

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21554

研究課題名(和文)キナーゼの過剰活性化が生むパラドキシカルながん細胞の増殖抑制機構と治療応用

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of paradoxical growth suppression by over activation of oncogene kinases

研究代表者

片山 量平(KATAYAMA, Ryohei)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 基礎研究部・部長

研究者番号：60435542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：がんの分子標的薬として様々なキナーゼ阻害薬が開発・承認されて実臨床で使用されている。しかし、多くの症例で薬剤耐性が生じ、その際に時折、キナーゼ活性が更に亢進するような変異が生じることがあり、そのような場合には阻害薬を除くことでキナーゼ活性が過剰になりすぎると逆に細胞増殖が抑制されることを見出していた。そこで本研究ではキナーゼ活性を逆に亢進させることで抗腫瘍効果を誘導できないかと考え、そのメカニズムの理解から新たな治療標的となる因子や経路を探索した。その結果、治療抵抗性を獲得したALK陽性肺がんにおいてしばしば過剰な増殖シグナルが認められること、その際にある因子の抑制が重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キナーゼ阻害薬などの分子標的薬に対して耐性がん細胞が出現する際には、様々な変異や他のがん遺伝子の活性化などが生じる。この時薬剤が除去されると、もともとのドライバーがん遺伝子からのシグナルに加えて、耐性時に獲得したシグナルも加わり過剰な増殖シグナルとなる。このことががんの増殖にとって不利に働くことメカニズムが本研究により少しずつ明らかになっており、また実際に患者検体からもこのような現象があることが判明しつつあることは、今後新たな治療戦略を見出す可能性につながり、学術的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：Various kinase inhibitors have been developed, and approved as molecular targeting drugs for cancer. However, in many cases, drug resistance inevitably occurs, and occasionally mutations that further increase kinase activity occurred. In such cases, we have found that the excess activation target kinase by temporally removing inhibitors inversely suppress cancer cell growth. In the present study, we tried to understand the mechanism of excessive kinase activity induced growth suppression to find new potential therapeutic targets. As a result, we found that several ALK-positive lung cancers that have developed resistance to therapy actually show excessive kinase activity, and also find that a certain factor plays an important role in that process.

研究分野：腫瘍学

キーワード：キナーゼ 過剰活性化 薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーを用いた包括的解析が進み、がんの遺伝子変異の“カタログ”情報が蓄積されてきている。それにより、これまでも言われてきたことではあるが、1つのがんには1つの Driver Oncogene のみが存在し、相互排他的である、ということも、改めて確認されてきた。肺線がんでは、Driver Oncogene の解析と治療薬開発が非常に良く進んでおり、ごく一部の例を除いて、やはり Driver mutation が概ね相互排他的であるということが、1万例を超える規模の研究でも示されてきている。しかし、なぜ Driver Oncogene の存在が相互排他的であるかについての分子基盤はほとんど明らかになっていない。また、Driver Oncogene 陽性の肺がんは、分子標的薬に著効を示す一方でほとんどの症例で耐性を獲得して再発してしまうが、研究代表者らは、ALK や ROS1 融合遺伝子陽性肺がんにおける各種 ALK/ROS1 阻害薬耐性機構の研究を臨床サンプルと培養実験系の両方を対比させながら行い、種々の耐性機構を明らかにしてきた。その過程で、薬剤存在下のほうがより増殖できる細胞の存在を発見し、そのメカニズムを明らかにし、新たな治療標的になりうるのではないかと考えていた。私たちはそのメカニズムの1つとして、ROS1 の活性化変異による過剰活性化が過剰なチロシンリン酸化を引き起こし、様々な基質の過剰なリン酸化を介して Drug Addiction を引き起こしていることを見出し発表していた。そこで本研究では、過剰な Driver Oncogene シグナル(活性化変異や2つ以上の Driver oncogene)の与える影響について、培養細胞レベル、動物実験レベルでの検討を行うとともに、過剰すぎる Driver Oncogene シグナルを誘導することで、がん細胞がどのようにふるまい、治療に応用できるような脆弱性を見出せないかと考え研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では、キナーゼ型のドライバーがん遺伝子が、キナーゼ阻害薬などのがんが分子標的薬に耐性を持つ際に、時折、活性化が亢進するような変異が生じることと、さらに、これまでに研究代表者が見出してきた過剰すぎる Driver がん遺伝子からのシグナル(ROS1 や ALK 融合遺伝子陽性がんにおいてしばしば認められるキナーゼ活性亢進型の耐性変異など)が引き起こすがん細胞のパラドキシカルな増殖抑制と細胞死誘導の詳細なメカニズムを明らかにするとともに、この現象を逆手に取った新規治療法が可能かどうか検討し、あらたながんの脆弱性を探索する。即ち本研究では、キナーゼ型 Driver Oncogene を過剰活性化することによる抗腫瘍効果を誘導できないかという新しいコンセプトの治療戦略開発を目指す。そのために、発現誘導型等の遺伝子発現ベクター等を複数作製し、Driver Oncogene からの増殖シグナルの強度が細胞増殖に与える影響を質的および量的の両面から解析する。過剰すぎる増殖シグナルが持つ細胞への負の影響を明らかにすることで、新たな弱点を解明することであり、それらを標的とした新規治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

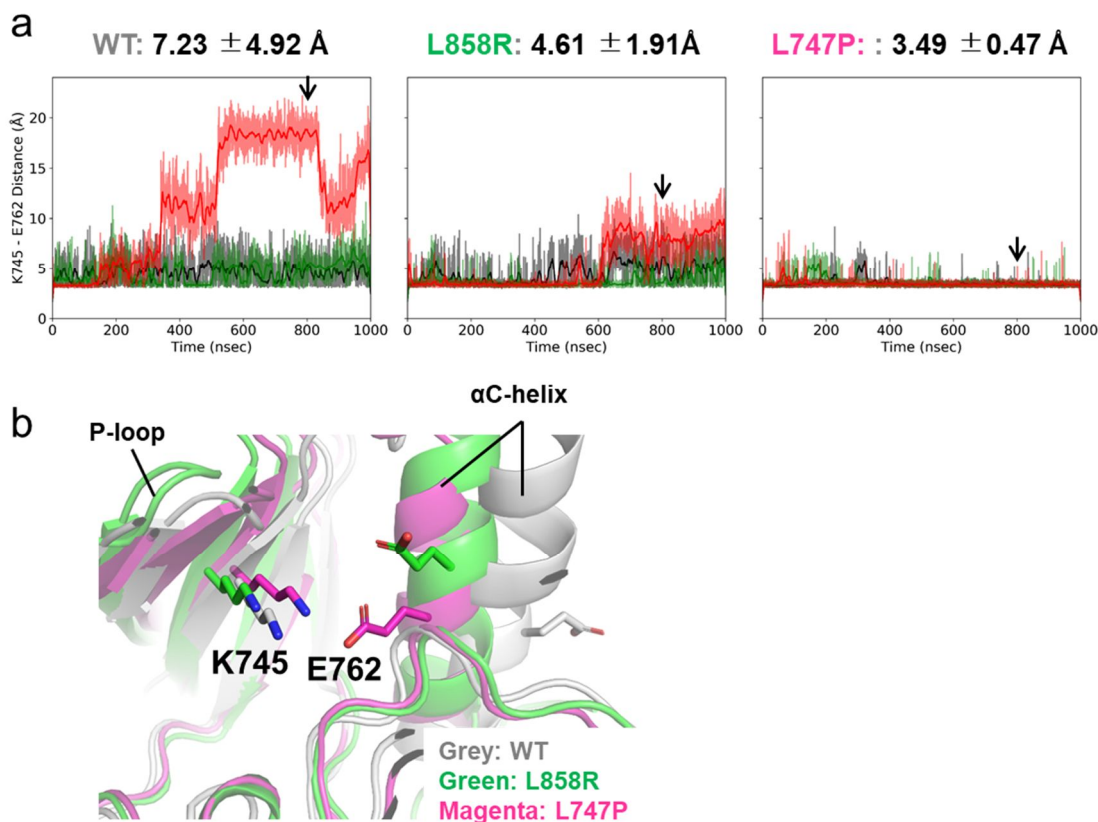
まず、各種がん遺伝子発現ベクターを作製し、ドライバーがん遺伝子(EGFR 活性化変異、ROS1 または ALK 融合遺伝子と、それらの薬剤耐性変異体)を発現する細胞株を作製(誘導型にして2つのドライバーがん遺伝子を発現できるようにした細胞も含む)。発現誘導ベクターとしては、Tet 誘導型の Lenti-virus ベクター(pSLIK-Tight TET など)などを利用する。次に、確立した細胞を利用して、Driver Oncogene の発現時に細胞がどのような挙動を示すかを次の点を中心に調べる。(a)2つ目の Driver Oncogene を発現させた際の細胞の増殖速度、造腫瘍性、細胞周期の変化。(b)2つ目の Driver Oncogene 導入による薬剤感受性の変化や増殖速度への影響、(c)新たな脆弱性につながる治療標的候補の探索と、新規治療法候補の有用性の検討を実施。

