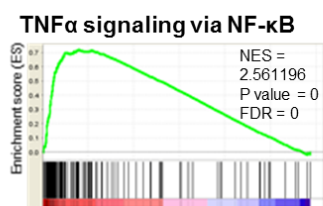


図 21. Cabozantinib 除去時の F2004V および F2075C 変異細胞の生存・増殖および細胞死関連遺伝子発現の変動 (GSEA)

Cabozantinib 除去時の F2004V (除去後 8 時間)および F2075C (除去後 3 時間)変異細胞の GSEA 結果 (表 1, 2)のうち、両者に共通する生存・増殖および細胞死関連遺伝子セットの解析結果を示す。

A

F2004V(8h)

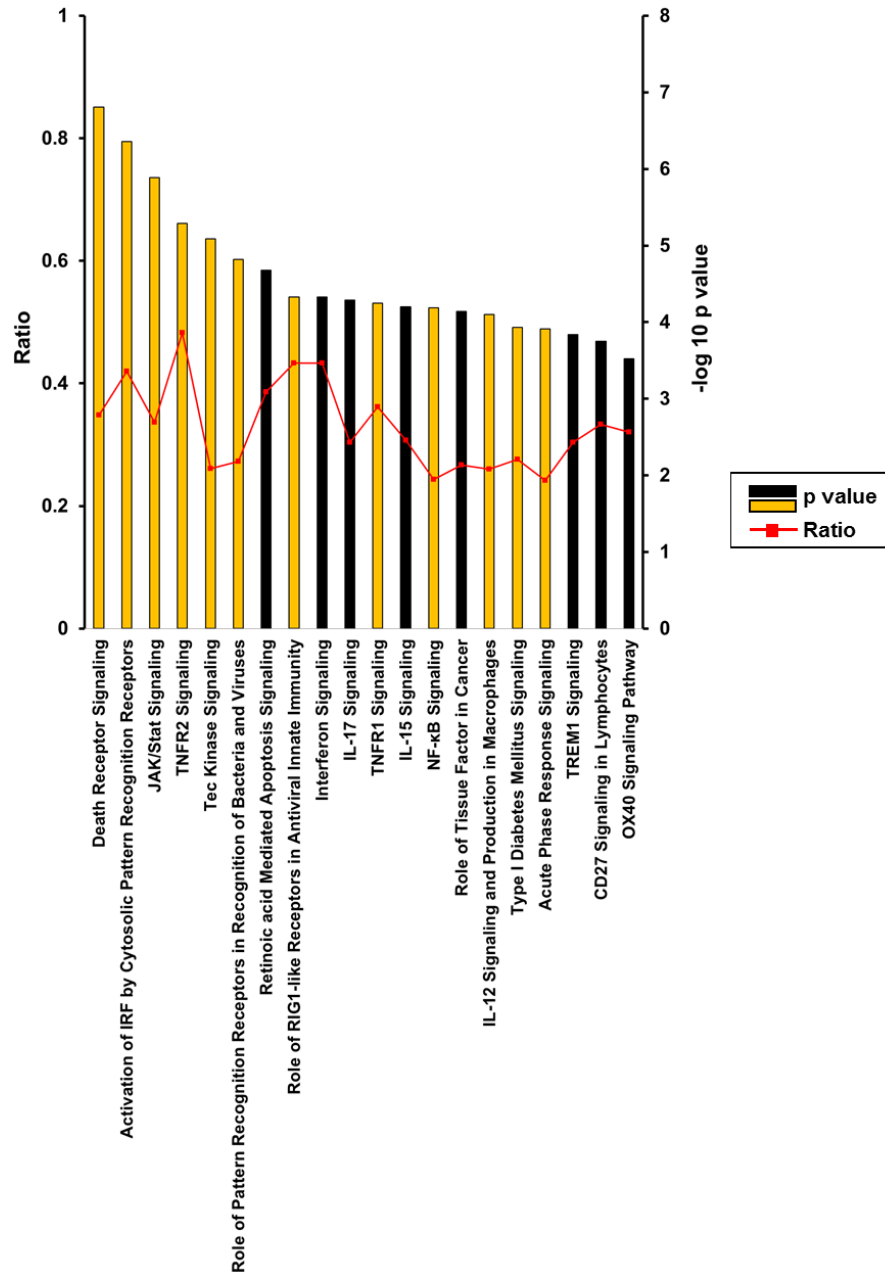


図 22. Cabozantinib 除去時の F2004V および F2075C 変異細胞の生存・増殖および細胞死関連遺伝子発現の変動 (IPA)

(A) Cabozantinib 除去時の F2004V 変異細胞(除去後 8 時間)の IPA 解析結果。棒グラフは p 値の $-\log_{10}$ 換算した値を示し、折れ線グラフは canonical pathway に登録されている遺伝子中の割合を示す。両者に共通する pathway のグラフを黄色に示す。

B

F2075C(3h)

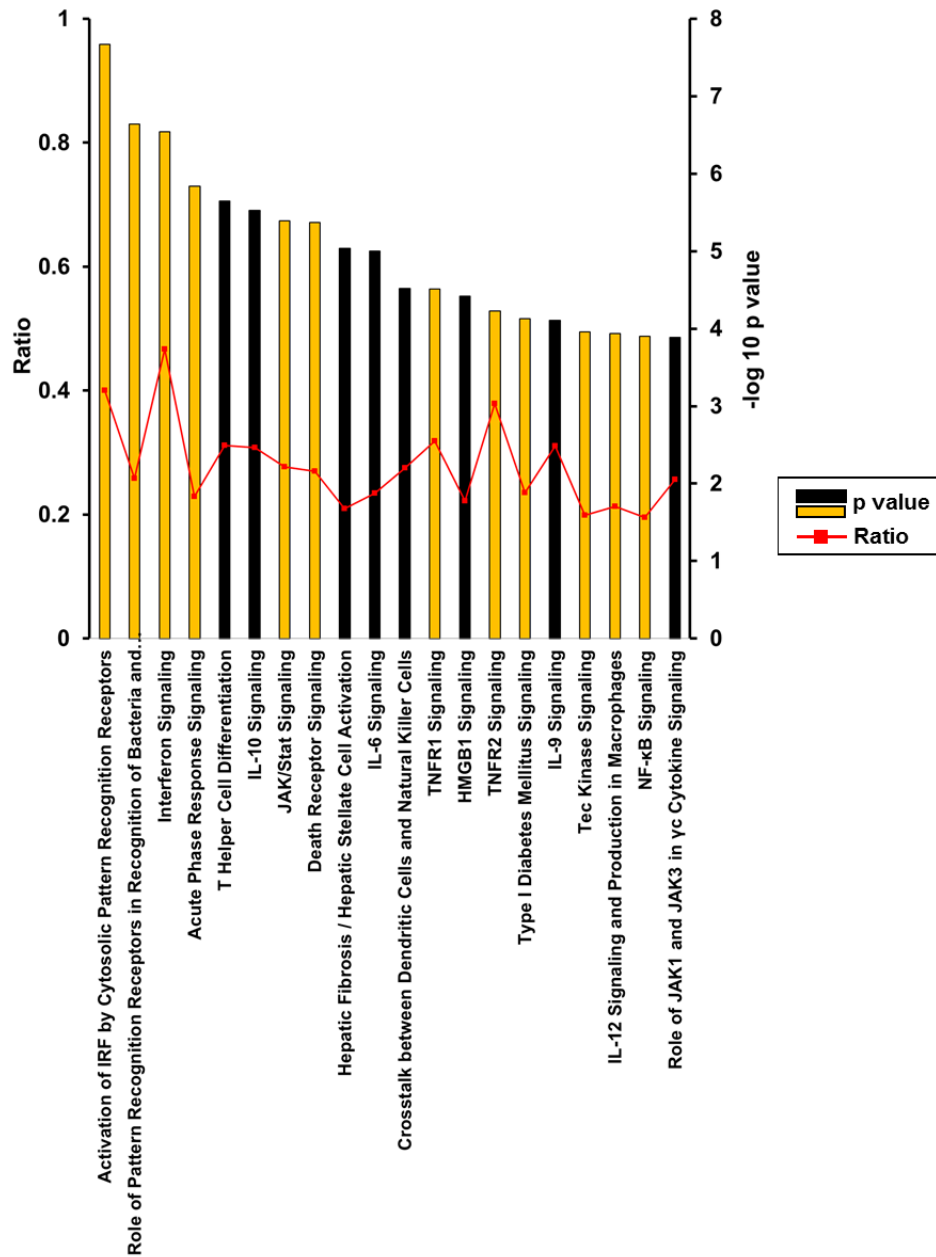


図 22. Cabozantinib 除去時の F2004V および F2075C 変異細胞の生存・増殖および細胞死関連遺伝子発現の変動 (IPA) (続き)

(B) Cabozantinib 除去時の F2075C 変異細胞(除去後 3 時間)の IPA 解析結果。

4-3-2. リン酸化プロテオミクスを用いた TKI-addicted な CD74-ROS1 変異細胞のリン酸化タンパク質解析

TKI-addicted な CD74-ROS1 変異細胞において ROS1-TKI 除去による過剰な ROS1 シグナルが、野生型 CD74-ROS1 発現細胞内の ROS1 シグナルよりも多くのタンパク質をリン酸化し、アポトーシス誘導を促すシグナル伝達経路を活性化することは十分に考えられる。過剰な ROS1 シグナルがどのようなタンパク質をリン酸化しているのかを網羅的に解析するため、リン酸化プロテオミクスを実施した。

F2004V および F2075C 変異細胞の cabozantinib 除去後 0 (10 nM cabozantinib 存在下で培養)、1、3 時間の細胞と、対照として野生型細胞の 100 nM cabozantinib 処理後 0 (未処理)、1 時間の細胞を用意し、それぞれリン酸化プロテオーム解析に供した。得られたリン酸化プロテオミクスデータを Perseus (Andromeda)によりデータ処理し、F2004V および F2075C 変異細胞においては同細胞の 0 時間サンプルを基準としたリン酸化ペプチド変化 (cabozantinib removal for 1 or 8 h/10 nM cabozantinib ; それぞれ log2 fold change で示す。)をデータとして用いた。一方、過剰な ROS1 シグナルによって生成されるリン酸化タンパク質と ROS1-TKI によって減少するリン酸化タンパク質を比較するため、野生型細胞においては cabozantinib 1 時間処理サンプルを基準とした cabozantinib 未処理サンプルのリン酸化ペプチド変化 (untreated/100 nM cabozantinib; log2 fold change で示す。)をデータとして用いた。

リン酸化プロテオーム解析の結果、いずれのサンプルにおいても約 4000 種類のリン酸化ペプチドが検出され、リン酸化セリン(pS)、リン酸化スレオニン(pT)、リン酸化チロシン(pY) ペプチドの比率はほぼ同一であった(表 4)。しかしながら、cabozantinib 除去後 8 時間における F2004V および F2075C 変異細胞内の統計的有意な増加(>平均+2SD)が認められた pY ペプチドは、全リン酸化ペプチド中、半数近く(F2004V; 55.6%, F2075C; 49.7%)を占めており、大量のチロシンリン酸化タンパク質の生成が示唆された(表 5、図 23)。

これらのリン酸化プロテオミクスデータを用いて統計的に有意な減少もしくは増加を示すリン酸化ペプチドを同定するため、2 群間 t 検定に基づいた volcano plot を作成した。この解析において、F2004V のリン酸化ペプチド変動 (cabozantinib removal/10 nM cabozantinib) または F2075C のリン酸化ペプチド変動 (cabozantinib removal/10 nM cabozantinib) と、野生型細胞のリン酸化ペプチド変動 (untreated/100 nM cabozantinib) 間の 2 群間 t 検定を行った。Cabozantinib 除去後 8 時間において、F2004V および F2075C 変異細胞内のリン酸化ペプチドは野生型細胞に比べ、統計的有意な差をもって変動していることが明らかとなった(図 24)。これらの統計的有意な変動を示したリン酸化ペプチドは F2004V 変異細胞から 52 種類、F2075C 変異細胞から 54 種類検出された。それらの中から両者の変異細胞に共通する 31 種類のリン酸化ペプチドに由来するタンパク質 30 種類を、過剰な ROS1 シグナルによってリン酸化される新規 ROS1 基質候補とした。それらの中には、自己リン酸化によって増加したと思われる ROS1 をはじめ、ESYT1 (extended

synaptoagmin 1) [59]や PTPN6 (protein-tyrosine phosphatase SHP-1)[60]といった ROS1 の基質として報告されているタンパク質由来ペプチドや、STAT5A (signal transducer and activator of transcription 5A)や SYK (spleen associated tyrosine kinase)などのチロシンキナーゼの下流シグナル伝達経路に関わるタンパク質に由来するリン酸化ペプチドが該当した。その一方で、CYCS (cytochrome *c*)や FAF1 (Fas associated factor 1) などのアポトーシス誘導因子のリン酸化ペプチドも検出された。そのほかにも VIM (vimentin) の Tyr61 リン酸化ペプチドが検出されたが、このチロシンリン酸化 vimentin はチロシンキナーゼの活性化により生成されることが多数報告されている (<http://www.phosphosite.org>) (表 6)。

表 4. リン酸化プロテオミクスにおける検出された pS, pT, pY 部位数および割合

	WT_1h (Untreated / 100 nM cabozantinib)		F2004V_1h (Cabozantinib removal /10 nM cabozantinib)		F2004V_8h (Cabozantinib removal /10 nM cabozantinib)		F2075C_1h (Cabozantinib removal /10 nM cabozantinib)		F2075C_8h (Cabozantinib removal /10 nM cabozantinib)	
	count	%	count	%	count	%	count	%	count	%
pS	3504	87.2	3519	87.3	3520	87.3	3514	87.2	3511	87.3
pT	407	10.1	406	10.1	406	10.1	406	10.1	406	10.1
pY	108	2.7	107	2.7	107	2.7	108	2.7	107	2.7
Total	4019	100	4032	100	4033	100	4028	100	4024	100

(n=2の平均値)

