

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08516

研究課題名（和文）ALK肺がんのアポトーシス抵抗性因子を標的とした新規治療の開発

研究課題名（英文）Development of Novel Therapies Targeting Apoptosis Resistance Factors in ALK-rearranged Lung Cancer

研究代表者

竹内 伸司（Takeuchi, Shinji）

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：90565384

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）：ALK肺がんのアポトーシス抵抗性機構を明らかにし、根治を目指した新規治療法の開発を目的として本研究を実施した。ALK肺がん株を用いた網羅的なゲノムスクリーニングにより、ALK-TKI投与下の細胞生存が主にSTAT3に依存していることを見出した。STAT3の発現抑制は、ALK-TKIによるアポトーシスを促進し、マウス皮下移植モデルでは、STAT3選択的阻害薬とalectinibの併用により、治療中止後の腫瘍再増殖が顕著に抑制され、明らかな毒性を認めなかった。以上の結果より、ALK-TKIにSTAT3阻害薬を併用する治療が有望であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALK融合遺伝子陽性の肺がん（ALK肺がん）患者にALKチロシンキナーゼ阻害薬（ALK-TKI）は奏効するが、ほとんどの場合、腫瘍は残存してがん細胞が生存し、数年の経過で多様な耐性を獲得して増悪するため、耐性後の治療が困難である。本研究では、ALK-TKI投与下でALK肺がん細胞が生存する機構を見出し、STAT3に対する選択的阻害薬の併用によりALK肺がん細胞をほぼ死滅させられることを実験的に明らかにした。臨床試験での検討が必要であるが、肺がん患者の予後改善に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Our study focused on developing novel therapeutic strategies targeting apoptosis resistance factors in ALK-rearranged lung cancer. Through functional genomic screening using small guide RNA libraries, we discovered that the treatment-induced adaptive survival of ALK-rearranged lung cancer cells is predominantly dependent on STAT3 activity following ALK inhibition. Inhibiting STAT3 significantly suppressed the adaptive survival of these cancer cells by enhancing ALK inhibition-induced apoptosis. In a xenograft study, the combination of YH0-1701 (a STAT3 inhibitor) and alectinib markedly suppressed tumor regrowth after treatment cessation, achieving near-complete tumor remission compared to alectinib alone. These findings provide new insights into the development of combined therapeutic strategies targeting apoptosis resistance factors in patients with ALK-rearranged lung cancer.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：ALK肺がん アポトーシス STAT3

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2007年に肺がんの新たなドライバー遺伝子として ALK 融合遺伝子が発見された (Soda M, et al. Nature. 2007)。ALK 融合遺伝子は非小細胞肺がんの約 3-7%の患者で認められており、融合パートナーとしては EML4 が最も多い。ALK 融合遺伝子陽性肺がん (ALK 肺がん) に対する治療薬として、crizotinib (Kwak EL, et al. N Engl J Med. 2010) が最初に国内外で承認されたが、crizotinib は当初、c-MET キナーゼ阻害薬として開発されていた薬剤であり、ALK に対する選択性が低く副作用も多いことから、より有効で忍容性の良い薬剤の開発が進められた。そのような中、ceritinib 及び alectinib が第 2 世代 ALK-TKI として高い有効性と安全性を示し、alectinib は本邦において、切除不能な進行・再発の ALK 肺がんに対して 1 次治療で使用可能となった。日本人 ALK 肺がん患者を対象として、crizotinib と alectinib の有効性を比較した第 3 相試験である J-ALEX では、alectinib の奏効率 93.5%、無増悪生存期間中央値 34.1 ヶ月と crizotinib よりも著明に優れた有効性を示した (Hida T, et al. Lancet. 2017, Seto T, et al. J Clin Oncol. 2019)。この結果は、肺がんにおける EGFR 変異 (Soria JC, et al. N Engl J Med. 2018)、ROS1 融合 (Shaw AT, et al. N Engl J Med. 2014)、BRAF V600E 変異 (Planchard D, et al. Lancet Oncol. 2017) に対して承認されているチロシンキナーゼ阻害薬によって示された有効性を凌駕している。一方で、ALK 肺がんの ALK-TKI 耐性については、L1196M、G1202R など多量の ALK 耐性変異の他、HGF-MET (Yamada T, Takeuchi S, et al. Clin Cancer Res. 2012) amphiregulin-EGFR (Taniguchi H, Takeuchi S, et al. Cancer Sci. 2017) などによる側副経路の活性化など様々な耐性機構が報告されている (Katayama R. Cancer Sci. 2018)。さらに、我々は ALK-TKI 耐性症例の剖検組織を用いて、免疫染色標本を laser capture microdissection により上皮系腫瘍部と間葉系腫瘍部に切り分けて得られた DNA を digital PCR で解析した結果、上皮系腫瘍部では耐性変異である L1196M が検出され、間葉系を示す腫瘍部ではほとんど耐性変異が検出されなかったことから、上皮間葉転換 (EMT) が、ALK 耐性変異とは独立した耐性機構として、同一症例において混在していることを初めて明らかにした (Fukuda K, Takeuchi S\*, et al. Cancer Res. 2019 \*corresponding author)。

