

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15032

研究課題名(和文) ALK融合遺伝子陽性非小細胞肺癌におけるALK-TKI耐性機序に関する研究

研究課題名(英文) Research on mechanisms of acquired resistance to ALK-TKI in ALK fusion gene positive non-small cell lung cancer

研究代表者

田中 薫 (TANAKA, Kaoru)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：80548628

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)：本研究には16例のALK-TKIに耐性を獲得したEML4-ALK融合遺伝子陽性肺癌患者を登録。全例で耐性後に血液検体採取し、12例では耐性後に再生検を施行し組織採取ができた。10例で治療前後両方の腫瘍組織検体を集めており、収集した検体から抽出したDNAを用いて行った体細胞遺伝子変異解析から5つの既知のALK遺伝子の2次変異を検出した。2次耐性変異検出例の患者背景としては、男性、非喫煙又は軽喫煙者が多く、全例Alectinibの投与歴を有していた。2次耐性変異検出例では全例で後治療が施行されており、4例で第3世代ALK-TKIであるLorlatinibが投与され、全例で腫瘍縮小効果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではALK陽性肺癌に対するTKI耐性獲得機序の研究体制を構築し、G1269A、L1196M、G1202R、V1180L、F1174Lの5つの既知の二次耐性遺伝子変異を確認。少数例ではあるが耐性機序と患者背景や治療歴の関連を検証し、2次耐性変異検出例への第3世代ALK-TKIの治療効果確認することが出来た。

ALK陽性肺癌は症例数が少なく、ALK-TKIのPFSが長く耐性化するまでの期間が長い。また、高い治療効果のために標的病変が消失しており耐性後の組織検体採取が困難である。そのような背景を鑑みると、本研究で得られた結果は将来の肺癌治療の基礎データとして国民に還元し得る重要なものである。

研究成果の概要(英文)：Between November 2016 and May 2019, 16 EML4-ALK fusion gene-positive patients were enrolled following disease progression on first- or second-generation ALK inhibitors. Blood samples were collected in all patients, and re-biopsy was performed in 12 patients. Paired samples of pre- and post-ALK-TKI treatment were collected in 10 patients and next-generation sequencing was performed. Among the 12 patients undergoing ALK-TKI-resistant biopsies, 6 (50.0%) had secondary mutations. The most common ALK resistance mutation was G1202R (2 cases), and the remaining ALK resistance mutations included: G1269A, L1196M, V1180L, and F1174L. The characteristics of patients with secondary mutations were mostly males (83.3%), non-smokers (50%), or light smokers (33.3%), and all patients pretreated with alectinib. Of the 4 patients (66.7%) with secondary mutations were treated with lorlatinib, a third-generation ALK-TKI, and all patients had a response to lorlatinib.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：分子標的治療 ALK阻害剤 薬剤耐性 非小細胞肺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国における肺癌の死亡率は、1950年以降、男女とも一貫して増加しており、1993年以降は男性の肺癌死亡数はがん死亡数の第1位、女性は第2位となっている。肺癌は非小細胞肺癌と小細胞肺癌の二つに大別され、前者が全肺癌のうち、80-85%を占める。非小細胞肺癌はその組織型により扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌等に分類される。非小細胞肺癌の3分の2は発見時すでに切除不能例であり薬物療法が治療の中心となる。

近年、進行非小細胞肺癌の治療選択にあたっては上皮成長様因子受容体(Epidermal growth factor receptor; EGFR) 変異や微小管会合タンパク(echinoderm microtubule associated protein-like 4; EML4) と未分化リンパ腫キナーゼ(anaplastic lymphoma kinase; ALK) 融合遺伝子などの遺伝子異常を検索することが必須となっている。これらは driver oncogene と称される強力な癌化遺伝子と考えられており、そのチロシンキナーゼ阻害剤(tyrosine kinase inhibitor; TKI)を投与する事で良好な治療成績が示されている。ALK 融合遺伝子を伴う進行・再発非扁平上皮非小細胞肺癌においては ALK-TKI であるクリゾチニブの無病増悪生存期間の優越性が証明され、ALK-TKI による治療が第一選択となった[1]。

EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌は肺腺癌の約 5%に存在するが、我が国では ALK 阻害剤であるクリゾチニブが 2012 年に、その後 2014 年にアレクチニブ、2016 年にセリチニブが ALK 融合遺伝子陽性肺癌治療薬として承認されており広く用いられている。ALK-TKI は、ALK 融合遺伝子陽性 NSCLC で高い奏効率を認めるが、奏効例においてもほとんどの症例がやがて耐性化し再燃することが知られている。これまでの研究から、クリゾチニブに対する耐性獲得機序として ALK 依存性の機序と ALK 以外のシグナル経路の活性化による機序が、再生検によって得られた組織検体の検討によって明らかにされている。前者は ALK 遺伝子の二次変異と ALK 遺伝子増幅であり、後者は EGFR シグナル活性化、KIT 遺伝子増幅、KRAS 遺伝子変異等が報告されているが、耐性機序の不明なものが 20%存在するとされている。また EGFR-TKI に対する EGFR 遺伝子の 2 次変異はそのほとんどが T790M であるのに対して ALK 遺伝子の 2 次変異は 10 種類以上の報告がある[2, 3]。次世代 ALK-TKI に対する耐性機序に関する報告は未だ限られているがクリゾチニブ耐性二次変異のうち I1174N/S/T、G1202R、V1180L はアレクチニブにも耐性を来すことが臨床検体から報告されている。またセリチニブ耐性患者の組織からは F1174C/V、G1202R が検出されており、これらの二次変異はクリゾチニブのみならず次世代 ALK-TKI の耐性にも関与することが示唆される。一方でクリゾチニブ耐性二次変異である L1196M、G1269A、I1171T、S1206Y に対して次世代 ALK-TKI は有効であることが報告されており[4]、耐性機序によって細かな薬剤選択が必要となる可能性がある。また薬剤トランスポーターである P-glycoprotein の発現増加がセリチニブ耐性に関与することも報告されており[5]、さまざまな耐性メカニズムが存在することが示唆される。これらの耐性機序を解明し、それに対して治療戦略を開発することは、ALK 融合遺伝子陽性非小細胞肺癌患者の予後延長に寄与する事が期待できる。

さらに、近年では腫瘍病変に対する再生検による患者への侵襲を軽減するために血液を主体とした liquid biopsy の実用化が求められている。Tumor-educated blood platelets(TEPs)はそのうちの一つであり、TEP はそのプロファイル解析をすることで原発巣が有する遺伝子変異の検出が可能であることが報告されている[6]。

本研究では ALK-TKI 治療後の腫瘍組織および血液検体を用いて薬剤耐性機序を分子生物学的に解明し、耐性克服のための治療標的の同定を目的とする。これらの薬剤耐性機序及び臨床的意義を解明する事は急務であり尚且つ個別化医療の実現に大きな寄与となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、ALK 融合遺伝子陽性進行再発非扁平上皮非小細胞肺癌患者を対象に ALK 阻害剤での治療後の腫瘍組織および血液検体を用いて薬剤耐性機序を分子生物学的に解明し、薬剤耐性克服のための新たな治療標的を同定することを目的とする。また、新たな耐性機序を示唆する分子学的変化が検出されれば、in vitro、in vivo において生物学的な特性を確認し、その克服のための治療戦略を開発する。

3. 研究の方法

ALK-TKI に耐性を獲得した EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌患者の治療前後の腫瘍組織検体試料を用いて、遺伝子発現解析、体細胞遺伝子変異解析、タンパク質発現解析を行うとともに、患者から得た血液検体由来の血小板から抽出した RNA や血漿から抽出した cell-free DNA を用いて上記と同様に遺伝子発現解析および体細胞遺伝子変異解析を行う。これらの測定結果と臨床情報をあわせて、各遺伝子変異などの耐性後変化と ALK-TKI 治療の効果との関係性を評価し、臨床的意義を明らかにする。

4. 研究成果

令和元年度末までに 16 例の ALK-TKI に耐性を獲得した EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌患者から本研究への参加同意を取得し、治療前後の腫瘍組織検体及び血液検体を可能な限り収集した。16 例の患者背景については表 1 に示す通りである。

		症例数 (%)
性別	男性	9 (56.3%)
	女性	7 (43.7%)
年齢	中央値	61.2 (35-84)
病期	III A	1 (6.3%)
	IV	11 (68.7%)
	術後再発	4 (25.0%)
喫煙歴	無し	7 (43.8%)
	軽喫煙者 (BI < 400)	4 (25.0%)
	重喫煙者 (BI ≥ 400)	5 (31.2%)
脳転移	有り	8 (50.0%)
	無し	8 (50.0%)
治療レジメン数	1	5 (31.3%)
	2	5 (31.3%)
	3 ≥	6 (37.5%)

表1：患者背景

EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌患者では、治療効果により治療後の再生検を行うことが困難な症例が多くみられるが、本試験の登録患者では 12 例 (75.0%) において治療後の再生検が施行され、収集した検体から抽出した DNA を用いて体細胞遺伝子変異解析を行うことができた。また、10 例 (62.5%) で治療前後両方の腫瘍組織検体を集めることが出来た。

