

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18452

研究課題名(和文) ALK阻害剤に対する耐性機序の網羅的解析と耐性克服の治療戦略の確立

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of resistance mechanism against ALK inhibitors and treatment strategy against such resistance mechanism

研究代表者

豊川 剛二 (TOYOKAWA, Gouji)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：30627261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまでにALK阻害剤に対する耐性獲得機序として、ALK遺伝子の二次変異をはじめ、ALK遺伝子のcopy number gainやbypass trackなどが報告されている。本研究成果から、新たなALK遺伝子の二次変異としてI1171T、I1171N、およびG1123Sが、crizotinib、alectinib、およびceritinibに対して耐性を惹起することが明らかになった。また、MET遺伝子増幅がalectinib体制を惹起し、crizotinibによって耐性が克服されることを示した。この結果はあるALK阻害剤に耐性獲得後に次のALK阻害剤を選択する上で重要な情報であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previous preclinical and clinical studies have identified various resistance mechanisms, such as secondary mutations in the ALK gene and the activation of bypass tracks. In the current study, novel ALK secondary mutations including I1171T/N and G1123S were shown to confer resistance against crizotinib, alectinib and ceritinib. Furthermore, we showed that MET amplification might mediate alectinib resistance, which could be overcome by crizotinib, a first generation ALK inhibitor. These findings are important for the optimal treatment strategies to overcome resistances against ALK inhibitors.

研究分野：胸部腫瘍学

キーワード：非小細胞肺癌 ALK融合遺伝子 ALK阻害剤 耐性機序

1. 研究開始当初の背景

(1) ALK 阻害剤についてのエビデンス

ALK は 2007 年に Soda らによって同定された強力な肺癌の原因遺伝子であり、非小細胞肺癌症例の原因遺伝子の 5%前後を占めている (Soda M, et al., *Nature* 2007)。若年者、非・軽喫煙者、腺癌症例に見られることが多く、EGFR などの他の driver mutations とは相互排他的とされている (Gainor JF, et al., *Clin Cancer Res* 2013)。ALK 融合遺伝子を有する症例に対しては特異的阻害剤である crizotinib が著効することが、二つの単群試験 (PROFILE1001 試験、および PROFILE1005 試験)によって示され、我が国でも 2011 年に承認された (Kwak EL, et al., *N Engl J Med* 2010; Camidge DR, et al., *Lancet Oncol* 2012)。また二つの第三相試験 (PROFILE1007 試験、および PROFILE1014 試験)によって、1 次治療、および 2 次治療における crizotinib の標準的化学療法に対する優越性が証明された (Shaw AT, et al., *N Engl J Med* 2013; Mok TS., presented at ASCO2014)。Crizotinib だけでなく次世代の ALK 阻害剤も開発されており、特に alectinib と ceritinib は他の ALK 阻害剤未治療例だけでなく、既治療例に対しても高い有効性を示すことが報告された (Seto T, et al., *Lancet Oncol* 2013; Shaw AT, et al., *N Engl J Med* 2014)。当施設では治験・実臨床で多くの ALK 融合遺伝子陽性症例に対する ALK 阻害剤投与を経験しており、これまで crizotinib 37 例、alectinib 14 例、および ceritinib 13 例の投与経験を誇っている。

(2) ALK 阻害剤に対する耐性獲得のメカニズム

上述の知見から、ALK 阻害剤は ALK 融合遺伝子陽性肺癌に対する key drug であると考えられる。しかし、ALK 阻害剤投与症例の多くは耐性を獲得することが知られており、耐性獲得機序の解明とそれを克服する治療法の開発が喫緊の課題である。ALK 阻害剤に対する耐性獲得のメカニズムとして、様々なものが知られている。ALK 遺伝子の二次変異が代表的なものであり、Choi らは crizotinib によって耐性を獲得した症例を検討し、耐性獲得後に ALK 遺伝子の二つの二次変異 (L1196M、および C1156Y)を同定した (Choi YL, et al., *N Engl J Med* 2010)。特に L1196M は EGFR における T790M、および BCR-ABL における T3151 に相当し、gatekeeper mutation であることが知られている。この他にもいくつかの ALK 遺伝子の二次変異が ALK 阻害剤に対して耐性を惹起することが報告されている。