この結果より、獲得耐性後は ALK 耐性変異以外の耐性機構が混在することから、ALK 耐性変異を克服できる ALK 阻害薬の開発だけでは十分な有効性が得られない可能性が示唆され、ALK-TKI 耐性後の治療薬として承認された第 3 世代 ALK-TKI である lorlatinib の有効性が限定的であること (Shaw AT, et al. Lancet Oncol. 2017) もこの仮説を支持している。

このような背景から、次世代型 ALK-TKI の初期治療における有効性をさらに高め、がん細胞の多様な耐性機構獲得を起させないことが、予後改善に重要であると考えた。

### 2. 研究の目的

次世代型 ALK-TKI に対するアポトーシス抵抗性機構を明らかにし、選択的阻害薬併用による ALK 肺がんの根治を目指した新規治療法の開発を目的として研究を実施した。

### 3. 研究の方法

(1) ALK 肺がん株である A925L を用いて 747 遺伝子を対象とした CRISPR-cas9 ライブラリでノックアウトし、alectinib 添加時の細胞生存に寄与する分子を網羅的に探索した。

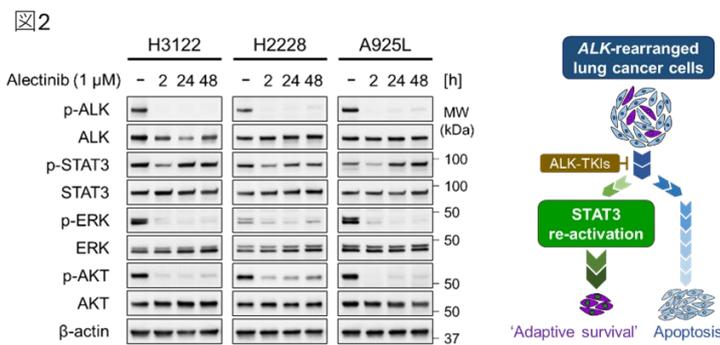
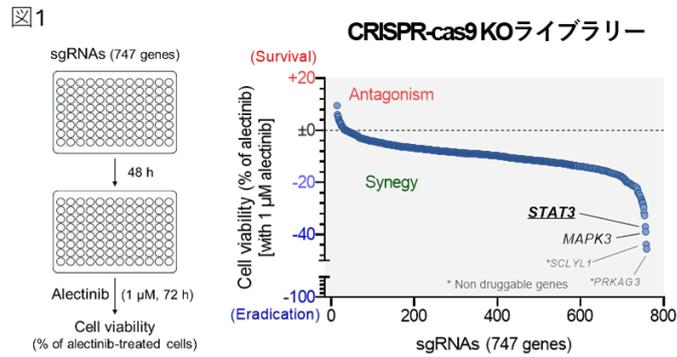
(2) 標的候補分子について、3 種の ALK 肺がん株 (H3122、H2228、A925L) を用いて、次世代型 ALK-TKI (alectinib、brigatinib、lorlatinib) 添加時のアポトーシス抵抗性との関連を *in vitro* で解析した。

