

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏 名 小倉 隼人

【序文】

がんは日本人の死因第一位であり、中でも肺がんによる死亡者数がもっとも多く、有効な肺がん治療法の開発が期待されている。肺がんの中でも肺腺がんは、*EGFR*活性化変異や、*ALK*、*ROS1*等の融合遺伝子といった様々なドライバー遺伝子変異が原因となって発症しており、これらの遺伝子変異産物を標的とした分子標的治療薬投与が著明な腫瘍縮小効果を示す。しかしほとんどの症例では1年程度で薬剤耐性が生じて再発することが臨床上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、それぞれの薬剤耐性がん細胞の性質についても不明な点が多い。それゆえ、耐性を克服可能な分子標的療法を開発するためには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、一部の薬剤耐性がん細胞が分子標的治療薬に耐性であるというだけでなく、むしろ薬剤存在下で増殖が促進されるという「薬剤に依存した」増殖を示すがん細胞が、複数の研究グループにより報告されはじめている。我々の研究室においては、*ENU mutagenesis* を用いた薬剤耐性変異がん細胞スクリーニングの過程で分子標的治療薬に依存して増殖する*ROS1*融合遺伝子陽性がん細胞が見出されている。そこで、分子標的治療薬に依存した増殖を示すがん細胞の増殖と死の制御機構に焦点を絞り解析することで、がんの治療薬耐性化における新たな分子機構の解明とその分子機構を標的とした新規治療法開発を目指した。

【研究目的】

分子標的治療薬依存的に生存・増殖する*ROS1*融合遺伝子陽性がん細胞をモデルとして用いて、がん細胞の生存・増殖と死を制御する分子機構を解析し、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。

【研究内容および考察】

(1) ROS1-TKI 依存的な生存・増殖(TKI addiction)を示すがん細胞の特徴

これまでに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へのcabozantinibの有効性が示されてきた。さらにROS1融合遺伝子陽性がんのcabozantinib耐性変異のスクリーニングが行われることで、複数のROS1融合遺伝子の変異クローンが得られている。得られたクローンの内、ROS1キナーゼドメインにF2004VおよびF2075Cの変異を有する2つの変異細胞においてcabozantinibに対する感受性を調べたところ、両変異細胞はいずれもcabozantinib低濃度存在下のみで細胞の生存が確認され、野生型CD74-ROS1陽性

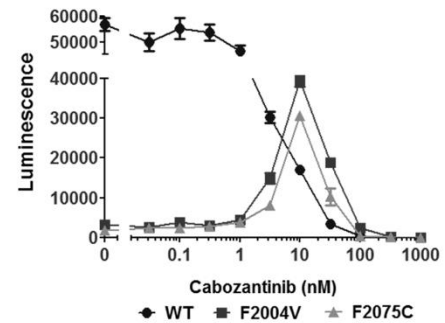


図1. 野生型(WT)およびTKI-addictedな変異型(F2004V, F2075C)細胞のcabozantinib処理下における細胞生存効果

細胞よりもやや高い濃度のcabozantinib存在下でも生き残る耐性の性質を有していた。しかし驚いたことに薬剤非存在下においては細胞がほとんど死滅した(図1)。Cabozantinibの他にも、同じROS1-TKIであるcrizotinibやlorlatinibにおいても同様の現象が再現された。これらのROS1キナーゼドメイン内の変異箇所はALKにおけるF1174VおよびF1245Cに相当し、神経芽細胞腫における活性化変異であると報告されている。ROS1とALKのキナーゼドメイン内の相同性は64%以上と非常に高いため、F2004VおよびF2075C変異体はROS1の活性化変異体であることが考えられた。

(2) TKI-addiction を示すがん細胞のシグナル伝達解析

Cabozantinibの有無によってF2004V, F2075C変異細胞内のシグナル伝達がどのように変化しているのかを確認するため、cabozantinib除去後のCD74-ROS1およびその下流の細胞内シグナル活性を継時的にウェスタンブロットにて解析した。その結果、F2004V, F2075C変異細胞はいずれもcabozantinibを除去後、時間依存的にROS1発現および自己リン酸化による活性化が過剰に増大していくことが確認された。さらに下流の生存・増殖シグナルに関わるERKやSTAT3の著しいリン酸化上昇も確認できた。その一方で、薬剤除去後24時間にはcaspase-8やPARPの切断をマーカーとするアポトーシスの誘導が認められた(図2)。以上の結果から、F2004VおよびF2075C変異細胞はROS1-TKI除去によりROS1の蓄積と過剰な活性化が起こり、下流の生存・増殖シグナルを活性化させる一方で、アポトーシス誘導シグナルをも活性化させていることが示唆された。

