

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	吉田 遼平
<h3>学位論文題目</h3> <p>Activation of Src signaling Mediates Acquired resistance to ALK Inhibition in Lung Cancer (ALK融合遺伝子陽性肺癌におけるALK阻害薬の耐性機序としてのSrcシグナル活性化の役割)</p> <h3>共著者名</h3> <p>佐々木 高明、南 幸範、日比野 幸子、奥村 俊介、佐渡 正敏、三代川 齊之、 林 諭史、北田 正博、大崎 能伸</p> <p>International Journal of Oncology 平成29年 掲載予定</p> <h3>研究目的</h3> <p>肺癌の組織型の約半数を占める肺腺癌において治療標的となるドライバー遺伝子が発見され、分子標的薬による治療が確立したが、分子標的薬には必ず治療抵抗性を獲得（耐性化）する。肺腺癌のドライバー遺伝子変異のひとつであるAnaplastic lymphoma kinase(ALK)融合遺伝子に対し、ALK阻害薬の有効性が示されたが、ALK阻害薬の耐性機序に関する理解は不十分で耐性獲得後の有効な治療の開発が行われていない。Heat shock protein (Hsp) 90は、細胞内分子シャペロンの一つであり細胞の分化や増殖に関与する重要なシグナル伝達分子を含むタンパク質（クライアントタンパク質）と相互作用する。Hsp90阻害薬はHsp90のATP結合部位に作用して、Hsp90依存性クライアントタンパク質の不活性化、不安定化、分解を引き起こしシャペロン機能を抑制する特異的な阻害薬である。このHsp90阻害薬はALK阻害薬耐性後にもALK融合遺伝子陽性肺癌に対してアポトーシスを誘導し抗腫瘍効果をもたらすことが知られている。我々は、ALK阻害薬の耐性機序として、癌細胞の生存・増殖のために必要な特定のシグナルタンパク質の活性化が存在すると考え、そのシグナルタンパク質がHsp90依存性クライアントタンパク質であると仮説を立てた。そのシグナルタンパク質を同定するために、ALK融合遺伝子陽性肺癌細胞にHsp90阻害薬を投与した前後に発現が変化するタンパク質を解析し、そのタンパク質がALK阻害薬の耐性機序の一因となっているか検討した。さらに、そのタンパク質の役割を解明し、新たな標的分子となるかを検討することで、ALK融合遺伝子陽性肺癌への新たな治療戦略を開発する目的とした。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 細胞株・薬剤

*EML4-ALK*融合遺伝子を有する細胞株としてH3122株 (*EML4* exon1-13と*ALK* exon20-29の融合)、H2228株 (*EML4* exon1-6と*ALK* exon20-29の融合)を用いた。Hsp90阻害薬としてAUY922、*ALK*阻害薬としてAlectinib、Ceritinib、Lorlatinib、Src阻害薬としてSaracatinib、Dasatinib、Bosutinibを用いた。

2. MTSアッセイ

細胞を96ウェルプレートにまき、24時間後に至適濃度の薬剤を投与した。さらに72時間後にCellTiter 96 AQ solutionを加えて、4時間インキュベートした。490nmの波長で吸光度を測定した。

3. ウェスタンブロッティング

至適条件で回収したタンパク質を4-12% SDS-PAGEで電気泳動し、PVDF膜に転写した。各種一次抗体と反応させた後、特異的二次抗体と反応させた。

4. 次世代シーケンサー

各細胞株からゲノムDNAを抽出し、*ALK*を含む409個の癌関連遺伝子パネル (Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel) を用いて解析を行った。機器はIon PGM Systemを使用し、変異検出はIon Reporter ver. 5.0.4を用いて解析した。

5. がん細胞株の皮下移植による異種異所性移植モデル

ヌードマウス (BALB/c ^{nu/nu}) を用いて、*ALK*阻害薬耐性細胞株を皮下へ注射し、腫瘍体積が100mm³以上を確認した日を薬剤投与第1日目と規定した。薬剤はAlectinib 20mg/kgで経口投与、Saracatinib 50mg/kgで腹腔内投与し、腫瘍の大きさの計測は週に2回行った。

6. iTRAQ解析

iTRAQにより、サンプルとなるタンパク質に異なるタグで標識後、2段階の質量分析法を行い、そこで得られた当該ペプチドを比較することでタンパク質の網羅的定量解析した。得られた結果を元にして、パブリケーションデータベースを用いて解析を行った。

7. 統計処理

計測は平均±標準誤差とした。GraphPad Prism version6.0を用いたStudent's t-testではp-valueを0.05以下が統計学的に有意差ありとした。

