The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	非小細胞肺癌における分子標的治療薬アレクチニブに関する研究
Author(s)	兒玉, 達史
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52259
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博　士　論　文

博 士 論 文 題 名

非小細胞肺癌における分子標的治療薬アレクチニブに関する研究

学位申請者

兒玉　達史

本学位論文は，下記の投稿論文を基に作成され，大阪大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

主論文

1. **Kodama T**, Tsukaguchi T, Yoshida M, Kondoh O, Sakamoto H. Selective ALK inhibitor alectinib with potent antitumor activity in models of crizotinib resistance. Cancer Lett. 2014 Sep 1;351(2):215-21.
2. **Kodama T**#, Hasegawa M#, Takanashi K, Sakurai Y, Kondoh O, Sakamoto H. Antitumor activity of the selective ALK inhibitor alectinib in models of intracranial metastases. Cancer Chemother Pharmacol. 2014 Nov;74(5):1023-8.【#equal contributor】
3. **Kodama T**#, Motoi N#, Ninomiya H, Sakamoto H, Kitada K, Tsukaguchi T, Satoh Y, Nomura K, Nagano H, Ishii N, Terui Y, Hatake K, Ishikawa Y. A Novel Mechanism of *EML4-ALK* Rearrangement Mediated by Chromothripsis in a Patient-Derived Cell Line. J Thorac Oncol. 2014 Nov;9(11):1638-46.【#equal contributor】
4. **Kodama T**, Tsukaguchi T, Satoh Y, Yoshida M, Watanabe Y, Kondoh O, Sakamoto H. Alectinib Shows Potent Antitumor Activity against *RET*-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. Mol Cancer Ther. 2014 Dec;13(12):2910-8.

参考論文

1. Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, **Kodama T**, Kobayashi T, Fukami TA, Oikawa N, Tsukuda T, Ishii N, Aoki Y. CH5424802, a Selective ALK Inhibitor Capable of Blocking the Resistant Gatekeeper Mutant. Cancer Cell. 2011 May 17;19(5):679-90.

目次

略語一覧 3
緒論 6
本論 9
第一章　クリゾチニブ耐性に対するアレクチニブの効果 9
　第一節　クリゾチニブ投与後の *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌モデルに対するアレクチニブの効果 9
　第二節　クリゾチニブ耐性に関わる ALK 二次的変異に対するアレクチニブの効果 12
　第三節　脳転移モデルに対するアレクチニブの効果 22
　第四節　小括 26
第二章　新規 *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌株に対するアレクチニブの効果 27
　第一節　肺癌患者由来の新規 *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性細胞株のプロファイリング 27
　第二節　肺癌患者由来の新規 *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性細胞株に対するアレクチニブの効果 33
　第三節　小括 35
第三章　アレクチニブの RET 阻害活性 36
　第一節　アレクチニブが阻害可能なキナーゼの網羅的な探索 36
　第二節　アレクチニブの *RET* 融合遺伝子陽性肺癌モデルに対する効果 39
　第三節　小括 48
総括 49
結論 51
実験材料及び方法 52
参考文献 59
謝辞 66

略語一覧

A:	Alanine
ABL:	Abelson tyrosine-protein kinase 1
AKT:	Acutely transforming retrovirus AKT8 in rodent T-cell lymphoma
ALK:	Anaplastic lymphoma kinase
ATCC:	American Type Culture Collection
ATP:	Adenosine triphosphate
BIM:	Bcl-2-interacting mediator of cell death
BSA:	Bovine serum albumin
C:	Cysteine
CCDC6:	Coiled-coil domain containing 6
cDNA:	Complementary deoxyribonucleic acid
CGH:	Comparative genomic hybridization
CHEK2:	Checkpoint kinase 2
CNS:	Central nervous system
DAB:	3,3'-Diaminobenzidine
DUSP2:	Dual specificity protein phosphatase 2
DUSP6:	Dual specificity protein phosphatase 6
EGFR:	Epithelial growth factor receptor
EML4:	Echinoderm microtubule associated protein like 4
EREG:	Epiregulin
ERK:	Extracellular signal-regulated kinases
ETV1:	ETS translocation variant 1
ETV4:	ETS translocation variant 4
ETV5:	ETS translocation variant 5
F:	Phenylalanine
FDA:	Food and Drug Administration
FFPE:	Formalin-fixed paraffin embedded
FISH:	Fluorescent in situ hybridization
FLT3:	Fms-like tyrosine kinase 3
FOS:	Proto-oncogene c-Fos