表 5. リン酸化プロテオミクスにおける減少 (<平均 - 2SD)および増加 (>平均 + 2SD)を示した pS, pT, pY 部位数および割合

		WT_1h		F2004V_1h		F2004V_8h		F2075C_1h		F2075C_8h	
		count	%	count	%	count	%	count	%	count	%
DOWN < mean - 2SD	pS	95	91.3	83	85.6	29	76.3	72	87.8	29	85.3
	pT	5	4.8	9	9.3	9	23.7	10	12.2	5	14.7
	pY	4	3.8	5	5.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Total	104	100	97	100	38	100	82	100	34	100
UP > mean + 2SD	pS	111	89.5	99	86.1	56	42.1	79	66.4	66	46.2
	pT	8	6.5	10	8.7	3	2.3	7	5.9	6	4.2
	pY	5	4.0	6	5.2	74	55.6	33	27.7	71	49.7
	Total	124	100	115	100	133	100	119	100	143	100

(n=2の平均値)

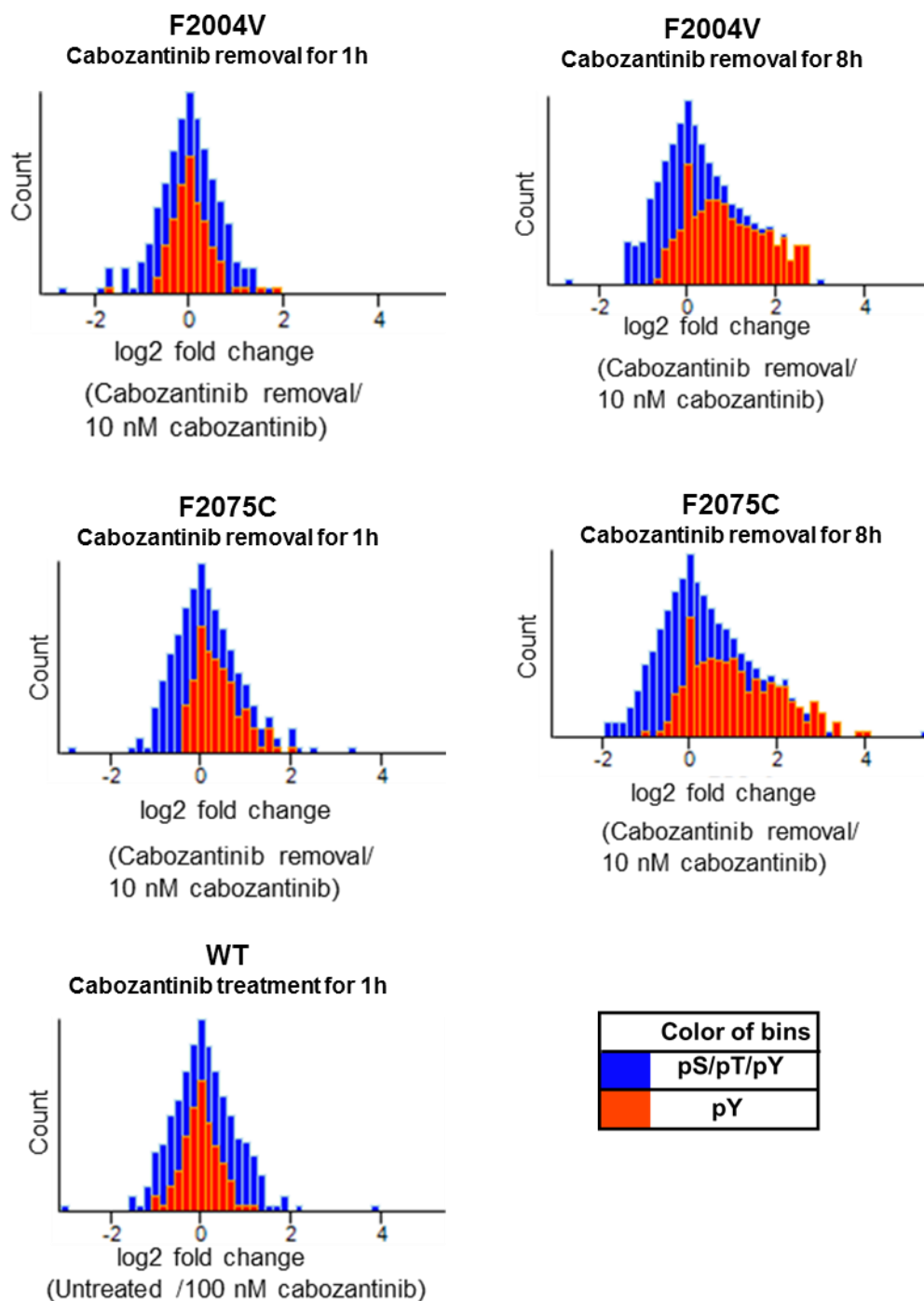
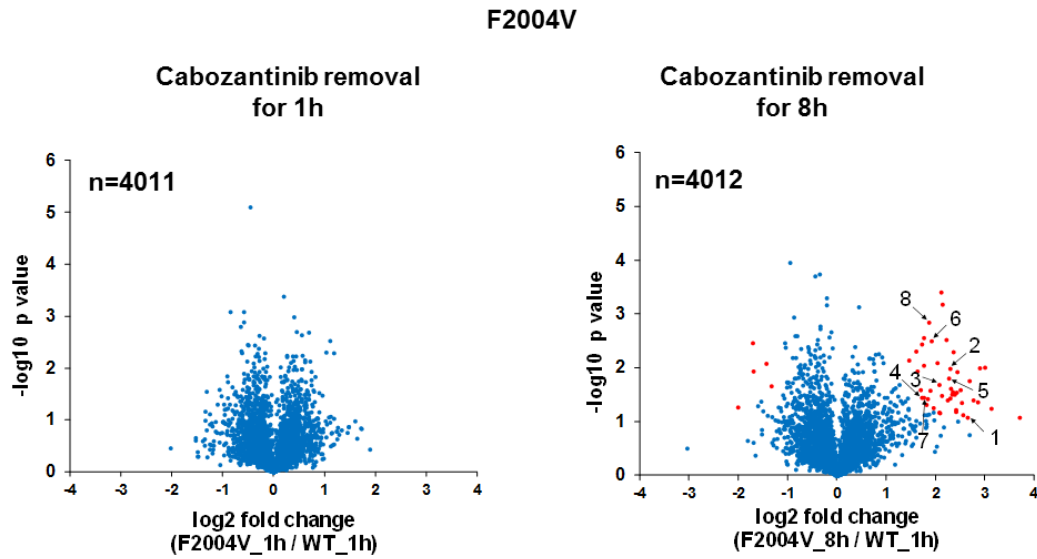


図 23. リン酸化プロテオミクスによる各サンプル中のチロシンリン酸化ペプチド分布
リン酸化プロテオミクスによる各サンプル中の全リン酸化ペプチドの分布をヒストグラム
の青いビンに示し、チロシンリン酸化ペプチドの分布をヒストグラムのオレンジ
色のビンに示す。

A



B

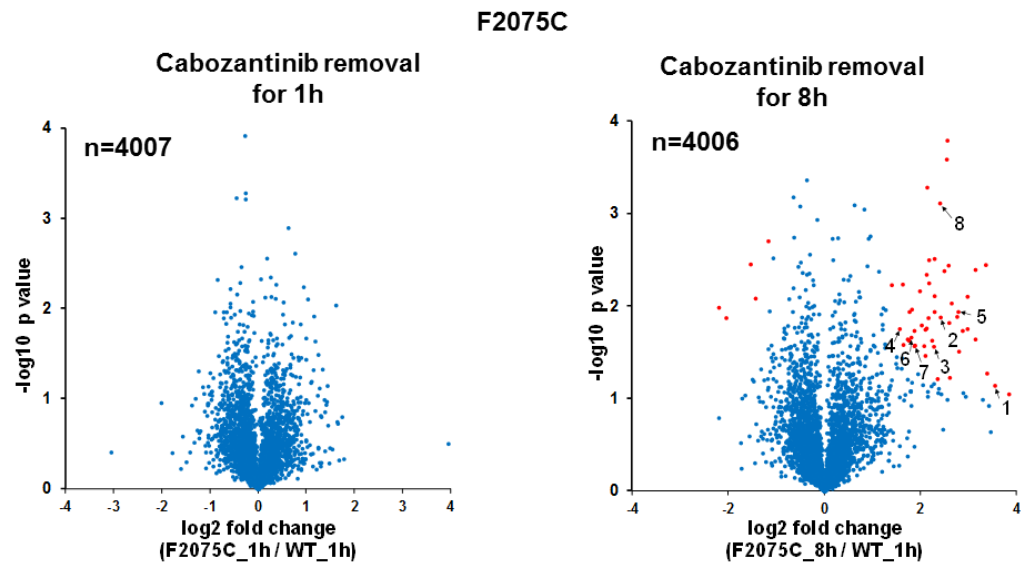


図 24. 過剰な ROS1 シグナルによってリン酸化されたリン酸化タンパク質の同定
(A, B) Volcano plot。cabozantinib 除去後 1 時間 (左)および 8 時間 (右)における F2004
(A)および F2075C (B)変異細胞と 100 nM cabozantinib1 時間処理した野生型細胞とのリ
ン酸化ペプチド検出比 (横軸、log2 換算)、および n=2 測定における p 値(縦軸、-
log10 換算)を示す。5%-BH-FDR を閾値とし、閾値を超えた発現変動を示したリン酸
化ペプチドを赤色のプロットで示す。プロット中の番号は表 6 と対応する。

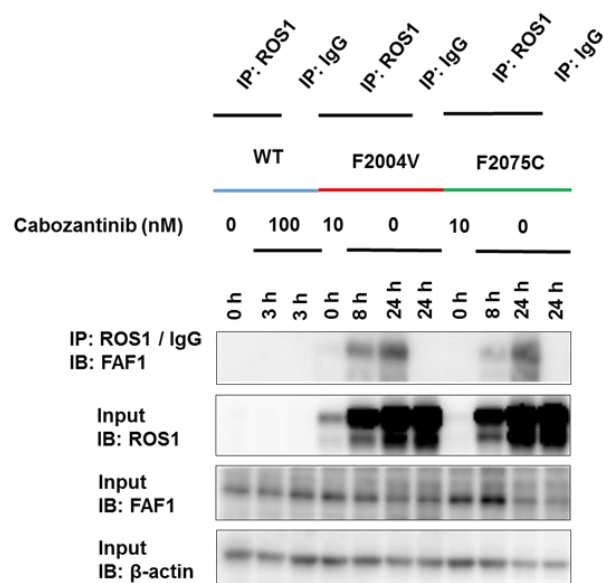
表 6. 過剰な ROS1 シグナルによってチロシンリン酸化されるタンパク質

No.	Gene name	Phosphorylation site	Fold change		
			WT (cabozantinib 100 nM for 1h)	F2004V (cabozantinib removal for 8h)	F2075C (cabozantinib removal for 8h)
1	CYCS	Y98	0.92	5.77	10.80
2	ESYT1	Y349	0.92	4.52	4.93
3	FAF1	Y224	0.80	3.35	3.85
4	PTPN6	Y276	0.91	2.97	2.67
5	ROS1	Y2069	0.87	4.52	3.72
6	STAT5A	Y694	0.95	3.57	3.32
7	SYK	Y202	0.87	2.95	3.20
8	VIM	Y61	0.85	3.10	4.52

4-3-3. 新規 ROS1 基質候補 FAF1 の解析

4-3-2 の結果より、アポトーシス関連因子である FAF1 に注目した。FAF1 が ROS1 によってリン酸化されるか確認するため、抗 ROS1 抗体を用いた免疫沈降法により、F2004V および F2075C 変異細胞内の FAF1/ROS1 相互作用を観察した。F2004V および F207C 変異細胞において、ROS1 タンパク質の発現量に依存して FAF1 が ROS1 と相互作用していることを確認した(図 25A)。また、抗 pY 抗体を用いた免疫沈降法により、同条件の F2004V および F2075C 変異細胞内の FAF1 はチロシンリン酸化されていることが明らかとなった(図 25B)。ヒト ROS1 およびヒト FAF1 リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* kinase assay の結果によって、FAF1 が ROS1 によって直接チロシンリン酸化されることが明らかとなった(図 26)。

A



B

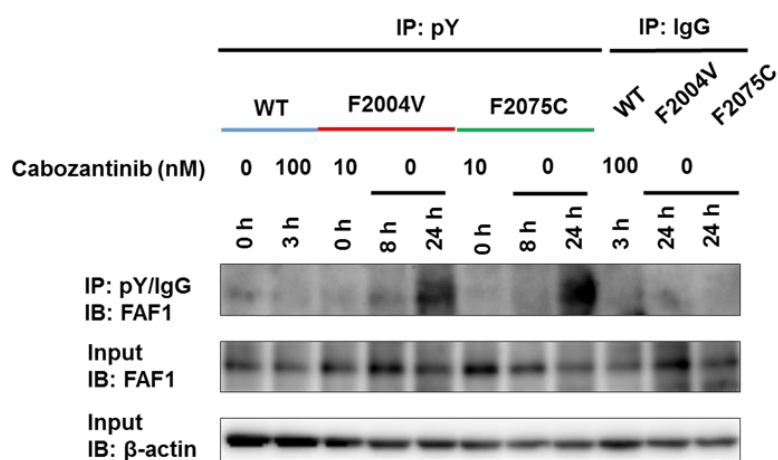
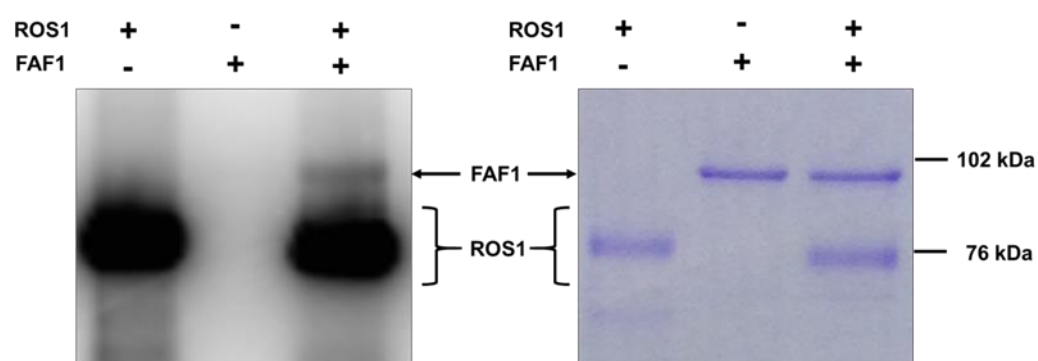


