

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16738

研究課題名（和文）ALK肺癌の髄膜癌腫症における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・特任助手

研究者番号：80824870

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：髄膜癌腫症（LMC）における第2世代ALK-TKIであるアレク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モデルにおいてアレクチニブ耐性を誘導し、耐性株であるAR細胞を樹立した。AR細胞は、リガンドであるAREGの発現上昇によりEGFRが活性化して耐性を獲得しており、AR細胞を用いたマウスLMCモデルでは、アレクチニブとEGFR-TKIを併用することで腫瘍の進展抑制が見られた。さらに、アレクチニブ耐性LMCを有するALK肺癌患者の髄液では、EGFR-TKI耐性LMCを有するEGFR変異非小細胞肺癌患者やLMCを伴わない患者と比較して高いレベルでAREGが検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

髄膜癌腫症や脳転移などの中枢神経系（CNS）転移は肺癌の20～30%に発症し、患者のQOLを著しく低下させる危険な病態であるが、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きている。本研究では、ヒトALK肺癌細胞株をマウスの髄腔に移植したモデルにおいてアレクチニブ耐性を誘導し、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 alectinib, a second-generation ALK-TKI, in Leptomeningeal carcinomatosis (LMC) and seek a novel therapeutic strategy. First, we induced alectinib resistance in an LMC mouse model using the ALK-rearranged NSCLC cell line A925L by continuous oral alectinib treatment, established AR cells from this model. AR cells acquired resistance through EGFR activation due to overexpression of its ligand, amphiregulin (AREG). In the LMC model with AR cells, combined treatment with alectinib and an EGFR-TKI successfully controlled LMC progression. Moreover, notably high AREG levels were detected in the cerebrospinal fluid from ALK-rearranged NSCLC patients with alectinib-resistant LMC compared with those in EGFR-mutated NSCLC patients with EGFR-TKI-resistant LMC or patients without LMC. These findings indicate the potential of novel therapies dual-targeting ALK and EGFR 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肺癌 中枢神経系転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳転移や髄膜癌腫症 (LMC) などの中枢神経系 (CNS) 転移は分子標的薬耐性が生じやすく、耐性化した CNS 転移の増悪は生命予後に直結する。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は、ALK 融合遺伝子陽性肺癌 (以下、ALK 肺癌) に対し、第 1 世代 ALK-TKI であるクリゾチニブよりも奏効率が高く脳転移や LMC などの CNS 病変に対する有効性も高いが、長期の治療により耐性となり再発症例が徐々に問題になりつつあり、その耐性機構の解明および耐性を克服する治療戦略の構築が急務の課題であった。

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 肺癌の LMC に焦点を絞り、LMC におけるアレク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) アレクチニブ耐性株の作成

ルシフェラーゼ遺伝子を導入した ALK 肺癌細胞株 (A925L) をマウスの髄腔内に移植し、アレクチニブを約 100 日間連日経口投与して耐性を誘導し、髄液からアレクチニブ耐性癌細胞 (AR) を樹立した。

(2) 耐性因子の同定

Western Blot 法により AR 細胞において EGFR のリン酸化が亢進していることを発見した。*in vitro* の検討において、siRNA による EGFR 発現抑制やアレクチニブと EGFR-TKI の併用により感受性が回復したことから EGFR が耐性因子であることを明らかにした。さらに、EGFR のリン酸化が亢進した原因がリガンドであるアンフィレギュリン (AREG) の発現上昇にあり、その発現上昇が AREG の発現を制御している microRNA である miR-449a の発現減少によることを明らかにした。

(3) LMC マウスモデルにおける耐性克服の検討

AR 細胞を髄腔内に移植した LMC マウスモデルにおいて、アレクチニブと EGFR-TKI の併用効果を検討した。

(4) 臨床検体における髄液中耐性因子発現の検討

臨床での LMC 患者における ALK-TKI 耐性と AREG の発現量の関連を調べるために、LMC で ALK-TKI または EGFR-TKI に耐性化した患者および肺癌、またはその他の患者から採取された全 73 検体の髄液におけるリガンドの濃度を ELISA 法により測定した。