その他にも ALK の copy number gain や bypass track (EGFR, K-ras や KIT)を介した

耐性獲得機序が報告されている (Camidge DR, et al., *Nat Rev Clin Oncol* 2012)。これ以外にも IGF-1R 経路の活性化や上皮間葉形質転換 (EMT)を介した耐性などが報告されているが、耐性獲得機序については不明な点が多く、有効な耐性克服の治療戦略の確立が十分とは言えない。

当施設では alectinib 投与後に耐性を獲得し DIC の状態となったが、crizotinib が劇的に奏効した症例を経験した (Toyokawa G, et al., *J Thorac Oncol* 2013; Toyokawa G, et al., *J Thorac Oncol* 2014)。特記すべきことに、alectinib に対する耐性獲得後の肝生検の結果、MET 遺伝子増幅が見られた (ALK の gatekeeper mutation や bypass track を介した耐性機序は見られなかった)。MET 阻害剤として開発された crizotinib が著効したことを考慮すると、MET 遺伝子増幅が alectinib に対する耐性獲得に関与している可能性が考えられる。

(3) ALK 阻害剤に対する耐性克服の戦略

Crizotinib 耐性獲得例に対する治療戦略として、次世代 ALK 阻害剤、bypass track を抑える阻害剤 (EGFR-TKI や KIT-TKI)や HSP90 阻害剤などが有望であると考えられる (Toyokawa G, et al., *Clin Lung Cancer* 2014)。しかしながら、次世代 ALK 阻害剤耐性獲得例の報告は少なく、その耐性克服の有効な治療戦略も明確となっていない。

2. 研究の目的

肺癌はわが国の癌死亡原因の第一位であり、2012年の肺癌死亡数は7万人(71,518人)を超えている。悪性度が高く予後不良であるが、近年、その発生機序が解明されつつあり、特に腺癌において oncogenic drivers の同定が進んでいる。EGFR や ALK などが代表的なものとして挙げられ (Lynch TJ, et al., *N Engl J Med* 2004; Soda M, et al., *Nature* 2007)、ALK 融合遺伝子を有する症例には crizotinib などの ALK 阻害剤が著効することが知られている (Shaw AT, et al., *N Engl J Med* 2013)。しかしながら、殆ど全ての症例で耐性を獲得することが知られており、耐性獲得機序の解明とその克服が喫緊の課題である (Choi YL, et al., *N Engl J Med* 2010)。本研究では、ALK 阻害剤に対して耐性を獲得した症例に対して手術を含めて再生検を行い、新たな耐性獲得機序の解明と既知の耐性獲得機序の詳細な検討を行う。さらに、耐性を克服する新たな治療戦略の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 治療前後の腫瘍組織における ALK 融合遺伝子の解析

Fluorescence in-situ hybridization (FISH)、免疫組織化学染色 (IHC)

可能な限り治療前後の腫瘍組織を採取し、ALK 融合遺伝子の確認を行う。FDA は crizotinib のコンパニオン診断薬として「Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit」を認可しているが、日本肺癌学会バイオマーカー委員会によると、FISH と IHC には不一致例が少なからず存在する。そのため、可能な限り FISH と IHC を行い ALK 融合遺伝子を確認する。治療後の FISH を行うことによって、ALK 遺伝子の copy number gain について解析可能となる。

RT-PCR、ダイレクトシーケンス

ALK 融合遺伝子には複数の variants が知られており、EML4-ALK 融合遺伝子では variants によって crizotinib の治療効果が異なるとの報告がある (Heuckmann JM, et al., *Clin Cancer Res* 2012)。そのため、FISH や IHC だけでなく治療前に RT-PCR を行い variants の同定を行う。また、治療後の検体で RT-PCR、およびダイレクトシーケンスを行うことで ALK 遺伝子の二次変異の解析を行う。

(2) Bypass track の解析

既知の bypass track による耐性獲得機序、即ち EGFR 遺伝子変異、K-ras 遺伝子変異、および KIT 遺伝子増幅について治療前後の検体で解析を行う。また、特に次世代 ALK 阻害剤については、我々の同定した MET 遺伝子増幅

について解析を行う (FISH)。

(3) 未知の耐性獲得機序の解析

(1)、および(2)で耐性機序が明らかでないものに対して、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム、またはエクソーム解析を行い、正常部・腫瘍部の体細胞遺伝子変異の解析により、未知の耐性獲得機序の解明を行う。

