

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790798

研究課題名(和文)新規ALK阻害薬に対する耐性機序の解明

研究課題名(英文)Resistance mechanisms of novel ALK inhibitors

研究代表者

佐々木 高明 (Sasaki, Takaaki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70516997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：新規ALK阻害薬アレクチニブによる肺癌細胞株の耐性機序を解明した。ALK陽性H3122細胞株にアレクチニブを長期暴露し耐性株を作成し、EGFRリン酸化の亢進、METシグナルによるALK下流シグナルの代償を見出した。またこれらを克服する方法として、EGFR阻害薬、MET阻害薬との併用療法をマウス腫瘍皮下移植モデルで有効性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms of resistance with novel ALK tyrosine kinase, alectinib were investigated. H3122, EML4-ALK positive lung cancer cell line were treated with alectinib and showed resistance. These cell lines showed EGFR phosphorylation and MET signaling activation. Combination therapy with EGFR tyrosine kinase inhibitor or MET inhibitor were effective for the treatment of H3122 alectinib resistance mouse xenograft model.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：ALK陽性肺癌 アレクチニブ 薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

近年、肺癌の治療において、癌細胞が生存するために必要な遺伝子異常と、この異常遺伝子から作られるタンパク質を治療標的とした分子標的治療が進歩してきている。例えば、上皮成長因子受容体(EGFR)の異常活性化を引き起こす遺伝子異常を持つ肺癌患者に対して、EGFR 阻害薬は奏効率 70-80%と著効することが知られている。肺癌において EGFR に次いで第 2 の癌遺伝子依存性として anaplastic lymphoma kinase(ALK)融合遺伝子が 2007 年に発見された。日本人の肺癌患者のうち 3-9%に検出され、年間およそ 2000 人の新規肺癌発症者に相当する。ALK はチロシンリン酸化受容体で ALK に対する特異的リン酸化阻害薬が ALK 融合遺伝子を有する肺癌患者に有効であることが示されたのは ALK 融合遺伝子の発見からわずか 3 年後という短期間であった。平成 23 年 8 月に米国において ALK 阻害薬であるクリゾチニブ(Xalkori, pfizer 社)は FDA で承認され、本邦でも 2012 年 5 月販売承認された。これは EGFR 阻害薬の例と同様に ALK 融合遺伝子陽性の肺癌患者への奏効率は 80%を上回るものと期待されている。しかし、クリゾチニブに対して効果を示した患者も 6-12 ヶ月の投与後にほぼ全症例が耐性を獲得することが知られている。

申請者はこれまで、ALK 融合遺伝子陽性腫瘍における ALK 阻害薬に対する耐性機序の研究を行ってきた。まず ALK 活性中心周辺に 2 次性に耐性変異を引き起こすことを発見した(Sasaki et al. Cancer Research, 2010, Sasaki et al. Cancer Research, 2011)。申請者らが発見した ALK 活性型変異である F1174L や L1152R 変異以外にも ALK 阻害薬結合部位の変異である L1196M も報告されている。これらの耐性変異に対しては ALK に対してより親和性が強

く阻害活性が強い第 2 世代の ALK 阻害薬を使用することで耐性を克服することができる。さらに申請者らは ALK 受容体の細胞内シグナルをバイパスする機序(EGFR リガンドの産生による EGFR シグナルの活性化)を同定し報告してきた。現在米国において ALK 阻害薬と EGFR 阻害薬の併用療法は ALK 耐性患者に対して臨床第 I 相試験で検討中である。第 2 世代の ALK 阻害薬であるアレクチニブはこれまで報告されている 2 次性耐性変異(L1196M, C1156Y, F1174L)に対しても有効であると報告されており、クリゾチニブに対して耐性獲得後も有効性が期待できる薬剤として、日本国内では ALK 陽性患者に対して薬事申請中である。申請者は、本研究においてに対する耐性獲得機序を解明することで耐性患者における新たな治療を提示することを目的とした。

## 2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は今後臨床で使用することが期待されるアレクチニブに対する獲得耐性機序を解明する。2 年の研究期間内に以下の事項を明らかにしていく。

これまでクリゾチニブで発見された 2 次性変異がアレクチニブでも検出されるか、またその検出頻度、変異部位の比較検討を行い、今後の ALK 阻害薬開発につなげる

ALK 融合遺伝子陽性の肺癌細胞株である H3122 を用い、アレクチニブ濃度を漸増し耐性株 H3122CH を作成し、細胞生存にかかわる細胞内シグナルを検討する。これによって ALK 受容体をバイパスする経路による耐性獲得機序を解明する。