図 25. ROS1 キナーゼによる FAF1 のチロシンリン酸化 (免疫沈降法)

(A, B) 野生型 (WT)細胞、F2004V および F2075C 変異細胞をそれぞれ図中に示したタンパク質認識抗体を用いた免疫沈降法を行った後、ウェスタンブロットにより解析した。IgG (mouse)はネガティブコントロールとして使用した。



Autoradiography

CBB stained gel

図 26. ROS1 キナーゼによる FAF1 のチロシンリン酸化 (*in vitro* kinase assay)

ヒト ROS1 およびヒト FAF1 のリコンビナントタンパク質を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と共にキナーゼ反応 (30°C , 1 h) した後、SDS-PAGE を行い、CBB 染色した (右)。左図は CBB 染色したゲル内の ^{32}P 由来の β 線をイメージングプレートに露光し、スキャンしたオートラジオグラフ (左)。

4-4. 考察

cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果より、ROS1-TKI 除去 8 時間後の F2004V 変異細胞と ROS1-TKI 除去 3 時間後の F2075C 変異細胞において、生存・増殖に関わる遺伝子の変動とともに、アポトーシス誘導に関わる遺伝子が大きく変動していることが明らかになった。GSEA および IPA の結果から、ROS1-TKI 除去後の F2004V および F2075C 変異細胞は TNF- α などの細胞死受容体シグナル伝達経路が活性化し、アポトーシス誘導による細胞死を生じていることが示唆された。細胞死受容体シグナル伝達経路は TNF- α や Fas などの受容体を介し、複数のアダプタータンパク質と複合体を形成し、caspase-8 活性化やミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導する[61]。第二章で示したウェスタンブロットによるタンパク質解析の結果から、本研究で用いている TKI-addicted な ROS1 変異細胞は、過剰な ROS1 シグナルによって caspase-8 依存的なアポトーシスの誘導が確認されている。したがって、過剰な ROS1 シグナルが細胞死受容体シグナル伝達経路を活性化し、caspase-8 依存的なアポトーシスを誘導していることが示唆された。

リン酸化プロテオミクスによる網羅的なリン酸化タンパク質解析の結果から、過剰な ROS1 シグナルにより、野生型 CD74-ROS1 陽性細胞よりも多くのタンパク質がチロシンリン酸化され、それらの中で生存・増殖に関わるタンパク質およびアポトーシスに関わるタンパク質のリン酸化体の過剰な生成が確認された。本解析によって見出された 30 種類の ROS1 基質候補タンパク質の中では、cytochrome *c* および FAF1 がアポトーシス関連因子として知られている。今回の解析によって同定された cytochrome *c* のリン酸化部位は Tyr98 (表 6)であるが、過去の報告により、この箇所のチロシンリン酸化は結晶構造上の安定性を低下させる機能を有するものの、下流のカスパーゼである caspase-9 の活性には大きな変化を生じないことが明らかにされている[62]。したがってもう一方の候補タンパク質である FAF1 に注目し、さらなる解析を行った。

免疫沈降法や *in vitro* kinase assay による解析の結果、F2004V および F2075C 変異細胞では、ROS1-TKI 除去によって過剰な ROS1 シグナルを生じている条件において、FAF1 が ROS1 と相互作用し、チロシンリン酸化される様子が観察された。また、FAF1 が ROS1 キナーゼによって直接的にチロシンリン酸化されることが明らかとなった。FAF1 は Fas 受容体との DISC (death-inducing signaling complex)や TNF 受容体との Complex II の構成成分の一つとして知られており、アポトーシス誘導効果の増強に寄与する[63]–[65](図 27)。臨床研究により、胃癌患者の半数(58 人中 29 人)で FAF1 の発現低下が生じ、子宮頸がん患者の 30%(20 人中 6 人)で遺伝子欠損しているという報告がある[66], [67]。さらに、Oncomine データベースより、肺腺がん患者においても FAF1 遺伝子の発現低下が確認される(図 28)。これらの FAF1 の臨床的背景からも、複数のがん腫において FAF1 の発現低下ががんのアポトーシス抵抗性の獲得に関与していることが示唆される。また、細胞死受容体シグナル伝達経路に関わる因子の内、FAF1 以外にも TRAIL (TNF super family 10)のおとり受容体が様々ながん腫において高発現することによって、TRAIL 誘導性の caspase-8 依存的アポ

トーシスに抵抗性を示すことが知られている[68]。さらに、肺がん細胞株の多くで caspase-8 のプロモーター領域メチル化による発現低下を介したアポトーシス耐性も報告されている[69]。以上のことから、caspase-8 依存的なアポトーシスに対し抵抗性を示すようながん細胞は多く見出されており、FAF1 やその他の caspase-8 依存性アポトーシス関連因子ががんのバイオマーカーや治療標的として有望であると期待できる。

現在までヒト FAF1 は Tyr225, Ser289, Ser291 部位(マウス FAF1: Tyr224, Ser288, Ser290 部位に相当)がリン酸化を受けることが報告されている(www.phosphosite.org)。アポトーシス誘導効果増強の他にも、CK2 (casein kinase 2)や aurora-A によって Ser289 および Ser291 がリン酸化されることで、CK2 による細胞周期促進やアポトーシス制御や、ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解機構を介した aurora-A のフィードバックループ形成に関与している[70], [71]。ALK 融合タンパク質 NPM-ALK により、FAF1-Tyr225 がリン酸化されるという報告がなされているものの、その生理学的機能はいまだ明らかにされていない[72]。本研究において、FAF1 が CD74-ROS1 の基質であることが世界で初めて明らかにされ、過剰なチロシンキナーゼシグナルが FAF1 のチロシンリン酸化を介してアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。しかしながら、本研究のリン酸化プロテオーム解析によって見出されたリン酸化部位であるマウス FAF1 Tyr224 を含んだ、caspase-8 らと複合体を形成するドメイン(DEDID ドメイン[73])内のすべてのチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した FAF1 変異体を F2004V や F2075C 変異細胞に過剰発現させて cell viability assay による検討を行ったが、ROS1-TKI 除去による細胞死を回避する様子は観察できなかった。したがって、過剰なチロシンキナーゼシグナルは FAF1 のみならず、今回の網羅的シグナル解析では見出しきれなかった他のアポトーシス誘導因子をも活性化し、細胞死を生じていることが考えられる。今後 FAF1 や FAF1 と相互作用する他のタンパク質に対する機能解析をより深く実施することで、未だ明らかになっていない FAF1 のがんの生存や死に関わる生理学的機能が明らかになるだろう。

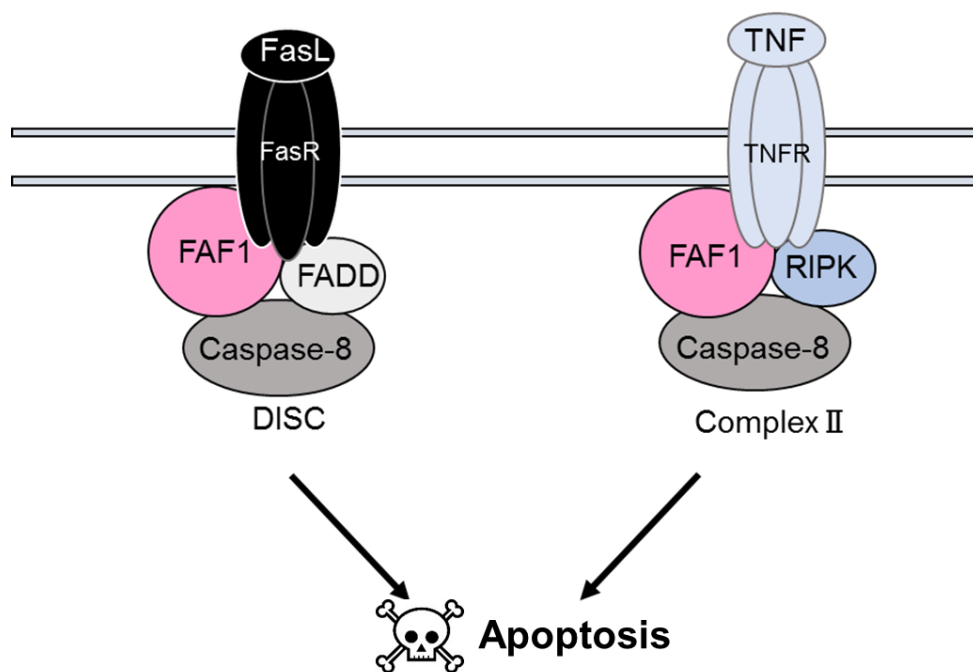
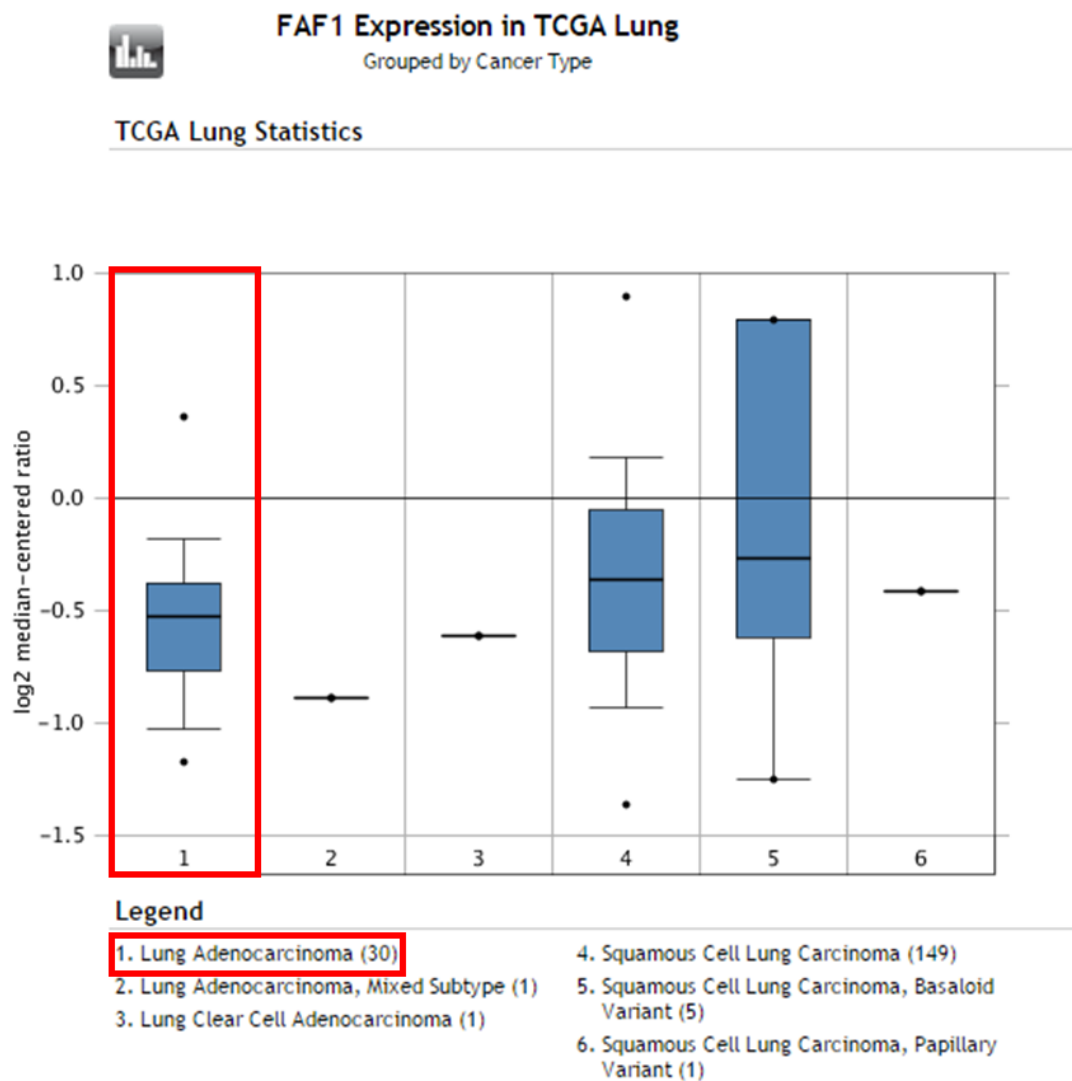


図 27. FAF1 が関与するアポトーシス誘導機構



Data from Oncomine database (www.oncomine.com)

図 28. 肺腺がん患者の FAF1 発現レベル

TCGA データベース内の肺がん患者の FAF1 発現レベル (Oncomine より抜粋)。
肺腺がん患者のデータを赤枠で示す。

第五章 TKI addiction に関わる細胞内シグナル伝達経路の探索

5-1. 目的

前章までの研究により、ROS1 キナーゼドメイン内の変異に依存した過剰な ROS1 シグナルの活性化はアポトーシス誘導シグナルを活性化し、細胞死を誘導することが示唆された。所属研究室により、F2004V および F2075C 変異細胞に対し化学療法基盤支援活動より提供された薬剤ライブラリを用いたスクリーニングが実施された。本スクリーニングで得られたデータを元に、ROS1 シグナル以外の因子を阻害することで F2004V もしくは F2075C 変異細胞の細胞死を抑制することのできる薬剤を同定した。本データによって推定された TKI addiction に関わる細胞内シグナル伝達経路の詳細な解析を目的として、F2004V、F2075C 変異細胞および reconstructed-F2075C に対して cell viability assay およびウェスタンブロットを実施した。

5-2. 材料と方法

5-2-1. 細胞培養

いずれの細胞も 37°C, CO₂ 5% インキュベータ内で培養した。使用培地は前章までと同様である。

- CD74-ROS1 発現 Ba/F3 細胞(野生型, F2004V および F2075C 変異型)
- Reconstructed F2075C

5-2-2. 使用薬剤

薬剤スクリーニングは化学療法基盤支援活動より提供された標準阻害剤キット(kit-1, 3, 4)に ASP3026 (ChemieTek), TAE684, AEW541 (ActiveBiochem), AP26113-analog (Biochempartner), cabozantinib, foretinib, ponatinib (Selleck), afatinib (BIBW2992, ChemieTek), E7080 (Selleck), motesanib (ChemieTek), CEP701 (Calbiochem), nintedanib (Selleck) を加え、総数 282 化合物のライブラリを構築した。