G:	Glysine
GAPDH:	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GST:	Glutathione S-transferase
HIV:	Human immunodeficiency virus
HRP:	Horseradish peroxidase
I:	Isoleucine
IHC:	Immunohistochemistry
IL-3:	Interleukin 3
Ins:	Insertion
KDR:	Kinase insert domain receptor
KIF5B:	Kinesin family member 5B
KRAS:	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L:	Leucine
M:	Methionine
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
MET:	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
mRNA:	Messenger ribonucleic acid
N:	Asparagine
NSCLC:	Non-small cell lung cancer
PARP:	Poly ADP ribose polymerase
PDB:	Protein Data Bank
P-gp:	P-glycoprotein
PFS:	Progression-free survival
PHKG2:	Phosphorylase kinase, gamma 2
PMSF:	Phenylmethanesulfonylfluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride
RET:	Rearranged during transfection
RON:	Recepteur d'Origine Nantais
ROS1:	ROS proto-oncogene 1
RSEM:	RNA-Seq by Expectation Maximization
RT-PCR:	Reverse transcription polymerase chain reaction
S:	Serine

SCID:	Severe combined immunodeficiency
SD:	Standard deviation
SDS-PAGE:	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STAT3:	Signal transducer and activator of transcription 3
TBST:	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TR-FRET:	Time-resolved Forester-resonance-energy-transfer
V:	Valine
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
WT:	Wildtype
Y:	Tyrosine

緒論

EML4-ALK 融合遺伝子は，2007 年に Soda らのグループにより，非小細胞肺癌患者から新規に同定された癌遺伝子である [1]。この *EML4-ALK* 融合遺伝子は，細胞内骨格タンパク質である EML4 とキナーゼタンパク質である ALK の両遺伝子が染色体逆位により融合したものであり，その融合遺伝子産物である EML4-ALK 融合タンパク質が EML4 領域にあるコイルドコイルドメインを介して二量体を形成することで，ALK の恒常的なキナーゼ活性を示すことが明らかにされている（Figure 1)[1]。この融合遺伝子をマウス 3T3 線維芽細胞に遺伝子導入すると著しい造腫瘍性が認められること [1]，*EML4-ALK* 融合遺伝子を肺特異的に産生するトランスジェニックマウスでは出生後わずか数週間で数百の肺腺癌結節が発生すること [2] から，*EML4-ALK* 融合遺伝子は極めて強い癌遺伝子であると考えられている。したがって，*EML4-ALK* 融合遺伝子に起因する異常な ALK のキナーゼ活性が，*ALK* 融合遺伝子陽性の非小細胞肺癌の癌化及びその後の腫瘍増殖に関与していると考えられている。また，非小細胞肺癌において *EML4-ALK* 融合遺伝子と *EGFR* 遺伝子変異あるいは *KRAS* 遺伝子変異が排他的な関係にあることも報告されている [3]。さらに，*EML4-ALK* 融合遺伝子を有する非小細胞