(3) アポトーシス抵抗性分子に対する選択的な阻害薬を用いて、次世代型 ALK-TKI との併用効果を *in vitro*、*in vivo* で検証した。

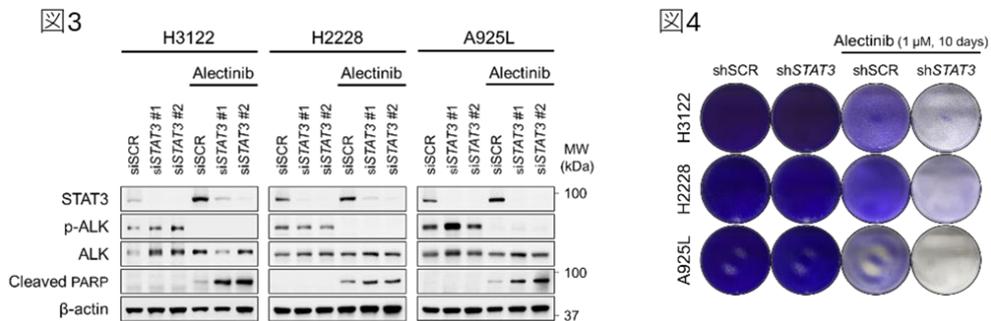
(4) アポトーシス抵抗性分子の制御機構について *in vitro* で解析を行った。

### 4. 研究成果

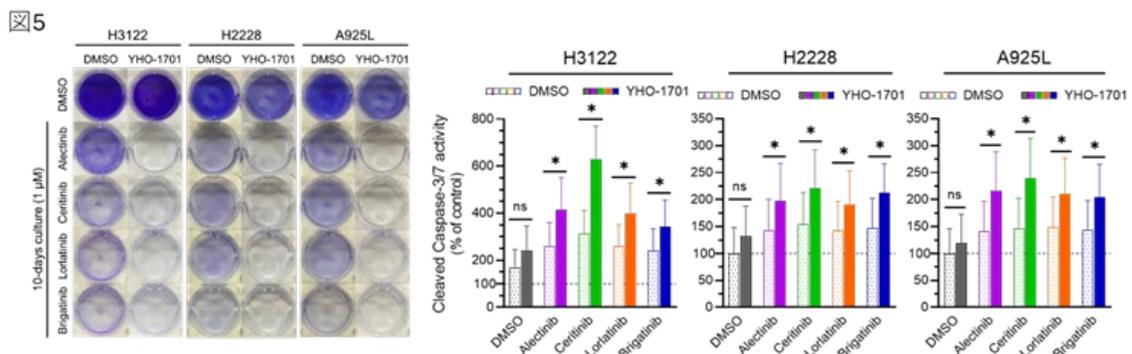
(1) CRISPR-cas9 によるノックアウトライブラリーを用いた網羅的な解析によって、STAT3 が alectinib 添加時の A925L 細胞の生存に重要な分子であることを見出した (図 1)。3 種の ALK 肺がん株を用いて western blot 法で STAT3 のリン酸化を評価した結果、alectinib による処理開始後 48 時間までに、再活性化することが明らかになり、アポトーシス抵抗性の標的分子であることが示唆された (図 2)。



(2) STAT3 に特異的な siRNA を用いて発現を抑制した結果、alectinib によるアポトーシスが促進された。さらに、shRNA で安定的に STAT3 の発現を抑制した結果、alectinib 添加時に生存する細胞の減少を認めた (図 4)。以上の結果から、STAT3 を阻害することで alectinib によるアポトーシスを促進できることを明らかにした。

