

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15036

研究課題名(和文) RET融合陽性肺がん薬剤耐性における転写因子を介したシグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of signaling pathway involving drug resistant in RET-rearranged lung cancer

研究代表者

中奥 敬史 (Nakaoku, Takashi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：20779491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、RET融合遺伝子陽性肺がんの薬剤耐性機構を明らかにし、その制御に向けた知見を得ることを目標に行った。RETチロシンキナーゼ阻害剤バンデタニブ耐性例より、RETタンパク質の活性化ループ上に薬剤耐性変異S904Fを同定した。さらに、細胞・精製タンパク質を用いた実験および分子動力学シミュレーション解析を行うことで、薬剤とキナーゼとの相互作用に変化を引き起こし、アロステリック効果によって薬剤結合が不安定化する過渡的なタンパク構造を誘導させることを見出した(Nakaoku T, et al. Nat Commun. 2018)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、薬剤の結合部位から離れた位置に存在するアロステリック効果を持つ遺伝子変異が分子標的薬剤に対する耐性を獲得する原因となることが明らかになった。今回の研究に用いた手法は、がん細胞に起こる変異の機能を解明し、治療の方針決定の手助けになることが期待される。また、その薬剤耐性変異の克服を目指した研究を行っており、その成果はより効果的な非小細胞肺がんへの治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the drug resistance mechanism in RET fusion gene positive lung cancer against RET tyrosine kinase inhibitor, and to obtain knowledge to overcome the resistance. We identified secondary S904F mutation on the activation loop of RET kinase domain from the patient who got re-progression of the tumor after treatment of vandetanib. In silico molecular dynamic simulation analysis as well as in vitro assay using Ba/F3 cells and purified kinase protein revealed the S904F mutation causing drug resistance by destabilizing RET kinase domain protein and vandetanib complex by the allosteric effect (Nakaoku T, et al. Nat Commun. 2018).

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：RET 非小細胞肺癌 チロシンキナーゼ阻害剤 薬剤耐性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者の所属する研究室では、肺がんの遺伝子異常に基づく個別化治療の進展に取り組んでおり、高速シーケンサーを用いた全 RNA シーケンシングにより新たな治療標的として、RET 融合遺伝子 (Kohno T, et al. *Nat Med.* 2012) と NRG1 融合遺伝子 (Nakaoku T, et al. *Clin Cancer Res.* 2014) を同定し、RET 融合遺伝子は RET チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) バンデタニブが著効するドライバー遺伝子異常であることを前臨床試験により示した。その結果を以って、RET 融合陽性肺がんに対するバンデタニブの第 II 相医師主導治験につながり、実地臨床においても RET 融合陽性例に対するバンデタニブの治療効果の証明に至った (Yoh K, et al. *Lancet Respir Med.* 2016)。しかしながら、先行するドライバー遺伝子異常である EGFR 変異や ALK 融合陽性肺がんと同様に、RET 融合陽性例においても RET-TKI への耐性が数ヶ月から 1 年程度で出現することが問題となっている。

### 2. 研究の目的

RET 融合遺伝子を標的とした肺がん治療を行い、さらに薬剤耐性を見据えて治療効果を改善するためには、その分子機構の解明が必須である。本研究の目的は、RET 融合遺伝子陽性肺がんにおける薬剤耐性を対象に、耐性機構解明とその制御に向けた知見を得ることである。

### 3. 研究の方法

本研究計画では、RET 融合遺伝子陽性の肺がん生体のモデルに対して、薬剤治療の前後でサンプリングを行い、薬剤耐性の原因となる遺伝子変化や細胞内シグナル変化を比較オミックス解析により調べる。耐性機構の候補となる因子を、Ba/F3 細胞や、RET 融合遺伝子陽性肺がん株にレンチウイルスベクターにより導入し、薬剤耐性に与える影響を調べる。その機構を解析には、細胞を用いたシグナル伝達の解析や、精製タンパク質を用いたキナーゼアッセイや分子動力学シミュレーションにより解析を用いる。