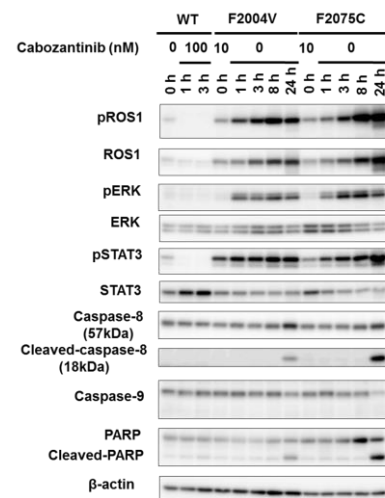


図2. Cabozantinib除去によるROS1過剰活性化およびアポトーシスの誘導

(3) TKI-addiction を示すがん細胞の再構築

ENU mutagenesis により得られた TKI-addicted ながん細胞における増殖と死の制御が CD74-ROS1 変異体の過剰発現に依存しているかを明らかにするために、野生型 CD74-ROS1 もしくは変異型 CD74-ROS1 F2075C をそれぞれドキシサイクリン (DOX) 誘導型ベ

クターに組み込み、野生型 CD74-ROS1 発現 Ba/F3 細胞に導入した (それぞれ WT + dox-WT / F2075C)。それぞれの再構成細胞をクローン単離したが、ROS1-TKI 依存的な増殖を示すクローンは WT + dox-WT からは得られなかった。しかしその一方で、WT + dox-F2075C からは ROS1-TKI に依存した増殖を示すクローンが複数得られた (図 3)。その中で顕著な ROS1-TKI 依存的増殖を示すクローン (Reconstructed-F2075C) の細胞生存率

アッセイを行ったところ (図 4)、ENU mutagenesis で得られた F2075C 変異細胞と同様に ROS1-TKI 依存的な生存・増殖活性を示し、F2075C 発現誘導した際には TKI を除去することで細胞死が生じることが明らかとなった。以上の結果から、TKI addiction は活性化変異体と考えられる変異型 ROS1 融合タンパク質の過剰発現が必要であることが示唆された。

(4) リン酸化プロテオミクスを用いた TKI addiction 制御因子の探索

過剰な ROS1 シグナルがどのような因子のリン酸化に寄与し、アポトーシスを誘導しているのかを観察するため、リン酸化プロテオミクスを実施した。薬剤除去後 8 時間の F2004V もしくは F2075C 変異細胞と野生型細胞をリン酸化プロテオーム分析に供し、得られたデータを 2 群間 t 検定により比較した (図 5)。F2004V、F2075C 変異細胞いずれも野生型 CD74-ROS1 発現細胞よりも相対的に多くのチロシンリン酸化ペプチドが検出され、様々なタンパク質が ROS1 の過剰活性化によりチロシンリン酸化されていることが確認できた。それらのタンパク質のうち、変異細胞間で共通してチロシンリン酸化されていた FAF1 (Fas associated factor 1) に着目して研究を進めた。この

タンパク質は Fas や caspase-8 らと複合体を形成することにより、アポトーシス誘導に関わる因子として報告されている。in vitro kinase assay による検証の結果、FAF1 は ROS1 によって直接的にリン酸化されることが明らかとなった (図 6)。以上の結果から、過剰な ROS1 シグナルはアポトーシスシグナルを含めたより多くのシグナル伝達経路を活性化させることが示唆された。