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 ALK 肺癌株 (A925L) を移植し、アレクチニブ 25 mg/kg を約 100 日間連日経口投与し、再発した腫瘍から耐性株 (alelectinib resistant: AR) を樹立した (図 1)。AR 細胞において、アレク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が、*in vitro* における解析で、親株と比較して AR 細胞では EGFR のリン酸化が亢進していることを見出した。EGFR のリン酸化亢進がアレクチニブ耐性の原因であることを確認するために、siRNA による EGFR 発現抑制や EGFR-TKI (ゲフィチニブ、エルロチニブ、オシメルチニブなど) の併用により、AR 細胞のアレクチニブ感受性が回復するか否かを検討した結果、アレクチニブに EGFR-TKI を併用することにより感受性が回復したことから、EGFR のリン酸化亢進が耐性であることが示唆された。

次に、AR 細胞において EGFR のリン酸化が亢進している原因を同定するために、EGFR 遺伝子の解析および EGFR リガンドの発現量の測定を行なった。その結果、AR 細胞において EGFR 遺伝子の変異や増幅は検出されなかったが、親株と比較して AR 細胞では EGFR リガンドであ

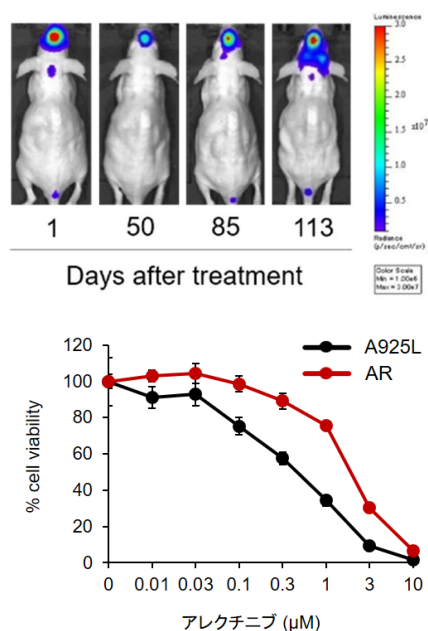


図 1 耐性株 (AR 細胞) の樹立

る **AREG** の発現量が有意に高いことが **ELISA** 法による測定で明らかとなった。**AREG** が **AR** 細胞におけるアレクチニブ耐性に関与しているかを調べるために **siRNA** を用いた実験を行なった結果、**AR** 細胞において **EGFR** または **AREG** をノックダウンすることでアレクチニブへの感受性が回復したことから、**AREG** の発現上昇がアレクチニブ耐性に深く関与していることが示唆された (図 2)。さらに、**AR** 細胞

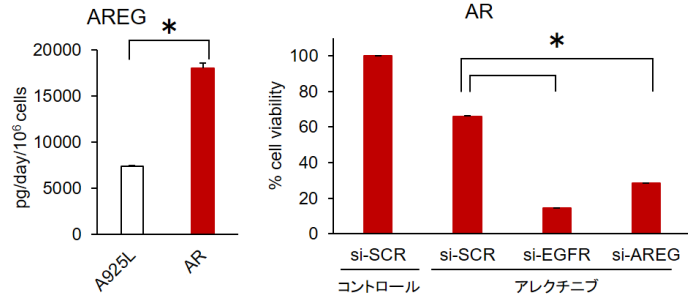


図 2 **AREG** 発現量およびノックダウンによる感受性回復

では **microRNA-449a** の発現が低下した結果、**AREG** の発現が上昇していることが明らかとなった。また、**AR** 細胞においてアレクチニブに第 3 世代であるオシメルチニブなどの **EGFR-TKI** を併用することで感受性が回復することが *in vitro* およびマウス **LMC** モデルを用いた *in vivo* において示された (図 3)。さらに、患者から採取された髄液中のアンフィレグリン濃度を測定した結果、アレクチニブ耐性となった **ALK** 融合遺伝子陽性非小細胞肺癌の **LMC** 患者の髄液では、**EGFR-TKI** 耐性となった **EGFR** 変異非小細胞肺癌の **LMC** 患者の髄液または **LMC** のない患者の髄液と比較して高いレベルで **AREG** が検出され、実臨床での **LMC** におけるアレクチニブ耐性に **AREG** が関与していることが強く示唆された。