その他の実験における使用薬剤は以下のとおりである。上記および前章までに使用した薬剤に関して、溶媒の記載は省略する。

Cabozantinib, ceritinib (LDK378, ActiveBiochem), foretinib (AdooQ), brigatinib (Selleck), TAE684 (ChemieTek), ponatinib, radicicol (Cayman Chemical), 17-*N*-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, LC Laboratories), SB202190 (Cell Signaling Technologies), SB239063 (Sigma), trametinib (GSK1120212, ActiveBiochem), GDC-0941 (LC Laboratories)

AP26113-analog および brigatinib は ethanol (和光純薬工業)に溶解して使用した。他の薬剤は DMSO に溶解して使用した。

5-2-3. 薬剤スクリーニング

Katayama R. らが実施した方法に従った[41]。野生型 CD74-ROS1 発現 Ba/F3 細胞、F2004V および F2075C 変異細胞を 2000 cells/well/120 μ L D-10 で 96 well black plate にそれぞれ 3 連で播種した。10, 100 nM, 1, 3 μ M に調製した薬剤ライブラリを 40 μ L 添加した。これらの 96 well black plate を 37°C, CO₂ 5% インキュベータ内に 72 時間静置した。72 時間経過後、CellTiter-Glo 溶液を 40 μ L/well 添加し、室温にて 10 分間振とうした後、Centro LB 941 microplate luminometer で発光量を測定した。DMSO 処理した well をコントロールに設定し、各薬剤における相対細胞生存率を求めた。

5-2-4. Cell viability assay

第一章と同様の方法で行った。

5-2-5. ウェスタンブロット

第二章と同様の方法で行った。本章で新たに使用した抗体やブロッキング溶液については表 M5 に示す。

表 M5 使用した一次抗体、二次抗体、ブロッキング溶液(第五章)

1 st Antibody	入手先	Blocking buffer (TBST で溶解)	2 nd Antibody (1% BSA で希釈)
pAKT (D9E)	Cell Signaling Technology	2% BSA	Rabbit
AKT (C67E7)	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Rabbit
p-p38 (D3F9)	Cell Signaling Technology	2% BSA	Rabbit
p38 (D13E1)	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Rabbit
pMKK3 (D8E9)	Cell Signaling Technology	2% BSA	Rabbit
MKK3 (D4E3)	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Rabbit
pMAPKAPK2 (27B7)	Cell Signaling Technology	2% BSA	Rabbit
MAPKAPK2 (D1E11)	Cell Signaling Technology	5% skim milk	Rabbit

5-3. 結果

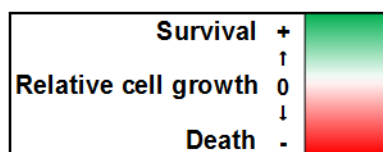
5-3-1. 薬剤スクリーニングによる TKI addiction 関連因子の推定

薬剤スクリーニングの結果(図 29)、第一章で示した cabozantinib, crizotinib, lorlatinib の他にも、ROS1/ALK-TKI である ceritinib, foretinib, brigatinib, AP26113-analog, TAE684 の低濃度処理によっても F2004V および F2075C 変異細胞のアポトーシスを抑制し、細胞の生存・増殖活性を維持していることが認められた(図 30)。また、慢性骨髄性白血病等で使用される multi-target TKI である ponatinib も同様の生存・増殖活性維持効果が認められた(図 31)。

TKI 以外にも、radicol や 17-AAG などの Hsp90 阻害剤が F2004V、F2075C 変異細胞および reconstructed-F2075C のアポトーシス誘導を部分的に抑制した(図 32-34)。

また、F2075 変異細胞および reconstructed-F2075C においてのみ、p38 (mitogen-activated protein kinase 14)阻害剤である SB202190 や SB239063 を処理することによってアポトーシス誘導を部分的に抑制することが認められた(図 35, 36)。

過去の報告より、BRAF や EGFR の過剰な driver oncogene シグナルが MEK/ERK シグナル伝達経路の過剰活性化を引き起こし、細胞死や細胞老化を誘導することが示唆されるという知見がある[74], [75]。本研究においても、過剰な ROS1 シグナルによって MEK/ERK シグナルや JAK/STAT シグナルの活性化がウェスタンブロットや cDNA マイクロアレイによって確認され、CHX を用いた CD74-ROS1 タンパク質分解速度の観察から、PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達経路活性化によるタンパク質合成促進が示唆された。そのため、F2004V や F2075C 変異細胞においても、それらのシグナル伝達経路を阻害する薬剤の曝露によって細胞死を回避することが可能ではないかと予想された。しかしながら、本研究で実施した薬剤スクリーニングの結果からは MEK 阻害剤、JAK 阻害剤、PI3K 阻害剤による F2004V および F2075C 変異細胞の細胞死を抑制する効果は確認できなかった。それらの下流生存・増殖シグナル阻害による細胞死抑制効果をより詳細に解析するため、MEK 阻害剤である trametinib や PI3K 阻害剤である GDC-0941 の F2004V や F2075C 変異細胞に対する影響をウェスタンブロットや cell viability assay によって検討したが、薬剤スクリーニングの結果と同様に細胞死を回避できるような効果は認められなかった(図 37)。



Category	Compound	WT				F2004V				F2075C			
		10 nM	100 nM	1 μM	3 μM	10 nM	100 nM	1 μM	3 μM	10 nM	100 nM	1 μM	3 μM
Control	DMSO												
RTK	AP26113-analog												
	TAE684												
	Ceritinib												
	Cabozantinib												
	Crizotinib												
	CEP701												
	Foretinib												
	Ponatinib												
	ASP3026												
	Pazopanib												
	Sorafenib												
	Axitinib												
	Sunitinib malate												
	Nilotinib												
	Vandetanib												
	Motesanib												
Downstream	AG 1478												
	PD173074												
	Afatinib												
	E7080												
	Erlotinib												
	SB218078												
	Go7874												
	Rapamycin												
	Ruxolitinib												
	Vemurafenib												
HSP90	PD169316												
	LY294002												
	TWS119												
	Everolimus												
	Temsirolimus												
	Akt Inhibitor IV												
	SB203580												
	SB202190												
	SB239063												
	WP1066												
HSP90	Radicicol												
	17-AAG												

Experiment performed by Kobayashi Y

図 29. 阻害剤スクリーニングによる細胞生存率変化の解析

野生型 (WT)細胞、F2004V および F2075C 変異細胞に各種阻害剤を処理し、72 時間後に CellTiter-Glo による cell viability assay を行った結果をヒートマップで示す (representative)。DMSO 処理 (ネガティブコントロール)と比較して細胞生存率が増加するほど濃い緑色で示し、減少するほど濃い赤色で示す。

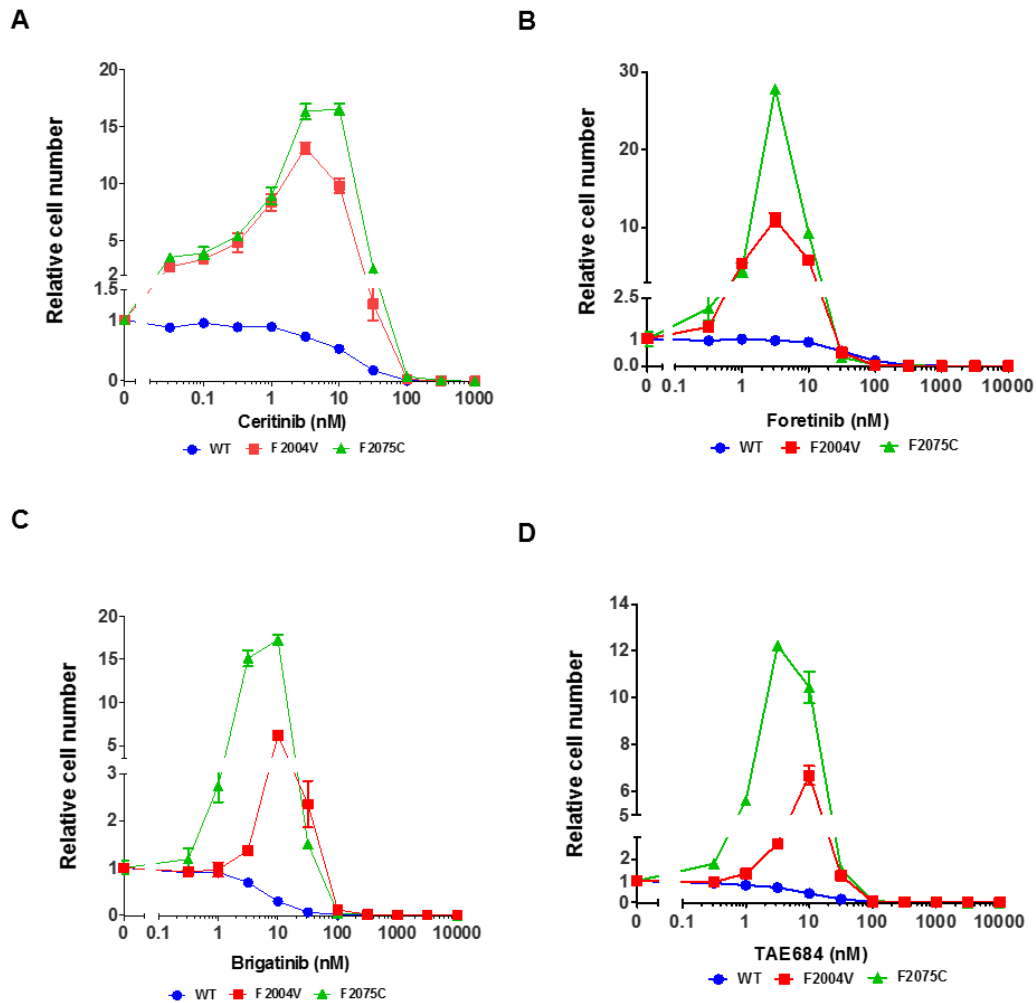


図 30. 野生型(WT)および TKI-addicted な変異細胞(F2004V, F2075C)の ROS1/ALK-TKI (ceritinib, foretinib, brigatinib, TAE684)処理に伴う生存細胞数

(A) ceritinib, (B) foretinib, (C) brigatinib, (D) TAE684, (E) ponatinib 処理下における各細胞の生存率を CellTiter-Glo によって測定した。薬剤未処理の細胞数を 1 とした相対細胞数を縦軸 (Relative cell number)に示す。

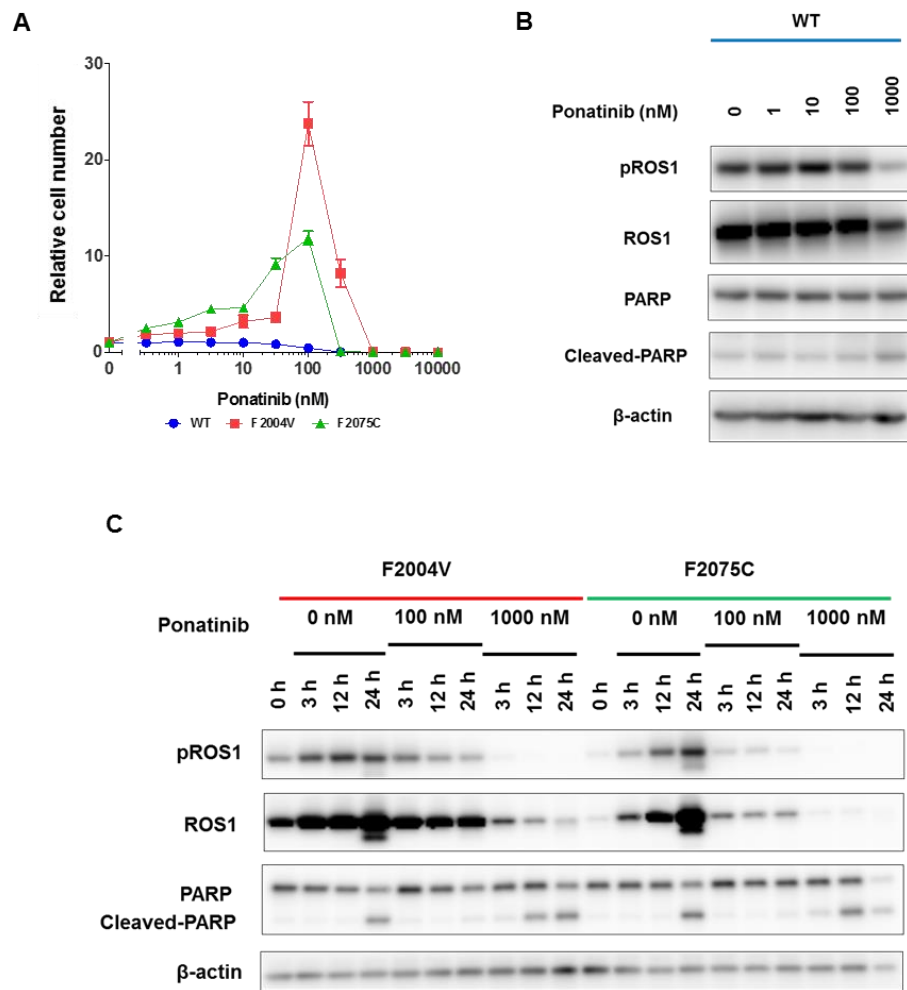


図 31. 野生型(WT)および TKI-addicted な変異細胞(F2004V, F2075C) の multi-target TKI (ponatinib)処理に伴う生存細胞数および細胞生存シグナル伝達機構

(A) ponatinib 処理下における各細胞の生存率を CellTiter-Glo によって測定した。薬剤未処理の細胞数を 1 とした相対細胞数を縦軸 (Relative cell number)に示す。

(B, C) 野生型 CD74-ROS1 細胞 (B)、F2004V および F2075C 変異細胞 (C)の各濃度での ponatinib 処理サンプルをウェスタンブロットにより解析した。

