

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 22 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14412

研究課題名(和文) Driver Oncogeneの相互排他性は偶然か必然か？

研究課題名(英文) Mutual exclusiveness of driver oncogenes

研究代表者

片山 量平 (KATAYAMA, Ryohei)

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

研究者番号：60435542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーなどの革新的技術の進歩に伴い、がんの遺伝子異常が網羅的に明らかにされてきた。そのなかで、ドライバーがん遺伝子の変異には相互排他性が見られることが知られているが、そのことが偶然なのか必然によるのかわかっていない。本研究では、ドライバーオンコジーンからのシグナルには適正量が存在し、多すぎても腫瘍にとってネガティブに働くため、相互排他性が結果として生まれているという仮説の下、研究を行ってきた。その結果、ROS1融合遺伝子陽性がん細胞モデルにおいてドライバーがん遺伝子からのシグナルが過剰になると細胞増殖シグナルが細胞死を誘導すること、さらにその下流の因子の関連因子の発見に成功した。

研究成果の概要(英文)：Along with the progress of genome sequencing with next generation sequencers, genetic abnormalities in cancer have been extensively uncovered. As the results of the comprehensive sequencing of cancer genome, it is known that driver oncogene mutation is mutually exclusive, but its reason has not been covered yet. In this study, we found that the excessively upregulate driver oncogene derived signaling induce cell death instead of cell proliferation using ROS1 fusion oncogene induced cells. We also found the key pathway and molecules which are related to trigger cell death when the driver oncogene signaling became excessive.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：分子標的治療 肺腺がん がん遺伝子 相互排他性

1. 研究開始当初の背景

肺がんの約 85%を占める非小細胞肺癌の中で最も多いのが肺腺がんである。これまでの研究から、我が国の非喫煙者の肺腺がん患者の約半数が EGFR 活性化型変異を有することが明らかとなっている。EGFR の活性化型変異は、がん化を誘導する強力なドライバーがん遺伝子 (Driver Oncogene) であることが明らかにされており、EGFR 変異陽性肺がんでは、EGFR 阻害薬が非常に有効であることが示されている。次いで、多くみられる変異は KRAS の活性化型変異、そして ALK 融合遺伝子が約 5%の患者に見られ、ROS1 や RET の融合遺伝子陽性の患者がそれぞれ 1~2%存在する。がんの遺伝子異常が包括的に調べられるようになり、これらのドライバーがん遺伝子がお互いに相容れない (mutually exclusive である) ということが明らかとなってきている。また、興味深いことに、ROS1 陽性肺がんのなかでも、CD74-ROS1 陽性肺腺がんでは、その他の重複する Driver mutation は見つかっていないにもかかわらず、SLC34A2-ROS1 では、高頻度にもう 1 つの Driver mutation が同時に存在することが報告されている。これらのことはあたかも Driver Oncogene からの強力ながん化 (増殖) シグナルは何かの因子で規定されており、一定以上は細胞の増殖 (がんの増殖) にとって不利に働く可能性が考えられる。つまり腫瘍にとって 2 つ以上の強力な Driver Oncogene の存在 (または過剰な Driver Oncogene の活性化) はデメリットとなる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、主に肺腺がんに注目して、同時に 2 つの Driver Oncogene が 1 つのがん細胞中に共存しない理由を明らかにし、がんが 1 つの Driver Oncogene に依存する (のみを受け入れる) 分子機構として、Driver Oncogene からの細胞増殖シグナルに許容しうる適正量が存在すると仮定し、その分子機構を明らかにすることを目的とする。さらに、過剰すぎる Driver Oncogene シグナルはがん細胞の増殖に不利である機構を逆に弱点と考え、全く新しい治療標的の探索へとつなげていくことを目的とする。

3. 研究の方法

ROS1 融合遺伝子などの Driver Oncogene を発現誘導できるウィルスベクターをより強力にタイトにドキシサイクリンの添加により発現調整できるものを作製し、強力な発現誘導系を確立した。さらに、ROS1 融合遺伝子を発現し、その活性に生存が依存する

Ba/F3-CD74-ROS1 細胞を用いた mutagenesis アッセイ (強力な変異原物質をさらすことで人工的に変異を導入し、薬剤耐性等に関わる遺伝子変異等を誘導・同定する方法) を行うことで、薬物により ROS1 などからの Driver Oncogene シグナルを抑制した時のみ生存できる細胞スクリーニングにより取得することを目指した。そして強すぎる ROS1 などからの Oncogene シグナルが増殖シグナルだけでなく細胞死を誘導するかどうか、各細胞を蛍光色素で染色し、細胞競合培養実験した際に優勢となる population について解析した。さらに、リン酸化プロテオーム解析と、薬剤ライブラリーを用いたスクリーニングから、その制御に関わる因子を探索した。

