

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25710015

研究課題名(和文)肺腺がんにおける分子標的治療への耐性機構解明と耐性克服のための治療法開発

研究課題名(英文)Resistance mechanisms to molecular targeted drugs in lung adenocarcinoma

研究代表者

片山 量平 (Katayama, Ryohei)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・主任研究員

研究者番号：60435542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円

研究成果の概要(和文)：本邦において肺がんは、がんによる死亡原因のトップであり効果的な治療法の開発が喫緊の課題となっている。我々はその中でも約6割を占める肺腺がんに焦点を絞り、臨床応用されているまたは臨床試験中の分子標的薬に対する獲得耐性機構とその克服法の探索を試みた。本研究では既存のがん培養細胞株だけでなく、分子標的治療薬前、および治療後の臨床検体(胸水や生検などの残余検体)を承認されたIRBのもとで使用し、耐性機構の解析を行った。その結果、ALKやROS1融合遺伝子陽性肺がんをはじめ、複数のDriver Oncogene陽性肺がんにおける様々な新規獲得耐性機構と耐性克服法の同定に複数成功し論文として発表した。

研究成果の概要(英文)：Non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring driver oncogene such as EGFR mutation, ALK-, ROS1-, rearrangements are exquisitely sensitive to small molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs). Although most these driver oncogene positive NSCLC markedly respond to the corresponding TKIs, cancers inevitably develop resistance within a few years by the multiple mechanisms. We explored the resistance mechanisms to TKIs using cell line models and the patient derived specimens. As the results, we succeeded to identify and reported various TKI resistance mechanisms in ALK, ROS1 or other driver oncogene positive NSCLC, such as multiple secondary mutations in the kinase domain, bypass pathway activation, or P-glycoprotein overexpression mediated resistance. We also found the potential therapeutic strategies to overcome the resistances. Our study potentially could serve as a framework for selecting and prioritizing therapeutic strategy in the clinic.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：分子標的薬 獲得耐性 変異 チロシンキナーゼ阻害薬

1. 研究開始当初の背景

我が国において、死亡原因の1位はがんであり、中でも肺がんによる死亡者数が最も多く約7万にのぼる。従って、より効果的な治療法の開発は喫緊の課題である。近年、がん特異的な分子標的療法の開発が盛んにおこなわれており、特定のがん遺伝子変異を有する症例において非常に顕著な腫瘍縮小を示すものも得られてきていた。

EGFRの活性化型変異を有する肺がん患者は、女性・非喫煙・比較的若年の患者に多く見られる。特に日本人の肺線がんではEGFR変異が約50%ともいわれている。EGFR活性化型変異肺がんに対してはゲフィチニブやエルロチニブといったEGFRチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)がきわめて有効であり、多くの患者において腫瘍の顕著な縮小が認められている。また、2007年にSodaらにより発見されたALK融合遺伝子の肺がんに対してはCrizotinibなどのALK-TKIが高い腫瘍縮小効果を示す。また最近、ALK同様に、RETやROS1融合遺伝子の存在が肺がん・大腸がんなどで報告されており、治療薬の探索と共に候補薬剤の臨床試験も始まっていた。

TKIなどの分子標的治療薬は適切な対象症例では著明な腫瘍縮小が見られる一方で、ほとんどのケースにおいて1年程度で耐性化し再発することが临床上問題となっている。EGFR変異におけるEGFR-TKI耐性機構については、約50%の症例においてEGFRのキナーゼドメイン内に2次変異(T790M)がみられ、他には、PIK3CA変異、c-Met遺伝子増幅やHGFの産生上昇が耐性機構として報告されている。しかし、依然として1/4のケースでは詳細な分子機構は不明であった。研究開始時には、T790M変異を有する肺がん細胞に対してもやや阻害効果を示すBIBW2992を抗EGFR抗体と併用することで、EGFR-TKIに耐性化した場合にも一定の効果があることが報告されており、このような耐性機構に基づいた耐性を克服できる治療法の探索が世界中で行われていた。また、ALK肺がんにおけるCrizotinib耐性機構に関する報告が相次いでいた。