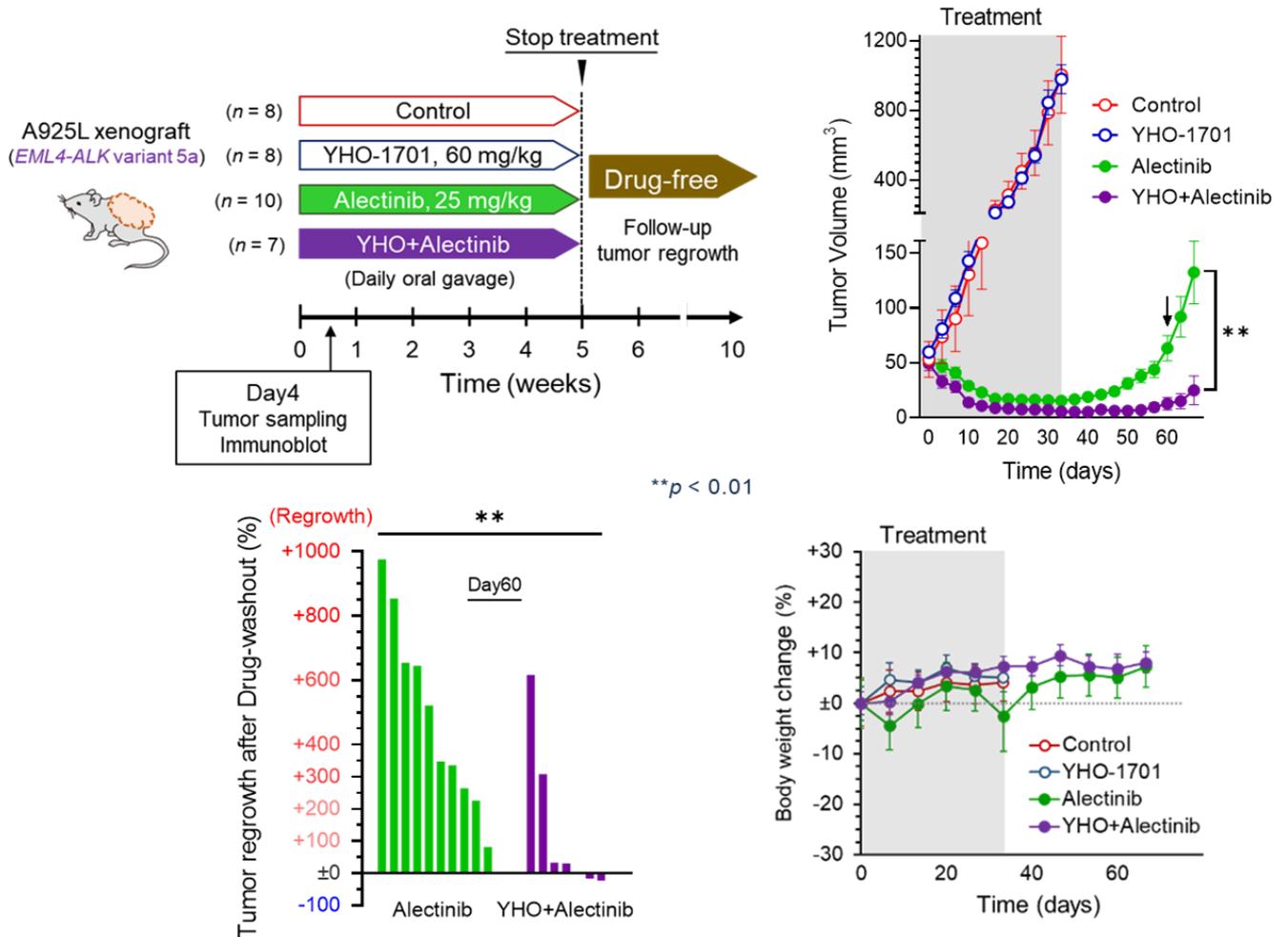


(3) STAT3 に選択性が高い新規阻害薬である YHO-1701 を用いて ALK-TKI との併用効果を 3 種の ALK 肺がん株で検討したところ、併用により生存細胞の減少を認め、アポトーシスが促進された (図 5)。



