

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790906
 研究課題名（和文）肺癌の ALK 阻害薬耐性化機序の解明と、耐性化癌細胞にも有効な新規治療法の開発。
 研究課題名（英文）Identifying and overcoming mechanisms of ALK tyrosine kinase inhibitor resistance in lung cancer cells bearing EML4-ALK gene fusions.
 研究代表者
 長友 泉（NAGATOMO IZUMI）
 大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）
 研究者番号：10570583

研究成果の概要（和文）：EML4-ALK 陽性肺癌細胞株（H2228）を用いて、ALK 阻害剤（Crizotinib）耐性の細胞株を樹立した。これまでに耐性化の機序として、主に ALK チロシンキナーゼ部位に生じる 2nd mutation が知られているが、今回の我々の検体では検出されなかった。次に、耐性細胞で特徴的に発現している遺伝子産物について網羅的な解析を行った。Non-coding RNA をリアルタイム定量 RT-PCR で解析するマイクロアレイの結果、4 種類の long non-coding RNA の発現が有意に変化していることが判明し、耐性化に関与していると示唆された。現在、これらの機能解析を行っているところである。

研究成果の概要（英文）：EML4-ALK positive lung cancer cells (H2228 cell line) were cultured in medium containing an ALK kinase inhibitor (Crizotinib), and crizotinib-resistant cells were established. Second mutations within the ALK kinase-coding region were not detected in those cells. Altered expression of four long non-coding RNAs were identified by real-time quantitative RT-PCR analyses in the resistant cells. Functional analyses of the alterations are in progress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌

1. 研究開始当初の背景

肺癌において、EGFR や ALK の遺伝子異常に対する分子標的治療薬は、従来の殺細胞性抗癌剤を上回る効果を発揮することが明らかになりつつあるが、いずれ無効となり癌は進展してしまう。このような獲得耐性を克服することが、基礎医学・臨床医学の両面から大きな問題となっており、解決には程遠い現状ではあるが、その糸口となるような知見は得られつつある。とりわけ EGFR に関しては、耐性の機序が解明されつつあり、大きく二つの機序が知られている。一つは、EGFR それ自体

に生じる新たな変異（その結果、薬剤と標的部位の親和性が低下し、結果として耐性化する）であり、もう一つは、EGFR 以外のシグナル伝達経路の活性化（その結果、EGFR が抑制されても、他のシグナルが機能を代替する）である。これらの機序に応じた対処法が考案され、前臨床段階を含む応用研究が行われつつあったが、一方の ALK に関しては、耐性化機序の解明が EGFR と比較して遅れており、従ってその克服法についてもデータは不十分であった。

2. 研究の目的

EML4-ALK 融合遺伝子を有する非小細胞肺癌の細胞生物学的な特性を明らかにするとともに、ALK 特異的阻害剤に対する耐性化機構を明らかにする。その上で、耐性化に関与する細胞因子の機能を修飾する事による、①耐性細胞に対する有効な治療法の開発 及び ②耐性化を抑制する手法の考案 を試みる事が、本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) EML4-ALK 陽性肺癌細胞株 (H2228) を材料として、Crizotinib 耐性細胞集団を樹立し、生化学的・細胞生物学的特性を明らかにする。裏付けのため、NIH3T3 細胞株に EML4-ALK を発現させた細胞株を樹立し、同様の解析を行う。

(2) 親株 (H2228) と Crizotinib 耐性株 (CR 1-4) から、ゲノム DNA・RNA・タンパク質を抽出し、配列や発現を比較する。配列に変化が生じている、あるいは、発現レベルが上昇又は低下している因子の中で、耐性に関与していると思われる標的候補を同定する。

(3) 標的候補の修飾による薬剤感受性の変化を解析し、真の標的を同定する。具体的には、耐性株で発現が上昇している因子については、①親株でこの因子を強制発現させ、薬剤感受性が低下するかを解析する②耐性株でこの因子を knock down し、薬剤感受性が亢進するかを解析する。また、耐性株で発現が低下している因子については、①親株でこの因子を knock down し、薬剤感受性が低下するかを解析する②耐性株でこの因子を強制発現させ、薬剤感受性が亢進するかを解析する。これら①②を満たす標的候補を、真の標的として決定する。