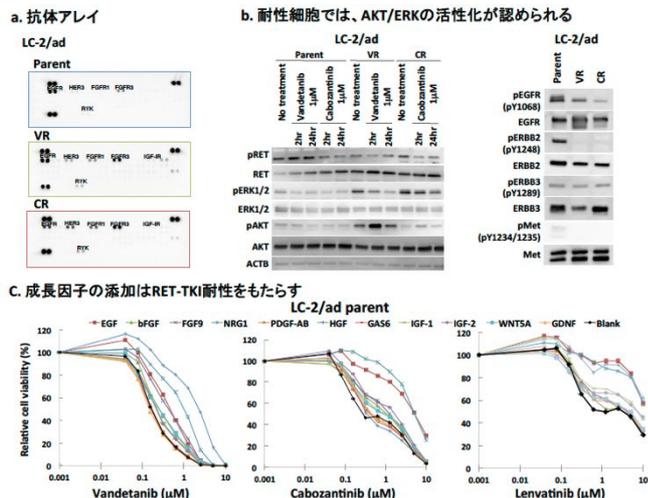
また、細胞内のシグナル変化に対しては、RET 融合遺伝子陽性の複数の細胞株を用いて、薬剤耐性モデルを構築し、比較オミックス解析によって薬剤耐性の候補因子を探索する。転写因子を含む候補因子によって形成される細胞内外のシグナルネットワークを制御することで、耐性克服法を探索する。

### 4. 研究成果

肺腺がん認められる RET 融合遺伝子は、数ヶ月程度で RET チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) へ薬剤耐性が出現する。本研究では、RET 融合遺伝子陽性肺がんの薬剤耐性機構を明らかにし、その制御に向けた知見を得ることを目標に行った。RET チロシンキナーゼ阻害剤バンデタニブ耐性例より、RET タンパク質の活性化ループ上に薬剤耐性変異 S904F を同定した。さらに、分子動力学シミュレーション解析を行うことで、薬剤とキナーゼとの相互作用に変化を引き起こし、アロステリック効果によって薬剤結合が不安定化する過渡的なタンパク構造を誘導させることを見出した (Nakaoku T, et al. *Nat Commun.* 2018)。現在は、その薬剤による制御機構の解明を行っている。

しかしながら、治療耐性例で 2 次変異を認めない症例もあり、その他の機序による耐性機構獲得の可能性も示唆される。バイパスシグナル経路の探索のため、樹立した RET 融合遺伝子陽性ヒト肺がん細胞株 LC-2/ad 由来の薬剤耐性クローンに対して、抗体アレイを行い、耐性細胞では複数の

キナーゼタンパク質の活性化が認められた。また、そうしたシグナル変化をもたらす細胞内の転写因子の活性化を見るために、アレイ型のマルチレポーターアッセイを行い、NF- $\kappa$ B を含む複数の転写因子の活性化が認められた。これらのシグナル活性化を惹起するリガンド加えることで、親株における薬剤感受性の低下が認められた。また、活性化タンパク質を抑制する阻害剤を RET 阻害剤と併用することで、より高い腫瘍抑制効果が認められ、RET タンパク質とのクロストークが示唆された。同定している候補には、がん幹細胞様形質の獲得に寄与する因子も含まれており、現在は機能解析を行っている (図)。



a. 抗体アレイによる受容体チロシンキナーゼのリン酸化を解析。耐性細胞では、HER3、FGFR1、FGFR3等のリン酸化レベルが親株と比較上昇していた。  
b. WBIによるシグナルの解析。耐性細胞VRではERK/AKTの活性化、CRではERKの活性化が認められた。HER3の活性化は保たれるも、HER2のリン酸化は消失していた。  
c. 各増殖因子を添加し、薬剤処理による細胞生存率を評価。EGF、HGF、NRG1などにより薬剤耐性が認められた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Takashi Nakaoku, Takashi Kohno, Mitsugu Araki, Seiji Niho, Chauhan Rahkee, Knowles P Phillip, Katsuya Tsuchihara, Shingo Matsumoto, Yoko Shimada, Sachiyo Mimaki, Genichiro Ishii, Hitoshi Ichikawa, Nagatoishi Satoru, Tsumoto Kouhei, Yasushi Okuno, Kiyotaka Yoh, Koichi Goto; A secondary RET mutation in the activation loop conferring resistance to vandetanib. *Nature Communications*, Feb 12;9(1):625.2, 2018
2. Yoko Shimada, Takashi Kohno, Hideki Ueno, Yoshinori Ino, Hideyuki Hayashi, Takashi Nakaoku, Yasunari Sakamoto, Shunsuke Kondo, Chigusa Morizane, Kazuaki Shimada, Takuji Okusaka, Nobuyuki Hiraoka; Oncogenic ALK Fusion and RRAS Mutation in KRAS mutation-negative Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *The Oncologist*, Feb;22(2):158-164, 2017