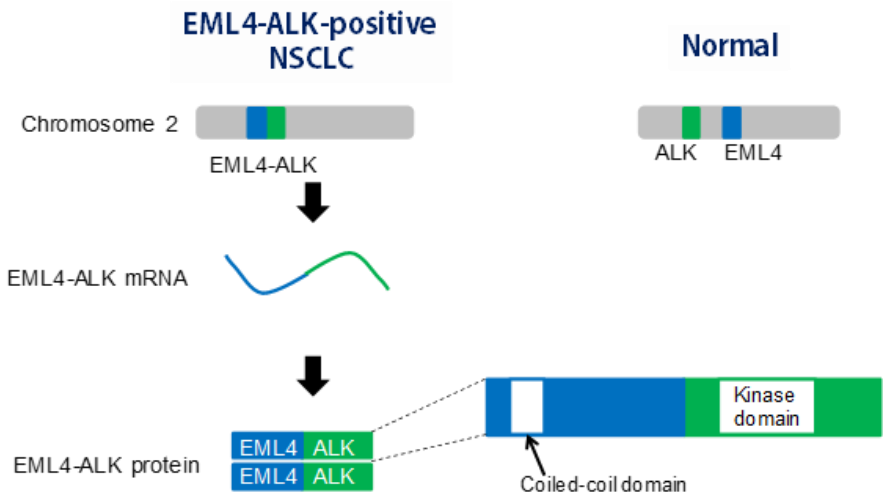

Figure 1. EML4-ALK in non-small cell lung cancer (NSCLC). EML4-ALK fusion gene results from a small inversion within chromosome 2, which leads to the expression of a chimeric tyrosine kinase, in which the N-terminus of EML4 is fused to the intracellular kinase domain of ALK. Constitutive activation of the ALK kinase results from EML4-ALK dimerization through the coiled coil domain of EML4.

肺癌患者は,肺癌の標準治療薬の1つであるEGFR阻害剤に対し耐性を示すとともに,化学療法による治療効果も高くないことが報告されており[4], *ALK*融合遺伝子陽性非小細胞肺癌はアンメットメディカルニーズが高いと言える。ALK は肺癌治療における新たな標的として有望であり，ALK 阻害剤は *ALK* 融合遺伝子陽性非小細胞肺癌に対して効果的かつ有用な分子標的治療薬となることが期待される。ALK 阻害剤として最初に注目を浴びたクリゾチニブ（Figure 2）は，当初は MET 阻害剤として臨床試験が進められていたが，MET 以外に ALK を含む複数のキナーゼを阻害する低分子化合物であることがわかっていた[5]。*EML4-ALK* 融合遺伝子の発見を受けて，クリゾチニブの ALK 阻害剤としての臨床試験が進められたことにより，同薬剤は *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌に対して 60.8%の客観的奏効率及び 9.7 カ月の progression-free survival (PFS) 中央値を示し[6]，2011 年に米国で，2012 年に日本で承認された。しかしながら，クリゾチニブが効果を示した患者において,獲得耐性により癌の再発が見られることが明らかになってきている[7-9]。特に，クリゾチニブに耐性を示した患者の腫瘍組織から同定された ALK の二次的変異や ALK 以外のシグナル経路の活性化による耐性メカニズムに加え[7-14]，肺癌の脳転移もクリゾチニブの再発患者から多く認められており[15]，現時点で *ALK*融合遺伝子肺癌においても治療ニーズが満たされていないと考えられる。

一方，我々は，優れた抗腫瘍効果を有し，安全性に優れた ALK 阻害剤の開発を目指して，ALK を強力かつキナーゼ選択的に阻害できる阻害剤の開発に着手した。まず，100 万以上の化合物ライブラリーを用いたキナーゼ阻害剤のハイスループットスクリーニングで見出されたヒット化合物の中から,化学構造の新規性や安全性など複数の視点で，独自性の高い四環性構造のリード化合物を選抜した。次に，ALK 阻害活性の増強，キナーゼ選択性の向上及び薬物動態を改善するため，リード化合物の誘導体を複数合成し，その中から ALK に対して選択的かつ強力な阻害活性を示し，クリゾチニブや他の ALK 阻害剤とは化学構造の異なる新規 ALK 阻害剤アレクチニブ（Figure 2）の創製に成功した。アレクチニブは *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌細胞に対して ALK のリン酸化を阻害することで抗腫瘍効果を示すことが明らかにされている[16]。これらの結果を踏まえ，アレクチニブは 2010 年に日本国内で *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌患者を対象に第Ⅰ/Ⅱ相試験を開始した。第Ⅱ相パートの 46 人の奏効率は 93.5%であり，忍容性も高い薬剤であることから[17]，アレクチニブは 2014 年 7 月には日本国内で *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌患者を対象にした治療薬として承認された。