(4) 発現変化ではなく、活性化状態が変化している場合 (例えば、チロシンやセリン・スレオニン等のアミノ酸部位がリン酸化されることにより活性が調節される酵素において、活性化型/非活性化型の比が変化する場合) に関しては、それら標的候補に対する特異的な agonist や antagonist が存在する場合には、(3) と同様の機能解析に進む。これらが存在しない場合には、より高度・複雑な機能解析が必要となり、本研究課題の期間内に進展させる事が困難であるため、真の標的を同定するステップには進めないこととする。

尚、本研究課題の計画当初では、目的欄に記載した通り“耐性化自体を抑制する手法の考案”を目標に掲げていた。しかし、予測した以上に幅広い性質を持つ標的候補が同定され、その絞り込みに時間を要したため、本研究期間内には標的候補の同定と機能解析の途中までしか行い得なかった。計画の見通

しが甘く反省するとともに、今後の検討課題とした。

4. 研究成果

4-1: H2228 細胞株を、ALK チロシンキナーゼ阻害薬の一種である Crizotinib の存在化で3ヶ月間培養することにより、耐性化した細胞集団を得た。その後、限界希釈法により細胞をクローン化し、4つのクローンを樹立した (CR 1-4)。これらの耐性細胞について、まず基本的な細胞生物学的解析を行い、親株の H2228 と比較した。増殖や生存・アポトーシスに関する各種 assay では、有意な違いは認められず、耐性化の機序と直接の関連は無いと結論付けた。次に、各種のシグナル伝達経路の活性化について検討した。ALK 自体の活性化 (リン酸化) は、CR 細胞において、むしろ H2228 よりも低下傾向であった。下流の細胞内シグナル伝達系 (MAPK, PI3K-Akt 等) については、一定の傾向は無く、亢進・不変・減弱など様々な挙動を示した。これらより、シグナル伝達系の変化は、少なくとも我々の系においては、薬剤耐性の主因では無いと考えられた。

4-2: EGFR 阻害薬の耐性化では、EGFR 遺伝子に生じる 2nd mutation が重要な役割を担っていることが既に明らかとなっている。ALK 耐性化においても同様の報告が散見されるが、その意義については EGFR 程には確立されていない。そこで今回、親株と CR 株の一つ (CR-1) から全ゲノム DNA を抽出し、癌細胞での機能が確立しているチロシンキナーゼ遺伝子群 (ALK を含む) の配列を、次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果、遺伝子配列に点変異や欠失等の一次構造変化は認められず、4-1 で述べた生化学的知見が裏付けられた。

4-3: 親株と CR 株で、遺伝子発現の変化を比較した。スクリーニングとして RT-PCR を行い、変化があった遺伝子産物に関しては、ウエスタンブロットや ELISA、免疫染色によってタンパク質の発現を解析した。

癌の生物学的研究の分野で、近年とりわけ注目されているのは、①癌幹細胞 及び ②癌細胞と微小環境の相互作用 の二つである。これら①、②と薬剤耐性について、関連があるという報告も散見されるが、その機序は明らかでないことが多い。そこで今回我々は、①、②において重要な機能を有する事が既知である複数の因子を選択し、まずこれらについて発現解析を行った。

①; 癌幹細胞における発現亢進が知られている遺伝子産物について、RT-PCR による解析を行った。具体的には、細胞表面マーカーの CD133, CD44、転写因子の myc, Oct4, Nanog

等の特異的なプライマーを設計し、標準的な RT-PCR を行った。その結果、親株と耐性株 (CR1-4) の間で明らかな差は無く、同程度の発現が認められた。少なくとも我々の系においては、薬剤耐性と癌幹細胞とは直接の関連は無いと結論付けた。

②; 微小環境には種々の成分が含まれるが、大きく分けて、細胞成分 (線維芽細胞、リンパ球やマクロファージ等の炎症性細胞)、細胞外マトリックス (コラーゲン、フィブロネクチン等)、液性因子 (growth factors, サイトカイン、ケモカイン、抗体、補体等) からなる。In vitro の実験系では、細胞成分との相互作用は解析が非常に困難であるため、今回は細胞外マトリックス (ECM) と液性因子に標的を絞って解析した。