これらの条件において、細胞増殖、細胞死、細胞内代謝系等への影響をアポトーシス、ミトコンドリア代謝系、各種細胞増殖シグナル等に注目して検討する。解析手法には、リン酸化チロシン濃縮プロテオーム解析も取り入れる。また、過剰すぎる Driver Oncogene シグナルによる細胞増殖抑制・細胞死誘導の分子機構解析については、Western Blot 法や抗体アレイ、網羅的 RNA 発現解析、リン酸化 proteome、shRNA、標的遺伝子のノックアウト、標的既知の阻害剤によるスクリーニング等の手法を駆使して行う。鍵となる分子を発見した場合には、そのたんぱく質/因子の機能と役割の解析を進めるとともに、Driver Oncogene の活性化を模擬するような低分子化合物(アゴニスト)等の探索にも挑戦することで、ケミカルに Driver Oncogene の過剰活性化を誘導できるかどうか検討することを計画した。

## 4. 研究成果

初年度は各種発現ベクターを作製し、ドライバーがん遺伝子(EGFR 活性化変異、ROS1 または ALK

融合遺伝子と、それらの薬剤耐性変異体、BRAF や MET、KRAS 等の耐性に関わるがん遺伝子)を発現する細胞株を作製(一部は誘導下で発現するものも同時に作成)。また、ENU mutagenesis の手法を用いて、ドライバーがん遺伝子に対する耐性細胞を樹立した。また、患者由来がん細胞を分子標的薬に暴露し、抵抗性細胞を取得する過程で薬剤依存的増殖を示す細胞も得ることができた。また、抵抗性細胞を用いた研究から派生した研究成果として論文として発表した成果としては次のようなものがあった。肺がんの3割を占める EGFR 活性化変異の中でも、低頻度に見つかる「マイナー」変異について、その薬剤感受性・抵抗性についての構造面からの解析と、活性化機構について実験的およびコンピュータシミュレーションを駆使した解析から解明し、論文として投稿、採択に至った(下図)。



図：EGFR キナーゼ領域(野生型並びに変異体)の長時間 MD シミュレーションから、時折構造がダイナミックに変化する様子がとらえられ、EGFR-L747P 変異では K745 と E762 の間の塩橋が形成され安定な構造を長時間とっている可能性が明らかになった。

2021 年度は 2020 年度に引き続き、様々なドライバーがん遺伝子の多様な発現ベクターを作製し、ドライバーがん遺伝子(EGFR 活性化変異、ROS1 または ALK 融合遺伝子と、それらの薬剤耐性変異体)を複数発現する細胞株を作製した。また、ENU mutagenesis の手法を用いて、ドライバーがん遺伝子に対する耐性細胞を樹立し、患者由来がん細胞を分子標的薬に短期間または長期間暴露し、初期抵抗性細胞や完全な耐性細胞を取得し耐性機構を解明・論文として発表するとともに、一部からは低濃度の薬剤依存的に増殖促進を示す細胞を得た。さらに、耐性に関わるバイパス経路の活性化をするがん遺伝子を導入しても、がん細胞は元から有するドライバーがん遺伝子に依存した増殖をすること、元から有するドライバーがん遺伝子を薬剤により阻害し続けることで、後から導入したドライバーがん遺伝子に依存性が移っていくことなどを見出した。

