

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15922

研究課題名(和文) ALK融合遺伝子陽性肺癌におけるアポトーシス抵抗性因子の解明と克服治療の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of resistance to apoptosis in ALK rearranged NSCLC

研究代表者

谷本 梓 (Tanimoto, Azusa)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：90776444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：未治療のALK融合遺伝子陽性肺癌患者に対するALK阻害薬(alectinib)の効果とTP53変異との相関関係を明らかにするため、肺がんの臨床情報と遺伝子情報が統合されたデータベースを解析した。その結果、TP53変異陽性群では野生型群よりも有意に無増悪生存期間が短かった。そして、TP53変異を有するALK融合遺伝子陽性肺癌細胞株に対してプロテアソーム阻害薬をalectinibに併用したところ、アポトーシスを強く誘導した。メカニズムとしてプロテアソーム阻害薬がアポトーシス蛋白であるNoxaの分解を阻害し、細胞内で増加したNoxaが抗アポトーシス蛋白であるMcl-1に結合することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALK融合遺伝子陽性肺癌の約1/4にTP53変異が共存しており、本来有効であるALK阻害薬の効果を減弱させる要因となっていることが明らかになった。TP53変異はEGFR遺伝子などの他のドライバー遺伝子変異陽性肺癌にも共存しており、本研究は選択的Mcl-1阻害薬の開発の意義が高めた。

研究成果の概要(英文)：We used integrated clinical and next-generation sequencing data.

ALK-rearranged NSCLC cell lines expressing wild-type or mutant TP53 were used to evaluate cellular apoptosis induced by ALK-TKIs. In 90 ALK-rearranged NSCLC patients who were treated with a selective ALK-TKI, alectinib, TP53 co-mutated patients showed significantly worse progression-free survival (PFS) than TP53 wild-type patients [median PFS, 11.7 months vs. NR; $p=0.0008$; hazard ratio, 0.33]. ALK-rearranged NSCLC cell lines which lost p53 function were resistant to alectinib-induced apoptosis, but a proteasome inhibitor, ixazomib markedly induced apoptosis in the alectinib-treated cells by increasing the expression of a pro-apoptotic protein, Noxa which bound to an anti-apoptotic protein, Mcl-1. In subcutaneous tumor models, combination of ixazomib and alectinib prominently induced tumor regression and apoptosis even though the tumors were generated from ALK-rearranged NSCLC cells with non-functional p53.

研究分野：肺癌

キーワード：ALK Mcl-1 Noxa

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原発性肺がんは、年間約 8 万人が死亡する我が国のがん死亡原因第一位のがんである。日本人の肺がんの約 4% に、*ALK* 遺伝子が他の遺伝子と融合することを原因とする肺がん (*ALK* 融合遺伝子陽性肺がん) が存在する。*ALK* は融合遺伝子となることで強い生存シグナルを発するようになるため、*ALK* の機能を抑える分子標的薬が有効である。中でも alectinib は、選択的に *ALK* を阻害することで、最初に開発された *ALK* 阻害薬である crizotinib と比較して、副作用の発現頻度が抑えられると同時に、優れた有効性を示したため、現在の *ALK* 融合遺伝子陽性肺がんに対する第一選択薬として位置づけられている。alectinib は約 9 割の *ALK* 融合遺伝子陽性肺がんに劇的に効いて腫瘍を一旦縮小させる一方で、一部の患者では効果が持続せず早期に再発することが問題になっている。近年ではアポトーシス抵抗性が分子標的薬の初期治療抵抗性に関与していることが示唆されており、*ALK* 融合遺伝子陽性肺がんにおいても、がん抑制遺伝子である *TP53* の変異を有する患者において *ALK* 阻害薬の効果が低下することが海外のグループによって報告されている。しかし、それらの報告に関しては *ALK* 阻害薬既治療の症例が多数含まれているため、*p53* 以外の二次的変異の影響が除外できていなかった。つまり、未治療の症例における *TP53* の変異ステータスによる *ALK* 阻害薬の効果に対する影響が臨床的にも実験的にも検証されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、*TP53* 変異を有する *ALK* 融合遺伝子陽性肺がんを臨床的・実験的に解析することで分子標的薬 alectinib に曝露された腫瘍細胞が抵抗するメカニズムを再現し、その抵抗性を解除する治療法を新たに見いだすことを目的とした。

