様 式 C－19、F－19－1、Z－19 （共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号： 13301
研究種目： 若手研究
研究期間： 2021～2022
課題番号： 21K15483

研究課題名（和文）ALK肺がんの髄膜がん腫症におけるALK-TKI耐性克服治療の開発

研究課題名（英文）Identification of resistance mechanism to ALK-TKIs in leptomeningeal carcinomatosis (LMC) model with EML4-ALK NSCLC cells

研究代表者
新井 祥子（Arai, Sachiko）

金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員

研究者番号：80824870

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：髄膜がん腫症（LMC）における第2世代ALK-TKIであるブリガチニブの耐性機構解明および新たな治療戦略の発見を目的とし、マウスLMCモデルにおいてブリガチニブ耐性を誘導し、耐性株であるBR細胞を樹立した。429のkinase inhibitor library を用いた結果、BR細胞においてブリガチニブと併用してSRCを阻害することにより耐性を克服できることをin vitroにおいて示した。さらに、in vivoにおいてブリガチニブとSRC阻害薬を併用することで腫瘍の再増大速度を有意に抑えることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
髄膜がん腫症や脳転移などの中枢神経系（CNS）転移は肺がんの20～30%に発症し、患者のQOLを著しく低下させる危篤な病態であるが、CNS転移が耐性獲得による病勢増悪の場となることが多く、CNSにおける耐性の分子機構解明やCNSにも有効な分子標的薬の開発が特に注目されている。本研究では、ヒトALK肺がん細胞株をマウスの髄腔に移植したモデルにおいてブリガチニブ耐性を誘導して得られた耐性株を用いて耐性機構を解明するため、in vitroの培養により誘導した薬剤耐性とは異なり患者と同様の生体内における薬物動態や血液脳関門を含む脳微小環境も反映した耐性機構の発見である。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to clarify the mechanism of resistance to brigatinib, a second-generation ALK-TKI, in Leptomeningeal carcinomatosis (LMC) and seek a novel therapeutic strategy. First, we induced brigatinib resistance in an LMC mouse model using the ALK-rearranged NSCLC cells by continuous oral brigatinib treatment, established BR cells from this model. Using a kinase inhibitor library of 429 kinases, we showed in vitro that SRC inhibition in combination with brigatinib overcomes resistance in BR cells. Furthermore, in vivo, the combination of brigatinib and SRC inhibitor significantly suppressed the rate of tumor re-growth. These findings indicate the potential of novel therapies dual-targeting ALK and SRC against ALK-TKI-resistant LMC in ALK-rearranged NSCLC patients.

研究分野： 薬剤耐性

キーワード： 薬剤耐性　ALK肺がん　中枢神経系転移

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

脳転移や髄膜がん腫症（LMC）などの中枢神経系（CNS）への転移は肺がん全体の 20～30%で生じ、患者の QOL の低下や予後不良につながる危篤な病態である。我々は以前の研究で第 2 世代の ALK チロシンキナーゼ阻害薬（ALK-TKI）であるアレクチニブの LMC における耐性がん細胞（AR）を樹立し、EGFR のリガンドであるアンフィレギュリンの発現上昇による EGFR の活性化が耐性に関与していること、また、*in vitro* および *in vivo* においてアレクチニブに EGFR-TKI を併用することにより耐性を克服できることを報告した。本研究では、EGFR と ALK を阻害することが報告されている第 2 世代の ALK-TKI であるブリガチニブにより AR の耐性克服を試み、さらにブリガチニブ耐性を誘導し、これまでに報告がない CNS 病変におけるブリガチニブ耐性機構を解明することに着目した。

２．研究の目的

本研究では、最も臨床的に治療に難渋する ALK 肺がんの LMC に焦点を絞り、LMC におけるブリガチニブ耐性機構を解明し、耐性を克服する治療法を見出すことを目的とした。

３．研究の方法

(1) ブリガチニブ耐性株の作成
以前の研究で樹立したルシフェラーゼ遺伝子を導入したアレクチニブ耐性 ALK 肺がん細胞株（AR）をマウスの髄腔内に移植し、ブリガチニブを約 50 日間経口投与して耐性を誘導し、髄液からブリガチニブ耐性がん細胞（BR）を樹立した。
(2) 耐性因子の同定
429 の阻害薬を含む kinase inhibitor library を用い、Bcr-Abl 阻害薬として臨床研究が進められている GZD824 において、ブリガチニブと併用時に高い細胞増殖抑制効果が示された。しかし、Bcr-Abl 阻害薬として承認されているイマチニブにおいてはブリガチニブとの併用効果が見られなかったことから GZD824 の他のターゲットに着目した結果、SRC の抑制することによりブリガチニブの細胞増殖抑制効果が高まったことから、SRC が耐性に関与していることが示唆された。
(3) *in vivo* における耐性克服の検討
BR 細胞を皮下移植したマウスモデルにおいて、ブリガチニブと GZD824 の併用効果を検討した。