成 績

1. ALK融合遺伝子陽性肺癌細胞を起源とした薬剤耐性株の樹立

H3122細胞に由来したALK阻害薬の耐性株を樹立した。ALK阻害薬Alectinib、Ceritinib、Lorlatinibに対応する耐性株をH3122-AFR、H3122-LDKR、H3122-PFRと命名した。各々のALK阻害薬におけるH3122のIC50(nM)はAlectinib 12.12、Ceritinib 51.22、Lorlatinib 0.34であるのに対して、耐性株ではすべてIC50は500nM以上であった。また、H3122-AFRでは次世代シーケンサーより、ALKチロシンキナーゼドメイン領域の二次性遺伝子変異は検出されなかった。

2. 質量分析を用いたALK阻害薬耐性機序に関与するHsp90依存性クライアントタンパク質の同定

H3122、H3122-AFR共にHsp90阻害薬であるAUY922に対して同等の薬剤感受性を示した。耐性機序に関与するHsp90依存性クライアントタンパク質を同定するために、AUY922の投与前後のH3122、H3122-AFRからタンパク質を抽出し、iTRAQを用いた定量的質量分析を行った。結果は各々の細胞株から1154個のタンパク質/ペプチドが検出された。統計学的に有意差を持つタンパク質(候補タンパク質)はH3122で72個、H3122-AFRで63個であり、その結果を元にパスウェイ解析を行ったところ、Srcを含むfocal adhesion pathwayのシグナル伝達カスケードが耐性機序の一因である可能性が示唆された。

3. ALK阻害薬耐性細胞株におけるSrc阻害薬とALK阻害薬の併用治療による抗腫瘍効果

*in vitro*実験で、H3122-AFRにおいてAlectinibとSrc阻害薬であるSaracatinibの併用治療による抗腫瘍効果を確認した。さらに他の細胞株であるH3122-LDKR、H3122-PFR、H2228でも各ALK阻害薬とSaracatinibの併用治療による抗腫瘍効果が得られた。*in vivo*実験では、H3122-AFRをヌードマウスに皮下移植し、経時的な腫瘍の大きさを計測し、結果は併用治療群で抗腫瘍効果がみられた。

4. 耐性株におけるALK阻害薬とSrc阻害薬の併用治療効果の機序の解明

H3122-AFRでは、H3122と比較しpaxillinなどのSrcシグナル関連タンパク質に加え、受容体型チロシンキナーゼ(Receptor tyrosine kinase; RTK)のリン酸化タンパク質の発現が有意に上昇していた。Src阻害薬単独投与下では、Srcシグナル関連タンパク質とRTKのリン酸化タンパク質の発現が共に抑制された。

考 案

本研究では以下の二つのことを明らかにした。1) ALK阻害薬の新たな耐性機序としてのSrcシグナル活性化。2) ALK阻害薬耐性細胞株におけるSrc阻害薬とALK阻害薬の併用治療による抗腫瘍効果。

まず、我々はALK阻害薬の新たな耐性機序を解明する前提として、ALK阻害薬の耐性機序にHsp90依存性クライアントタンパク質が関与していると仮説をたてた。そこでALK融合遺伝子陽性肺癌細胞においてHsp90阻害薬を投与した前後で生じる細胞内のタンパク質発現の変化に注目した結果、耐性機序としてfocal adhesion pathwayが関与している可能性が示唆された。Srcはfocal adhesion pathwayに含まれ、ALK阻害薬耐性株でSrcのリン酸化タンパク質が高発現しており、ALK阻害薬の耐性機序としてSrcシグナル活性化の関与が示唆された。

第二に、ALK阻害薬の耐性機序であるSrcが新たな治療標的となるかについて検討した。ALK阻害薬耐性株において、*in vitro*、*in vivo*の実験でAlectinibとSrc阻害薬の併用治療による抗腫瘍効果を確認し、SrcがALK阻害薬やvariantの種類によらない共通した治療標的であることを示した。

結 論

ALK融合遺伝子陽性肺癌におけるALK阻害薬の新たな耐性機序としてSrcシグナルの活性化が存在し、またALK阻害薬耐性への新たな治療戦略としてSrc阻害薬とALK阻害薬の併用治療の有効性を示した。