(4) 細胞株樹立と in vitro での解析

包括同意が得られている ALK 融合遺伝子陽性肺癌患者の ALK 阻害剤投与前後の新鮮腫瘍組織から肺癌細胞株樹立を試みる。これらの細胞株を用いて、上記解析によって同定された耐性機序の confirm を行う。さらに、各々の耐性機序を克服すると考えられる阻害剤や siRNA などを in vitro で投与することにより、効果的な耐性克服の方法を開発する。

4. 研究成果

本研究では、ALK 阻害剤に対して新たな耐性獲得機序を解明した。すなわち、crizotinib に対する ALK I1171T、alectinib に対する ALK I1171N、および MET 増幅、また ceritinib に対する ALK G1123S を同定した。以下に、各耐性機序を同定した症例を提示する。

(1) 症例 1 は 27 歳の非喫煙女性であり、骨・脳転移を有する進行肺腺癌であった。左鎖骨生検標本の FISH、および RT-PCR/ダイレクトシーケンス法にて ALK 融合遺伝子が同定された (図 1A)。Cisplatin+pemetrexed による一次化学療法後に、crizotinib が投与された。最良効果は部分奏効であったが、約 8 か月後に脳転移の再燃、および約 18 か月後に右胸水が増加した。胸水は癌性胸水であり、RT-PCR、およびダイレクトシーケンス法にて crizotinib 投与前には見られなかった ALK の二次変異 (I1171T) が同定された。

(2) 症例 2 は 49 歳の非喫煙女性であり、局所進行肺癌と診断された。化学放射線療法 (cisplatin+vinorelbine+放射線照射) が行われたが、約 7 か月後に原発巣の再燃と多発・肝・骨転移の出現が見られた。皮膚転移の生検標本に関して、FISH、IHC、および RT-PCR の結果、ALK 融合遺伝子が同定された。Pemetrexed による二次化学療法により部分奏効が得られたが、8 サイクルの後に再燃した。その後、alectinib の投与が行われ、原発巣、ならびに肝転移巣の著明な縮小が得られた。しかしながら、alectinib 投与開始から約 7 か月後に原発巣・肝転移巣の再燃が見られた。肝転移巣に対する再生検を行い、I1171N という新たな ALK の二次変異が同定された。

(3) 症例 3 は 58 歳の非喫煙男性であり、癌性胸水・骨転移を有する IV 期肺腺癌と診断

された。プラチナベースの一次化学療法が奏効しなくなった後に、胸膜播種巣の生検が行われ、FISH法にてALK融合遺伝子が同定された。その後、crizotinibが投与され部分奏効が得られたが、28か月後に腰椎転移が増悪したためcrizotinibを中止しceritinibを投与開始した。肝転移巣の縮小が認められたが、約2年後に肝転移巣の再燃が見られた。その後、肝生検が行われ、治療前には見られなかったG1123SというALK遺伝子の二次変異が同定された。特記すべきことに、alectinib投与によって迅速かつ劇的な肝転移縮小がみられた。このことから、ALK G1123Sを介したceritinib耐性獲得に対してはalectinibが奏効することが示された。

(4) 症例4は43歳の非喫煙女性であり、標準的殺細胞性抗癌剤が奏効しなくなった後に、alectinibが投与された。最良効果は部分奏効、ならびに10.5か月の無増悪生存期間が得られたが、急激な肝転移巣の増悪と播種性血管内凝固症候群(DIC)が見られた。その時点で全身状態不良であり、また標準的殺細胞性抗癌剤が存在しないため、crizotinibを投与する方針とした。その後、劇的に全身状態、およびDICは改善し、肝転移巣も著明に縮小した。状態改善後に肝生検を行った結果、MET遺伝子増幅が見られた(ALKの二次変異や他のbypass trackを介した耐性機序はなし)。c-MET阻害剤として開発されたcrizotinibが著効したことを考慮すると、MET遺伝子増幅がalectinibに対する耐性獲得に関与しているものと考えられた。

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11件)

1. Toyokawa G, Seto T, Takenoyama M, Ichinose Y. W 'ALK' Into the Next Stage. *Clin Lung Cancer*, in press.
2. Toyokawa G, Seto T. Updated Evidence on the Mechanisms of Resistance to ALK Inhibitors and Strategies to Overcome Such Resistance: Clinical and Preclinical Data. *Oncol Res Treat* 38: 291-8, 2015.
3. Toyokawa G, Seto T, Takenoyama M, Ichinose Y. Insights into brain metastasis in patients with ALK+ lung cancer: is the brain truly a sanctuary? *Cancer Metastasis Rev*, 34:797-805, 2015.
4. Toyokawa G, Inamasu E, Shimamatsu S, Yoshida T, Nosaki K, Hirai F, Yamaguchi M, Seto T, Takenoyama M, Ichinose Y.