本研究では，アレクチニブの特性をさらに理解するため，まずクリゾチニブ耐性モデ

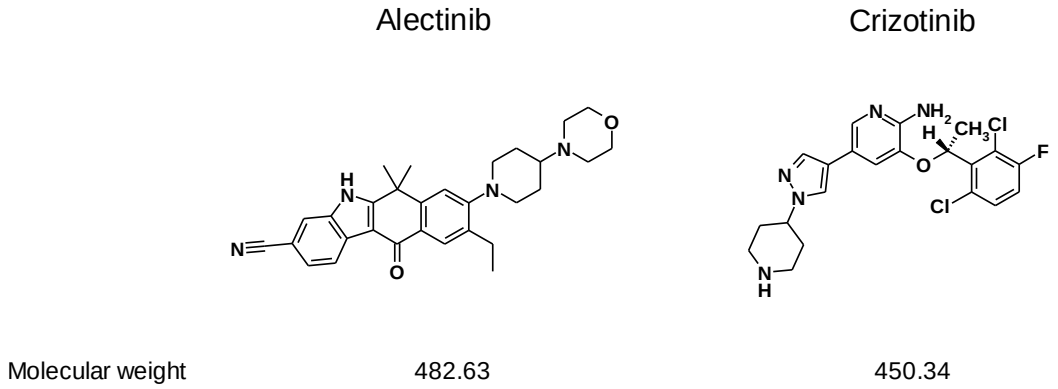

Figure 2. Chemical structures and molecular weights of alectinib and crizotinib.

ルに対するアレクチニブの効果を検証した。その結果，アレクチニブがクリゾチニブの耐性に関わる ALK 二次的変異を有するモデル及び脳転移モデルに対して，強い薬効を示すことが明らかになった。次に，*EML4-ALK* 融合遺伝子の形成メカニズムを理解するため，肺癌患者由来の *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌株を用いて染色体構造解析を行ったところ，この細胞株の *EML4-ALK* 融合遺伝子は，クロモトリプシス [18] と呼ばれる 1 回のゲノムイベントによる染色体の断片化・再結合により形成されていることが示唆され，その細胞株をマウスに移植したモデルに対してもアレクチニブは薬効を示すことが明らかになった。さらには，*EML4-ALK* 融合遺伝子と同様に，肺癌の原因遺伝子として考えられている *RET* 融合遺伝子 [19-21] を有する肺癌に対してアレクチニブが効果を示すかどうかを検証したところ，アレクチニブは *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌細胞と同様，*RET* 融合遺伝子陽性肺癌細胞に対しても RET のリン酸化を阻害することで強い薬効を示すことが明らかになった。

以上の研究成果は，これまでわかっていたアレクチニブの *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌に対する効果だけではなく，クリゾチニブに抵抗性を示す *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌や *RET* 融合遺伝子陽性肺癌における治療に対して貢献できるものであると考えられることから，博士論文としてまとめた次第である。

本論

第一章　クリゾチニブ耐性に対するアレクチニブの効果

本章では，臨床で報告されているクリゾチニブ耐性に関する薬効評価モデルを構築し，そのモデルに対するアレクチニブの効果について述べる。

第一節では，クリゾチニブ投与後の *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌モデルに対するアレクチニブの効果について，第二節では，クリゾチニブ耐性に関わる ALK 二次的変異を有するモデルに対するアレクチニブの効果について，第三節では，マウス頭蓋内に *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌を移植した肺癌の脳転移を模倣したモデルに対するアレクチニブの効果について述べる。

第一節　クリゾチニブ投与後の *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌モデルに対するアレチニブの効果

クリゾチニブは，*ALK* 融合遺伝子陽性肺癌に対して劇的な効果を示した一方[6]，同薬剤が効果を示した患者において，獲得耐性によって癌の再発が認められることが明らかになってきている[7]。そのため，クリゾチニブ投与後に効果が不十分だった *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌に対して，強い薬効を示す ALK 阻害剤が求められている。そこで，クリゾチニブの効果が不十分な *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌モデルに対して，アレクチニブにより強い薬効が期待できるかどうかを評価することにした。

まず，アレクチニブ及びクリゾチニブの最大薬効を評価するため，*EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌細胞株 NCI-H2228 をマウスの皮下に移植したモデルに対して，アレクチニブ及びクリゾチニブを投与し薬効を評価した。アレクチニブ 60 mg/kg を 1 日 1 回経口で 21 日間投与したところ，腫瘍の退縮及び完全奏効が確認され，投与終了後 4 週間後も腫瘍の増殖が認められなかった（Figure 3)。一方，クリゾチニブのマウスにおける最大耐用量（100 mg/kg）[22] を 1 日 1 回経口で 21 日間投与したところ，腫瘍の退縮は確認されたが，完全奏効には至らず腫瘍が静止状態になり，投与終了後は腫瘍の再増殖が認められた（Figure 3)。よって，クリゾチニブは，NCI-H2228 細胞をマウスの皮下に移植したモデルに対して十分な効果を示さなかったのに対し，アレクチニブはそのモデルに対して完全奏効が確認できるほどの強い薬効を示すことが確認された。