2. 研究の目的

本研究では、肺腺がんにおける分子標的薬への獲得耐性の分子機構を明らかにし、耐性克服のための治療法・併用療法といった、臨床にフィードバックできる成果を得ることを目的とした。

EGFR活性化型変異を有する肺がん患者にはEGFR-TKIが、ALK融合遺伝子を有する肺がんには、CrizotinibなどのALK-TKIが著大な腫瘍縮小効果を示す。しかしながら、いずれにおいても約1年程度で不応となり耐性化することが临床上問題となっていた。本研究では、それまで研究代表者が進めてきたALK陽性肺がんに対するCrizotinib獲得耐性研究で得た知見を基に、肺がんにおける

種々の分子標的薬に対する耐性のメカニズムを明らかにし、分子標的薬に対して不応となった際の治療法・併用療法の開発につながる成果を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、EGFR活性化型変異やALK、ROS1、RET等の融合遺伝子により引き起こされる肺がんにおいて、TKI等の分子標的薬剤治療後に認められる耐性のメカニズムについて調べることにした。研究の進め方として大きく分けて以下の3つの手法を用いた。

1. 培養細胞を用いた耐性細胞の作製とその解析
2. ノードマウスに分子標的薬感受性細胞を移植し、長期間分子標的薬で治療することで耐性腫瘍のモデルを構築し、その耐性のメカニズムを探索
3. 治療前、および薬剤耐性となり再発した患者からの組織(胸水、腹水、診断のための生検)を用いた解析(細胞株を樹立)

上記手法から得たサンプルを用いて、耐性メカニズムを遺伝子変異・遺伝子発現・タンパク質レベルで解析し、検証した。そしてその耐性を克服するための治療法を探索した。

4. 研究成果

(1) ALK融合遺伝子陽性肺がんにおける獲得耐性機構の同定

培養細胞株(H3122)および、EML4-ALK融合遺伝子を発現させ、IL-3非存在下で生存できるようにしたBa/F3細胞株を用い、各種ALK阻害薬耐性細胞の樹立を試みた。H3122細胞については、段階的に阻害剤濃度を上げて培養していく方法、in vivo(ゼノグラフト)を作製し、治療を継続していく方法を用いた。Ba/F3細胞に関しては、ENU(DNAアルキル化剤)を用いて人工的に変異を導入してから薬剤でセレクションする方法により、各種耐性細胞の樹立を行った。その結果、Ba/F3細胞を用いた実験系からは、新たな耐性変異を含めて複数の耐性変異の同定に成功した。H3122細胞からは、非常にユニークな耐性機構の同定に成功した。さらに、それぞれの耐性変異にも有効な薬剤を探索し、他との共同研究等により耐性克服薬を見出し発表してきた。(研究業績1、3、9ほか)

ALK融合遺伝子陽性肺がんの患者検体(胸水等や生検検体)から培養細胞の樹立、ゼノグラフトモデルの樹立を進めつつ、ALK阻害薬耐性時の検体からは耐性機構の解析とその検証、耐性克服法の探索を行った。その結果、第2世代ALK阻害薬耐性機構として、新たなAlectinib耐性メカニズム、セリチニブ耐性メカニズムの同定に成功し、発表した(図1、研究業績9、10)。

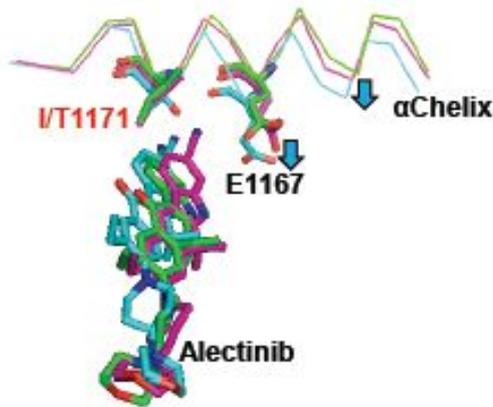


図 1：新規 Alectinib 耐性変異と結合モデル

さらに、全く新しい ALK-TKI 耐性機構として、P 糖たんぱく質の過剰発現による Ceritinib や Crizotinib 耐性を患者検体より発見し、さらにその治療戦略を見出すことに成功した(図 2、研究業績 2)。

