

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15300

研究課題名(和文) 蛋白多量体化阻害ペプチドによる新規抗癌機序の解明と細胞内デリバリーシステムの探索

研究課題名(英文) Monomerization of dimerized oncogenic fusion proteins by mimetic peptides as cancer treatments

研究代表者

平井 理子 (Hirai, Noriko)

旭川医科大学・大学病院・客員助教

研究者番号：90596272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の重要な標的であるEML4-ALK融合は、ccドメインを介した二量体化により恒常的に活性化している。では、本蛋白質の二量体化阻害は抗癌効果をもたらすだろうか。本研究では、ALK陽性肺癌細胞に対するcc模倣分子と合成ペプチドの生物学的効果を検証した。FKBPによる量体調節モデルでは、ALKの単量体化により腫瘍増殖が抑制された。蛍光モデルにおいては、ccの過剰発現により二量体融合蛋白の減少と腫瘍増殖速度の低下がみられた。合成ccペプチドの投与により、ALKリン酸化の減少と細胞増殖の抑制がみられた。以上より、本研究は癌異常タンパクの多量体化阻害が今後の癌治療の一戦略となる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は国内罹患率・死亡率ともに高く、治療開発と予後改善は重要な課題である。非小細胞癌の5%にみられるEML4-ALK融合の発見後、ALKキナーゼ阻害を機序とした治療薬の開発が進んできた。それらは従来の殺細胞性抗癌剤と比較して劇的な生存期間の延長や毒性軽減によるQOLの改善をもたらしたが、長期投与により耐性化することが知られており、その克服が重要な課題である。本研究はその課題に対し「蛋白の多量体化に依存したがん」という全く新しい切り口からアプローチしたことに意義がある。また、多量体化による恒常的活性化は、臓器横断的に様々な腫瘍でみられ、将来重要な治療標的となる可能性を示したことに意義がある。

研究成果の概要(英文)：Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4)-anaplastic lymphoma kinase (ALK) (EML4-ALK) fusion accounts for 5% of non-small cell lung cancers (NSCLC). These oncogenic proteins are constitutively activated by dimerization via the coiled-coil (cc) domain. This gives us a question whether inhibition of the oncogenic protein dimerization could have an anti-cancer effect or not. This study investigated biological effects of cc mimetic molecules for ALK positive NSCLC cells.

In FKBP-mediated dimerization inducing model, we found cells expressing monomeric ALK did not grow both in vitro and vivo. Using a fluorescent system, we found overexpression of cc suppressed the fusion protein dimerization concomitant with decreasing the tumor growth. The treatment with synthesized cc peptides decreased the phosphorylation of ALK and suppressed the cell growth.

These findings suggested the monomerization of ALK fusion proteins could be a therapeutic strategy for ALK positive NSCLC.

研究分野：がん分子生物学、がん治療学

キーワード：がん 肺がん 遺伝子 タンパク質 治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

EML4-ALK 遺伝子は、肺腺癌の 5%と高頻度にみられるドライバー遺伝子である。切断された EML4 が逆位で ALK キナーゼドメインと融合することにより、癌ドライバー遺伝子としての機能を獲得する。その産物である EML4-ALK 融合蛋白は、ALK がリガンド不在化に恒常的二量体化することで発癌増殖に至ると考えられており (Soda M, Choi YL, et al: Nature 448:561-6, 2007)、この過程には融合パートナーである EML4 の coiled-coil domain (cc) の三量体化が重要であることが、2015 年 Richard らによって突き止められた (Richards MW, 2015)。そこから、逆説的に「cc domain を介した ALK 融合蛋白の多量体化を阻害することで発癌・増殖を抑制できるか？」を核心的問いとし、EML4 の cc 構造自身が持つ競合阻害作用と抗癌効果を明らかにし、薬剤として細胞内にデリバリーする方法を探索しようとしたのが本研究である。

### 2. 研究の目的

本研究は、「EML4 の c-c domain 構造自身が競合的に作用することで、EML4-ALK 融合蛋白の多量体化を阻止し、ALK キナーゼの活性化と下流シグナルを抑制し、発癌・増殖を抑制する。」という独自の仮説のもとで、

- 1、 c-c domain と EML4-ALK のタンパク相互作用の確認
  - 2、 c-c domain による ALK タンパク発現抑制の確認
  - 3、 c-c ペプチドの細胞内への効率的な delivery system 探索と確立
  - 4、 in vivo での c-c ペプチドによる抑癌効果の検証
- を達成することを当初の目的とした。