次に，クリゾチニブ を 21 日間投与した後の *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌モデルに対して，アレクチニブが効果を示すかどうかを評価した。その結果，クリゾチニブ投与 21 日後にアレクチニブ投与に変更した群では，クリゾチニブ投与を継続した群

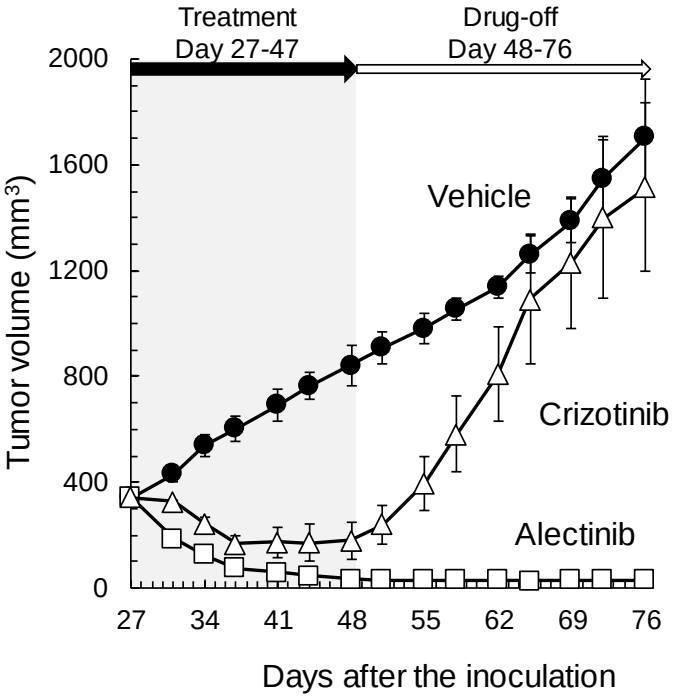

Figure 3. Antitumor activity of alectinib and crizotinib in a mouse xenograft model of NCI-H2228 harboring EML4-ALK. Mice bearing NCI-H2228 cells were orally treated with alectinib at 60 mg/kg or crizotinib at 100 mg/kg on a daily basis for 21 days (days 27–47). Then tumor volume was continuously measured during the treatment and the 4-week drug-free period that followed. Data are shown as mean ± SD (n = 5 per group).

に比べて，顕著な腫瘍縮小が認められた（Figure 4A)。クリゾチニブを 21 日間投与した腫瘍においては，ALK キナーゼドメインに変異は認められなかった（data not shown)。このことから，クリゾチニブ投与後の効果が不十分だった *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌に対してもアレクチニブは，強い薬効を示すことが示唆された。

アレクチニブ及びクリゾチニブの薬効の違いを理解するため，NCI-H2228細胞をマウスの皮下に移植したモデルに対して，両薬剤をそれぞれ投与しアポトーシス誘導能を比較した。アレクチニブ及びクリゾチニブいずれにおいても，アポトーシスのマーカーであるPARPの切断が確認されたが，アレクチニブのほうがその切断が顕著にみられたことから（Figure 4B)，アレクチニブはクリゾチニブに比べてアポトーシス誘導能が高いと考えられた。

以上のことから，アレクチニブは，クリゾチニブを投与した後の *EML4-ALK*融合遺伝子陽性肺癌モデルに対して強い薬効を示し，また高いアポトーシス誘導能を示すこと

が示唆された。したがって，臨床において，アレクチニブは，*ALK*融合遺伝子陽性肺癌を有するクリゾチニブ耐性患者及びクリゾチニブ未治療の患者に対してより効果の持続性のある薬剤である可能性があり，臨床試験の結果が期待される。