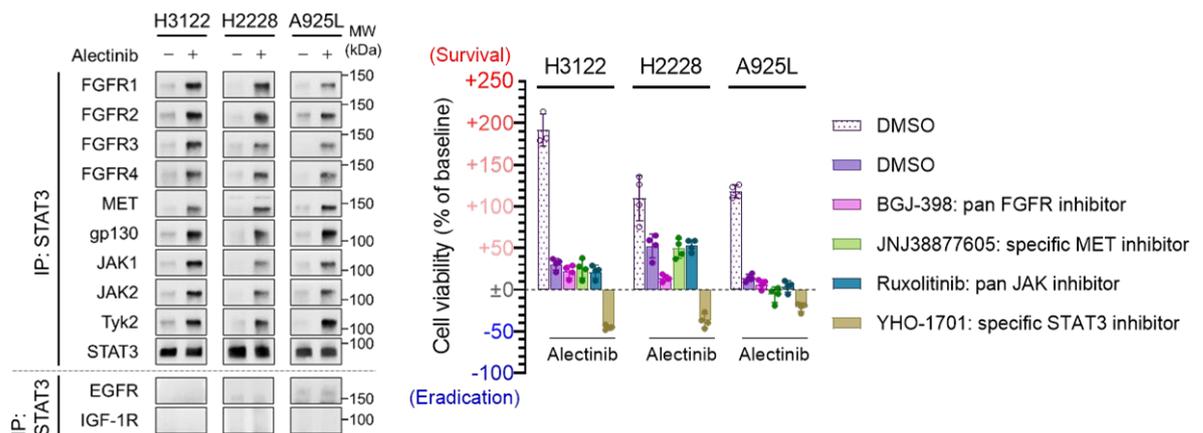
さらに、A925Lのマウス皮下移植モデルで治療実験を行ったところ、alectinib単剤で治療した群と比較し、YHO-1701を併用した群において、治療中止後の腫瘍再増大を有意に抑制し、さらに数匹のマウスでは再増大を認めず、根治を示唆する結果も得られた。また、併用治療群において、体重減少を含む明らかな毒性を認めなかった(図6)。

図6



(4) ALK肺がん株を用いて alectinib 添加時の STAT3 制御機構を解析した。免疫沈降法による検討では、alectinib 添加により FGFR、MET や JAK と STAT3 の結合が増加することを確認した。そこで、各分子の阻害薬及び YHO-1701 を用いて alectinib との併用効果を比較したところ、YHO-1701 のアポトーシス誘導効果が高いことが確認された。以上の結果から、STAT3 は上流の多様なシグナルによって制御されており、ALK-TKI との併用において、STAT3 を選択的に阻害する治療が有望であることを明らかにした(図7)。

図7



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 Yanagimura Naohiro, Takeuchi Shinji, Fukuda Koji, Arai Sachiko, Tanimoto Azusa, Nishiyama Akihiro, Ogo Naohisa, Takahashi Hiroyuki, Asai Akira, Watanabe Satoshi, Kikuchi Toshiaki, Yano Seiji	4. 巻 6
2. 論文標題 STAT3 inhibition suppresses adaptive survival of ALK-rearranged lung cancer cells through transcriptional modulation of apoptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Precision Oncology	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41698-022-00254-y	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柳村尚寛、竹内伸司、新井祥子、福田康二、西山明宏、矢野聖二
2. 発表標題 ALK融合遺伝子陽性肺癌におけるSTAT3阻害薬の併用によるアポトーシス抵抗性の克服
3. 学会等名 第25回日本分子標的治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳村 尚寛, 竹内 伸司, 福田 康二, 西山 明宏, 小郷 尚久, 浅井 章良, 矢野 聖二
2. 発表標題 ALK融合遺伝子陽性肺癌におけるSTAT3阻害薬の併用によるアポトーシス抵抗性の克服
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------	---------