

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860595

研究課題名(和文) 肺癌における分子標的薬耐性機序の解明と治療戦略の開発

研究課題名(英文) Novel strategy for overcoming drug resistance in Lung Cancer

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の分子標的治療の最大の難関は、耐性獲得である。これを克服するための新戦略を開発した。まず、ALK陽性肺癌において耐性獲得後も重要な細胞内シグナルを同定し、この経路を阻害することで耐性を克服することが可能となった。このシグナルはCrk-Srcシグナル系で、今回の我々の検討では、Srcシグナルを抑制する薬剤を併用することで、耐性にかかわるバイパス経路のチロシンリン酸化受容体を幅広く抑制することが示された。このSrc阻害薬とALK阻害薬の併用効果は、細胞実験のみならず、マウス皮下移植モデルにおいてもALK耐性細胞の増殖を完全に制御できた。

研究成果の概要(英文)：ALK tyrosine kinase inhibitors (TKIs) play a significant role in the treatment of ALK rearranged non-small cell lung cancer patients. After the significant response to ALK-TKIs, the emergence of acquired resistance occurs for all patients. Understanding the origin of resistance mechanisms within a patient is crucial to guide treatment and developing drugs/combinations to circumvent resistance. There are reported that some of the tyrosine kinases are involving by bypassing ALK signaling, but comprehensive identification of proteins that are significant for acquired resistance in ALK-TKIs is still required.

Our results revealed that Crk-Src related proteins were overexpressed in ALK TKI resistance cells and had a significant protein expression changes. To address the impact of overcoming resistance by blocking Crk-Src pathway, Drugs/combinations with ALK inhibitor and/or Src inhibitors showed that significant treatment effect in vitro and in vivo study using tumor-bearing mouse model.

研究分野：分子標的治療

キーワード：薬剤耐性 ALK肺癌 Src阻害薬 アレクチニブ サラカチニブ セリチニブ ロラチニブ

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌は、世界で最も癌関連死亡の多い癌腫である。非小細胞肺癌のうちがん遺伝子を標的とした「分子標的治療」臨床に導入され飛躍的に延命効果が期待されるようになった。例えば、EGFR 特異的阻害薬は EGFR 肺癌の平均生存期間を 20 か月以上へ延長している。ALK 融合遺伝子は 2007 年に肺癌のがん遺伝子異常として発見されて以来、ALK 阻害薬の開発が進み、現在 ALK 阻害薬は 3 剤臨床導入されている。クリゾチニブ、アレクチニブは現在本邦で汎用されている ALK 阻害薬であるが、最終的にこれらの薬剤に対する耐性が生じることが知られている。

2. 研究の目的

(1) ALK 阻害薬に対する耐性機序を解明することは、これらの ALK 阻害薬を有効に使い、耐性を克服する治療戦略を考えるうえで非常に有用である。これまでに、ALK 遺伝子の獲得変異によって耐性が生じることや、ALK 以外のがん生存シグナルの活性化によって耐性が生じることが示されている。本研究では、ALK 肺癌が ALK 融合遺伝子以外に重要なシグナルを同定し、耐性機序とのかかわりを調べることにした。

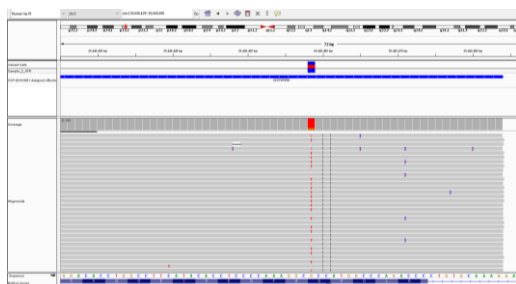
3. 研究の方法

(1) HSP90 阻害薬(AUY922)は、ALK 融合遺伝子が安定的に活性を持つために重要なタンパクであることが示されている。この HSP90 阻害薬による ALK 肺癌細胞株を治療することで生じる細胞内のタンパク変化を、質量分析ベースのタンパク/ペプチド解析を行った。

(2) ALK 阻害薬(クリゾチニブ、アレクチニブ、セリチニブ、ロラチニブ) に対する耐性株 (H3122AFR, H3122LDKR, H3122PFR) を作成し、(1) のスクリーニングで得られた、Src/CrkII シグナル系の阻害薬に対する抗がん効果を in vitro, in vivo 確認した。