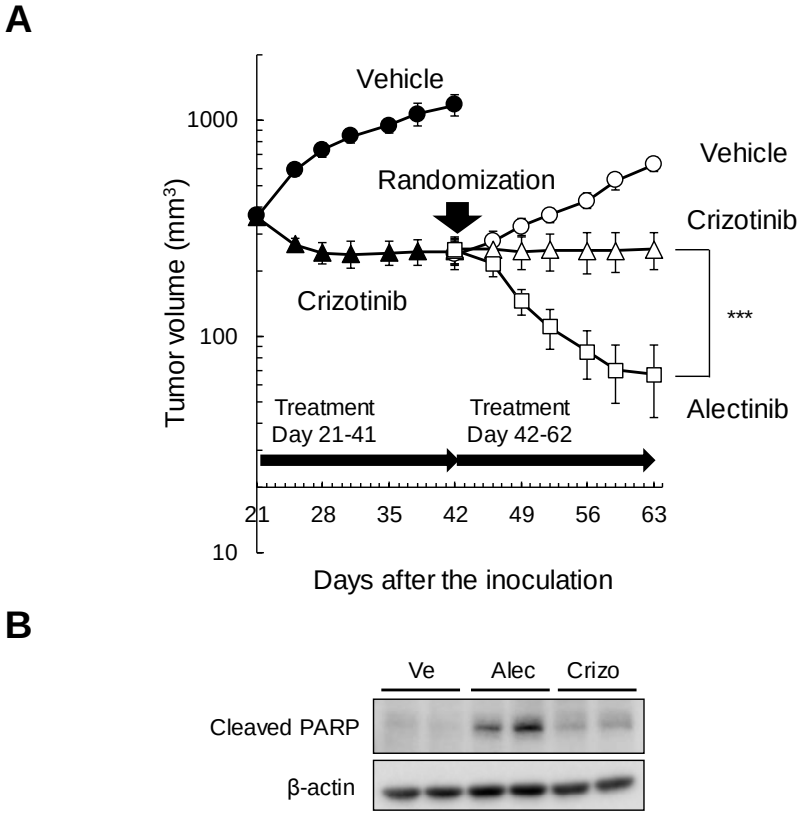

Figure 4. Efficacy of alectinib against tumors remaining after treatment with crizotinib. (A) Mice bearing NCI-H2228 cells were orally treated with crizotinib at 100 mg/kg on a daily basis for 21 days and then randomized. After randomization, the mice were orally treated with vehicle, alectinib at 60 mg/kg, or crizotinib at 100 mg/kg on a daily basis for 21 days. Parametric Dunnett's test: ***, $p < 0.001$, treatment with alectinib versus crizotinib at final day (n = 5 per group). (B) Apoptosis-inducing ability of alectinib. Mice bearing alectinib cells were orally treated with a single dose of vehicle, alectinib at 60 mg/kg, or crizotinib at 100 mg/kg and the tumors were collected and lysated at 6 h post-dosing. Cleavage of PARP and ß-actin were detected by immunoblot analysis using antibodies against each of them (n = 2 per group).

第二節　クリゾチニブ耐性に関わる ALK 二次的変異に対するアレクチニブの効果

クリゾチニブの臨床試験において奏効した後に再発した非小細胞肺癌患者の癌検体を用いた遺伝子解析から，ALK 二次的変異である ALK L1196M，G1269A，F1174L，L1152R，1151Tins，S1206Y，C1156Y 及び G1202R が同定されたことから，これらの ALK 二次的変異はクリゾチニブ耐性に関わると考えられる（Table 1）[7-14]。アレクチニブは，他の ALK 阻害剤であるクリゾチニブや NVP-TAE684 と化学構造が異なり，ALK のキナーゼドメインに他の ALK 阻害剤と異なる様式で結合している（Figure 5）。そこで，本研究ではクリゾチニブ耐性に関わる ALK 二次的変異に対して，アレクチニブが効果を示すかどうかを評価することにした。まず，これらの ALK 二次的変異を有する ALK タンパク質を用いたアレクチニブの酵素阻害活性を調べたところ，ALK L1196M，G1269A，F1174L，L1152R，1151Tins 及び C1156Y に対しては変異をもたない ALK と同じ程度の高い酵素阻害活性が認められたが，ALK G1202R に対しては阻害活性の減弱が見られた（Figure 6）。次に，アレクチニブの *EML4-ALK* 融合遺伝子発現細胞に対する増殖阻害活性を評価するため，マウスプロ B 細胞株 Ba/F3 細胞に野生型の *EML4-ALK* 融合遺伝子及び ALK 二次的変異（L1196M，G1269A，F1174L，1151Tins，S1206Y，C1156Y あるいは G1202R）を有する *EML4-ALK* 融合遺伝子をそれぞれ遺伝子導入した安定発現細胞株を作製した。親株の Ba/F3 細胞は IL-3 依存的な細胞増殖を示したのに対し，野生型及び変異型 *EML4-ALK* 融合遺伝子を導入した Ba/F3 細胞は，IL-3 非依存的な増殖を示したことから，これらの作製した細胞株は，*EML4-ALK* 融合遺伝子に依存して増殖することが示唆された（data not shown）。