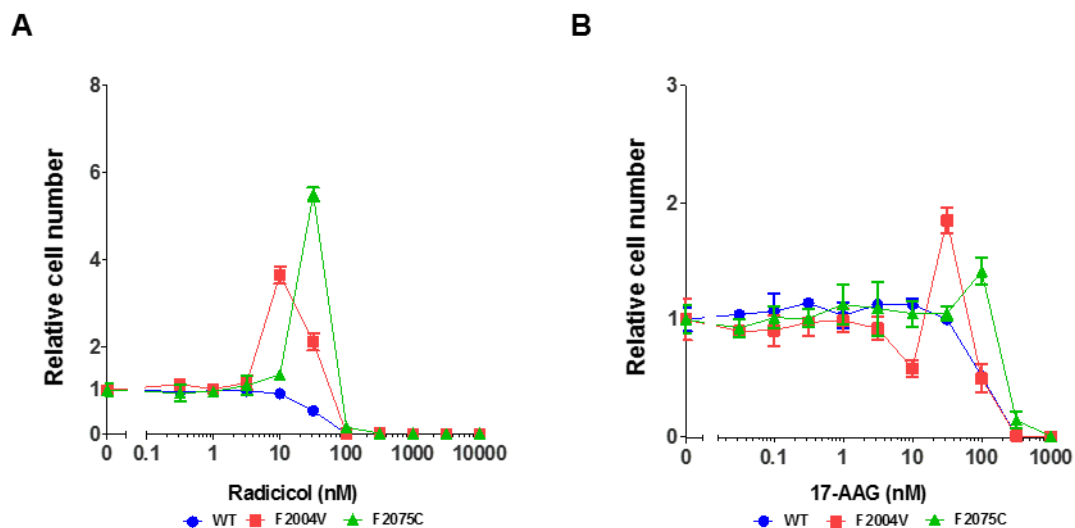


図 32. 野生型(WT)および TKI-addicted な変異細胞(F2004V, F2075C)の Hsp90 阻害剤 (radicicol, 17-AAG)処理に伴う生存細胞数

(A) radicicol, (B) 17-AAG 処理下における各細胞の生存率を CellTiter-Glo によって測定した。薬剤未処理の細胞数を 1 とした相対細胞数を縦軸 (Relative cell number)に示す。

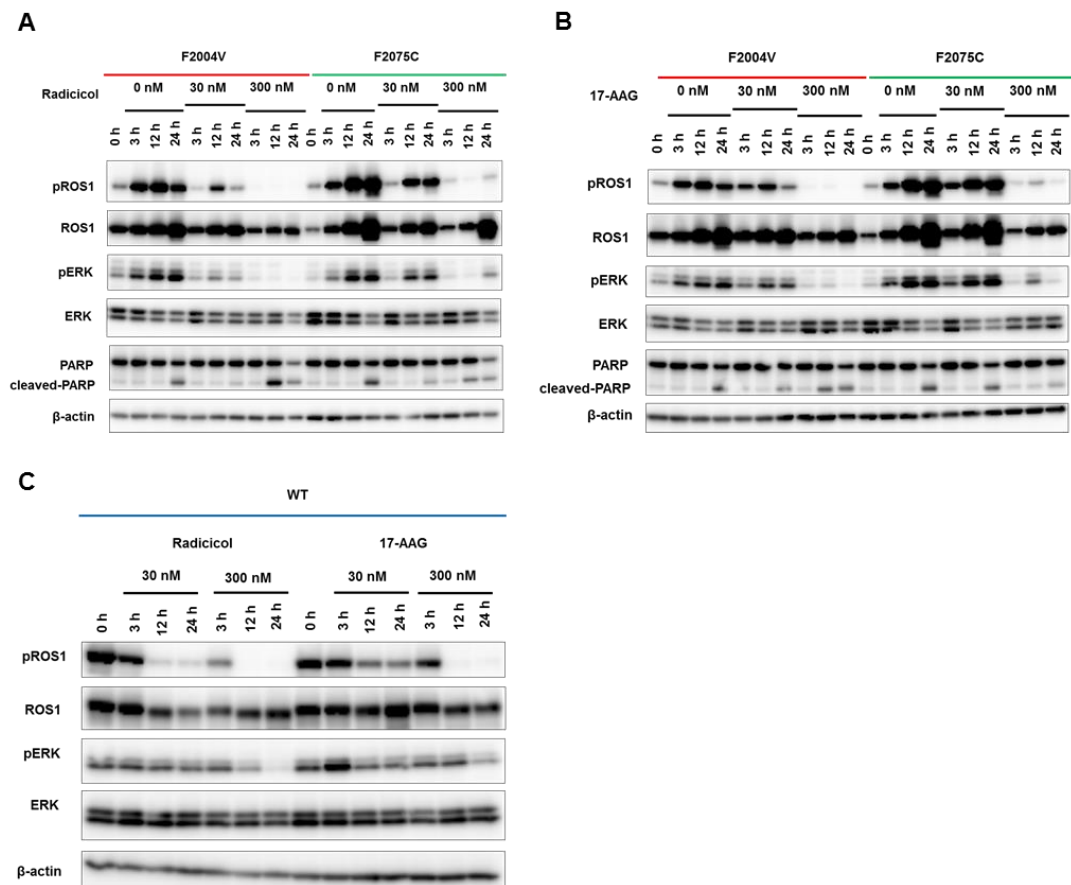


図 33. 野生型(WT)および TKI-addicted な変異細胞(F2004V, F2075C)の Hsp90 阻害剤 (radicicol, 17-AAG)処理に伴う細胞生存シグナル伝達機構
(A, B) F2004V および F2075C 変異細胞、(C) 野生型 CD74-ROS1 細胞 の各濃度での radicicol/17-AAG 処理サンプルをウェスタンブロットにより解析した。

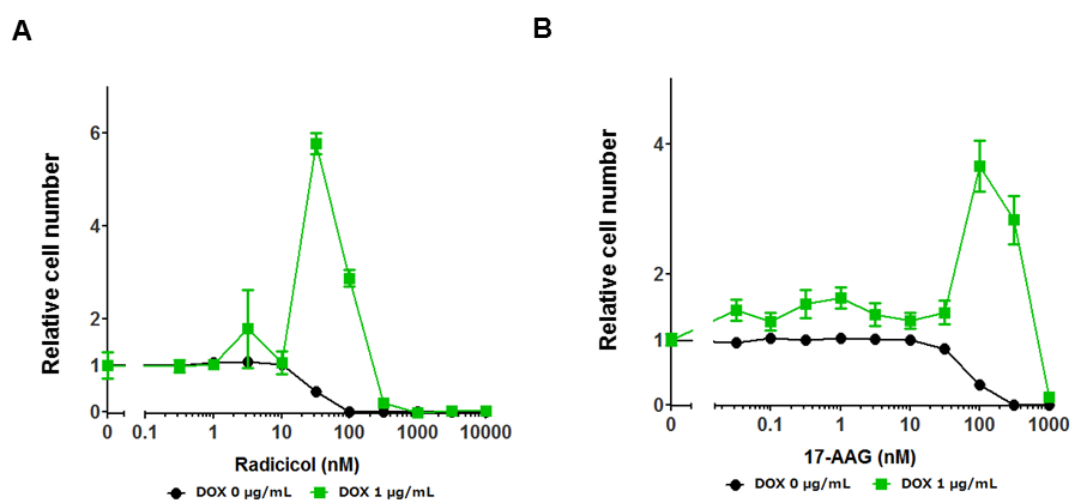


図 34. Reconstructed-F2075C の DOX 有無による Hsp90 阻害剤 (radicicol, 17-AAG) 処理に伴う生存細胞数
 (A) radicicol, (B) 17-AAG 処理下における reconstructed-F2075C の DOX 未添加および 1 $\mu\text{g/mL}$ 添加での生存率を CellTiter-Glo によって測定した。薬剤未処理の細胞数を 1 とした相対細胞数を縦軸 (Relative cell number) に示す。

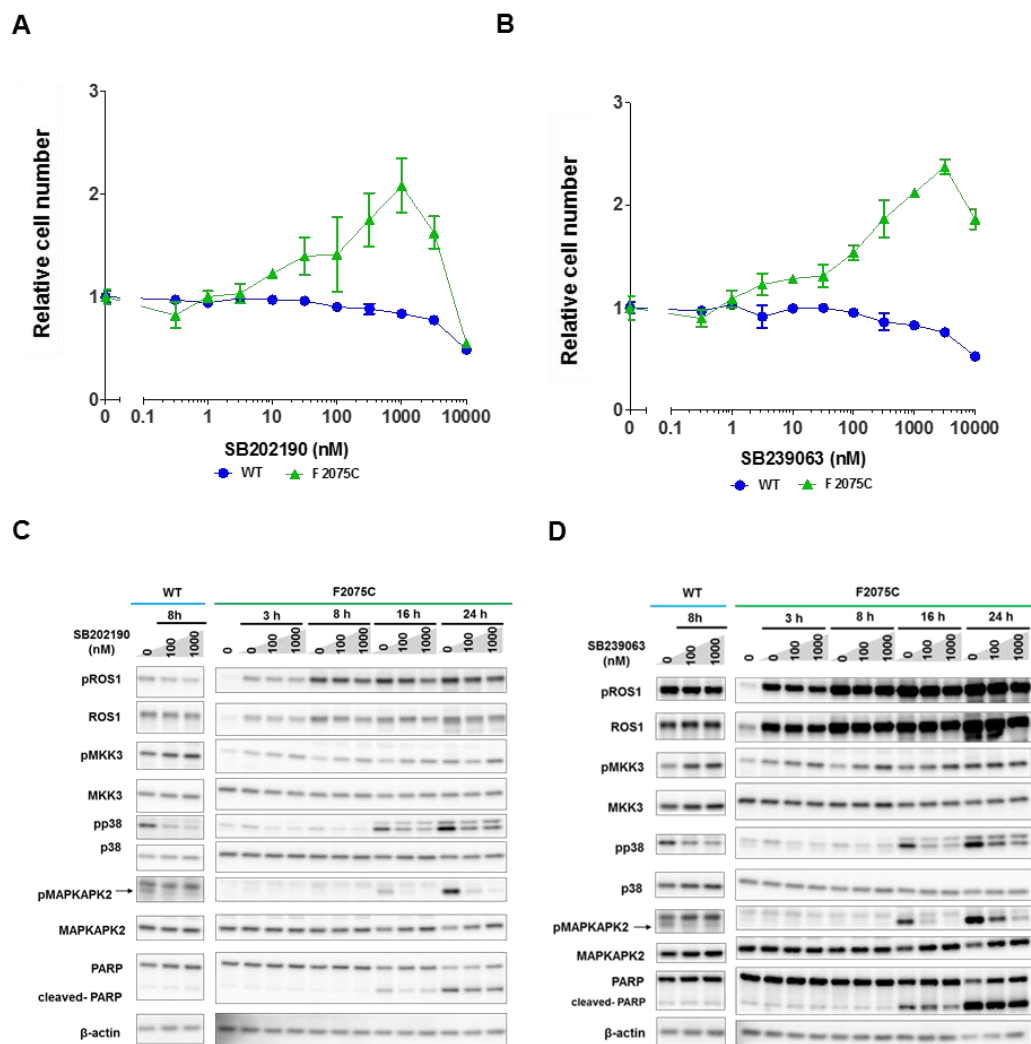


図 35. 野生型(WT)および F2075C 変異細胞の p38 阻害剤 (SB202190, SB239063)処理に伴う生存細胞数および細胞生存シグナル伝達機構

(A, B) SB202190 (A), SB239063 (B)処理下における各細胞の生存率を CellTiter-Glo によって測定した。薬剤未処理の細胞数を 1 とした相対細胞数を縦軸 (Relative cell number)に示す。

(C), (D) 野生型 CD74-ROS1 細胞および F2075C 変異細胞の各濃度での SB202190 (C), SB239063 (D)処理サンプルをウェスタンブロットにより解析した。

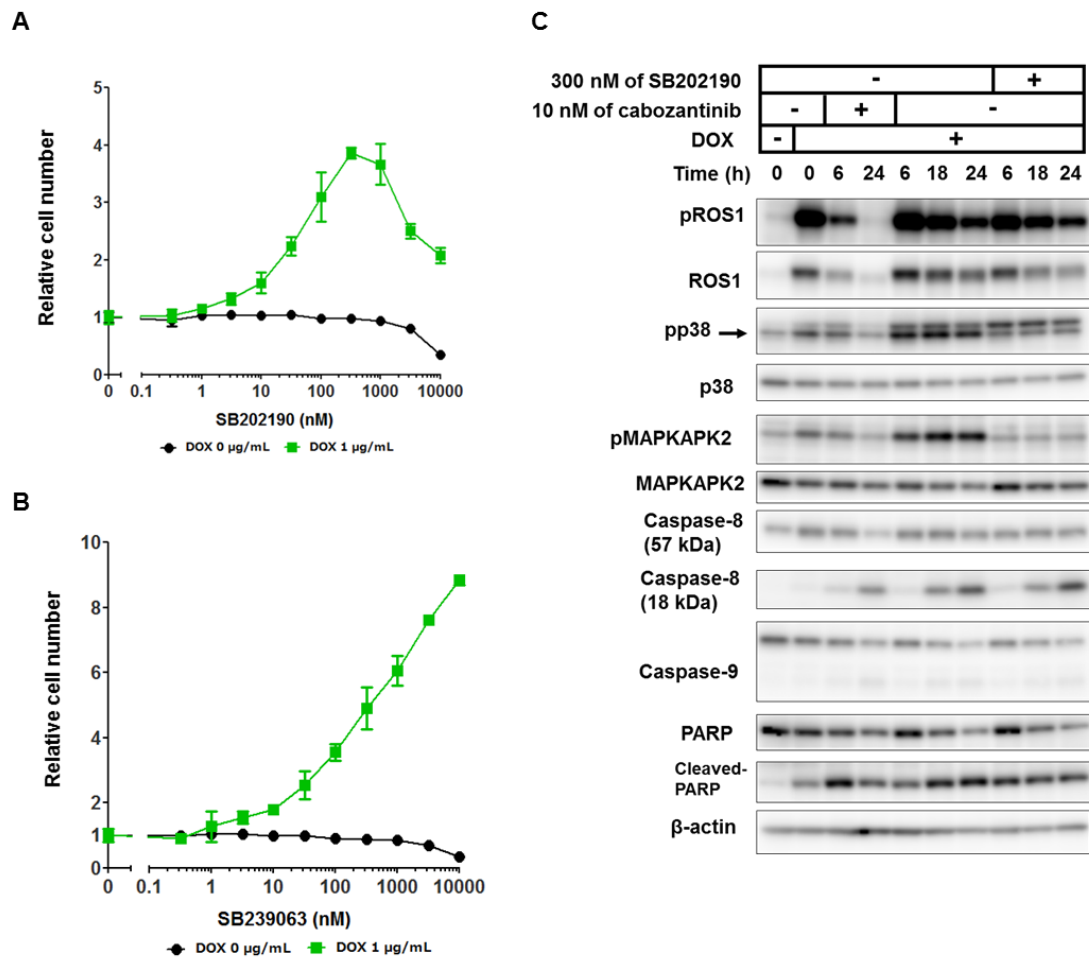


図 36. Reconstructed-F2075C の DOX 有無による p38 阻害剤 (SB202190, SB239063) 処理に伴う生存細胞数および細胞生存シグナル伝達経路

