

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	Noriko Hirai (平井 理子)
<p>学位論文題目</p> <p>Monomerization of ALK Fusion Proteins as a Therapeutic Strategy in ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancers (ALK陽性非小細胞肺癌におけるEML4-ALK融合蛋白の単量体化による治療戦略)</p> <p>共著者名</p> <p>Takaaki Sasaki Shunsuke Okumura Yoshinori Minami Shinichi Chiba Yoshinobu Ohsaki</p> <p>ジャーナル名</p> <p>Frontiers in Oncology Front. Oncol., 02 April 2020 https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00419</p>			

研究目的

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) と *Echinoderm microtubule-associated protein-like 4* (EML4) はヒト2番染色体短腕上に離れて存在し、各々神経系の発達維持、紡錘体や微小管ネットワークの調整に関与する。ALKのC末端(キナーゼ)とEML4のN末端(coiled-coil, 以下cc)を保存したまま逆位に融合したEML4-ALK融合遺伝子は、非小細胞肺癌の5%で見られる重要なドライバー遺伝子である¹⁻³。正常肺にはALKの発現がないことから、臨床的には融合産物であるEML4-ALK融合蛋白の免疫染色により診断される。ALKチロシンキナーゼ阻害薬(TKI) (e. g. アレクチニブ)が奏功するが、耐性化が課題である。

全長ALK蛋白は受容体型キナーゼで、リガンド依存性の下流の生存増殖シグナルが活性化するため、野生型の場合単独で腫瘍活性を持たない。一方EML4-ALK融合蛋白は、EML4内のccドメインが熱力学的に安定な三量体構造をとることを介してALKキナーゼドメインが二量体化するため、リガンド非依存性の恒常的ALKリン酸化と下流シグナル活性化が誘導される。また全長ALK蛋白でも、キナーゼドメイン内に特定の活性変異(e. g. F1174L)が入ると、リガンドに関係なく単量体で自己リン酸化し得ることがneuroblastomaで知られている。これらの知見から、EML4-ALK融合蛋白を単量体化できればALK陽性肺癌の新たな治療戦略となるのではないか。

我々はEML4-ALKの単量体化誘導分子としてEML4内のcc構造自体に注目し、その模倣分子による競合的阻害により融合蛋白の単量体化が誘導され、恒常的ALKリン酸化とシグナル伝達を抑制することができる、との仮説を立てた。仮説に基づき、まずALK融合蛋白のシグナル伝達及び発癌性がALKの二量体化に依存することを示した。更にccドメインの過剰発現モデルと合成ペプチドを用い、ヒトEML4-ALK陽性肺癌に対するEML4cc構造自身が持つ抗腫瘍効果を検証した。

材料・方法

単量体化誘導モデルとして、ALKキナーゼドメインとFKBP1A(DmrBドメイン)の融合遺伝子、コントロールとしてF1174Lを挿入した融合遺伝子を作成し、各々Ba/F3細胞(IL-3依存性に生存増殖)に導入した。各細胞をIL-3不在下にDmrBリガンドであるB/Bと培養し、DmrB-ALK、DmrB-ALKF1174L安定発現株を樹立した。両株で細胞生存増殖能、ALKリン酸化と下流シグナル、ヌードマウスにおける腫瘍形成/増殖能をB/B継続群(マウスはB/B腹腔投与)と中止群(マウスはMock群)で比較した。蛍光tagシステムを用いてEML4-ALK発現Ba/F3、EML4-ALKとEML4ccを共発現させたBa/F3を樹立し、蛋白相互作用と細胞増殖能、マウスでの腫瘍増殖能を比較した。続いてEML4ccドメインに相同配列のペプチドをヒト肺癌細胞株に投与し、抗腫瘍活性を検証した。

成 績

DmrB-ALK陽性Ba/F3において、B/B継続投与により細胞増殖が得られたが、B/B中止により生存増殖能が失われ、ALK及び下流Akt/Stat3/ERKのリン酸化シグナルが低下した。DmrB-ALKF1174L陽性Ba/F3において、B/B継続有無によらず生存増殖能とALK及び下流リン酸化シグナルが維持された。両細胞株を各々皮下移植したマウスでは、DmrB-ALKマウスにおいてMock群で腫瘍は形成されず、B/B投与群でのみ腫瘍が形成された。腫瘍形成後にB/Bを中止し観察を続けた個体において、中止後腫瘍体積は減少した。DmrB-ALKF1174Lマウスにおいて、B/B群、Mock群ともに腫瘍体積は同等に増加し、生存期間に有意差はみられなかった。これらから、ALK融合蛋白の腫瘍活性はALK二量体化に依存していることが示された。