引 用 文 献

1. A.S. Crystal, A.T. Shaw, L.V. Sequist, L. Friboulet, M.J. Niederst, E.L. Lockerman, R.L. Frias, J.F. Gainor, A. Amzallag, P. Greninger, D. Lee, A. Kalsy, M. Gomez-Caraballo, L. Elamine, E. Howe, W. Hur, E. Lifshits, H.E. Robinson, R. Katayama, A.C. Faber, M.M. Awad, S. Ramaswamy, M. Mino-Kenudson, A.J. Iafrate, C.H. Benes, J.A. Engelman, Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer, *Science (New York, N.Y.)* 346(6216) (2014) 1480-6.
2. S. Zhang, W.C. Huang, P. Li, H. Guo, S.B. Poh, S.W. Brady, Y. Xiong, L.M. Tseng, S.H. Li, Z. Ding, A.A. Sahin, F.J. Esteva, G.N. Hortobagyi, D. Yu, Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways, *Nature medicine* 17(4) (2011) 461-9.
3. Z. Chen, T. Sasaki, X. Tan, J. Carretero, T. Shimamura, D. Li, C. Xu, Y. Wang, G.O. Adelmant, M. Capelletti, H.J. Lee, S.J. Rodig, C. Borgman, S.I. Park, H.R. Kim, R. Padera, J.A. Marto, N.S. Gray, A.L. Kung, G.I. Shapiro, P.A. Janne, K.K. Wong, Inhibition of ALK, PI3K/MEK, and HSP90 in murine lung adenocarcinoma induced by EML4-ALK fusion oncogene, *Cancer research* 70(23) (2010) 9827-36.

参 考 论 文

1. Yoshida R, Sasaki T, Ohsaki Y. EGFR and KRAS Mutations in Triple-Mutated Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017 Jul;12(7):e92-e93.
2. 吉田遼平、佐々木高明. ALK 阻害薬の耐性機序と次世代 ALK 阻害薬 *腫瘍内科*, 19(5):526-531, 2017.

平成 29 年 11 月 10 日

大学院博士課程委員会委員長 殿

審査委員長 西川 祐司



学位論文審査結果の報告について

吉田 遼平 氏提出の学位論文審査及び学力の確認を終了しましたので、
下記により提出します。

記




1. 学位論文の要旨 (3, 000字以内)
2. 学位論文の審査結果の要旨 (800字以内) 1部
3. 学力確認の結果

審査委員長 西川 祐司 (適) 否 (印)

審査委員 山本 明美 (適) 否 (印)

審査委員 武井 英博 (適) 否 (印)

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	吉田 遼平
審査委員長 西川 祐司  審査委員 山本 明美  審査委員 武井 英博 			
学位論文題目 Activation of Src Signaling Mediates Acquired Resistance to ALK Inhibition in Lung Cancer (ALK 融合遺伝子陽性肺癌における ALK 阻害薬の耐性機序としての Src シグナル活性化の役割) 掲載雑誌: International Journal of Oncology 51(5):1533-1540, 2017			
<p>Anaplastic lymphoma kinase (ALK) 融合遺伝子はヒト非小細胞肺癌の一部 (3-5%) でのドライバー遺伝子である。ALK 阻害薬はこのタイプの肺癌に著効を示すが、他の標的治療と同様に、次第に耐性が生じることが問題となっている。ALK 阻害薬に対する耐性機序は不明であるが、細胞内分子シャペロンの 1 つ heat shock protein (HSP) 90 阻害薬により AKL 阻害薬耐性の一部が解除されることから、申請者らは HSP90 のクライアント蛋白のシグナル分子が耐性機序に関わっている可能性を考えた。申請者らは、非小細胞肺癌株 H3122 とその AKL 阻害剤耐性株 H3122-AFR を用い、タグ標識蛋白の質量分析技法である iTRAQ 解析により、HSP90 クライアント蛋白の中から、耐性に関連するものをスクリーニングし、paxillin や CrkII を含む focal adhesion 経路関連蛋白およびインスリンシグナル経路関連蛋白を同定した。また、親株と耐性株から得られた蛋白の Western blotting 解析で、paxillin、CrkII が耐性株で増加していることを確認するとともに、これらの蛋白の制御に関わる Src 蛋白のチロシン 416 リン酸化が亢進していることを見出した。これらの結果は ALK 阻害薬耐性に Src を含む focal adhesion 経路のシグナル伝達に関わっていることを示唆している。実際、in vitro での H3122-AFR の増殖が ALK 阻害薬と Src 阻害薬の組み合わせで抑制され、同様の併用効果は他の 3 種類の AKL 阻害薬耐性株でも認められた。また、H3122-AFR をヌードマウスの皮下に移植する実験でも併用効果が証明された。さらに、ALK 阻害薬耐性獲得の機序として、Src 活性化による種々の受容体型チロシンキナーゼの活性化が示唆された。本研究で得られた成果は今後の ALK 融合遺伝子陽性肺癌の治療に応用できるもので、臨床的意義が大きい。</p> <p>申請者は審査委員の質問に適切に回答し、関連領域の知識も十分であると考えられた。慎重な討議の結果、本論文は学位論文にふさわしいとの結論に至った。</p>			