(A) SB202190, (B) SB239063 処理下における reconstructed-F2075C の DOX 未添加および 1 µg/mL 添加での生存率を CellTiter-Glo によって測定した。薬剤未処理の細胞数を 1 とした相対細胞数を縦軸 (Relative cell number) に示す。

(C) DOX 有無における cabozantinib もしくは SB202190 処理による reconstructed-F2075C をウェスタンブロットにより解析した (データの一部は図 17D と同一)。DOX(+) のサンプルはあらかじめ 24 h の 1 µg/mL DOX 前処理を施した。

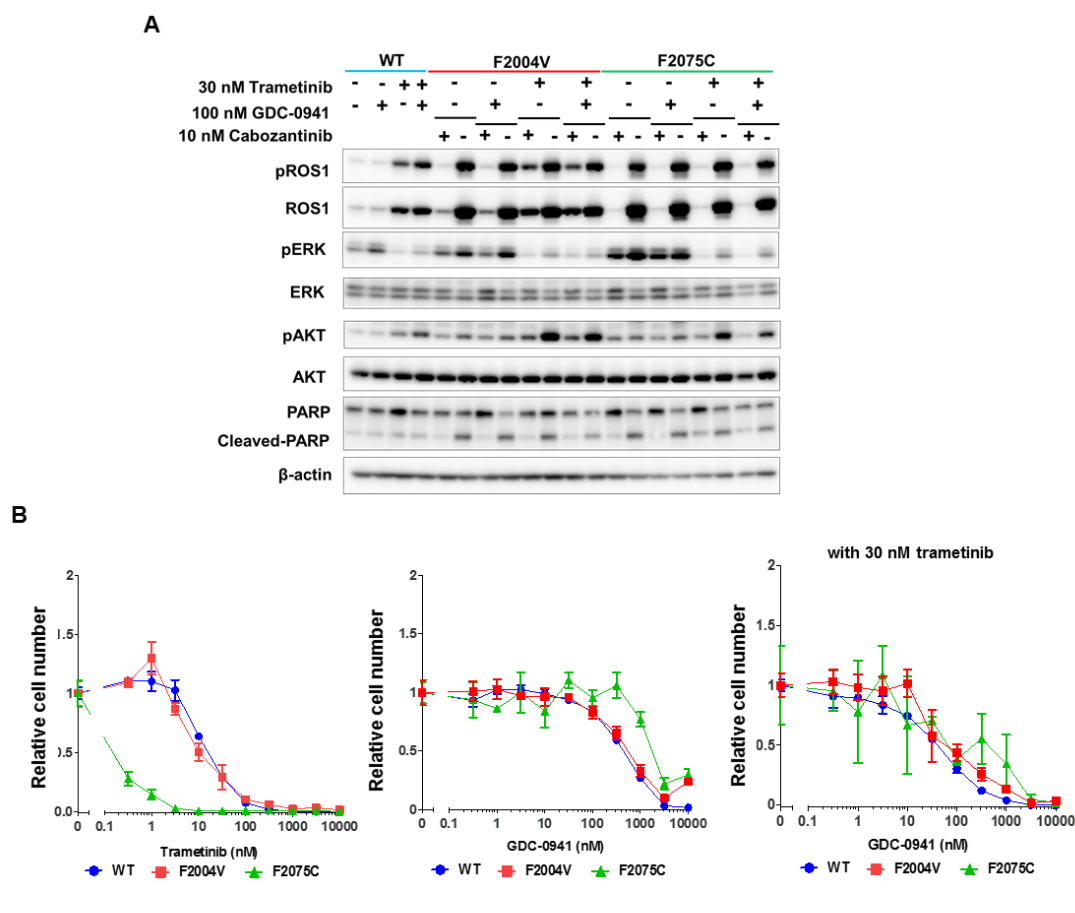


図 37. 野生型(WT)および F2075C 変異細胞の MEK 阻害剤(trametinib)および PI3K 阻害剤(GDC-0941)に対する影響

(A) 野生型 CD74-ROS1 細胞(WT)、F2004V および F2075C 変異細胞の cabozantinib 処理/未処理における trametinib および GDC-0941 に対する影響をウェスタンブロットにより解析した。Trametinib や GDC-0941 の処理時間および cabozantinib の除去時間はそれぞれ 24 時間である。

(B) trametinib (左), GDC-0941 (中), 30 nM trametinib 存在下の GDC-0941 (右)処理下における各細胞の生存率を CellTiter-Glo によって測定した。薬剤未処理の細胞数を 1 とした相対細胞数を縦軸 (Relative cell number)に示す。

5-4. 考察

薬剤ライブラリを用いたスクリーニング結果より、CD74-ROS1 以外にも、Hsp90 や p38 が過剰な ROS1 シグナルによる細胞死を部分的に抑制することが明らかとなった。

Hsp90 はタンパク質のフォールディングや安定化を制御する分子シャペロンの一種である[76]。Hsp90 と相互作用するクライアントタンパク質には EGFR[77]や EML4-ALK[11]、SLC34A2-ROS1[78]などが知られており、それぞれ Hsp90 阻害剤の投与によってがん遺伝子シグナル伝達経路を不活性化し、細胞死が誘導される。これらの知見と本研究結果より、Hsp90 阻害剤が過剰な ROS1 シグナルによって過剰に発現・活性化している ROS1 融合タンパク質の活性を ATP 非競合的に抑制することにより、アポトーシス誘導に至るまでの ROS1 シグナルが発生せず、TKI-addicted ながん細胞は部分的に生存・増殖できると考えられる。

また、F2075C 変異細胞や reconstructed-F2075C において、p38 や p38MAPK シグナル伝達経路が過剰な ROS1 シグナルによって活性化されることが示唆された。P38MAPK シグナル伝達経路は炎症性サイトカインや細胞内ストレス応答(紫外線刺激、DNA 損傷、酸化ストレス等)によって活性化されるシグナル伝達経路であり、分化、オートファジー、アポトーシスに関与している[79]。したがって、過剰な ROS1 シグナルががん細胞にとってある種のストレスとしてふるまっている可能性が示唆された。また、増殖因子が RTK を介して p38MAPK シグナル伝達経路を活性化するという報告もある[80]。したがって、p38MAPK シグナル伝達経路が ROS1 シグナルの下流シグナルとして活性化されたという可能性も考えられるため、RTK と p38MAPK シグナル伝達経路との関連性は今後より詳細に解析される必要があると思われる。

ROS1/ALK-TKI 処理における TKI-addicted な ROS1 変異細胞の細胞死抑制効果は確認できたものの、ROS1 シグナルの下流シグナル伝達経路である MEK 阻害剤や PI3K 阻害剤による細胞死抑制効果は認められなかった。第二章で示したウェスタンブロットによる解析により、過剰な ROS1 シグナルによって MEK/ERK シグナル伝達経路が過剰に活性化していることは明らかである。しかしながら、過去に同様の薬剤依存的な増殖を示す BRAF 変異細胞や EGFR 変異細胞が MEK/ERK シグナル伝達経路の過剰活性化により細胞死や細胞老化を誘導するという知見[74], [75]とは異なり、今回見出された F2004V および F2075C 変異細胞は、ROS1-TKI 低濃度処理によって細胞死を回避できたが、MEK や PI3K、もしくはその両方を阻害することによって細胞死を回避することができなかった。本研究で用いている TKI-addicted な ROS1 変異細胞において、これらの結果は過去の報告とは異なるメカニズムで薬剤依存的な生存・増殖、そして細胞死を制御していることを示唆している。すなわち、チロシンキナーゼや他の driver oncogene の違い、もしくは薬剤耐性獲得機構の違いなどによって、過剰なチロシンキナーゼシグナルもしくはがん遺伝子シグナルにより引き起こされる細胞死ないし細胞老化誘導メカニズムも多岐にわたる可能性を示唆している。

総括

本研究では、ROS1-TKIに依存した生存・増殖を示す変異型ROS1融合遺伝子陽性細胞であるF2004VおよびF2075C変異細胞の生存・増殖および細胞死を司る二面性制御機構を分子生物学的手法やcDNAマイクロアレイやリン酸化プロテオミクスを用いた網羅的解析手法を用いて解析した。その研究結果において、薬剤耐性がん細胞の新たな性質を発見し、薬剤依存的な生存・増殖を示すROS1融合遺伝子陽性がん細胞に特徴的なシグナル伝達経路を見出した(図38)。

ENU mutagenesis スクリーニングにより得られた F2004V および F2075C 変異細胞は cabozantinib をはじめ、crizotinib、lorlatinib などの ROS-TKI の低濃度存在下においてのみ生存・増殖活性を示し、薬剤非存在下において死滅してしまうというユニークな形態を示していた。従来まで、がん分子標的療法における薬剤耐性がん細胞は、分子標的治療薬が存在しても存在しなくても、ほぼ一様に生存・増殖できるという特徴を有しているものと考えられてきた。しかしながら今回見出された2種類の変異細胞は、分子標的治療薬が存在しなければ生存・増殖できないという特徴を有している点で一線を画すものである。

そのような ROS1-TKI に依存した細胞、すなわち TKI-addicted な変異型 ROS1 融合遺伝子陽性細胞は ROS1-TKI 非存在下において過剰な ROS1 シグナルの活性化を生じる。それに伴って下流の生存・増殖シグナルの過剰な活性化が認められるものの、caspase-8 依存的なアポトーシスも同時に観察された。また、TKI-addicted な細胞を高濃度の ROS1-TKI で処理した場合、従来の TKI 感受性がん細胞で観察されるようなミトコンドリア依存的なアポトーシス誘導が認められた。これらの結果は、過剰な ROS1 シグナルによる caspase-8 依存的なアポトーシスは、RTK 活性遮断によって生じるミトコンドリア依存的なアポトーシスとは異なるメカニズムであることを示唆しており、ROS1 シグナルの強度によって細胞死の機構が異なるという点が特徴的である。この相違点が新たな治療標的となる可能性を秘めている。

ENU mutagenesis スクリーニングによって得られた TKI-addicted な ROS1 変異細胞は、F2075C 変異型 CD74-ROS1 が組み込まれた DOX 誘導性ベクターを野生型 CD74-ROS1 発現細胞に導入することでも、TKI-addicted な性質を再現することができた。この結果から、今回見出された TKI-addicted な CD74-ROS1 発現細胞は、過剰な CD74-ROS1 発現と活性化変異の存在により、過剰な ROS1 シグナルを発生させることが示唆された。

cDNA マイクロアレイ解析によって、過剰な ROS1 シグナルによって細胞死受容体に関わるシグナル伝達経路が有意にはたらいっていることが示唆された。この遺伝子発現解析データはウェスタンブロットによる解析によって明らかにされた、過剰な ROS1 シグナルによる caspase-8 依存的なアポトーシスの誘導、という結果を裏付けるデータである。さらにリン酸化プロテオーム解析によって、細胞死受容体シグナル伝達経路に関わるタンパク質である FAF1 のチロシンリン酸化が確認された。今回得られた結果から、FAF1 のチロシン

リン酸化ががん細胞の腫瘍原性やアポトーシスに関与していることが予想されるため、FAF1 や FAF1 と相互作用する因子の機能解析が行われることで、FAF1 の生理学的機能が明らかになると考えられる。

薬剤スクリーニングを用いた検討により、ROS1-TKI 依存的な変異細胞は ALK/ROS1-TKI の他にも、Hsp90 阻害剤による ATP 非競合的な ROS1 キナーゼの抑制も部分的な細胞死抑制効果を示した。また、F2075C 変異細胞や reconstructed-F2075C のみで観察された結果ではあるが、p38 阻害剤によっても過剰な ROS1 シグナルによるアポトーシス誘導を部分的に抑制できたことから、p38MAPK シグナル伝達経路の関与も示唆された。

今回見出された『TKI addiction』という現象は、過去に本研究と同様に薬剤耐性がん細胞の研究過程で発見され、それぞれユニークな細胞生存・増殖および細胞死の現象を報告している。BRAF V600E 変異や EGFR エクソン 19 欠失変異による MEK/ERK シグナル伝達経路の過剰な活性化を介した細胞死、もしくは細胞老化の誘導[74], [75]、*c-Met* (*MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*) コピー数増加に伴う過剰な *c-Met* シグナルを介した細胞周期停止[81]、*NPM-ALK* の遺伝子増幅を介したアポトーシスや DNA 損傷応答の誘導[52], [82]等が観察されている。これらのがん細胞は分子標的治療薬に抵抗するべく、遺伝子変異や遺伝子増幅を介して過剰な *oncogene* シグナルを発しているものと考えられる。しかしながらそれぞれに対応する分子標的治療薬が存在しないと、自身の生存に必要不可欠な *oncogene* シグナルが逆に生存や増殖を止める方向にはたらいってしまう。これらの知見は、がんの生存にとって最適なチロシンキナーゼ活性強度が存在することを示唆しており、*oncogene* シグナルはこのようないわば『諸刃の剣』のような性質を持っていることが過去の研究や本研究結果より示唆された。