Table 1. The total number of ALK secondary mutations in patients with crizotinib resistance

ALK mutation	Total number of patients	Reference
L1196M (Gatekeeper mutation)	9	Choi et al., Katayama et al., Doebele et al., Kim et al., Huang et al., & Gainor et al.
G1269A	7	Katayama et al., Doebele et al., Kim et al., Huang et al., & Gainor et al.
C1156Y	2	Choi et al., & Huang et al.
F1174L	1	Camidge et al.
1151Tins	1	Katayama et al.
L1152R	1	Sasaki et al.
G1202R	1	Katayama et al.
S1206Y	1	Katayama et al.

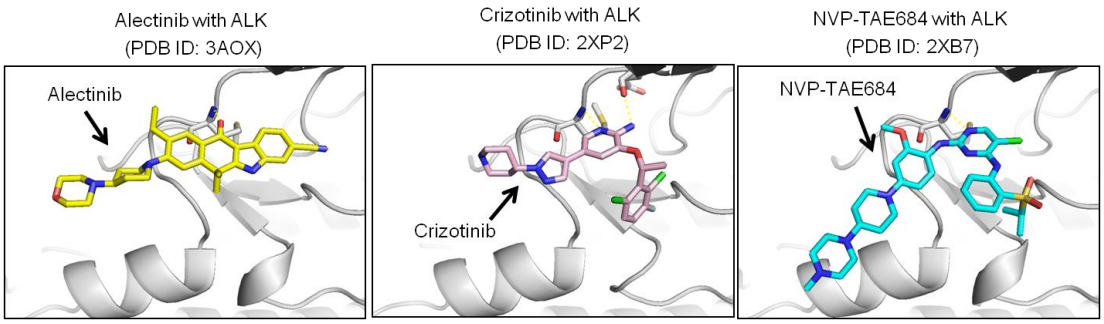

Figure 5. X-ray structure of alectinib with ALK (PDB ID: 3AOX), crizotinib with ALK (PDB ID: 2XP2), and NVP-TAE684 with ALK (PDB ID: 2XB7). Alectinib (C in yellow), crizotinib (C in pink), and NVP-TAE684 (C in aqua) are shown in stick form. Figures were drawn using PyMol software (Schrödinger K.K.).

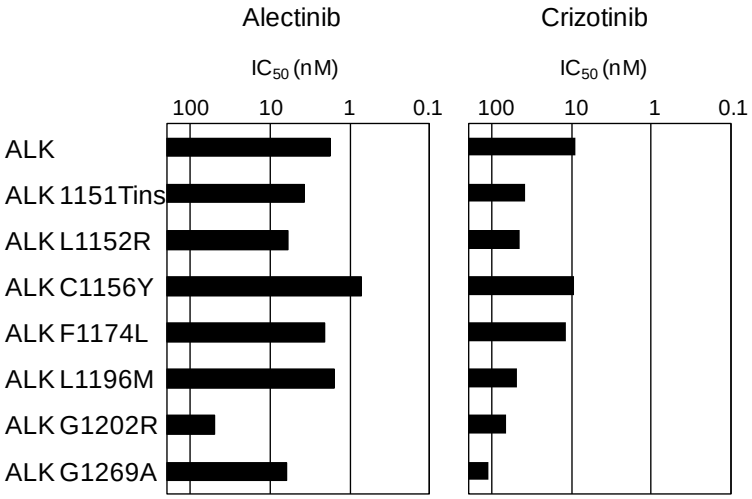

Figure 6. Kinase inhibitory activity of alectinib or crizotinib against ALK mutants. The *in vitro* kinase inhibitory assays of purified native ALK (amino acids 1081–1410), 1151Tins, L1152R, C1156Y, F1174L, L1196M, G1202R, and G1269A fused to GST in the presence of alectinib or crizotinib were carried out as described in Materials and Methods.