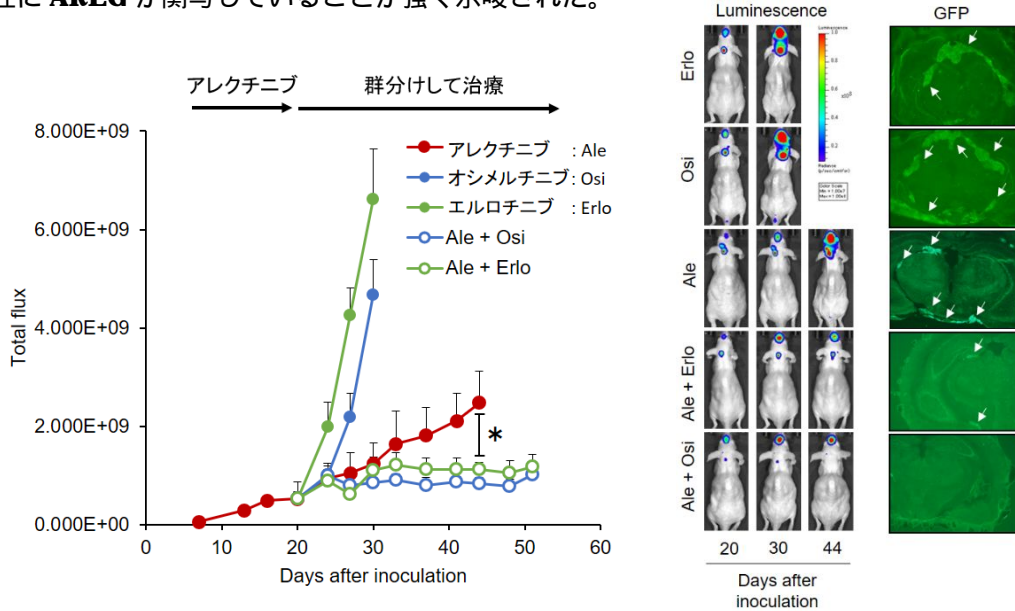


図 3 *in vivo* における耐性克服

本研究では、マウス **LMC** モデルからアレクチニブ耐性株を樹立し、その耐性機序の解明と克服するための治療法の確立に成功した (図 4)。さらに、アレクチニブ耐性 **LMC** 患者の髄液中で **AREG** が高いレベルで検出されたことから、臨床においても同様の機序でアレクチニブ耐性を引き起こすことが示唆された。以上のことから、アレクチニブ耐性となった **ALK** 融合遺伝子陽性非小細胞肺癌の **LMC** 患者において **ALK** と **EGFR** を標的とした治療戦略が有用であることが示唆された。

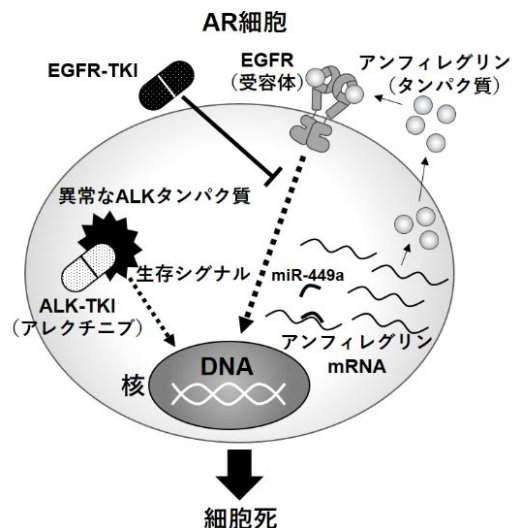


図 4 アレクチニブ耐性克服の機序

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sachiko Arai	4. 巻 15
2. 論文標題 Osimertinib Overcomes Alectinib Resistance Caused by Amphiregulin in a Leptomeningeal Carcinomatosis Model of ALK-Rearranged Lung Cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of thoracic oncology	6. 最初と最後の頁 752-765
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtho.2020.01.001	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 新井 祥子
2. 発表標題 EML4-ALK肺癌の髄膜癌腫症モデルにおけるamphiregulinに起因するアレクチニブ耐性の克服
3. 学会等名 日本がん転移学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井 祥子
2. 発表標題 Osimertinib Overcomes Alectinib Resistance Caused by Amphiregulin in a Leptomeningeal Carcinomatosis Model of EML4-ALK Lung Cancer
3. 学会等名 World Conference on Lung Cancer（国際学会）
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------