4. 研究成果

ROS1 融合遺伝子などの Driver Oncogene を強力にかつタイトにドキシサイクリンの添加により発現調整できる発現ベクターを作製し、強力な発現誘導系を確立することに成功した。さらに、ROS1 融合遺伝子を発現し、その活性に生存が依存する Ba/F3-CD74-ROS1 細胞を用いた mutagenesis アッセイ (10^8 乗以上の Ba/F3-CD74-ROS1 細胞を強力な変異原物質 ENU をさらすことで人工的に変異を導入し、ROS1 融合遺伝子の点突然変異を誘導した) を行った結果、ROS1-F2004V, F2075C 変異が、ROS1 融合タンパク質からの細胞増殖シグナルを過剰活性化するだけでなく、驚くことに細胞死をも誘導することを発見した。この変異箇所は ROS1 と相同性が非常に高い ALK チロシンキナーゼでは、F1174 と F1245 の部位に相当し、この部位の変異は ALK の恒常的活性化変異であることが明らかとなっている。さらに、この CD74-ROS1 の変異体をタイトに発現制御できる系で過剰発現させるだけでも、過剰すぎる Driver Oncogene からのシグナルが細胞死を誘導することを確認した。そこで、リン酸化プロテオーム解析と、薬剤ライブラリーを用いたスクリーニングから、その経路に関わる因子を複数同定した。そのうちの 1 つはアポトーシスに関係することが知られているたんぱく質であり、ROS1 チロシンキナーゼによりチロシンリン酸化される基質たんぱく質であることを新たに発見した。また、過剰な ROS1 キナーゼの活性化が p38 - MAPK パスウェイを過剰に活性化し、細胞死を誘導していることも発見した。他にも薬剤スクリーニングからはこの他にも新たな因子の関与を発見した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

1. Ogura H, Nagatake-Kobayashi Y, Adachi J, Tomonaga T, Fujita N, Katayama R, TKI-addicted ROS1-rearranged cells are destined to survival or death by the intensity of ROS1 kinase activity. *Scientific Reports*, *in press*

2. Uchibori K, Inase N, Araki M, Kamada M, Sato S, Okuno Y, Fujita N, *Katayama R. Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *Nature Commun.* 2017, 8:14768. doi:10.1038/ncomms14768

3.*Katayama R. Therapeutic strategies and mechanisms of drug resistance in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-rearranged lung cancer. *Pharmacol Ther.* 2017, Feb [Epub ahead of print], doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.015

4. Shaw AT, Friboulet L, Leshchiner I, Gainor JF, Bergqvist S, Brooun A, Burke BJ, Deng YL, Liu W, Dardaei L, Frias RL, Schultz KR, Logan J, James LP, Smeal T, Timofeevski S, Katayama R, Iafrate AJ, Le L, McTigue M, Getz G, Johnson TW, Engelman JA. Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F. *N Engl J Med.* 2016 Jan 7;374(1):54-61. doi: 10.1056/NEJMoa1508887.

5. *Katayama R, Sakashita T, Yanagitani N, Ninomiya H, Horiike A, Friboulet L, Gainor JF, Motoi N, Dobashi A, Sakata S, Tambo Y, Kitazono S, Sato S, Koike S, John Iafrate A, Mino-Kenudson M, Ishikawa Y, Shaw AT, Engelman JA, Takeuchi K, *Nishio M, *Fujita N. P-glycoprotein Mediates Ceritinib Resistance in Anaplastic Lymphoma Kinase-rearranged Non-small Cell Lung Cancer. *EBioMedicine.* 2015 Dec 12;3:54-66. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.12.009.

他4件

[学会発表](計19件)

1. 片山量平, ドライバーがん遺伝子陽性がんにおける分子標的薬耐性機構とその検索, 口頭, 第1回 Liquid Biopsy 研究会, 2017/1/21, 国内.

2. 片山量平, ALK 戦線異常アリ: 多様な TKI 耐性機構とその克服, 第57回日本肺癌学会

学術集会, シンポジウム口頭, 2016/12/19, 国内.

3. 片山量平, Tumor cell and stromal cell mediated drug resistance in driver oncogene positive non-small cell lung cancer, 第74回日本癌学会学術総会, シンポジウム口頭, 2016/10/6, 国内.

4. 小倉隼人, 足立淳, 朝長毅, 藤田直也, 片山量平, Excessive oncogene signaling induced "drug addiction" characteristic, 第74回日本癌学会学術総会, ポスター, 2016/10/7, 国内.

5. 内堀健, 藤田直也, 片山量平, Identification of inhibitors which can overcome acquired resistance to third-generation EGFR-TKI, 第74回日本癌学会学術総会, 口頭, 2016/10/6, 国内.

6. 片山量平, 多様な ALK, ROS1 陽性肺がんにおける分子標的薬耐性, 第74回日本臨床腫瘍学会学術総会, シンポジウム口頭, 2016/7/28, 国内.