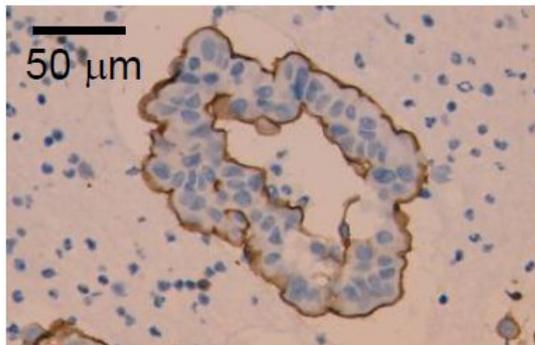


図 2：P 糖たんぱく質を過剰発現する Ceritinib 耐性 ALK 肺がん患者由来がん細胞

(2) ROS1 融合遺伝子陽性肺がんにおける獲得耐性機構と耐性克服法の同定

ALK と非常に相同性の高い受容体型チロシンキナーゼである ROS1 も、ALK 同様に融合遺伝子による異常活性化が一部の肺がんの原因となっている。その ROS1 陽性肺がんに関して、(1)の ALK 融合遺伝子陽性肺がんの際と同様に種々の耐性機構と耐性克服法の解析を行った。その結果、ALK/ROS1 阻害薬 Crizotinib の臨床試験の中で、一旦奏功が見られたものの薬剤耐性となった検体を用いて新たな Crizotinib 耐性変異を発見し報告した(研究業績 1 2)。さらに、Ba/F3 を用いたモデル系を駆使し、新たな耐性変異の候補を同定するとともに、Crizotinib 耐性変異にも有効な薬剤として、Cabozantinib を同定し発表した(研究業績 6)。この成果等に基づき、米国においては Cabozantinib の ROS1 融合遺伝子陽性肺がんへの治験が行われており、実際に Crizotinib 耐性患者において Cabozantinib の奏功が認められた症例が報告されている。しかし、その症例においては毒性発現により長期間継続した治療法と

ならなかったと報告されており、今後さらなる研究が必要である。

(3) EGFR 変異陽性肺がんにおける獲得耐性機構と耐性克服法の検索

EGFR 変異陽性肺がん細胞株(PC9、HCC827 など)、Ba/F3 細胞に EGFR 変異体を導入した細胞株、EGFR 変異陽性肺がん患者検体より樹立した培養細胞株を用いて、第 1、第 2、第 3 世代 EGFR 阻害薬への耐性機構を検討してきた。共同研究により、非小細胞がん(NSCLC)から小細胞がん(SCLC)に変化し耐性になるメカニズム解析などを発表してきた(研究業績 5)。そのほかの新たなメカニズム、耐性克服法に関しては現在論文準備中である。

(4) そのほかの希少な Driver Oncogene 変異陽性肺がんの獲得耐性機構と耐性克服法の探索

RET 融合遺伝子やその他の比較的希少な Driver Oncogene についても、獲得耐性機構、耐性克服法を既存の培養細胞株、患者検体からの培養株樹立等を通じ、耐性機構と一部の耐性克服法の解析を行い、複数の耐性変異等の機構の同定に成功した。一部に関しては現在論文準備中である。

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 13 件)

1: Shaw AT, Friboulet L, Leshchiner I, Gainor JF, Bergqvist S, Brooun A, Burke BJ, Deng YL, Liu W, Dardaei L, Frias RL, Schultz KR, Logan J, James LP, Smeal T, Timofeevski S, Katayama R, Iafrate AJ, Le L, McTigue M, Getz G, Johnson TW, Engelman JA. Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F. *N Engl J Med.* 2016 Jan 7;374(1):54-61. doi: 10.1056/NEJMoa1508887.

