

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19447

研究課題名(和文) ALK肺癌のEMTに起因するALK-TKI耐性克服治療の開発

研究課題名(英文) Development of ALK-TKI-resistant treatment due to EMT of ALK lung cancer

研究代表者

福田 康二 (Fukuda, Koji)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：10722548

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)：ALKチロシンキナーゼ阻害薬(ALK-TKI)はALK肺癌に著効を示す分子標的薬であり、臨床で使用されている。しかし、1～2年程度で耐性を獲得することが問題となっている。近年、その獲得耐性機構として上皮間葉転換(EMT)が注目されているが、克服治療は確立されていない。本研究により、マウスの耐性腫瘍モデルにおいて薬剤Aは上皮系を誘導することで耐性克服できることが示唆された。また、大規模スクリーニングにより5種類の阻害薬で耐性株のE-カドヘリン発現誘導能を確認した。これらの結果から、miR-200cの発現誘導がALK肺癌のEMTによる耐性克服の戦略として有望であることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：ALK rearrangement, most commonly EML4-ALK, is detected in approximately 5% of non-small cell lung cancer (NSCLC). While ALK tyrosine kinase inhibitor (TKI) shows dramatic clinical efficacy in ALK-rearranged NSCLC patients, almost all patients acquire resistance over time. Epithelial mesenchymal transition (EMT) was also reported to be associated with various targeted drugs, however, its involvement in ALK-inhibitor resistance is largely unknown. We found that pre-treatment with Drug A can overcome the resistance by reverting EMT, in vitro and in vivo, due to up-regulation of miR-200c. The results of drug screening on a 200 kinase inhibitor library showed that 5 drugs increased E-cadherin expression of the resistant cells. These findings indicate that chemical restoration of miR-200c could be useful to circumvent resistance due to EMT in ALK-rearranged NSCLC.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：EMT miR-200 ALK融合遺伝子陽性肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

肺がんはわが国における悪性新生物による死亡原因の第1位であり、ALK 肺癌に対しては ALK-TKI が著効することが多い。しかしながら、著効例においても1~2年程度の経過ではほぼ全ての症例が ALK-TKI に耐性を獲得する(獲得耐性)。この臨床上の大きな課題を克服するためには、ALK-TKI 耐性獲得機構を明らかにし、その分子メカニズムに基づいた耐性克服治療を確立することが必須である。

ALK-TKI 獲得耐性機構の約30%が ALK チロシンキナーゼドメインへの二次変異であり、L1196M や G1296M などの変異が ALK 遺伝子内に起こると、ALK-TKI 結合性が低下することにより耐性化する(Clin Cancer Res. 2012; 18:1472-1482)。また他の耐性機構として側副シグナルの関与が知られ、EGFR や c-KIT の活性化が報告されている(Sci Transl Med. 2012;4 120ra17)。

近年、二次変異や側副シグナルの活性化だけでなく、全く異なる TKI への耐性機序として **epithelial mesenchymal transition (EMT)**が報告された(Sci Transl Med 2011;3 75ra26)。EMT は上皮系 (epithelial) 細胞が細胞極性や周囲細胞との細胞接着機能を失い遊走、浸潤能を得ることで間葉系 (mesenchymal) 細胞へと変化するプロセスであり、獲得耐性との関連が報告されている。例えば、EGFR 変異肺癌細胞において E-カドヘリン低発現、ビメンチン高発現の間葉系の形質を示す細胞では EGFR-TKI であるエルロチニブへの感受性が低いことが示されている(Cancer Res 2006;66 944-50)。また臨床では、エルロチニブと化学療法の併用治療を行った肺癌患者において E-カドヘリンの低発現 (EMT 誘導型) は生命予後不良と関連していることが示唆された(Clin Cancer Res 2005;11 8686-98)。このような **EMT による TKI 耐性獲得**の報告が増加している一方、EMT を標的とした治療薬や有効な治療法は未だにないのが現状である。

## 2. 研究の目的

最近、EMT と miR-200 との関連性が報告されている(Mol Biol Cell 2011;22:1686-98)。これまでに我々が In vivo で樹立した ALK-TKI 耐性株で、耐性株の miR-200 の発現量を定量的 PCR 法で調べたところ、耐性株の miR-200c, 141 の発現が親株に比べて低下していた。また、耐性株を薬剤 A で処理した結果 miR-200c, 141 の発現の上昇が認められた一方、antago-miR200c 導入により薬剤 A の ZEB1 抑制効果がキャンセルされた。これらの結果より、薬剤 A は miR-200c の発現上昇により ZEB1 を低下させ、MET を誘導することが示唆された。そこで、申請者は