まず ECM に関して、通常の培養皿を使用する 2 次元培養法は、細胞極性の観点から、ECM-細胞相互作用の解析にとって最適とは言えない (本来 3 次元で存在する細胞にとっては非生理的な環境である)。そこで、3 次元培養法により、親株と耐性株に phenotype の違いが生じるか検討を試みた。材料としてはマトリジェルを使用した。増殖や生存に関しては、親株と耐性株で変化を認めなかったが、細胞塊の形態に関しては明らかな違いが認められた。具体的には、親株の細胞塊は辺縁が不整で、マトリジェル中にランダムに浸潤する傾向を示した。他方、耐性株の細胞塊は辺縁が極めて整で、マトリジェル中に浸潤する像は認められなかった。この現象だけでは、細胞-ECM 相互作用に一義的な変化が生じているのか、細胞-細胞相互作用に一義的な変化が生じた結果として細胞-ECM 相互作用が変化したのかは判別できないので、まずは細胞-細胞相互作用に関わる因子について網羅的に検討した。Tight junction や Adherence junction に存在する接着因子・裏打ちタンパクについて、細胞分画法を用いた発現解析を行ったが、(方法論的な問題もあるのか) 一定の傾向を同定するには至らず、この 3 次元での形態変化が生じる原因及び、形態変化と薬剤耐性の相互関係について、結論を得ることは出来なかった。これも今後の検討課題としたい (例えば、まず細胞膜タンパクすべてをビオチン化して、その後で発現を網羅的に解析する、等を計画している)。

次に液性因子に関しては、先行研究にて広く検討されている growth factor, サイトカイン、ケモカイン等ではなく、“ガイダンス因子”と総称される遺伝子ファミリーを主な対象とした。元来、神経組織における発生・形態形成における機能が知られ、その後、免疫系の細胞・組織における種々の機能が明らかとなりつつあるファミリーである。ファミリーに属する遺伝子を RT-PCR で広く検討した結果、親株で発現せず、耐性株の中の一つ

のクローンのみで発現 (CR1-3 で発現せず、CR4 でのみ発現) する因子を同定した。この因子に対する受容体は、親株と耐性株で等しく発現しており、CR4 のみで機能的な ligand-receptor システムが生じていると考えられた。mRNA レベルの発現に加え、タンパクレベルの発現も確認し (ELISA 及びウエスタンブロット)、今後は薬剤耐性における機能についての更なる解析を行う予定であり、リガンドの培養液中への添加、発現ベクターを使用する overexpression の実験、siRNA を使用する knock down の実験を計画している (本来、今回の研究課題期間内に行っておくべき内容であるが、予備実験に時間を要してしまった結果、まだ行えていない。重ね重ね、計画段階での不備につき反省するところである)。

4-4: 4-3 で述べたのは、すべてタンパク質をコードする遺伝子に関する解析である。これらとは別に、我々は今回、近年その多様な機能が知られつつある non-coding RNA の発現変化に注目し、上記の細胞膜タンパク質やガイダンス因子-受容体とは独立して解析する計画を立てた。尚、non-coding RNA の中では、microRNA の研究が最も進展しているが、我々は敢えて、microRNA ではなく、より多岐にわたる生理的機能を有するとされる “long non-coding RNA” を解析の対象とした。具体的には、親株と CR 株から各々 total RNA を採取し、RT 反応により cDNA を作成し、特異的なプライマーセットを使用するリアルタイム定量 PCR によって、long non-coding RNA の発現変化を解析した。

その結果、親株と CR 株で有意に発現が変化している遺伝子として、4 種類の long non-coding RNA を同定できた。うち 2 種類は CR 株で発現上昇し、2 種類が CR 株で発現低下していた。上昇していたものの一つは、(最も良く知られた long non-coding RNA の一つである) H19 であり、低下していたものの一つは (同様に良く知られた) MEG3 であった。この結果は、SYBR green を使用する $\Delta \Delta$ Ct 法により得られたものであり、スクリーニングでの標的候補という位置付けである。今後は、①Taqman 法を使用した、より確実に定量性の高いリアルタイム qRT-PCR によって、これらの発現変化を再確認する。②再確認の結果、真に発現が変化している場合、これらの標的候補が真の標的であるかを解明するために、in vitro での機能解析を行う (既に行いつつある)。上述の 3 次元培養や、ガイダンス因子の機能解析の結果とともに、long non-coding RNA の薬剤耐性化における役割についても解明し、将来は論文発表する予定である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長友 泉 (NAGATOMO IZUMI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教

(常勤)

研究者番号：10570583

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし