

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08132

研究課題名(和文) Coiled-coil領域の重合阻害を誘導する薬剤による融合遺伝子肺癌の治療開発

研究課題名(英文) Development of treatment for Lung Cancer with Fusion Proteins by inhibitors of polymerization in the coiled-coil domain

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の原因となる遺伝子転座の一つであるEML4-ALKの分子機構について研究した。ALK分子は自己リン酸化されることでがん細胞の増殖に寄与するが、ALK活性阻害薬を長期に投与するとALK遺伝子に変異をきたし耐性を生じることが知られている。我々の研究では、ALKと融合しているEML4タンパクに注目しその機能を解析した。

EML4分子の多量体を分離し単量体化することでがん細胞の増殖を抑えらるので、EML4のcoiled-coil領域の類似タンパク(CCペプチド)を作成し細胞に投与した。このCCペプチド投与群の細胞では、非投与群に比較し70-80%程度の細胞増殖抑制効果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の肺癌ドライバー遺伝子陽性に対する治療は、低分子化合物による治療あるいは、高分子である抗体薬の治療が主体である。本研究では、ペプチド化合物(中分子)を用いることで従来の薬剤と異なる医薬品分類で安価に合成できるものである。

がん細胞内へのペプチドの取り込みなど課題はあるが、新しい視点でのがん治療の基礎となる研究である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the molecular mechanism of EML4-ALK, one of the gene translocations responsible for lung cancer, which contributes to cancer cell growth through autophosphorylation. In our study, we focused on the EML4 protein, which is fused to ALK, and analyzed its function.

Since the multimeric EML4 molecule can be isolated and monomerized to suppress the growth of cancer cells, we prepared an analogous protein of the coiled-coil region of EML4 (CC peptide) and administered it to the cells. The cells in the CC peptide group showed 70-80% inhibition of cell proliferation compared to the non-treated group.

研究分野：癌の分子標的治療

キーワード：多量体阻害 肺がん 分子標的薬 ペプチド療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

BCR-ABLをはじめとする血液腫瘍では、融合遺伝子によるドライバー癌遺伝子が数多く発見されているが、2007年以前の固形癌での報告は限られていた。

肺癌で EML4-ALK 融合遺伝子が発見されて以来、ROS1 融合遺伝子、RET 融合遺伝子、TRKA 融合遺伝子など、ドライバー癌遺伝子の異常として多数の融合遺伝子が報告されており、肺癌の融合遺伝子は肺腺癌の 15%を占めている。これらの融合遺伝子の遺伝子異常は、チロシンキナーゼ部位を持ち、その恒常的な活性化により発がんに寄与しており、チロシンキナーゼ阻害剤に大きく反応することが知られている。しかし、がん治療におけるチロシンキナーゼ阻害剤の最大の弱点は耐性であり、治療初期に有効性を示した患者でも、10~20ヶ月で薬剤に対する耐性が生じ、再発・再燃することが知られている。この耐性を克服するために、耐性変異を克服できる新規のチロシンキナーゼ阻害剤の使用や抗がん剤との併用療法が検討されているが、その臨床効果は限定的であり、根治治療には至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、融合遺伝子の構造を再考し、チロシンキナーゼ活性には二量体から多量体の形成が必須であることに着目し、EML4-ALK が EML4 のコイルドコイル (CC) 領域で三量体を形成し、発がんを促進することを確認した。本研究では、EML4-ALK が多量体を解離させることで発がんシグナルを停止させ、腫瘍の成長を抑制できるかどうかを検討した。

## 3. 研究の方法

CC 相同性ペプチドによる単量体化の検討

CC 相同性タンパクを強制発現させた EML4-ALK では、EML4 の重合阻害による単量体化で細胞増殖能低下することが予備実験で示された。これをもとに CC 相同性ペプチドの阻害薬としての臨床応用可能性について検討する。この CC 相同性ペプチドは、人工ペプチド合成を行い、細胞株添加による細胞増殖能の変化、さらにマウスを用いた腫瘍皮下移植モデルで同タンパクの腫瘍内移行と腫瘍増殖抑制効果を確認した。

## 4. 研究成果

がん融合タンパク質の重合阻害剤は、従来の分子標的薬のターゲットとは異なる新しい阻害剤となる。低分子化合物や中分子ペプチドを設計することができれば、既存のチロシンキナーゼ阻害剤に加えることで抗腫瘍効果を高めた治療法として、新たな治療戦略を提供できる可能性が示された。私たちの研究では、この多量体の解離（重合阻害）が EML4-ALK のリン酸化活性を低下させ、細胞増殖を抑制することを明らかにしています。この方法は、CC 領域を持つ他の融合パートナー (TRIM33、KIAA1217、CCDC6、KIF5B など) も対象とすることができ、ALK 融合遺伝子だけでなく、ROS1、RET、NTRK 融合遺伝子の肺がんにも適用することができる。