**miR-200c の発現誘導が EMT による耐性克服の治療方法として有効ではないかと着目した。**

本研究では、まずマウスモデルにおける薬剤 A の効果を検証する。また、miR-200c の発現を誘導できる薬剤 A 以外のスクリーニングを行い、臨床応用可能な治療薬の絞り込みを行う。さらにその効果を *in vivo* でも証明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 肺移植マウスモデルにおける薬剤 A の抗腫瘍効果の検証

免疫不全マウスの肺にルシフェラーゼで標識したクリゾニブ耐性クローンを移植し、薬剤 A による前治療を行った後、クリゾニブへ切り替えて、治療効果を検証した。ルシフェラーゼを用いた *in vivo* イメージングを行い、経時的に発光強度を調べ、腫瘍量評価を行った。薬剤 A による前治療後の腫瘍組織を採取して、間葉系から上皮系への移行について Western blot 法、免疫染色法により評価を行った。さらに、薬剤の正常細胞への毒性について、マウスの体重減少を指標に検討した。

### (2) miR-200c レポーターアッセイ系の構築

miR-200c は 12 番染色体上の miR-200c、miR-141 クラスタで構成され、同一のプロモーターにより発現が調節されている。そこで、そのプロモーター領域とナノルシフェラーゼ遺伝子を連結しベクターを構築した後、耐性株にそれぞれ遺伝子導入し、*in vitro* でのスクリーニング系を確立した。

### (3) 薬剤スクリーニング

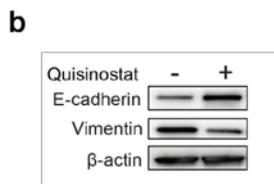
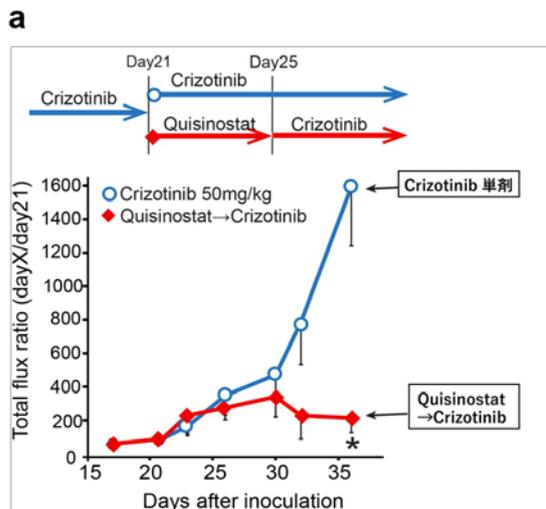
スクリーニングには 420 種類のキナーゼ阻害薬を含む薬剤ライブラリを使用し、耐性株を 48 時間処理した後、ルシフェラーゼ活性を評価することで miR-200 の発現誘導可能な候補薬を選抜した。

## 4. 研究成果

### (1) 肺移植マウスモデルにおける薬剤 A の抗腫瘍効果の検証

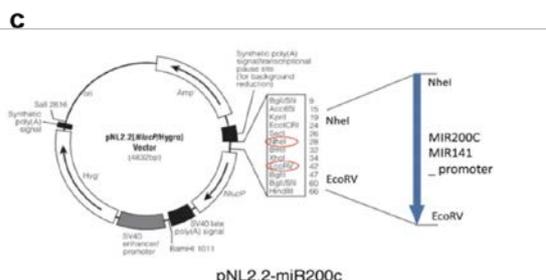
まず、耐性株をマウス胸腔内に移植し、薬剤 A を 5 日間投与した後に Crizotinib で治療を行った結果、コントロール群に比べて増殖は著明に抑制された(図 a)。また、薬剤 A による治療後腫瘍組織を採取し、EMT マーカーの発現を調べた結果 E-カドヘリンの上昇およびビメンチンの低下を認めたことから、EMT の誘導が示唆された(図 b)。また、体重減少について

も5日間以内であれば、10%以上の減少は見られなかったことから、忍容性は高いと考えられた。以上の結果から、**薬剤AによるmiR-200c/141発現誘導はEMTによる耐性克服のアプローチとして有望である**ことが強く示唆された。