ALK 融合遺伝子陽性の肺癌患者から細胞株を樹立する。また、同患者がアレクチニブ治療を受け、耐性を獲得した時点で

癌細胞を回収し細胞株化する。耐性獲得前後での ALK 遺伝子変異や細胞内シグナルの変化を探索する。

### 3. 研究の方法

1. アレクチニブによる2次性変異の出現頻度、遺伝子変異の部位を検討する
  2. アレクチニブ耐性H3122細胞における細胞内シグナルの変化の検討
  3. ALK 融合遺伝子陽性患者から細胞株を樹立し耐性機序を明らかにする
- 申請者はこれまで、ALK 阻害薬、クリゾチニブに対する耐性機序解明の研究を行ってきた。より ALK 阻害活性の強いアレクチニブにおいても同様の耐性機序が引き起こされるか研究する

### 4. 研究成果

ALK 阻害薬に対する初期耐性として、腫瘍周囲からの EGF 刺激による EGFR がリン酸化され、ALK 下流のシグナル (AKT、ERK1/2) を介して生存シグナルを代償することが本研究で示された。また肺がん手術症例の検体における免疫染色の結果、ALK 陽性肺癌患者 9 例はすべて panEGFR が発現していることが示された。(ALK 陰性肺腺癌は 231 例、このうち panEGFR 陽性は 150 例,65%) また、獲得耐性機序については ALK 陽性肺癌細胞株 H3122 を長期間アレクチニブに暴露し耐性化させた細胞株 H3122AFR を樹立し検討を行った。H3122AFR において SNP array による全遺伝子の網羅的 copy number 解析を行い、EML4-ALK の focal amplification のパターンを解析した。またレセプター型チロシンキナーゼのスクリーニングでは、EGF-EGFR シグナル系の関与が示唆されたがこのほか、MET のタンパク発現亢進により、ALK 下流シグナルの活性化がみられた。

これらの耐性克服の手段として EGFR 阻害薬(Erlotinib)とアレクチニブの併用、 MET 阻害薬(crizotinib)との併用をマウス皮下腫瘍移植モデルで有効性が確認された。

図 1

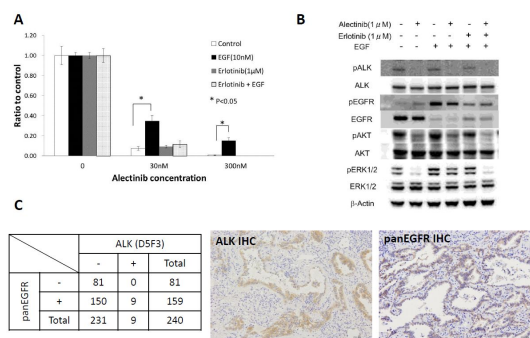


図 2

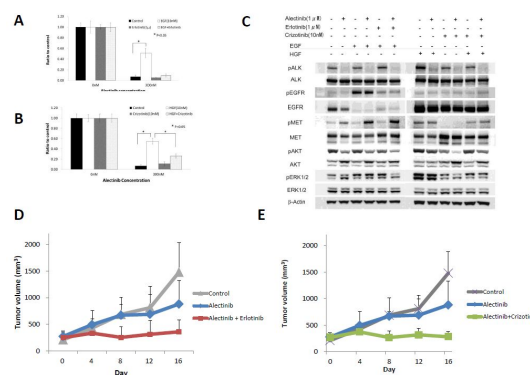
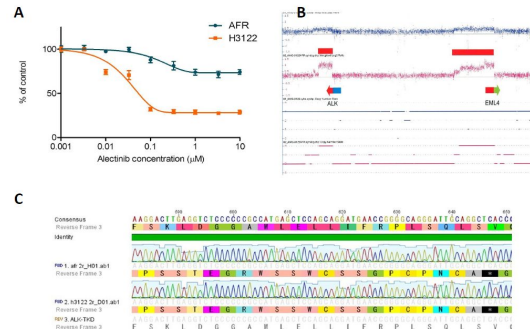


図 3



上図

H3122AFR ではこれまで耐性変異を起こす2次性変異は検出されなかった。

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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Intrinsic and acquired resistance mechanisms of alectinib in ALK rearranged cells, Yukiko Hibino<sup>1</sup>, Sasaki Takaaki<sup>1</sup>, Yoshinori Minami<sup>1</sup>, Pasi A. Janne<sup>2</sup>, Yoshinobu Ohsaki<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Asahikawa Medical University, Asahikawa, Japan; <sup>2</sup>Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA  
AACR annual meeting 2014

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

( )

佐々木 高明 (SASAKI Takaaki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70516997

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：