### 3. 研究の方法

まず、ALK の恒常的活性化が二量体化に依存しているのかどうかを検証するため、Ba/F3 細胞と FKBP (タンパク質フォールディングシャペロン) 変異体及びそのリガンドを用いて、ALK 融合蛋白の量体調節モデルを作成した。Ba/F3 細胞が IL-3 依存性増殖であることを利用し、FKBP-ALK キナーゼドメインを恒常発現する Ba/F3 細胞株を樹立した後、リガンド除去により ALK キナーゼドメインの単量体化を誘導することで、細胞増殖への影響を in vitro, in vivo (ヌードマウス) で検証した。また、単量体化が及ぼす ALK リン酸化と下流シグナルへの影響を、ウエスタンブロットにより確認した。同時に、単量体で活性化することが知られている ALK 機能獲得型変異をコントロールとした。

次に、EML4cc の過剰発現により誘導される蛋白相互作用を確認するため、蛍光タグを付加した標的蛋白を Ba/F3 細胞にトランスフェクトし、蛍光顕微鏡及びフローサイトメトリにより観察した。同時に、これらの細胞増殖を in vitro, in vivo で検証した。

ヒト EML4cc ドメインのアミノ酸配列をもとに、3.3kD の模倣ペプチド (cc ペプチド) を合成し、ALK 陽性肺癌細胞株に投与し、その生物学的効果を MTS アッセイ、ウエスタンブロットにより検証した。さらにペプチドの透過率を上げるため、16His 付加や、膜透過ペプチドの併用等の工夫を試みた。

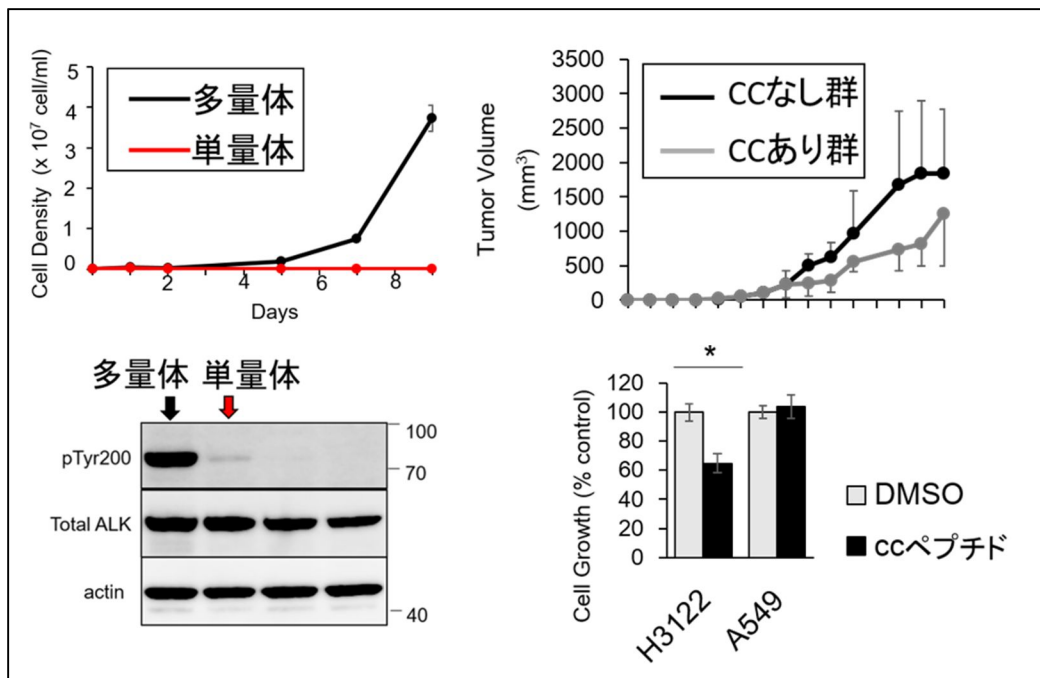
### 4. 研究成果

量体調節モデルにより ALK 融合蛋白を単量体に誘導した場合、ALK リン酸化とその下流シグナルが抑制され、さらに vitro の細胞増殖、マウスの腫瘍形成を抑制することが明らかになった (図 1 左段上下)。また蛍光を用いた検証により、ALK 融合蛋白の二量体化を可能にしている EML4 の coiled-coil ドメインを EML4-ALK 陽性 Ba/F3 細胞に過剰発現させた場合、EML4-ALK 自身の多量体化が減少することが示された。同時に、これらの細胞増殖比較において、過剰発現群で増殖速度の低下が観察された (図 1 上段右)。ALK 陽性肺癌細胞株に対する cc ペプチド投与により ALK リン酸化の減少及び下流シグナルの減少が観察された。同時に cc ペプチド単独投与・キナーゼ阻害剤との併用の両者において、増殖抑制効果が観察された (図 1 下段右)。