続いて、EML4cc過剰発現モデルとしてFluoppiシステムを用いた系を構築した。GFP(緑色蛍光)を付与したEML4-ALK遺伝子と、Ash tag(GFP側の蛋白と相互作用を有する蛋白の場合、GFP-Ash間の連結が起こり強蛍光を示す)を付与したEML4cc遺伝子(EML4のccドメイン配列のみ)を共発現させたBa/F3(EA/cc)と、GFP-EML4-ALKを単独発現させたBa/F3(EA/EA)を樹立した。フローサイトメトリによりEA/ccはEA/EAに比して強蛍光を示す細胞比率が減少した。両細胞株の増殖アッセイでは、EA/ccはEA/EAより増殖能が低下した。両細胞株を各々皮下移植したヌードマウスにおいて、EA/cc群はEA/EA群よりも腫瘍増殖速度が低下した。以上から、EML4-ALKに対してEML4ccを過剰発現させることにより、EML4-ALKの二量体化が阻害され、腫瘍性増殖に負の影響を与えることが示された。これらのコンセプトを薬剤として応用することを想定し、EML4ccのアミノ酸配列を模してccペプチドを合成した。蛍光を付与したccペプチドをヒト肺癌細胞株に投与した結果、EML4-ALK陽性細胞株(H3122)、陰性細胞株(A549)の両者で蛍光発現がみられ、ccペプチドの細胞内への取り込みが確認された。引き続きccペプチド単独投与によるH3122とA549の増殖アッセイでは、H3122でのみ阻害効果を認め、ペプチド投与によるALKリン酸化と下流シグナルの減弱がみられた。ALKチロシンキナーゼ阻害剤であるアレクチニブ単独投与とccペプチド併用投与の比較において、併用で有意に阻害効果が増強した。細胞株による感受性の差を考慮し、Ba/F3、EML4-ALK陽性Ba/F3、EML4-ALKF1174L陽性Ba/F3に対しccペプチド投与後の増殖アッセイを行った。EML4-ALK陽性Ba/F3において阻害効果がみられたが、parent、F1174Lにおいて顕著な阻害はみられなかった。

考 案

ALK融合蛋白の単量体化は、EML4-ALK陽性肺癌に対して従来のALKチロシンキナーゼ阻害、殺細胞性抗癌剤とは全く異なる機序で、有効な治療戦略となり得ることを示した。特に臨床的に課題であるALK-TKI耐性例においてbreak throughとなる可能性がある。また、ALK陽性肺癌で報告されている他の融合パートナー(e.g. TPN3)や、他のドライバー融合遺伝子(e.g. EZR-ROS1, TPM3-NTRK1, STRN-NTRK2)も、アミノ末端にあるccドメインやoligomerizationドメインを介して恒常的多量体化を得ているものが多いことから、それらのドメインを標的にするというコンセプトは癌種を問わず幅広く応用できる可能性がある。一方で薬剤としてのccペプチドには、細胞内デリバリー効率の改善、ペプチド安定性の改善、vivoでの効果検証、体内動態の解明などまだ課題があり今後検証を進める必要がある。

結 論

EML4cc構造自身を用いた競合的阻害を機序とする単量体化は、EML4-ALK融合遺伝子陽性肺癌において新しい治療戦略になる。

引 用 文 献

1. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. (2007) 448:561-6.
2. Mano H. Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer Sci*. (2008) 99:2349-55.
3. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Janne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. (2010) 46:1773-80.

参 考 论 文

1. Shaw AT, Solomon B. Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. *Clin Cancer Res*. (2011) 17:2081-6.
2. Katayama R. Therapeutic strategies and mechanisms of drug resistance in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-rearranged lung cancer. *Pharmacol Ther*. (2017) 177:1-8.
3. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. (2008) 455:971-4.
4. Richards MW, O'Regan L, Roth D, Montgomery JM, Straube A, Fry AM, et al. Microtubule association of EML proteins and the EML4-ALK variant 3 oncoprotein require an N-terminal trimerization domain. *Biochem J*. (2015) 467:529-36.
5. Beissert T, Hundertmark A, Kaburova V, Travaglini L, Mian AA, Nervi C, et al. Targeting of the N-terminal coiled coil oligomerization interface by a helix-2 peptide inhibits unmutated and imatinib-resistant BCR/ABL. *Int J Cancer*. (2008) 122:2744-52.