Identification of a Novel ALK G1123S Mutation in a Patient with ALK-rearranged Non-small-cell Lung Cancer Exhibiting Resistance to Ceritinib. *J Thorac Oncol* 10: e55-7, 2015.

5. Toyokawa G and Seto T. *Anaplastic Lymphoma kinase* rearrangement in lung cancer: Its biological and clinical significance. *Respir Investig* 52: 330-8, 2014.
6. Toyokawa G and Seto T. ALK inhibitors: What is the best way to treat patients with ALK-positive NSCLC? *Clin Lung Cancer* 15: 313-9, 2014.
7. Toyokawa G, Hirai F, Inamasu E, Yoshida T, Nosaki K, Takenaka T, Yamaguchi M, Seto T, Takenoyama M, Ichinose Y. Secondary mutations at I1171 in the ALK gene confer resistance to both crizotinib and alectinib *J Thorac Oncol* 9: e86-7, 2014.
8. Toyokawa G, Seto T, Takenoyama M, Ichinose Y. Crizotinib can overcome acquired resistance to CH5424802: Is amplification of the MET gene a key factor? *J Thorac Oncol* 9: e27-8, 2014.
9. Toyokawa G, Takenoyama M, Taguchi K, Toyozawa R, Inamasu E, Kojo M, Shiraishi Y, Morodomi Y, Takenaka T, Hirai F, Yamaguchi M, Seto T, Shimokawa M, Ichinose Y. An extremely rare case of small-cell lung cancer harboring variant 2 of the EML4-ALK fusion gene. *Lung Cancer* 81: 487-490, 2013.
10. Toyokawa G, Takenoyama M, Watanabe S, Toyozawa R, Inamasu E, Kojo M, Shiraishi Y, Morodomi Y, Takenaka T, Hirai F, Yamaguchi M, Taguchi K, Seto T, Ichinose Y. Dramatic response to crizotinib in an ALK-positive adenocarcinoma patient with disseminated intravascular coagulation. *J Thorac Oncol* 8: e96-8, 2013.
11. Toyokawa G, Taguchi K, Ohba T, Morodomi Y, Takenaka T, Hirai F, Yamaguchi M, Seto T, Takenoyama M, Sugio K, Ichinose Y. First case of combined small cell lung cancer with adenocarcinoma harboring EML4-ALK fusion and an exon 19 EGFR mutation in each histological component. *J Thorac Oncol* 7: e39-41, 2012.

〔学会発表〕(計2件)

1. ALK 阻害剤に対する耐性獲得後の治療戦略、第 57 回日本肺癌学会学術集会、シンポジウム、2016 年 12 月 19 日、福岡
2. ALK 阻害剤に対する耐性獲得と克服の治療戦略、第 55 回日本肺癌学会九州支部学術集会、シンポジウム、2015 年 2 月 27 日、福岡

研究者番号：

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()

〔図書〕(計5件)

1. 豊川剛二, 瀬戸貴司. 肺がんの個別化医療-第2世代のALK阻害剤-. R-TKI, 最新医学 70 巻, in press.
2. 豊川剛二, 瀬戸貴司. ALK 阻害剤に対する耐性獲得メカニズムと対策. 医学のあゆみ Vol.252, No.7, 2015 年.
3. 豊川剛二, 瀬戸貴司. 進行期非小細胞肺がんに対する化学療法について. 日本臨牀 2014 増刊号: 350-354, 2014.
4. 豊川剛二, 瀬戸貴司. 「Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer, N Engl J Med, 368:2385-2394, 2013」についての解説. MMJ 9: 220-222, 2013.
5. 豊川剛二, 瀬戸貴司. EGFR-TKI, ALK 阻害剤をいつまで使うか? MEDICALVIEW in press, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

豊川 剛二 (TOYOKAWA, Gouji)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：30627261