3. 研究の方法

国立がん研究センター東病院を中心とした肺がんの全国遺伝子診断ネットワーク「LC-SCRUM-Japan」に 2013 年 2 月から 2020 年 6 月までに登録された 10389 の肺がん症例のデータベースを活用し、日本人における *TP53* 変異の *ALK* 融合遺伝子陽性肺がんの臨床データを解析した。具体的には *ALK* 阻害薬未治療の *ALK* 融合遺伝子陽性肺がんを抽出し、alectinib の効果と *TP53* 変異の有無との相関を検討した。そして、*in vitro* での検証を行うため、*TP53* 野生型と変異型の *ALK* 融合遺伝子陽性肺がん細胞株を用いた。*In vivo* の検証では *TP53* 変異型の細胞株を SCID Hairless マウスに皮下移植し、治療実験を行った。

4. 研究成果

ALK 融合遺伝子陽性肺がん症例に対する次世代シーケンサーによる解析の結果、25% (31/124 例) に *TP53* 変異を認めた。ミスセンス変異 (20 例)、フレームシフト変異 (8 例)、ナンセンス変異 (3 例) の順に多く、*p53* 以外の遺伝子異常の頻度は少なかった (図 1)。

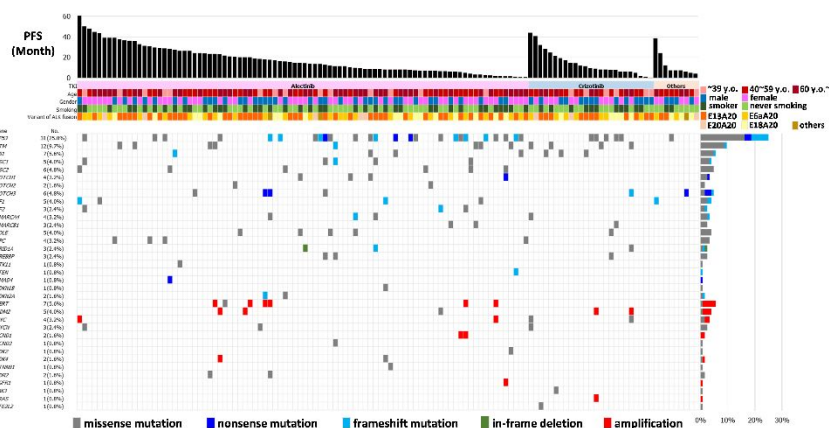


図 1 本邦における *ALK* 肺癌の網羅的解析

また、*TP53* 変異群が野生型群よりも一次治療の alectinib の無増悪生存期間中央値が有意に短かった (図 2) ことから、*TP53* 変異が未治療 *ALK* 肺癌に対する *ALK*-TKI の初期治療抵抗性へ関与することが示唆された。