一方で、本研究には研究上重要な制限が二点存在する。一点は、マウス *pro-B* 細胞である Ba/F3 細胞を用いて解析を行った点である。特に第四章で示したような網羅的なシグナル解析において、細胞の種類や種の違いが原因で明らかにされなかった発現変動遺伝子や、活性化もしくは阻害されるタンパク質が存在することは十分に考えられる。したがって、肺腺がん (可能であれば *ROS1* 融合遺伝子陽性肺腺がん) 患者由来の細胞から、第三章で示したような手法で過剰なチロシンキナーゼシグナルを発生させるような細胞株を構築し、シグナル解析を実施することで、より臨床的意義に富む知見が得られることが期待できる。二点目は、*in vivo* での実験系を採用していない点である。一点目と関わることであるが、Ba/F3 細胞は interleukin-3 に依存して増殖する性質を有するため、マウス体内における *driver oncogene* 依存的な Ba/F3 細胞の増殖が見込めなかった。そのため、Ba/F3 細胞を用いた *in vivo* 実験は断念せざるを得なかったが、先述のとおり、患者由来細胞株やマウス移植実験に適した NIH3T3 細胞等を利用して TKI-addicted ながん細胞を構築することができれば *in vivo* での実験系に用いることができ、TKI-addicted ながん細胞が生体内で TKI 投与の有無によってどのような挙動を示すのかを観察することが可能となるだろう。

本研究で示したような分子標的治療薬に依存したがん細胞や腫瘍は現在のところ臨床現

場において報告されていない。EGFR 変異陽性肺がん患者の EGFR-TKI 投与を中断することで烈火の如く腫瘍の増大・進展が促進されてしまう『Disease flare』という現象が臨床現場において確認されている[83]が、それとは逆に『TKI addiction』は分子標的治療薬投与を中断することで腫瘍の縮小が生じることが予想されるため、臨床現場において発見することができないのかもしれない。そのため TKI-addicted ながん細胞を臨床現場において見出すことは非常に難しいが、我々が発見できないほど小さいクローンが腫瘍内に潜在すれば、TKI 投与を続けることで TKI-addicted な性質を持つ腫瘍が増大・進展し、患者の予後を増悪させる事態を招くだろう。それゆえ、TKI addiction を研究し、その増殖と死の二面性制御機構を解明することは、薬剤耐性がん細胞を克服する上で臨床的に意義深いものである。

また、これらの知見は分子標的治療薬の間欠投与による休薬期間の設定という、新たな治療方法の有用性を示唆している。実際に過去の報告においても、薬剤依存的な増殖を示すがん細胞を移植されたマウスにおいて薬剤の間欠投与を行うことで、薬剤感受性クローンと薬剤依存的クローンの両方の致死的な増大を防ぎつつ、マウスの生存期間を有意に延長した実験結果を示している[52], [74], [82](図 39)。また、米国 NCI (National Cancer Institute) と SWOG (SouthWest Oncology Group) の共同治験において、BRAF V600E 陽性悪性黒色腫患者に対する trametinib および dabrafenib の持続投与と間欠投与の有効性を比較する臨床試験が現在進行中である(ClinicalTrials.gov study NCT02196181)。これらの研究結果や臨床試験より、TKI addiction やそれに類する現象に対し分子標的治療薬の間欠投与という新たな治療戦略を検討することは非常に意義深いことである。しかしながら同時に患者個々人の薬物動態にも注意を払わなければならないだろう。たとえば crizotinib (www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202570Orig1s000ClinPharmR.pdf) や cabozantinib (www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/203756Orig1s000ClinPharmR.pdf) はそれぞれ CYP3A4 (Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4) の活性を阻害する効果があることが明らかにされている。CYP の遺伝子多型やその他の要因により特定の分子標的治療薬に対する代謝能力の低い患者に対し休薬期間を設定する場合、一定の休薬期間では分子標的治療薬依存的な腫瘍の縮小が充分でないばかりか、より増大させてしまう危険性がある。分子標的治療薬依存的な増殖を示すがんに対する薬剤間欠投与や休薬期間の設定は、個別化医療の一つとして取り扱われる必要があるだろう。

本研究において、私は自身を活性化し得る変異を有する CD74-ROS1 陽性細胞が ROS1-TKI 非存在下で過剰な ROS1 シグナルを発して細胞死を誘導する現象を見出し、その分子機構の一部を明らかにすることに成功した。過剰なチロシンキナーゼ活性が薬剤耐性がん細胞の増殖にとって不利にはたらくという私の研究成果が、薬剤耐性がん細胞を克服するための新たな治療法の実現へとつながり、分子標的治療薬が効かなくなってしまった多くのがん患者の希望となることを切に願う。

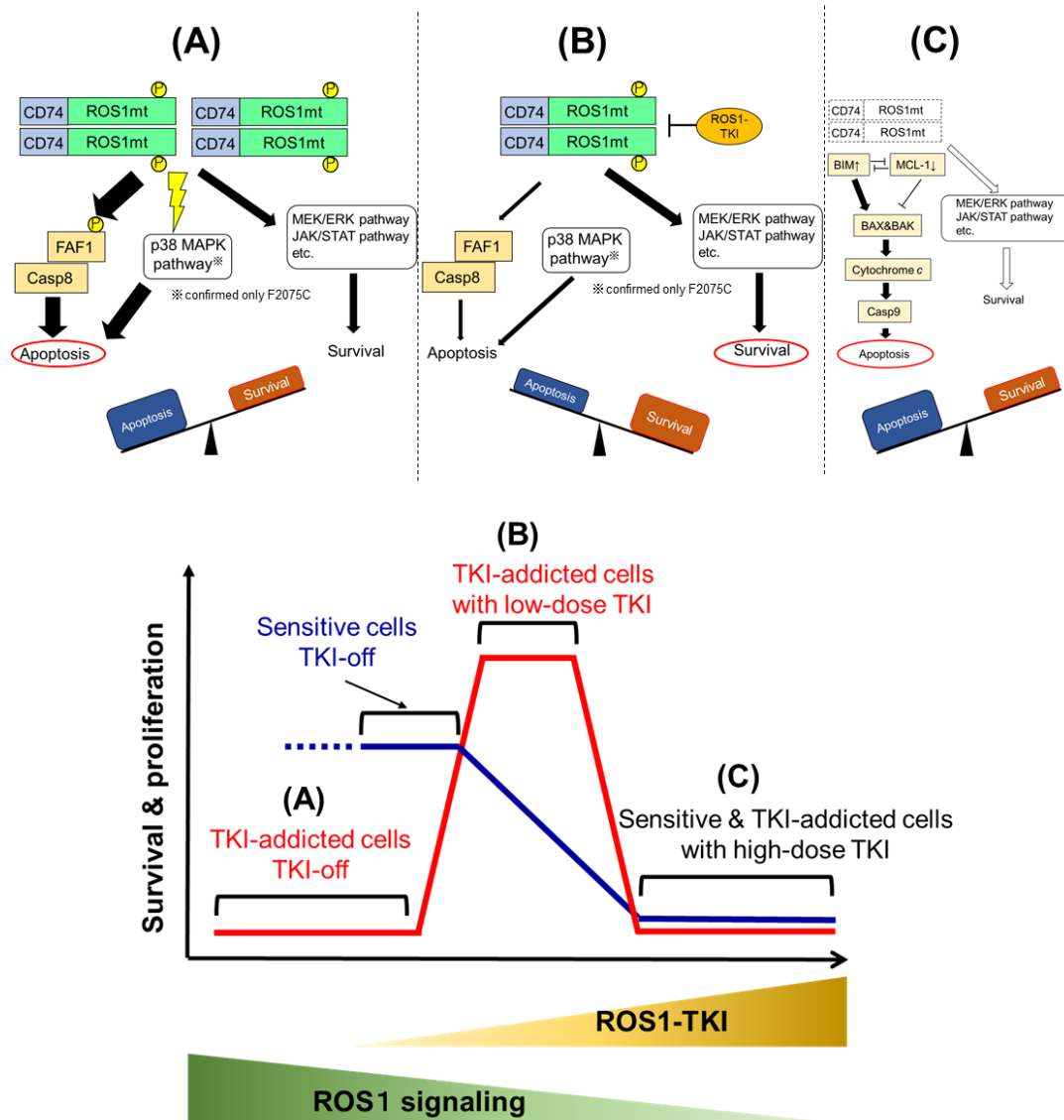


図 38. ROS1 キナーゼシグナルにより規定されるがん細胞の増殖と死を制御する二面性制御機構

ROS1-TKI-addicted ながん細胞は、ROS1-TKI 非存在下において caspase-8 依存的な細胞死や p38 MAPK 経路の活性化によりアポトーシスが誘導(A)され、ROS1-TKI 低濃度存在下によってそれらのアポトーシス誘導機構よりも生存・増殖シグナルの活性化が優位となる(B)。高濃度 ROS1-TKI 存在下においては、TKI 感受性細胞と同様にミトコンドリア依存的なアポトーシスが誘導される(C)。

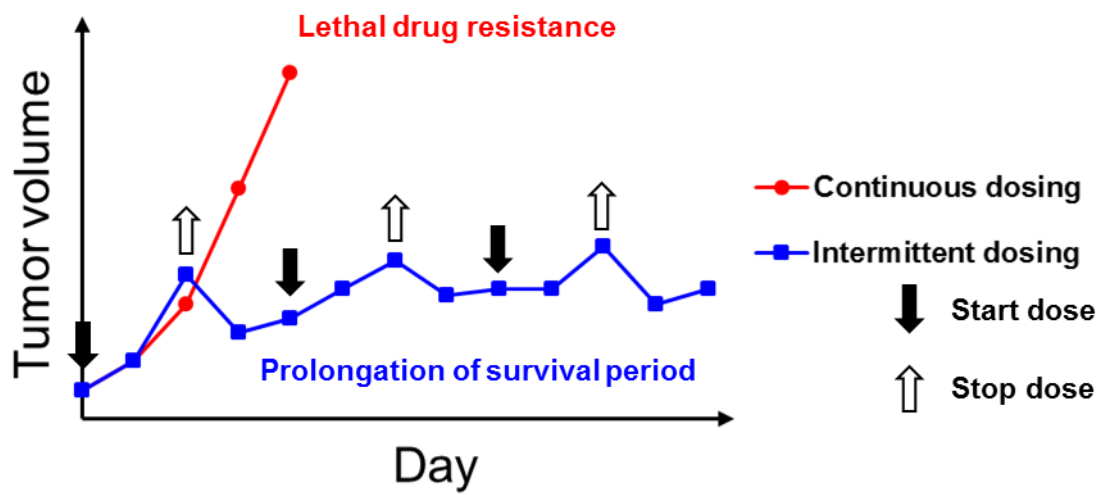


図 39. TKI addicted ながん細胞における休薬の有用性

参考文献

- [1] G. Giaccone, “Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 14, pp. 3235–3242, 2005.
- [2] M. Soda *et al.*, “Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer,” *Nature*, vol. 448, no. 7153, pp. 561–566, 2007.
- [3] A. T. Shaw *et al.*, “Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 371, no. 21, pp. 1963–1971, 2014.
- [4] K. Takeuchi, M. Soda, Y. Togashi, Y. L. Choi, Y. Satoh, and S. Okumura, “RET , ROS1 and ALK fusions in lung cancer,” *Nat. Med.*, vol. 18, no. 3, pp. 378–381, 2012.
- [5] I. B. Weinstein and A. K. Joe, “Mechanisms of disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy,” *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, vol. 3, no. 8, pp. 448–457, 2006.
- [6] E. J. Jordan *et al.*, “Prospective comprehensive molecular characterization of lung adenocarcinomas for efficient patient matching to approved and emerging therapies,” *Cancer Discov.*, pp. 596–609, 10.1158/2159-8290. CD-16-1337, 2017.
- [7] S. Kobayashi *et al.*, “EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to Gefitinib,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, no. 8, pp. 786–792, 2005.
- [8] R. C. Doebele *et al.*, “Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 1472–1482, 2012.
- [9] J. A. Engelman *et al.*, “MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling,” *Science*, vol. 316, no. 5827, pp. 1039–43, 2007.
- [10] S. Yano *et al.*, “Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 22, pp. 9479–9487, 2008.
- [11] R. Katayama *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.*, vol. 108, no. 18, pp. 7535–40, 2011.
- [12] R. Katayama *et al.*, “P-glycoprotein Mediates Ceritinib Resistance in Anaplastic Lymphoma Kinase-rearranged Non-small Cell Lung Cancer,” *EBioMedicine*, vol. 3, pp. 54–66, 2016.
- [13] M. Shibuya, H. Hanafusa, and P. C. Balduzzi, “Cellular sequences related to three new oncogenes of avian sarcoma virus (fms, yes, and ros) and their expression in normal and transformed cells,” *J. Virol.*, vol. 42, no. 1, pp. 143–52, 1982.
- [14] H. Matsushime, L. H. Wang, and M. Shibuya, “Human c-ros-1 Gene Homologous to the v-ros Sequence of UR2 Sarcoma Virus Encodes for a Transmembrane Receptorlike Molecule,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 6, no. 8, pp. 3000–3004, 1986.
- [15] L. Nagarajan, E. Louie, Y. Tsujimoto, P. C. Balduzzi, K. Huebner, and C. M. Croce, “The human