2: Katayama R, Sakashita T, Yanagitani N, Ninomiya H, Horiike A, Friboulet L, Gainor JF, Motoi N, Dobashi A, Sakata S, Tambo Y, Kitazono S, Sato S, Koike S, John Iafrate A, Mino-Kenudson M, Ishikawa Y, Shaw AT, Engelman JA, Takeuchi K, Nishio M, Fujita N. P-glycoprotein Mediates Ceritinib Resistance in Anaplastic Lymphoma Kinase-rearranged Non-small Cell Lung Cancer. *EBioMedicine.* 2015 Dec 12;3:54-66. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.12.009.

3: Zou HY, Friboulet L, Kodack DP, Engstrom LD, Li Q, West M, Tang RW,

- Wang H, Tsaparikos K, Wang J, Timofeevski S, Katayama R, Dinh DM, Lam H, Lam JL, Yamazaki S, Hu W, Patel B, Bezwada D, Frias RL, Lifshits E, Mahmood S, Gainor JF, Affolter T, Lappin PB, Gukasyan H, Lee N, Deng S, Jain RK, Johnson TW, Shaw AT, Fantin VR, Smeal T. PF-06463922, an ALK/ROS1 Inhibitor, Overcomes Resistance to First and Second Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models. *Cancer Cell*. 2015 Jul 13;28(1):70-81. doi: 10.1016/j.ccell.2015.05.010.
- 4: Katayama R, Lovly CM, Shaw AT. Therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase in lung cancer: a paradigm for precision cancer medicine. *Clin Cancer Res*. 2015 May 15;21(10):2227-35. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2791. Review.
- 5: Niederst MJ, Sequist LV, Poirier JT, Mermel CH, Lockerman EL, Garcia AR, Katayama R, Costa C, Ross KN, Moran T, Howe E, Fulton LE, Mulvey HE, Bernardo LA, Mohamoud F, Miyoshi N, VanderLaan PA, Costa DB, Jänne PA, Borger DR, Ramaswamy S, Shioda T, Iafrate AJ, Getz G, Rudin CM, Mino-Kenudson M, Engelman JA. RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nat Commun*. 2015 Mar 11;6:6377. doi: 10.1038/ncomms7377.
- 6: Katayama R, Kobayashi Y, Friboulet L, Lockerman EL, Koike S, Shaw AT, Engelman JA, Fujita N. Cabozantinib overcomes crizotinib resistance in ROS1 fusion-positive cancer. *Clin Cancer Res*. 2015 Jan 1;21(1):166-74. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1385.
- 7: Crystal AS, Shaw AT, Sequist LV, Friboulet L, Niederst MJ, Lockerman EL, Frias RL, Gainor JF, Amzallag A, Greninger P, Lee D, Kalsy A, Gomez-Caraballo M, Elamine L, Howe E, Hur W, Lifshits E, Robinson HE, Katayama R, Faber AC, Awad MM, Ramaswamy S, Mino-Kenudson M, Iafrate AJ, Benes CH, Engelman JA. Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science*. 2014 Dec 19;346(6216):1480-6. doi: 10.1126/science.1254721.
- 8: Aoyama A, Katayama R, Oh-Hara T, Sato S, Okuno Y, Fujita N. Tivantinib (ARQ 197) exhibits antitumor activity by directly interacting with tubulin and overcomes ABC transporter-mediated drug resistance. *Mol Cancer Ther*. 2014 Dec;13(12):2978-90. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0462.
- 9: Katayama R, Friboulet L, Koike S, Lockerman EL, Khan TM, Gainor JF, Iafrate AJ, Takeuchi K, Taiji M, Okuno Y, Fujita N, Engelman JA, Shaw AT. Two novel ALK mutations mediate acquired resistance to the next-generation ALK inhibitor alectinib. *Clin Cancer Res*. 2014 Nov 15;20(22):5686-96. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1511.
- 10: Friboulet L*, Li N*, Katayama R*, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, Michellys PY, Awad MM, Yanagitani N, Kim S, Pferdekamper AC, Li J, Kasibhatla S, Sun F, Sun X, Hua S, McNamara P, Mahmood S, Lockerman EL, Fujita N, Nishio M, Harris JL, Shaw AT, Engelman JA. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*. 2014 Jun;4(6):662-73. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0846. *: co-first authors
- 11: Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, Kabraji S, Awad MM, Katayama R, Pawlak A, Mino-Kenudson M, Yeap BY, Riely GJ, Iafrate AJ, Arcila ME, Ladanyi M, Engelman JA, Dias-Santagata D, Shaw AT. ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2013 Aug 1;19(15):4273-81. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0318.
- 12: Awad MM, Katayama R, McTigue M, Liu W, Deng YL, Brooun A, Friboulet L, Huang D, Falk MD, Timofeevski S, Wilner KD, Lockerman EL, Khan TM, Mahmood S, Gainor JF, Digumarthy SR, Stone JR, Mino-Kenudson M, Christensen JG, Iafrate AJ, Engelman JA, Shaw AT. Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. *N Engl J Med*. 2013 Jun 20;368(25):2395-401. doi: 10.1056/NEJMoa1215530.
- 13: Katayama R, Aoyama A, Yamori T, Qi J, Oh-hara T, Song Y, Engelman JA, Fujita N. Cytotoxic activity of tivantinib (ARQ 197) is not due solely to c-MET inhibition. *Cancer Res*. 2013 May 15;73(10):3087-96.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3256.