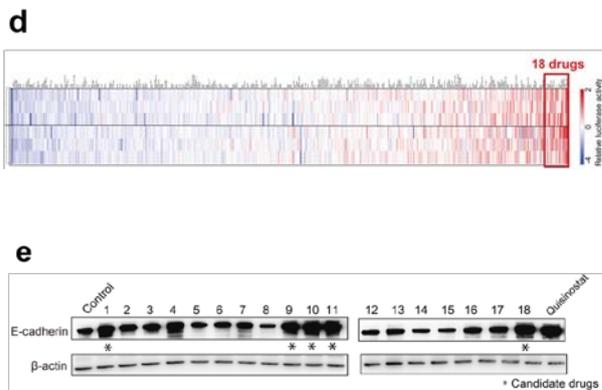
### (2)miR-200c レポーターアッセイ系の構築

薬剤Aは腫瘍縮小に効果的が認められた一方、長期間投与によるmiR-200以外のオフターゲットによる毒性が懸念された。そこで、薬剤A以外の薬剤を見出すために、420種類のキナーゼ阻害薬ライブラリを用いて大規模スクリーニングを行った。miR-200cは12番染色体上のmiR-200c、miR-141クラスターで構成され、同一のプロモーターにより発現が調節されている。そこで、そのプロモーター領域とナノルシフェラーゼ遺伝子を連結した(図c)。さらに、耐性株にLipofectamineでトランスフェクションを行い、薬剤Aをコントロールとしてスクリーニングの最適条件検討を行い、miR-200c/141の発現誘導可能な薬剤のスクリーニング系を確立した。



### (3)薬剤スクリーニング

耐性株を薬剤で48時間処理した後、ルシフェラーゼ活性を評価することでmiR-200の発現誘導可能な候補薬を選抜した。その結果、コントロールと比較して1.8倍以上のmiR-200c/141発現誘導活性を持つ阻害薬を新たに18種類発見し(図d)、**5種類の阻害薬で耐性株のE-cadherin発現誘導能を確認した**(図e)。



本研究から、ALK肺癌のEMTに起因するALK-TKI耐性獲得後の腫瘍において、miR-200を標的とした薬剤は間葉系腫瘍を上皮系に誘導し、逐次的にALK-TKIで治療することで耐性を克服できる可能性が示唆された。今後は臨床応用に向けて、選抜した候補薬の中からEMTによる薬剤耐性を克服できる、より有効で安全性の高い治療薬の絞り込みを行う。さらにその効果を*in vivo*でも証明し、その作用メカニズムを詳細に検討する。

### 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)

[論文] (計0件)

[学会発表] (計4件)

- 第5回 Medical Frontier Consortium beyond the Organocentric Dogma(東京、2018)

EMTに起因した肺癌の分子標的薬耐性の克服 福田康二

- The 1st NanoLSI International Symposium(東京、2018)  
Heterogeneity of epithelial to mesenchymal transition and resistance

mutation in ALK inhibitor-resistant lung cancer and its circumvention

Koji Fukuda, Shinji Takeuchi, Sachiko Arai, Ryohei Katayama, Shigeki Nanjo, Azusa Tanimoto, Akihiro Nishiyama, Takeshi Suzuki, Kengo Takeuchi, Makoto Nishio, Seiji Yano.

3. Fifth AACR-IASLC International Joint Conference (アメリカ、サンディエゴ、2018)

Heterogeneity of epithelial to mesenchymal transition and resistance mutation in ALK inhibitor-resistant lung cancer and its circumvention

Koji Fukuda, Shinji Takeuchi, Sachiko Arai, Ryohei Katayama, Shigeki Nanjo, Azusa Tanimoto, Akihiro Nishiyama, Takeshi Suzuki, Kengo Takeuchi, Makoto Nishio, Seiji Yano.

4. IASLC WCLC 2016 17th World Conference on Lung Cancer (オーストリア、ウィーン、2016)

HDAC inhibition overcomes crizotinib resistance by mesenchymal epithelial transition(MET) in EML4-ALK lung cancer cells

Koji Fukuda, Shinji Takeuchi, Ryohei Katayama, Shigeki Nanjo, Tadaaki Yamada, Takeshi Suzuki, Kengo Takeuchi, Makoto Nishio, Seiji Yano.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://syuyounaika.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 康二 (KOJI FUKUDA)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：10722548

(2) 研究分担者

竹内 伸司 (SHINJI TAKEUCHI)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：90565384

(3) 連携研究者

なし