## 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 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshizawa Takahiro, Uchibori Ken, Araki Mitsugu, Matsumoto Shigeyuki, Ma Biao, Kanada Ryo, Seto Yosuke, Oh-hara Tomoko, Koike Sumie, Ariyasu Ryo, Kitazono Satoru, Ninomiya Hironori, Takeuchi Kengo, Yanagitani Noriko, Takagi Satoshi, Kishi Kazuma, Fujita Naoya, Okuno Yasushi, Nishio Makoto, Katayama Ryohei	4. 巻 5
2. 論文標題 Microsecond-timescale MD simulation of EGFR minor mutation predicts the structural flexibility of EGFR kinase core that reflects EGFR inhibitor sensitivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Precision Oncology	6. 最初と最後の頁 32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41698-021-00170-7	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 Ariyasu Ryo, Uchibori Ken, Sasaki Takaaki, Tsukahara Mika, Kiyotani Kazuma, Yoshida Ryohei, Ono Yusuke, Kitazono Satoru, Ninomiya Hironori, Ishikawa Yuichi, Mizukami Yusuke, Yanagitani Noriko, Fujita Naoya, Nishio Makoto, Katayama Ryohei	4. 巻 in press
2. 論文標題 Monitoring epidermal growth factor receptor C797S mutation in Japanese non-small cell lung cancer patients with serial cell free DNA evaluation using digital droplet PCR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14879	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 Mizuta Hayato, Okada Koutaroh, Araki Mitsugu, Adachi Jun, Takemoto Ai, Kutkowska Justyna, Maruyama Kohei, Friboulet Luc, Katayama Kazuhiro, Ma Biao, Sasakura Yoko, Sagae Yukari, Kukimoto-Niino Mutsuko, Shirouzu Mikako, Takagi Satoshi, Simizu Siro, Nishio Makoto, Okuno Yasushi, Fujita Naoya, Katayama Ryohei, et al	4. 巻 12
2. 論文標題 Gilteritinib overcomes lorlatinib resistance in ALK-rearranged cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-21396-w	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 該当する
1. 著者名 Ariyasu Ryo, Yanagitani Noriko, Tadokoro Kenichi, Yamaguchi Toshikazu, Uchibori Ken, Kitazono Satoru, Fujita Naoya, Katayama Ryohei, Nishio Makoto	4. 巻 86
2. 論文標題 Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients having EGFR-activating mutations with or without BIM polymorphisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 517 ~ 525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00280-020-04136-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Yuki, Okada Koutaroh, Adachi Jun, Abe Yuichi, Narumi Ryohei, Uchibori Ken, Yanagitani Noriko, Koike Sumie, Takagi Satoshi, Nishio Makoto, Fujita Naoya, Katayama Ryohei	4. 巻 6
2. 論文標題 GSK3 inhibition circumvents and overcomes acquired lorlatinib resistance in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Precision Oncology	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41698-022-00260-0	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3件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 片山量平、藤田直也
2. 発表標題 Targeting drug persistent and resistant cells in driver mutation positive cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片山量平
2. 発表標題 ALK rearranged NSCLC ; prediction and simulation of the resistance mutations and therapeutic strategies
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片山量平
2. 発表標題 再発がん患者検体と初代培養がん細胞を用いた薬剤耐性機構と耐性克服法の探索
3. 学会等名 2020年度日本学術会議・日本薬学会主催シンポジウム「創薬を加速させる革新的な細胞・臓器・個体モデル」(招待講演)
4. 発表年 2021年

## 〔図書〕 計1件

1. 著者名 Luc Friboulet, Ryohei Katayama, et al	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 216
3. 書名 Therapeutic Strategies to Overcome ALK Resistance in Cancer, Volume 13 1st Edition	

## 〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ギルテリチニブの種々の変異体に対する適用	発明者 片山量平	権利者 公益財団法人がん研究会
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-20640号	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

## 〔取得〕 計0件

## 〔その他〕

<p>ALK融合遺伝子陽性肺癌に対する薬剤耐性克服薬の発見 ~ 第3世代ALK阻害薬耐性の克服を目指す ~  <a href="https://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/pickup/index.html">https://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/pickup/index.html</a></p> <p>ALK融合遺伝子陽性肺癌における薬剤耐性がん細胞の新たな治療標的候補を発見  <a href="https://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/news/9205.html">https://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/news/9205.html</a></p>
--

## 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	西尾 誠人  (NISHIO Makoto)		
研究協力者	内堀 健  (UCHIBORI Ken)		

6. 研究組織（つづき）

	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	藤田 直也  (FUJITA Naoya)		
研究協力者	高木 聡  (TAKAGI Satoshi)		

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		
フランス	Gustave Roussy Cancer Campus		