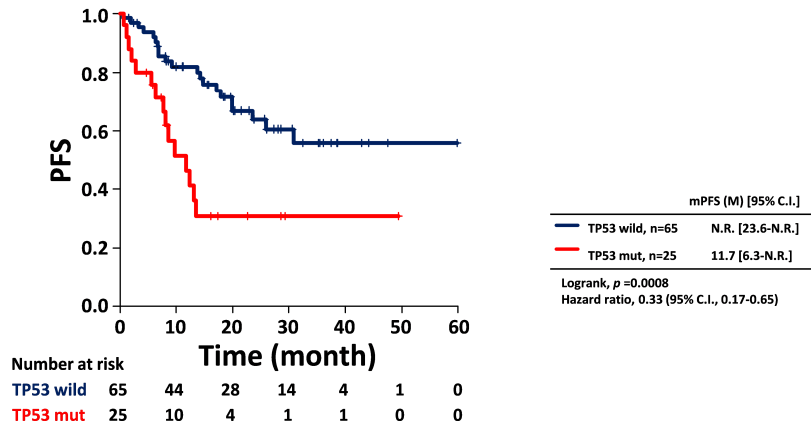


図 2 TP53 遺伝子変異と選択的 ALK-TKI の治療効果

そして、ALK 肺癌細胞株の TP53 野生型 CCL-185IG 株に対し p53 の発現を抑制すると alectinib によるアポトーシスが減弱し、TP53 がフレームシフト変異している A925L 株に対し野生型 p53 をレンチウイルスベクターにて導入するとアポトーシスが增強したことから、p53 の活性が ALK-TKI が誘導するアポトーシスに関与していることが再現された。さらに、Proteasome 阻害薬 ixazomib によって p53 非依存的なアポトーシス促進タンパクである Noxa を強く発現させることで、TP53 変異を有する ALK 肺癌株である A925L 株と H2228 株の alectinib に対するアポトーシス抵抗性を解除することを見出した。Noxa と他のアポトーシス蛋白との相互関係を解析する目的で免疫沈降法を行ったところ、ixazomib に曝露後に Noxa が抗アポトーシス蛋白である Mcl-1 に結合することが明らかとなった。実際に A925L 株と H2228 株に対し、Mcl-1 を siRNA にて発現抑制したところ alectinib によるアポトーシスが增強された。このことから、ixazomib によって分解を免れた Noxa が Mcl-1 に結合することによってアポトーシス誘導を促すことが示された (図 3)。最後に、A925L 株を用いた *in vivo* 実験では、ixazomib と alectinib の併用群において著明な腫瘍縮小を認めると同時に、アポトーシスマーカーである cleaved caspase 3 の発現が免疫染色にて上昇していた。

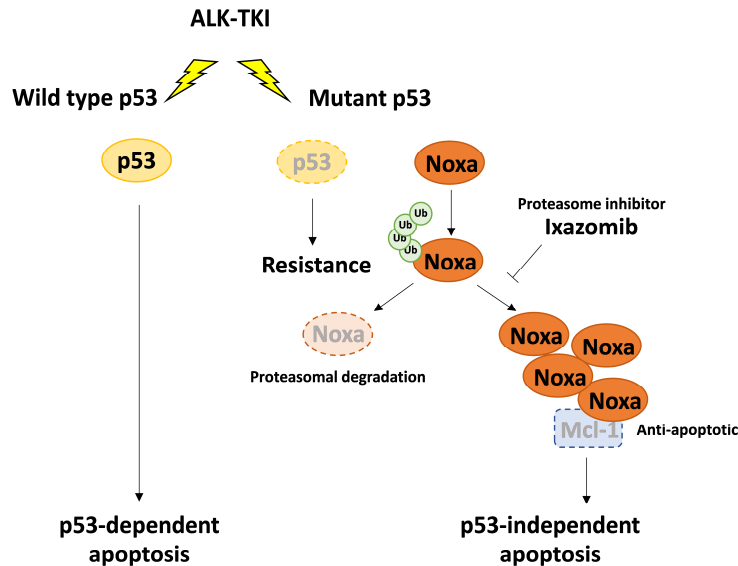


図 3 Mcl-1 を標的としてアポトーシスを誘導する概略図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Tanimoto Azusa, Matsumoto Shingo, Takeuchi Shinji, Arai Sachiko, Fukuda Koji, Nishiyama Akihiro, Yoh Kiyotaka, Ikeda Takaya, Furuya Naoki, Nishino Kazumi, Ohe Yuichiro, Goto Koichi, Yano Seiji | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Proteasome Inhibition Overcomes ALK-TKI Resistance in ALK-Rearranged/TP53-Mutant NSCLC via Noxa Expression | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Clinical Cancer Research | 6. 最初と最後の頁 1410 ~ 1420 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-20-2853 | 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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 谷本 梓 |
| 2. 発表標題 ALK 融合遺伝子陽性肺癌においてp53 の機能低下がもたらすALK-TKI 自然耐性の克服 |
| 3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 谷本 梓 |
| 2. 発表標題 Proteasome inhibitor overcomes ALK-TKI resistance by p53 inactivation through Noxaexpression in EML4-ALK NSCLC |
| 3. 学会等名 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 谷本 梓 |
| 2. 発表標題 分子標的薬の自然耐性に着目した基礎研究と臨床応用への試み |
| 3. 学会等名 第13回日本緩和医療薬学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 谷本 梓、松本 慎吾、後藤 功一、矢野 聖二 |
| 2. 発表標題 ALK融合遺伝子陽性肺癌におけるp53の機能低下に起因するALK阻害薬耐性の克服治療の開発 |
| 3. 学会等名 第117回日本内科学会講演会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 谷本 梓、松本 慎吾、後藤 功一、矢野 聖二 |
| 2. 発表標題 ALK融合遺伝子陽性肺癌におけるp53の機能低下に起因するALK阻害薬耐性の新規克服治療の開発 |
| 3. 学会等名 第85回呼吸器合同北陸地方会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|-------|--------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 松本 慎吾 (Matsumoto Singo) | | |
| 研究協力者 | 後藤 功一 (Goto Koichi) | | |
| 研究協力者 | 矢野 聖二 (Yano Seiji) | | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|