- c-ros gene (ROS) is located at chromosome region 6q16---6q22,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 83, no. 17, pp. 6568–6572, 1986.
- [16] W. S. Neckameyer, M. Shibuya, M. T. Hsu, and L. H. Wang, “Proto-oncogene c-ros codes for a molecule with structural features common to those of growth factor receptors and displays tissue specific and developmentally regulated expression,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 6, no. 5, pp. 1478–86, 1986.
 - [17] H. Satoh, M.C. Yoshida, H. Matsushime, and M. Shibuya, “Regional localization of the human c-ros1 on 6q22 and fit on 13q2.,” *Jpn. J. Cancer Res.*, vol. 8, no. 78, pp. 772–5, 1987.
 - [18] C. Birchmeier, K. O’Neill, M. Riggs, and M. Wigler, “Characterization of ROS1 cDNA from a human glioblastoma cell line,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 12, pp. 4799–803, 1990.
 - [19] V. M. Rimkunas *et al.*, “Analysis of receptor tyrosine kinase ROS1-positive tumors in non-small cell lung cancer: Identification of a FIG-ROS1 fusion,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 16, pp. 4449–4457, 2012.
 - [20] H. J. Jun *et al.*, “ROS1 signaling regulates epithelial differentiation in the epididymis,” *Endocrinology*, vol. 155, no. 9, pp. 3661–3673, 2014.
 - [21] T. Raabe, “The sevenless signaling pathway: Variations of a common theme,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1496, no. 2–3, pp. 151–163, 2000.
 - [22] R. Nagaraj and U. Banerjee, “The little R cell that could,” *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 48, no. 8–9, pp. 755–760, 2004.
 - [23] C. Birchmeier, S. Sharma, and M. Wigler, “Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human glioblastoma cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 24, pp. 9270–4, 1987.
 - [24] A. Charest, K. Lane, K. McMahon, and D. E. Housman, “Association of a Novel PDZ Domain-containing Peripheral Golgi Protein with the Q-SNARE (Q-soluble N-Ethylmaleimide-sensitive Fusion Protein (NSF) Attachment Protein Receptor) Protein Syntaxin 6,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 31, pp. 29456–29465, 2001.
 - [25] K. Rikova *et al.*, “Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer,” *Cell*, vol. 131, no. 6, pp. 1190–1203, 2007.
 - [26] C. S. Zong, J. L. K. Chan, S. K. Yang, and L. H. Wang, “Mutations of Ros differentially effecting signal transduction pathways leading to cell growth Versus transformation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 3, pp. 1500–1506, 1997.
 - [27] K. D. Davies and R. C. Doebele, “Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 15, pp. 4040–4045, 2013.
 - [28] K. Bergethon *et al.*, “ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 8, pp. 863–870, 2012.
 - [29] Z. Chen, C. M. Fillmore, P. S. Hammerman, C. F. Kim, and K.-K. Wong, “Non-small-cell lung

- cancers: a heterogeneous set of diseases,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 14, no. 8, pp. 535–546, 2014.
- [30] G. Manning, “The protein kinase complement of the human genome,” *Science*, vol. 298, no. 5600, pp. 1912–1934, 2002.
- [31] M. A. Davare *et al.*, “Structural insight into selectivity and resistance profiles of ROS1 tyrosine kinase inhibitors,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 39, pp. E5381–E5390, 2015.
- [32] J. Mazières *et al.*, “Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: Results from the EUROS1 cohort,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 9, pp. 992–999, 2015.
- [33] A. T. Shaw *et al.*, “Ceritinib in ALK -rearranged non–small-cell lung cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, no. 13, pp. 1189–1197, 2014.
- [34] V. Subbiah, D. S. Hong, and F. Meric-Bernstam, “Clinical activity of ceritinib in ROS1 - rearranged non-small cell lung cancer: Bench to bedside report,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 11, pp. E1419–E1420, 2016.
- [35] S. M. Lim *et al.*, “Open-label , multicenter , phase II study of ceritinib in patients with non – small-cell lung cancer harboring ROS1 rearrangement,” *J. Clin. Oncol.*, 10.1200/JCO.2016.71.3701, 2017.
- [36] H. Y. Zou *et al.*, “PF-06463922 is a potent and selective next-generation ROS1/ALK inhibitor capable of blocking crizotinib-resistant ROS1 mutations,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 112, no. 11, pp. 3493–3498, 2015.
- [37] A. Drilon *et al.*, “Safety and Antitumor Activity of the Multi-Targeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib (RXDX-101): Combined Results from Two Phase 1 Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1),” *Cancer Discov.*, vol. 7, no. 4, pp. 400–409, 2017.
- [38] F. Facchinetti *et al.*, “Crizotinib-resistant ROS1 mutations reveal a predictive kinase inhibitor sensitivity model for ROS1- and ALK-rearranged lung cancers.,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 24, pp. 5983–5991, 2016.
- [39] M. M. Awad *et al.*, “Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 25, pp. 2395–2401, 2013.
- [40] A. Drilon *et al.*, “A novel crizotinib-resistant solvent-front mutation responsive to cabozantinib therapy in a patient with ROS1-rearranged lung cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 10, pp. 2351–8, 2015.
- [41] R. Katayama *et al.*, “Cabozantinib overcomes crizotinib resistance in ROS1 fusion-positive cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, no. 1, pp. 166–174, 2015.
- [42] S. C. Bresler *et al.*, “ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma,” *Cancer Cell*, vol. 26, no. 5, pp. 682–694, 2014.
- [43] B. Hallberg and R. H. Palmer, “Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 10, pp. 685–700, 2013.

- [44] G. R. Bean *et al.*, “PUMA and BIM are required for oncogene inactivation-induced apoptosis,” *Sci. Signal.*, vol. 6, no. 268, p. ra20, 2013.
- [45] K. Takezawa, I. Okamoto, K. Nishio, P. A. Jänne, and K. Nakagawa, “Role of ERK-BIM and STAT3-survivin signaling pathways in ALK inhibitor-induced apoptosis in EML4-ALK-positive lung cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 8, pp. 2140–2148, 2011.
- [46] D. B. Costa *et al.*, “BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations,” *PLoS Med.*, vol. 4, no. 10, pp. 1669–1680, 2007.
- [47] D. Ren *et al.*, “BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program,” *Science*, vol. 330, no. 6009, pp. 1390–1393, 2010.
- [48] H. Zou, Y. Li, X. Liu, and X. Wang, “An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 17, pp. 11549–11556, 1999.
- [49] J. Deng *et al.*, “Proapoptotic BH3-only BCL-2 family protein BIM connects death signaling from epidermal growth factor receptor inhibition to the mitochondrion,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 24, pp. 11867–11875, 2007.
- [50] M. G. Vander Heiden, N. S. Chandel, E. K. Williamson, P. T. Schumacker, and C. B. Thompson, “Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria,” *Cell*, vol. 91, no. 5, pp. 627–37, 1997.
- [51] H. A. Bradeen *et al.*, “Comparison of imatinib mesylate, dasatinib, and nilotinib in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)–based mutagenesis screen : high efficacy of drug combinations,” *Blood*, vol. 108, no. 7, pp. 2332–2338, 2006.
- [52] M. Ceccon *et al.*, “Excess of NPM-ALK oncogenic signaling promotes cellular apoptosis and drug dependency,” *Oncogene*, vol. 35, no. 29, pp. 3854–65, 2015.
- [53] K. J. Shin *et al.*, “A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no. 37, pp. 13759–13764, 2006.
- [54] A. Subramanian, P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, and B. L. Ebert, “Gene set enrichment analysis : A knowledge-based approach for interpreting genome-wide,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no. 43, pp. 15545–15550, 2005.
- [55] J. Adachi *et al.*, “Improved proteome and phosphoproteome analysis on a cation exchanger by a combined acid and salt gradient,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 16, pp. 7899–7903, 2016.
- [56] Y. Ishihama, J. Rappsilber, and M. Mann, “Modular stop and go extraction tips with stacked disks for parallel and multidimensional peptide fractionation in proteomics,” *J. Proteome Res.*, vol. 5, no. 4, pp. 988–994, 2006.
- [57] J. Rappsilber, M. Mann, and Y. Ishihama, “Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips,” *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 8,

- pp. 1896–1906, 2007.
- [58] J. Cox, N. Neuhauser, A. Michalski, R. A. Scheltema, J. V. Olsen, and M. Mann, “Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment,” *J. Proteome Res.*, vol. 10, no. 4, pp. 1794–1805, 2011.
 - [59] H. J. Jun, H. Johnson, R. T. Bronson, and S. De Feraudy, “The oncogenic lung cancer fusion kinase CD74-ROS activates a novel invasiveness pathway through E-Syt1 phosphorylation,” *Cancer Res.*, vol. 72, no. 10, pp. 3764–3774, 2012.
 - [60] H. Keilhack *et al.*, “Negative regulation of Ros receptor tyrosine kinase signaling,” *J. Cell Biol.*, vol. 152, no. 2, pp. 325–334, 2001.
 - [61] F. H. Igney and P. H. Krammer, “Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 4, pp. 277–288, 2002.
 - [62] J. M. García-Heredia *et al.*, “Tyrosine phosphorylation turns alkaline transition into a biologically relevant process and makes human cytochrome c behave as an anti-apoptotic switch,” *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 16, no. 8, pp. 1155–1168, 2011.
 - [63] S. W. Ryu, S. J. Lee, M. Y. Park, J. il Jun, Y. K. Jung, and E. Kim, “Fas-associated factor 1, FAF1, Is a member of Fas death-inducing signaling complex,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 26, pp. 24003–24010, 2003.
 - [64] K. Chu, X. Niu, and L. T. Williams, “A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 25, pp. 11894–11898, 1995.
 - [65] P. G. Knox, C. C. Davies, M. Ioannou, and A. G. Eliopoulos, “The death domain kinase RIP1 links the immunoregulatory CD40 receptor to apoptotic signaling in carcinomas,” *J. Cell Biol.*, vol. 192, no. 3, pp. 391–399, 2011.
 - [66] W. M. Craig, A. A. Deborah, and R. T. Joseph, “FAS-Associated Factor 1 (FAF1): diverse functions and implications for oncogenesis,” *Cell Cycle*, vol. 8, no. 16, pp. 2528–2534, 2009.
 - [67] A. Hidalgo *et al.*, “Microarray comparative genomic hybridization detection of chromosomal imbalances in uterine cervix carcinoma,” *BMC Cancer*, vol. 5, no. 1, p. 77, 2005.
 - [68] X. D. Zhang, A. Franco, K. Myers, C. Gray, T. Nguyen, and P. Hersey, “Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE- inhibitory protein expressi,” *Cancer Res.*, vol. 59, no. 7136, pp. 2747–2753, 1999.
 - [69] N. Shivapurkar *et al.*, “Loss of expression of death-inducing signaling complex (DISC) components in lung cancer cell lines and the influence of MYC amplification,” *Oncogene*, vol. 21, no. 55, pp. 8510–8514, 2002.
 - [70] B. B. Olsen, V. Jessen, P. Højrup, O. G. Issinger, and B. Boldyreff, “Protein kinase CK2 phosphorylates the Fas-associated factor FAF1 in vivo and influences its transport into the

- nucleus,” *FEBS Lett.*, vol. 546, no. 2–3, pp. 218–222, 2003.
- [71] M. S. Jang *et al.*, “Negative feedback regulation of Aurora-A via phosphorylation of Fas-associated factor-1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 47, pp. 32344–32351, 2008.
 - [72] F. Wu, P. Wang, J. Zhang, L. C. Young, R. Lai, and L. Li, “Studies of phosphoproteomic changes induced by nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK) highlight deregulation of tumor necrosis factor (TNF)/Fas/TNF-related apoptosis-induced ligand signaling pathway in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 9, no. 7, pp. 1616–1632, 2010.
 - [73] S. W. Ryu, S. J. Lee, M. Y. Park, J. il Jun, Y. K. Jung, and E. Kim, “Fas-associated factor 1, FAF1, Is a member of Fas death-inducing signaling complex,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 26, pp. 24003–24010, 2003.
 - [74] M. D. Thakur *et al.*, “Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance,” *Nature*, vol. 494, no. 7436, pp. 251–5, 2013.
 - [75] K. Suda *et al.*, “Conversion from the ‘oncogene addiction’ to ‘drug addiction’ by intensive inhibition of the EGFR and MET in lung cancer with activating EGFR mutation,” *Lung Cancer*, vol. 76, no. 3, pp. 292–299, 2012.
 - [76] M. Taipale, D. F. Jarosz, and S. Lindquist, “HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 7, pp. 515–28, 2010.
 - [77] T. Shimamura *et al.*, “Hsp90 inhibition suppresses mutant EGFR-T790M signaling and overcomes kinase inhibitor resistance,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 14, pp. 5827–5838, 2008.
 - [78] J. Sang *et al.*, “Targeted inhibition of the molecular chaperone Hsp90 overcomes ALK inhibitor resistance in non-small cell lung cancer,” *Cancer Discov.*, vol. 3, no. 4, pp. 430–443, 2013.
 - [79] T. Zarubin and J. Han, “Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway,” *Cell Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 11–18, 2005.
 - [80] M. Katz, I. Amit, and Y. Yarden, “Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1773, no. 8, pp. 1161–1176, 2007.
 - [81] Y. Funakoshi *et al.*, “Excessive MET signaling causes acquired resistance and addiction to MET inhibitors in the MKN45 gastric cancer cell line,” *Invest. New Drugs*, vol. 31, no. 5, pp. 1158–1168, 2013.
 - [82] A. D. Amin *et al.*, “Evidence suggesting that discontinuous dosing of ALK Kinase Inhibitors May Prolong Control of ALK+ Tumors,” *Cancer Res.*, vol. 75, no. 14, pp. 2916–2927, 2015.
 - [83] G. J. Riely *et al.*, “Prospective assessment of discontinuation and reinitiation of erlotinib or gefitinib in patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib followed by the addition of everolimus,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 17, pp. 5150–5155, 2007.

謝辞

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、ご鞭撻のもとに行わせていただきました。心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、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主任研究員 片山量平博士に直接のご指導を仰ぎ、多くの助言や議論を交わしていただきました。心より感謝申し上げます。

リン酸化プロテオーム解析の実施にあたり、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所プロテオームリサーチプロジェクトプロジェクトリーダー 朝長毅教授に共同研究ならびに数週間の研究所滞在による解析手法の習得をお認めいただき、解析結果における貴重なご助言をいただきました。深く感謝申し上げます。

リン酸化プロテオーム解析の実施にあたり、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所プロテオームリサーチプロジェクトプロジェクト研究員 足立淳博士にサンプル処理方法ならびにデータ解析手法のご指導を賜り、助言や議論を交わしていただきました。心より感謝申し上げます。

本研究における **ENU mutagenesis** スクリーニングおよび薬剤スクリーニングは東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻修士課程 長竹(旧姓:小林)由佳様に実施していただきました。本当にありがとうございました。

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人がん研究会の先生方ならびにがん化学療法センター基礎研究部研究員 竹本愛博士をはじめ、同研究部研究生の皆様に議論を通じた多くのご指導、ご支援を賜りました。心より感謝申し上げます。また、同研究部主任研究助手ならびに研究助手の皆様に研究手法のご指導を賜りました。本当にありがとうございました。

前職を辞して本学博士課程への進学を決意する際、応援いただきました前職の先輩、同僚、そして友人の皆様に感謝申し上げます。

最後に、前職を辞したために多大な心配をかけたにもかかわらず、私の意志を尊重し、信頼し、応援してくれた両親に心より感謝します。

小倉 隼人