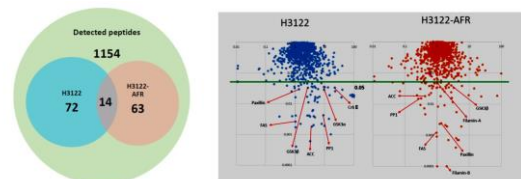
4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサを用いた、アレクチニブ、セリチニブ、ロラチニブの耐性株の獲得変異を検討した。Ion AmpliSeq Cancer Panelv2 を用いて Ion Torrent で解析した。ALK チロシンリン酸化部位に相当する exon21-exon23 には、耐性変異を認めなかった。



(2) ① 質量分析計を用いた、HSP90 阻害薬 (HSP90i) 投与後のペプチド変化

H3122 と H3122 の耐性株である H3122AFR において、治療前後で変化するタンパク群の同定を行った。iTraq 法で、4 群のタンパク (H3122, H3122AFR +/- HSP90i) を安定同位体で置換した。この方法は、レポーターグループの分子構造を変えないまま、一部の原子を安定同位体で置き換えることで、お互いに区別可能なタグを作っている。バランスグループも安定同位体を用いて、タグ全体の分子量が変わらないように調整している。このように全体としては同じ構造、同じ質量ながら、4 種類の区別可能なタグが使用された。本解析では、計 1,154 のペプチド断片を検出し、データベースとの照合で候補のタンパク群を下図のように同定した。



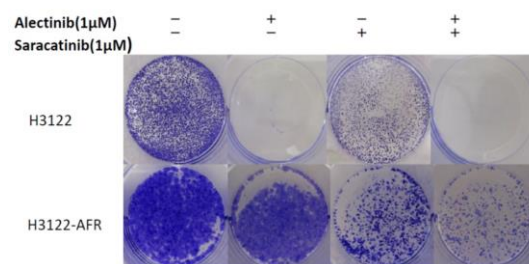
(図 1 : iTraq の結果)

H3122 と H3122AFR それぞれで、優位に ($P < 0.05$) 変化を認めたタンパク候補に関して、細胞内分子パスウェイ解析を行った (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, <https://david.ncifcrf.gov/>)

この解析結果から、IGFR パスウェイと Integrin/Src/Crk シグナル系が ALK 細胞内で重要な役割を果たしていることが示された。

② ①で得られた、治療標的のひとつ Src 経路について検討を行った。

Src 阻害薬と、ALK 耐性細胞株に対する感受性を検討した。

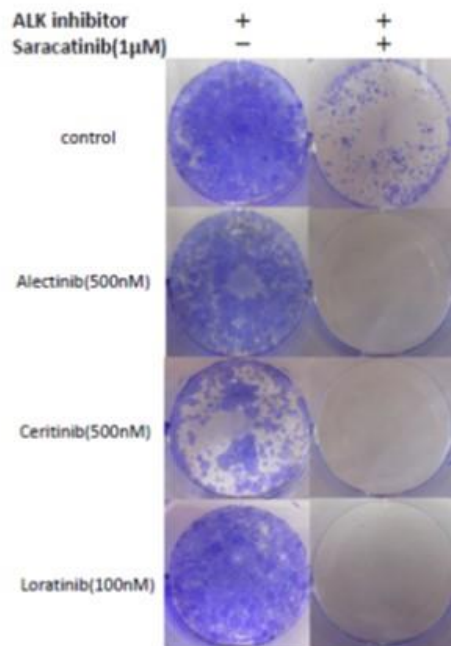


(図 2 : ALK 耐性細胞株に対する Src 阻害薬の効果)

Src 阻害薬として、Saracatinib, Dasatinib を Alectinib と併用することで耐性克服が可能であった。

これらの併用効果は、アレクチニブ耐性株に限らず、セリチニブ、ロラチニブ耐性株に対しても同様に有効であった。また図 2 のように saracatinib 単剤では抗腫瘍効果は示されていないことから、ALK 阻害薬と併用するこ

とで、ALK シグナルをバイパスする経路の遮断にかかわっているものと考えられた。



これを示すために、ALK 遺伝子転座を有し、ALK 以外に EGFR シグナルも活性化している H2228 細胞株を用いて併用効果について検討した。

H2228 細胞に対して、ALK 阻害薬（アレクチニブ、セリチニブ、ロラチニブ） + saracatinib では、ALK 阻害薬単剤の効果に比べて優位に細胞増殖抑制効果を示した。

③ Src 阻害薬の治療標的に関する検討
ALK 阻害薬と Src 阻害薬の併用で、ALK 耐性細胞への抗腫瘍効果が認められたが、Src 阻害薬自体の治療標的に関して検討した。