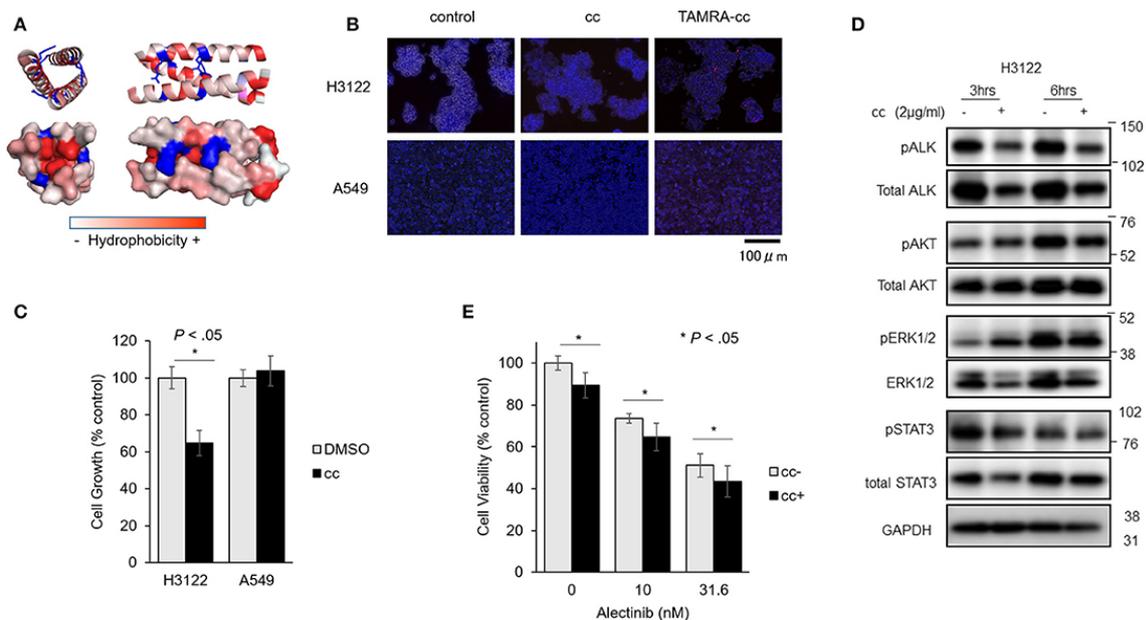


図 A EML4 のコイルドコイル領域に相同性のあるペプチド合成 3 量体を形成することが示されている。

図 B EML4-ALK 融合遺伝子を有する細胞株 H3122 と有さない細胞株 A549 に対し、CC ペプチドを添加。いずれも細胞内に取り込まれていることを確認した。

図 C H3122 細胞において CC ペプチド添加 (3 時間、6 時間後) の ALK リン酸化と下流シグナルの変化。ALK リン酸化の阻害がみられる。

図 D H3122 細胞において CC ペプチド添加したときに細胞増殖が抑制されていることが示された。

図 E H3122 細胞において、ALK チロシンキナーゼ阻害薬との併用で相加効果であり併用療法の可能性が示唆された。

## 肺癌における融合遺伝子例

チロシンキナーゼ	CC 領域を持つ融合パートナー
ALK, ROS1, RET, NTRK1, NTRK3	EML4, KIF5B, TRIM33, CCDC6, NCOA4, GOLGAA5, ERC1, KTN1, HOOK3, PCM1, TRIM24, TRIM27, AKAP13, FKBP15, SPECC1L, ACBD5, MYH13, CUX1, KIAA1468, FRMD4A, AFAP1L2, PPFIBP2, KIAA1217

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Noriko Hirai, Takaaki Sasaki, Shunsuke Okumura, Yoshinori Minami, Shinichi Chiba, Yoshinobu Ohsaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Monomerization of ALK Fusion Proteins as a Therapeutic Strategy in ALK-Rearranged Non-small Cell Lung Cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Oncol	6. 最初と最後の頁 419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2020.00419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Noriko Hirai, Takaaki Sasaki, Yoshinobu Ohsaki
2. 発表標題 Monomerization of ALK fusion proteins as a therapeutic strategy in ALK rearranged cancers
3. 学会等名 American Association of Cancer Research（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
研究 分 担 者	大崎 能伸  (Ohsaki Yoshinobu)  (30191935)	旭川医科大学・大学病院・客員教授   (10107)	

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