他、査読なしの日本語総説を計4編

〔学会発表〕(計24件)内、招待講演11件

1. Katayama R. Resistance mechanisms to tyrosine kinase inhibitors in fusion gene positive non-small cell lung cancer, Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthrough in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, 2016年2月14日、マウイ(米国)(招待講演)
2. 片山量平, 肺がん臨床検体を用いた分子標的薬耐性機構の解明、平成27年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム、2016年2月9日、学術総合センター(東京都・千代田区)(招待講演)
3. 片山量平, ALK 阻害薬耐性の分子基盤 (Molecular Mechanisms of ALK tyrosine kinase inhibitor resistance. 第56回日本肺癌学会学術集会、2015年11月26日(パシフィコ横浜(神奈川県横浜市))(招待講演)
4. Katayama R, Sakashita T, Yanagitani N, Takeuchi K, Nishio M, Fujita N, Novel ceritinib resistance mechanisms: new resistant mutation, fibroblast growth factor receptor 3 overexpression and cMET amplification-mediated ceritinib resistance, AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2015年11月5日~9日、ボストン(米国)(国際学会、口頭発表)
5. 片山量平, Resistance mechanisms to molecular targeted therapy in ALK or ROS1 rearranged non-small cell lung cancer (融合遺伝子陽性肺がんにおける分子標的薬耐性の分子基盤) 第53回 日本癌治療学会総会、2015年10月29日、京都国際会議場、(京都府京都市)(招待講演)
6. 布施 美保 ジェーン、藤田直也、片山量平、Therapeutic strategies and resistance mechanisms in NTRK1 rearranged cancer (NTRK1 阻害薬探索とその耐性化機構) 第74回 日本癌学会学術総会(2015年10月8日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市))
7. 片山量平、Molecular mechanisms of the resistance to ALK- or ROS1-TKIs in ALK or ROS1 rearranged non-small cell lung cancer (ALK, ROS1 陽性肺がんにおける分子標的薬耐性の分子基盤) 第74回 日本癌学会総会、2015年10月8日、名古屋国際会議場、(愛知県名古屋市)(シンポジウム、招待講演)
8. 片山量平、Identification of the acquired resistance mechanisms to tyrosine kinase inhibitors in fusion gene positive non-small-cell lung cancer (融合遺伝子陽性肺がんにおける分子標的薬耐性機構の解明) 第74回 日本癌学会総会 2015年10月9日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)(日