(1) 蛍光免疫染色法

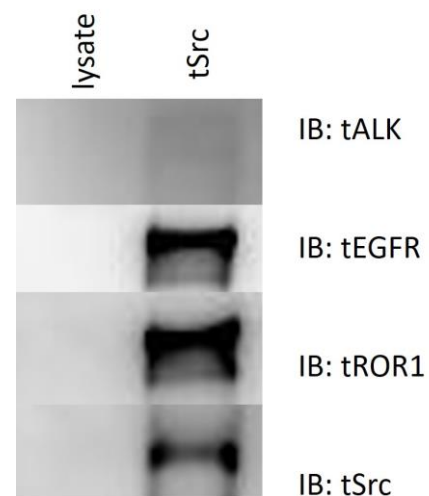
ALK 阻害薬耐性細胞において、Src と pTyr の 2 重免疫染色を行った。無治療の細胞では、Src は細胞質に局在し、pTyr は主に細胞膜に点状に存在することが示された。Src+ALK 阻害薬投与後は、pTyr 自体が、減弱していることが分かった。また、Src の下流シグナルである AKT の核内移行を確認できた。

これらの結果から、Src 阻害薬が、EGFR や MET など従来、ALK シグナルのバイパスとして知られてきたチロシンリン酸化シグナル全体の低下を引き起こしていることが示唆された。

(2) 免疫沈降法 (IP)

Src と直接結合しているタンパク質検出のため IP を行った。この結果、Src と EGFR、MET などの受容体が直接結合して、リン酸化の調整にかかわっていることが示された。

AFR



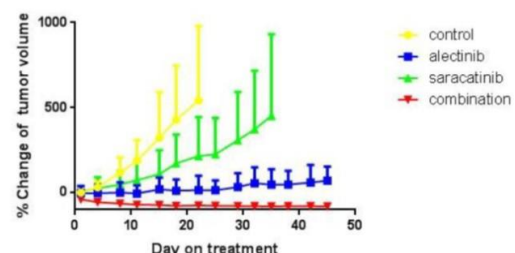
(3) リン酸化受容体抗体アレイ
網羅的なチロシンリン酸化受容体の発現変化の観察のために、path scan を使用した。この結果、EGFR ファミリー (EGFR, ErbB2, ErbB3) 以外にも幅広い種類のリン酸化抑制にかかわっていることが示された。

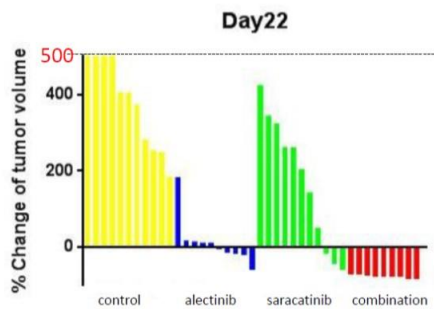
③ アレクチニブ耐性株における、マウス皮下腫瘍移植モデルでの検討

マウス皮下腫瘍移植モデルを用いて、上記②の効果を in vivo でも確認した。

(図3 マウス皮下腫瘍移植における、アレクチニブ、saracatinib、併用療法の効果)

アレクチニブ単剤での治療効果は、長期間投与で耐性獲得するのに対して、これに Src 阻害薬を併用することで腫瘍増殖を完全に抑制することができた。また、副作用などによるマウスの体重減少は各群において見られなかった。





まとめ

肺がんの分子標的治療の最大の難関は、耐性獲得である。これを克服するための新戦略を開発した。まず、ALK 陽性肺癌において耐性獲得後も重要な細胞内シグナルを同定し、この経路を阻害することで耐性を克服することが可能となった。このシグナルは Crk-Src シグナル系で、今回の我々の検討では、Src シグナルを抑制する薬剤を併用することで、耐性にかかわるバイパス経路のチロシンリン酸化受容体を幅広く抑制することが示された。

この Src 阻害薬と ALK 阻害薬の併用効果は、細胞実験のみならず、マウス皮下移植モデルにおいても ALK 耐性細胞の増殖を完全に制御できた。

5. 主な発表論文等

英文論文として論文投稿中

[学会発表] (計 2 件)

- ① 吉田 遼平、佐々木 高明 など Src mediated acquired resistance to ALK inhibitor in ALK-rearranged Non-small cell lung cancers、米国癌学会、2016 年 4 月 8 日、New Orleans (USA)
- ② 吉田 遼平、佐々木 高明、ALK 陽性非小細胞肺癌に対して HSP90 阻害薬を用いた際の HSP 群の変化 日本がん分子標的学会、2015 年 6 月 11 日、松山市
- ③

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