これらの研究成果は、がんドライバー融合タンパク質の多量体化阻害が治療戦略として有効である可能性を示した点で意義がある。ドライバー遺伝子陽性肺癌においては種々のキナーゼ阻害剤が現在進行形で開発・使用されており劇的な生存期間の延長や QOL の改善をもたらしているが、獲得耐性の克服が重要な課題である。また、ドライバー遺伝子は肺癌のみならず種々のがんにおいて発現していることが知られており、例えば甲状腺がんの RET 遺伝子、血液腫瘍の Bcr-Abl 遺伝子などがある。肺癌においても EML4-ALK の他に、ROS1 融合、RET 融合などが知られており、いずれも融合パートナーの cc ドメインを介した多量体化が恒常的活性化の鍵である可能性が高い。以上から、本研究は「蛋白の多量体化に依存したがん」という全く新しい切り口

を提示し、多量体化阻害ペプチドというこれまでになかった治療的アプローチを提示したことで、将来臓器横断的ながん治療の開発に結び付く可能性を示した点に意義がある。

図 1. 主な研究成果



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hirai Noriko, Sasaki Takaaki, Okumura Shunsuke, Minami Yoshinori, Chiba Shinichi, Ohsaki Yoshinobu	4. 巻 10
2. 論文標題 Monomerization of ALK Fusion Proteins as a Therapeutic Strategy in ALK-Rearranged Non-small Cell Lung Cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2020.00419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirai Noriko, Sasaki Takaaki, Okumura Shunsuke, Sado Masatoshi, Akiyama Naoko, Kitada Masahiro, Takei Hidehiro, Ohsaki Yoshinobu	4. 巻 9
2. 論文標題 Novel ALK-specific mRNA in situ hybridization assay for non-small-cell lung carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Lung Cancer Research	6. 最初と最後の頁 257 ~ 268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/tlcr.2020.03.04	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirai Noriko, Oikawa Kensuke, Tanino Mishie, Ohsaki Yoshinobu	4. 巻 158
2. 論文標題 A 47-Year-Old Woman With Pulmonary Nodules and Facial Hemispasms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chest	6. 最初と最後の頁 e197 ~ e204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chest.2020.03.078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Umekage Yasuhiro, Okumura Shunsuke, Tenma Toshiyuki, Kazebayashi Yoshihiro, Hirai Noriko, Minami Yoshinori, Doshita Kazushi, Sasaki Takaaki, Yamamoto Yasushi, Ohsaki Yoshinobu	4. 巻 31
2. 論文標題 Acute eosinophilic pneumonia following inhalation of turpentine oil: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine Case Reports	6. 最初と最後の頁 101143 ~ 101143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rmcr.2020.101143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirai Noriko, Sasaki Takaaki, Okumura Shunsuke, Minami Yoshinori, Chiba Shinichi, Ohsaki Yoshinobu	4. 巻 10
2. 論文標題 Monomerization of ALK Fusion Proteins as a Therapeutic Strategy in ALK-Rearranged Non-small Cell Lung Cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2020.00419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Noriko Hirai, Takaaki Sasaki, Shinichi Chiba, Yuji Uno, Hidehiro Takei
2. 発表標題 CDK4 copy number gain in BRAF V600E-mutated non-small cell lung cancers resistant to dabrafenib plus trametinib
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 高明、平井 理子、堂下 和志、梅影 泰寛、天満 紀之、吉田 遼平、風林 佳大、南 幸範、奥村 俊介、山本 泰司、長内 忍、大崎 能伸
2. 発表標題 気管支擦過ブラシ洗浄液を用いた肺がん遺伝子変異解析の有用性
3. 学会等名 第42回日本呼吸器内視鏡学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木 高明、吉田 遼平、平井 理子、梅影 泰寛、天満 紀之、南 幸範、奥村 俊介、大崎 能伸
2. 発表標題 Tissue biopsy vs Liquid biopsy ALK耐性遺伝子変異に対するLiquid biopsyの試み
3. 学会等名 第42回日本呼吸器内視鏡学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平井 理子、佐々木 高明、大崎 能伸
2. 発表標題 coiled-coilを標的としたEML4-ALK融合蛋白の単量体化がもたらす抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Noriko Hirai
2. 発表標題 Monomerization of ALK Fusion Proteins as a Therapeutic Strategy in ALK Rearranged Cancers
3. 学会等名 AACR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平井 理子
2. 発表標題 coiled-coilを標的としたEML4-ALK融合蛋白の単量体化がもたらす抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko Hirai
2. 発表標題 Monomerization of ALK Fusion Proteins as a Therapeutic Strategy in ALK Rearranged Cancers
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------