収集した 12 例の再生検検体から抽出した DNA を用いて行った体細胞遺伝子変異解析から、6 例 (50%) において ALK 遺伝子の 2 次変異を検出した。検出された 2 次耐性変異は G1202R が 2 例で、他に G1269A、L1196M、V1180L、F1174L の 5 つの既知の 2 次耐性変異が検出された。2 次耐性変異検出例の患者背景としては、男性、非喫煙又は軽喫煙者が多く、全例アレクチニブの投与歴を有していた。2 次耐性変異検出例では全例で後治療が施行されており、4 例で第 3 世代 ALK-TKI であるロルラチニブが投与され、4 例全てで腫瘍縮小効果が確認された (表 2)。

	症例1	症例2	症例3	症例4	症例5	症例6
2次変異	G1269A	G1202R	L1196M	G1202R	V1180L	F1174L
年齢	69	48	47	70	54	68
性別	男	男	女	男	男	男
喫煙歴	280 (40×7)	750 (30×25)	無し	無し	無し	400 (20×20)
脳転移	有り	無し	有り	無し	無し	有り
病期	IV	IV	IV	IV	IV	再発
前治療	クリゾチニブ アレクチニブ	CBDCA+PEM クリゾチニブ アレクチニブ セリチニブ	CCDP+PEM クリゾチニブ アレクチニブ	クリゾチニブ アレクチニブ	アレクチニブ	CBDCA+PEM DTX+ ニンテタニブ セリチニブ アレクチニブ
後治療	セリチニブ (評価無)	S-1 ロルラチニブ (部分奏効)	ロルラチニブ (部分奏効)	アレクチニブ	※	ロルラチニブ (部分奏効)

※セリチニブ (部分奏効)、プリガチニブ (部分奏効)、ロルラチニブ (部分奏効)、CBDCA+PEM (増悪)、アテゾリズマブ (安定)、DTX+RAM

表2：2次耐性変異検出例の患者背景

本研究では ALK 陽性肺癌に対する TKI 耐性獲得機序の研究体制を構築し、実臨床で治療経過中の患者検体から 5 つの既知の二次耐性遺伝子変異を確認することが出来た。少数例ではあるが耐性機序と患者背景や治療歴の関連を検証し、2 次耐性変異検出例への第 3 世代 ALK-TKI の治療効果確認することが出来た。これらの成果は、ALK 陽性肺癌において治療中に 2 次耐性変異の有無や種類をもとに、治療効果予測を行いながら治療戦略を考え個別化治療を進めることの可能性を示唆している。

ALK 陽性肺癌は症例数が少なく、ALK-TKI の PFS が長く耐性化するまでの期間が長い。また、高い治療効果のために標的病変が消失しており、中枢神経系転移再発例も多く、耐性後の組織検体採取が困難である。そのような背景を鑑みると、本研究で得られた結果は将来の肺癌治療の基礎データとして国民に還元し得る重要なものである。

【引用文献】

1. Solomon BJ, Mok T, Kim DW et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-

- positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371: 2167-2177.
2. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 1472-1482.
3. Katayama R, Shaw AT, Khan TM et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci Transl Med* 2012; 4: 120ra117.
4. Toyokawa G, Seto T. Updated Evidence on the Mechanisms of Resistance to ALK Inhibitors and Strategies to Overcome Such Resistance: Clinical and Preclinical Data. *Oncol Res Treat* 2015; 38: 291-298.
5. Ryohei Katayama TS, Noriko Yanagitani, Hironori Ninomiya, Atsushi Horiike, Luc Friboulet, Justin F. Gainor, Noriko Motoi, Akito Dobashi, Seiji Sakata, Yuichi Tambo, Satoru Kitazono, Shigeo Sato, Sumie Koike, A. John Iafrate, Mari Mino-Kenudson, Yuichi Ishikawa, Alice T. Shaw, Jeffrey A. Engelman, Kengo Takeuchi, Makoto Nishio, Naoya Fujita. P-glycoprotein Mediates Ceritinib Resistance in Anaplastic Lymphoma Kinase-rearranged Non-small Cell Lung Cancer. *EBioMedicine* 2015, January; 3: 54-66.
6. Best MG, Sol N, Kooi I et al. RNA-Seq of Tumor-Educated

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中薫
2. 発表標題 ALK融合遺伝子陽性非小細胞肺癌におけるALK-TKI耐性機序に関する検討
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中薫
2. 発表標題 Research on mechanisms of acquired resistance to ALK-TKI in ALK fusion gene positive non-small cell lung cancer
3. 学会等名 第16回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中薫
2. 発表標題 ALK融合遺伝子陽性非小細胞肺癌におけるALK-TKI耐性機序に関する検討
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----