４．研究成果

まず、マウス髄腔内へルシフェラーゼ遺伝子を導入したアレクチニブ耐性肺がん細胞株（AR）を移植し、アレクチニブへの耐性を確認後、50 mg/kg ブリガチニブの投薬を開始した。一度は腫瘍の退縮が確認できたが、投薬を続けることにより再発した腫瘍から耐性株（brigatinib resistant：BR）を樹立した（図 1）。BR 細胞において、ブリガチニブ耐性を惹起する既知の ALK 遺伝子の変異は検出されなかった。また、BR において EMT（Epithelial-Mesenchymal Transition）は誘導されていないことを WB により確認した。

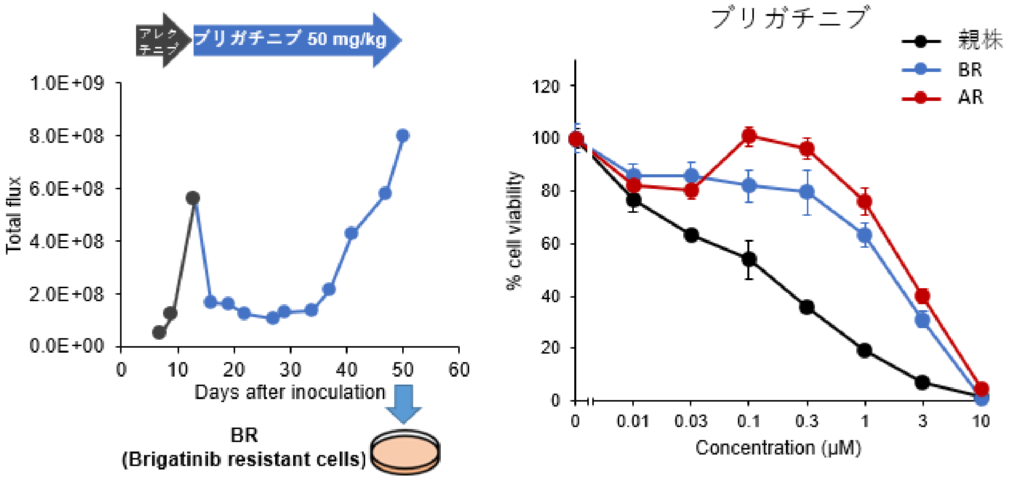

図１　ブリガチニブ耐性株（BR）の樹立

耐性因子を同定するために、429 の阻害薬を含む kinase inhibitor library を用いブリガチニブとの併用効果を検討した結果、Bcr-Abl 阻害薬として臨床研究が進められている GZD824 において高い併用効果が見られた（図 2）。library に含まれるいくつかの Bcr-Abl 阻害薬と Bcr-Abl 阻害薬として承認されているイマチニブにおいてブリガチニブとの併用効果を検討したが、イマチニブにおいてはブリガチニブとの併用効果が見られなかった。このことから、GZD824 やブリガチニブとの併用効果が見られた他の Bcr-Abl 阻害薬に共通する他のターゲットが耐性に関与している可能性が示唆され、共通ターゲットであった SRC に着目した。BR において si-RNA により SRC をノックダウンすることによりブリガチニブへの感受性が回復した（図 3）。さらに、*in vitro* において BR に GZD824 を添加することにより SRC の発現抑制が見られ、GZD824 とブリガチニブの併用はそれぞれの単剤と比較して caspase3/7 活性を有意に増強した。これらのことから、ブリガチニブに SRC 阻害薬を併用することで耐性を克服できることが示唆された。