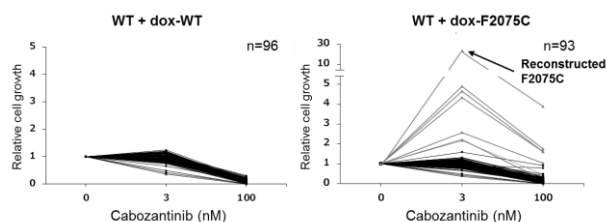


図3. ROS1変異体導入によるTKI-addicted細胞の樹立

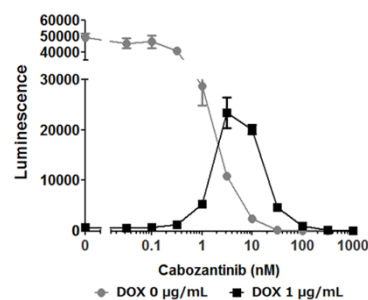


図4. Reconstructed F2075Cのcabozantinib処理下、DOX-OFF/ONにおける細胞生存効果

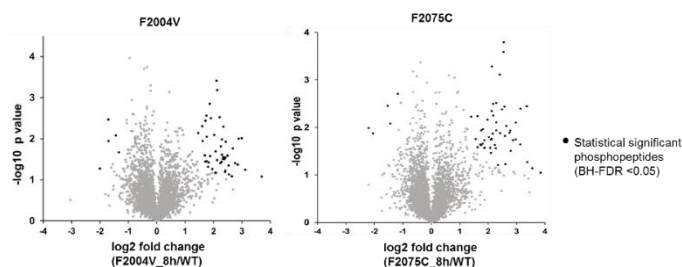


図5. 薬剤除去8時間後のF004VおよびF2075C内リン酸化ペプチドの変動

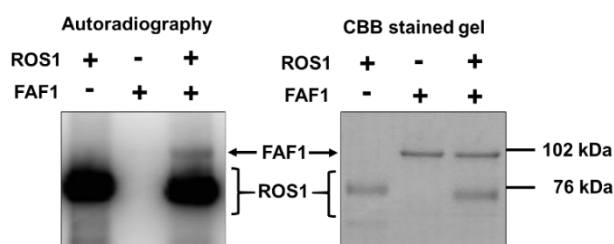


図6. in vitro kinase assayによるROS1とFAF1との相互作用の解析

(5) TKI addiction に関わる細胞内シグナル伝達経路の探索

所属研究室により化学療法基盤支援活動提供の標準阻害剤ライブラリを用いたスクリーニングが行われ、ROS1 シグナル以外のシグナル経路を阻害することでも TKI addiction を示すがん細胞の生存率を上げる責任シグナル伝達経路の探索が進められた。スクリーニング実験の結果を解析することで、複数の ROS1-TKI によって F2004V や F2075C 変異細胞の生存率が維持されていることが明らかとなった。その他に、p38 阻害剤によっても F2075C 変異細胞の生存率が部分的に維持されることが認められた。そこで、F2075C 変異細胞に

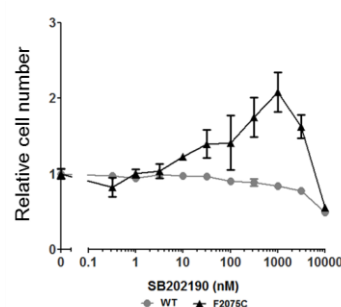


図7. F2075C変異細胞におけるp38阻害剤(SB202190)による部分的な細胞死抑制効果

対して p38 阻害剤を曝露した結果、部分的に ROS1-TKI 除去により誘導される細胞死が抑制できることを確認した (図 7)。以上の結果から、F2004V および F2075C 変異細胞の生存・増殖活性は ROS1 シグナル量に強く依存していることが明らかになり、F2075C 変異細胞に関しては p38 MAPK シグナル経路の活性化が細胞死に対して部分的に関与していることも示唆された。

【まとめ】

本研究において、ROS1-TKI存在下でのみ増殖可能となるがん細胞の特性の一部を明らかにすることに成功した (図8)。F2004VやF2075Cなどの変異により過剰なROS1シグナルが恒常的に活性化された場合、生存・増殖シグナル以上にアポトーシス誘導シグナルが活性化されて細胞死を生じることが明らかとなった。また、F2075C変異体においては過剰なoncogeneシグナルが、通常DNAダメージや活性酸素等によって活性化し細胞死誘導に関与するp38 MAPKシグナル経路の活性化を介して細胞死誘導に寄与していることが示唆された。このことは、がん細胞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、チロシンキナーゼ活性の強度によるがん細胞の生存と死の二面的なシグナル制御機構の一部を明らかにした本研究は、治療薬耐性がん細胞を克服するための新たな知見を与えるものである。

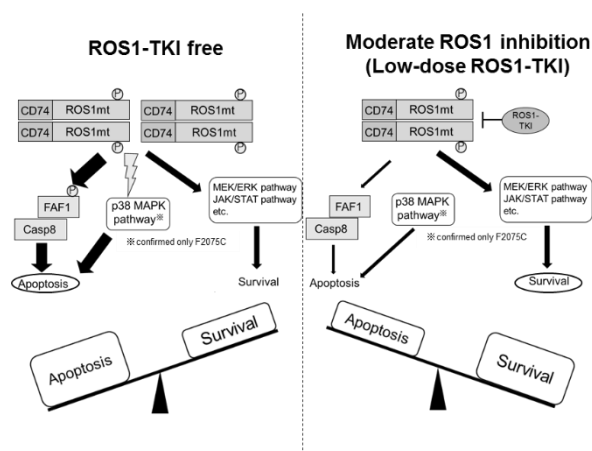


図8. ROS1キナーゼシグナルにより規定されるがん細胞の増殖と死の二面性制御機構