本癌学会奨励賞受賞講演)

9. 小倉 隼人、足立 淳、朝長 毅、藤田 直也、片山 量平, CD74-ROS1 融合遺伝子陽性がんにおける分子標的治療薬に依存した細胞増殖機構 (Drug addiction) のメカニズム解析 (Molecular mechanism of tyrosine kinase inhibitor dependent cell growth (Drug addiction) in CD74-ROS1 fusion gene positive cancer) 平成27年度文科省科研費新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』がん若手研究者ワークショップ、2015年9月2日~9月5日、蓼科グランドホテル滝の湯(長野県茅野市)
10. 片山量平、Molecular mechanism of the TKI resistance in lung cancer ~ TKI-resistance in fusion gene driven lung cancer ~ (肺がんにおける TKI 耐性の分子機構 -融合遺伝子陽性肺がんの獲得耐性) 第13回 日本臨床腫瘍学会学術総会、2015年7月16日、ロイトン札幌、(北海道札幌市)(シンポジウム、招待講演)
11. 片山量平、小池清恵、西尾誠人、藤田直也、培養細胞株と患者検体を用いた ALK 阻害薬耐性機構の解析、第19回日本がん分子標的治療学会、2015年6月10-12日、松山全日空ホテル、(愛媛県松山市)

他13件

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計4件)

名称:「新規融合体及びその検出法」
発明者: 竹内賢吾、富樫由紀、坂田征士、藤田直也、片山量平
権利者: 竹内賢吾、富樫由紀、坂田征士、藤田直也、片山量平
種類: 特許権
番号: 特願 2014-078728
出願年月日: 2014年10月29日
国内外の別: 国内

名称:「新規融合体及びその検出法」
発明者: 竹内賢吾、朝賀礼美、坂田征士、藤田直也、片山量平
権利者: 竹内賢吾、朝賀礼美、坂田征士、藤田直也、片山量平
種類: 特許権
番号: 特願 2014-078729
出願年月日: 2014年10月29日
国内外の別: 国内

名称:「RET 阻害薬耐性癌に対する治療剤」
発明者: 矢野聖二、竹内伸司、藤田直也、片山量平
権利者: 矢野聖二、竹内伸司、藤田直也、片山量平
種類: 特許権

番号：特願 2014-222847
出願年月日：2014 年 10 月 31 日
国内外の別： 国内

研究者番号：90527863

他 1 件

○取得状況 (計 0 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〕

報道関連情報：

「ALK 陽性肺がんに対する治療薬耐性の原因を発見」に関して、以下のメディアでとりあげられた。

- ・産経新聞 平成 28 年 1 月 20 日朝刊
- ・47News (時事通信社) 平成 28 年 1 月 26 日 オンライン掲載 (医療新世紀 短信)
- ・山梨日日新聞 平成 28 年 1 月 25 日
- ・愛媛新聞 平成 28 年 1 月 26 日
- ・熊本日日新聞 平成 28 年 1 月 29 日
- ・下野新聞 平成 28 年 2 月 5 日

ホームページ等：

<http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/fundamental/achievement/index.html>
<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/news/4146.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 量平 (KATAYAMA, Ryohei)
公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター・基礎研究部・主任研究員
研究者番号：60435542

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

西尾 誠人 (NISHIO, Makoto)
公益財団法人がん研究会・有明病院・呼吸器内科・部長
研究者番号：00281593

柳谷 典子 (YANAGITANI, Noriko)
公益財団法人がん研究会・有明病院・呼吸器内科・医長
研究者番号：60400785

北園 聡 (KITAZONO, Satoru)
公益財団法人がん研究会・有明病院・呼吸器内科・副医長