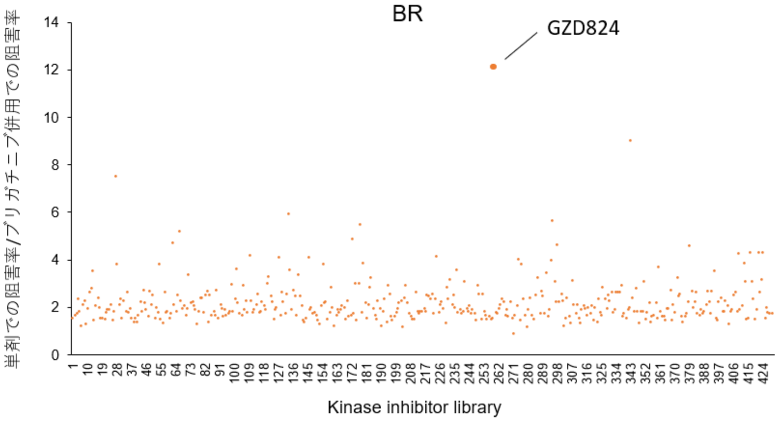

図 2　kinase inhibitor library を用いたスクリーニング

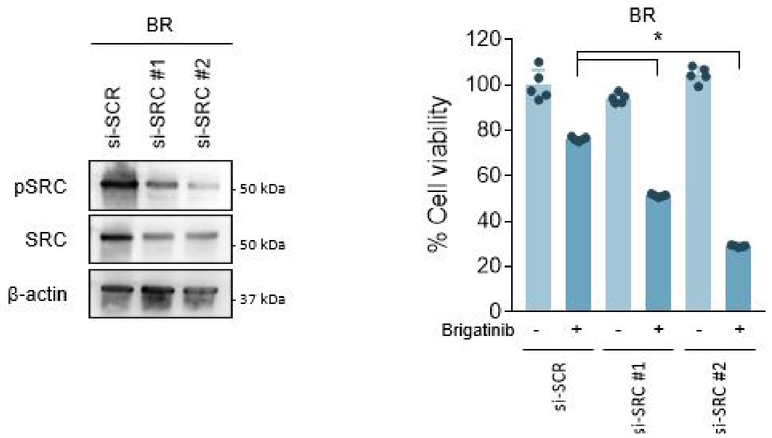

図 3　si-SRC によるブリガチニブ感受性の回復

次に、*in vivo* におけるブリガチニブと SRC 阻害薬の併用効果を検討した。初めに BR をマウス髄腔内へ移植した LMC モデルにおいて検討を行ったが GZD824 との併用効果は見られなかった。CNS への薬剤の移行性が影響した可能性を考慮し、皮下移植モデルにおいて再検討をした。SRC 阻害薬として GZD824 およびダサチニブを使用した。その結果、day18 までの治療においてブリガチニブ単剤群と GZD824 またはダサチニブとの併用群に有意な差は見られなかったが、治療を中止し腫瘍の再増大を観察した結果、ブリガチニブと GZD824 併用群において有意差はないものの再増大を抑制する傾向が見られ、ダサチニブとの併用群においては有意に腫瘍の再増大を抑制していた（図 4）。これらの結果から、CNS 病変におけるブリガチニブ耐性に SRC が関与していることが示唆された。

本研究では、マウス LMC モデルからブリガチニブ耐性株を樹立し、*in vitro* において SRC 阻害薬とブリガチニブを併用することによりブリガチニブの感受性が回復することを示した。しかしながら、*in vivo* においてマウス皮下腫瘍モデルでの腫瘍の再増大でブリガチニブ単剤群とブリガチニブと SRC 阻害薬の併用群に有意差が出たものの、その効果は限定的であった。また、SRC がどのようなメカニズムで耐性に関与しているかは不明であり、今後更なる解析が必要である。

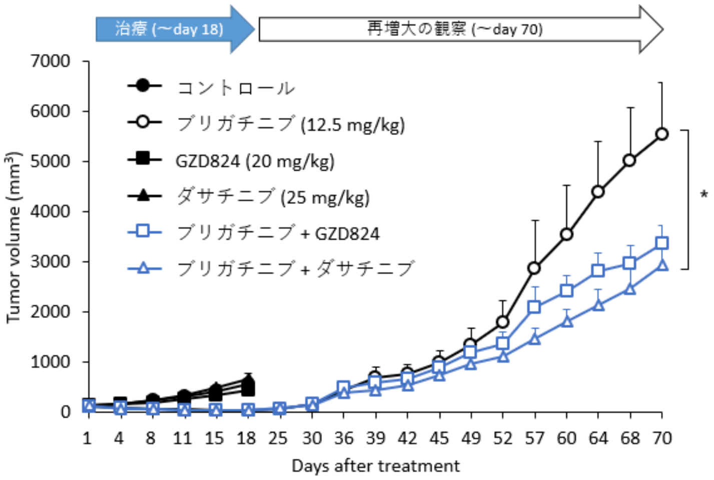

図 4　皮下腫瘍モデルにおける併用効果

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔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