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Takashi Nakaoku, Mitsugu Araki, Seiji Niho, Rakhee Chauhan, Phillip P. Knowles, Katsuya Tsuchihara, Shingo Matsumoto, Yoko Shimada, Sachiyo Mimaki, Genichiro Ishii, Hitoshi Ichikawa, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, Yasushi Okuno, Kiyotaka Yoh, Neil Q. McDonald Koichi Goto, Takashi Kohno; A Secondary RET Mutation in the Activation Loop Conferring Resistance to Vandetanib Through Allosteric Effects. Cambridge Healthtech Institute's 2018 Drug Discovery Chemistry conference, San Diego, California, USA, April 3 2018. ポスター
2. Takashi Nakaoku, Takashi Kohno, Mitsugu Araki, Seiji Niho, Rakhee Chauhan, Phillip P. Knowles, Katsuya Tsuchihara, Shingo Matsumoto, Yoko Shimada, Sachiyo Mimaki, Genichiro Ishii, Hitoshi Ichikawa, Yasushi Okuno, Kiyotaka Yoh, Neil Q. McDonald, Koichi Goto, A secondary RET mutation allosterically conferring resistance to vandetanib; AACR annual meeting 2018, Chicago, Illinois, USA, April 14 2018. ポスター
3. Takashi Nakaoku, Mitsugu Araki, Seiji Niho, Rakhee Chauhan, Phillip P. Knowles, Katsuya Tsuchihara, Shingo Matsumoto, Yoko Shimada, Sachiyo Mimaki, Genichiro Ishii, Hitoshi Ichikawa, Yasushi Okuno, Kiyotaka Yoh, Neil Q. McDonald, Koichi Goto, Takashi Kohno; Druggable oncogene fusions and resistance mechanisms in lung cancer. The 6th JCA-AACR Special Joint Conference, Kyoto, Japan, July 11 2018, 口頭
4. Takashi Nakaoku, Takashi Kohno; Molecular targeted therapy for lung cancer based on driver oncogenes such as RET and NRG1 fusions. 第 77 回日本癌学会学術総会 シンポジウム “Molecular target therapy under precision medicine”. 大阪、日本. 2018 年 9 月. 口頭
5. 中奥 敬史、仁保 誠治、土原 一哉、松本 慎吾、市川 仁、葉 清隆、後藤功一、河野 隆志; RET S904F 変異によるアロステリック効果を介したバンデタニブ耐性機構. 第 59 回日本肺癌学会学術集会. 2018 年 11 月. 東京、日本. 口頭
6. RET 融合遺伝子陽性肺がんにおける薬剤耐性メカニズムの解明, ポスター、中奥 敬史、大塚 綾香、河野 隆志、第 76 回日本癌学会学術総会、2017/09/29、国内
7. Identification of mechanisms of drug resistance in RET-rearranged lung cancer. ポスター、中奥 敬史、河野 隆志、18th World Conference on Lung Cancer、2017/10/10、国内
8. RET 融合遺伝子陽性肺がんにおける薬剤耐性メカニズムの解明, ポスター、中奥 敬史、河野 隆志、第 58 回日本肺癌学会学術総会、2017/10/14、国内

〔図書〕(計 1 件)

中奥敬史、河野隆志、がんゲノム医療を実現する遺伝子パネル検査とその実用、医学のあゆみ 266(5): 385-388, 2018.

〔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:

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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：  
研究成果のプレスリリース  
[https://www.ncc.go.jp/jp/information/pr\\_release/2018/0214/index.html](https://www.ncc.go.jp/jp/information/pr_release/2018/0214/index.html)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。