7. 片山量平, 小池清恵, 大原智子, 西尾誠人, 藤田直也, FGFR3 または cMET の過剰活性化を介した ALK 阻害薬耐性機構の発見, 第20回日本がん分子標的治療学会学術総会, 口頭, 2016年5月31日, 国内

8. 小池清恵, 藤田直也, 片山量平, ABC トランスポーターを介した ALK 阻害薬耐性, 第20回日本がん分子標的治療学会学術総会, ポスター, 2016年5月31日, 国内

9. Katayama R. Resistance mechanisms to tyrosine kinase inhibitors in fusion gene positive non-small cell lung cancer, Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthrough in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, 2016年2月14日, マウイ(米国)(招待講演)

10. 片山量平, 肺がん臨床検体を用いた分子標的薬耐性機構の解明, 平成27年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム, 2016年2月9日, 学術総合センター(東京都・千代田区)(招待講演)

11. 片山量平, ALK 阻害薬耐性の分子基盤 (Molecular Mechanisms of ALK tyrosine kinase inhibitor resistance. 第56回日本肺癌学会学術集会, 2015年11月26日(パシフィコ横浜(神奈川県横浜市))(招待講演)

12. Katayama R, Sakashita T, Yanagitani N, Takeuchi K, Nishio M, Fujita N, Novel ceritinib resistance mechanisms: new resistant mutation, fibroblast growth factor receptor 3 overexpression and cMET amplification-mediated ceritinib resistance, AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2015年11月5日~9日, ボストン(米国)(国際学会, 口頭発表)

13. 片山量平, Resistance mechanisms to molecular targeted therapy in ALK or ROS1 rearranged non-small cell lung cancer (融合遺伝子陽性肺癌における分子標的薬耐性の分子基盤) 第53回 日本癌治療学会総会、2015年10月29日、京都国際会議場、(京都府京都市)(招待講演)

14. 布施 美保 ジェーン、藤田直也、片山量平、Therapeutic strategies and resistance mechanisms in NTRK1 rearranged cancer (NTRK1 阻害薬探索とその耐性化機構) 第74回 日本癌学会学術総会(2015年10月8日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市))

15. 片山量平、Molecular mechanisms of the resistance to ALK- or ROS1-TKIs in ALK or ROS1 rearranged non-small cell lung cancer (ALK, ROS1 陽性肺癌における分子標的薬耐性の分子基盤) 第74回 日本癌学会総会、2015年10月8日、名古屋国際会議場、(愛知県名古屋市)(シンポジウム、招待講演)

16. 片山量平、Identification of the acquired resistance mechanisms to tyrosine kinase inhibitors in fusion gene positive non-small-cell lung cancer (融合遺伝子陽性肺癌における分子標的薬耐性機構の解明) 第74回 日本癌学会総会 2015年10月9日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)(日本癌学会奨励賞受賞講演)

17. 小倉 隼人、足立 淳、朝長 毅、藤田 直也、片山 量平、CD74-ROS1 融合遺伝子陽性肺癌における分子標的治療薬に依存した細胞増殖機構 (Drug addiction) のメカニズム解析 (Molecular mechanism of tyrosine kinase inhibitor dependent cell growth (Drug addiction) in CD74-ROS1 fusion gene positive cancer) 平成27年度文科省科研費 新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』がん若手研究者ワークショップ、2015年9月2日~9月5日、蓼科グランドホテル滝の湯(長野県茅野市)

18. 片山量平、Molecular mechanism of the TKI resistance in lung cancer ~ TKI-resistance in fusion gene driven lung cancer ~ (肺癌における TKI 耐性の分子機構・融合遺伝子陽性肺癌の獲得耐性) 第13回 日本臨床腫瘍学会学術総会、2015年7月16日、ロイトン札幌、(北海道札幌市)(シンポジウム、招待講演)

19. 片山量平、小池清恵、西尾誠人、藤田直也、培養細胞株と患者検体を用いた ALK 阻害薬耐性機構の解析、第19回日本がん分子標的治療学会、2015年6月10-12日、松山全日空ホテル、(愛媛県松山市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: EGFR-TKI 耐性を獲得した肺癌の治療薬

発明者: 片山量平、内堀健、藤田直也

権利者: 公益財団法人がん研究会

種類: 特許権

番号: 特願2016-239889号

出願年月日: 2016年12月6日

国内外の別: 国内出願

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

報道関連情報:

「EGFR 変異陽性肺癌に対する新規耐性克服療法を発見~今後予想されるオシメルチニブ耐性の克服へ~」に関して、以下の全国紙をはじめ多数の新聞等でとりあげられた。

・日本経済新聞 平成29年3月14日

・朝日新聞 平成29年3月14日

・毎日新聞 平成29年3月14日

ほか多数地方紙に掲載

「ALK 陽性肺癌に対する治療薬耐性の原因を発見」に関して、以下の新聞等でとりあげられた。

・産経新聞 平成28年1月20日朝刊

・47News(時事通信社) 平成28年1月26日 オンライン掲載(医療新世紀 短信)

・山梨日日新聞 平成28年1月25日

・愛媛新聞 平成28年1月26日

・熊本日日新聞 平成28年1月29日

・下野新聞 平成28年2月5日

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/news/4824.html>

<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/news/4146.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

片山 量平 (KATAYAMA RYOHEI)

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

研究者番号：60435542

(2)研究分担者
なし

研究者番号：

(3)連携研究者
藤田 直也 (FUJITA NAOYA)
公益財団法人がん研究会
がん化学療法センター
所長
研究者番号：20280951