これらの Ba/F3 細胞に対して，アレクチニブの細胞増殖阻害活性を評価したところ，アレクチニブは，野生型あるいは ALK 二次的変異を有する *EML4-ALK* 融合遺伝子を導入した Ba/F3 細胞に対し，ALK G1202R を除いて高い感受性を示した（Figure 7）。薬剤処理したこれらの細胞株の ALK のリン酸化を調べたところ，ALK のリン酸化の抑制効果は細胞増殖阻害活性の結果と一致した（Figure 8, 9）。さらに，ALK 二次的変異を有する癌に対するアレクチニブの抗腫瘍効果を，樹立した変異型 *EML4-ALK* 融合遺伝子を発現する Ba/F3 細胞株（ALK L1196M, G1269A, 1151Tins, F1174L, S1206Y 及び G1202R）をマウスの皮下に移植したモデルを用いて評価した。クリゾチニブ耐性変異として最も報告の多い ALK L1196M（Table 1）を有するモデルに対して，アレクチニブは強い薬効を示し，クリゾチニブは効果を示さなかった（Figure 10）。

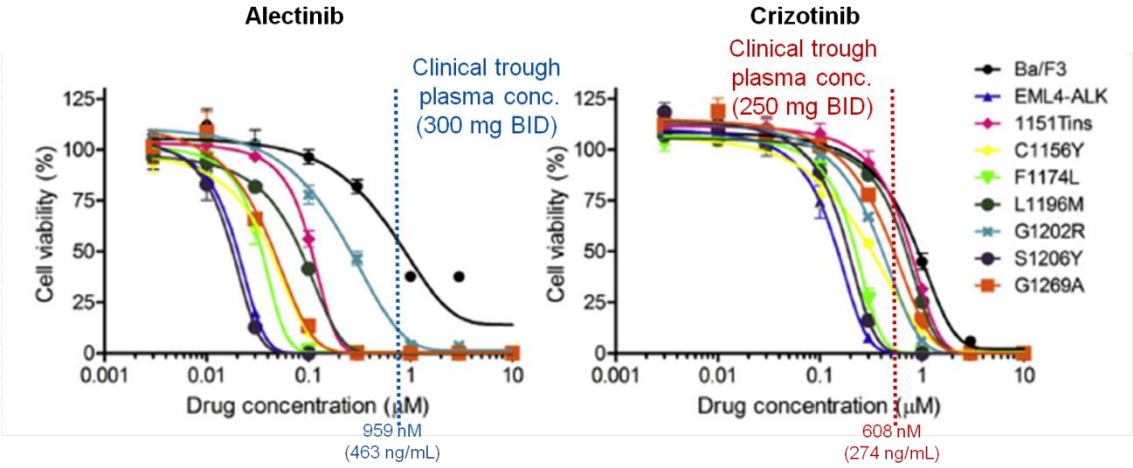

Figure 7. Growth inhibition of alectinib or crizotinib against EML4-ALK mutant-driven Ba/F3 cells. Cells were seeded and then treated with various concentrations of alectinib or crizotinib for 2 days. The viable cells were measured by a CellTiter-Glo luminescent cell viability assay. Data are shown as mean ± SD (n = 3).

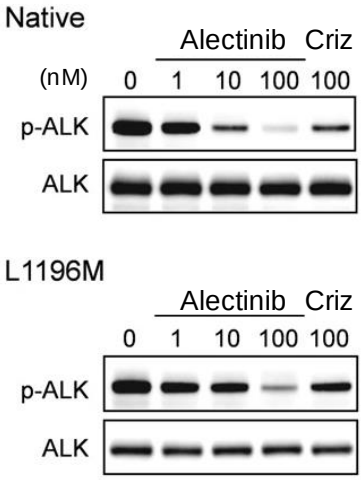

Figure 8. Inhibition of ALK phosphorylation by alectinib in the Ba/F3 cell lines expressing EML4-ALK L1196M. Cells were treated with alectinib or crizotinib for 2 h at the indicated concentrations. Phosphorylated ALK (Tyr 1604) and ALK were detected by immunoblot analysis using antibodies to each of them.

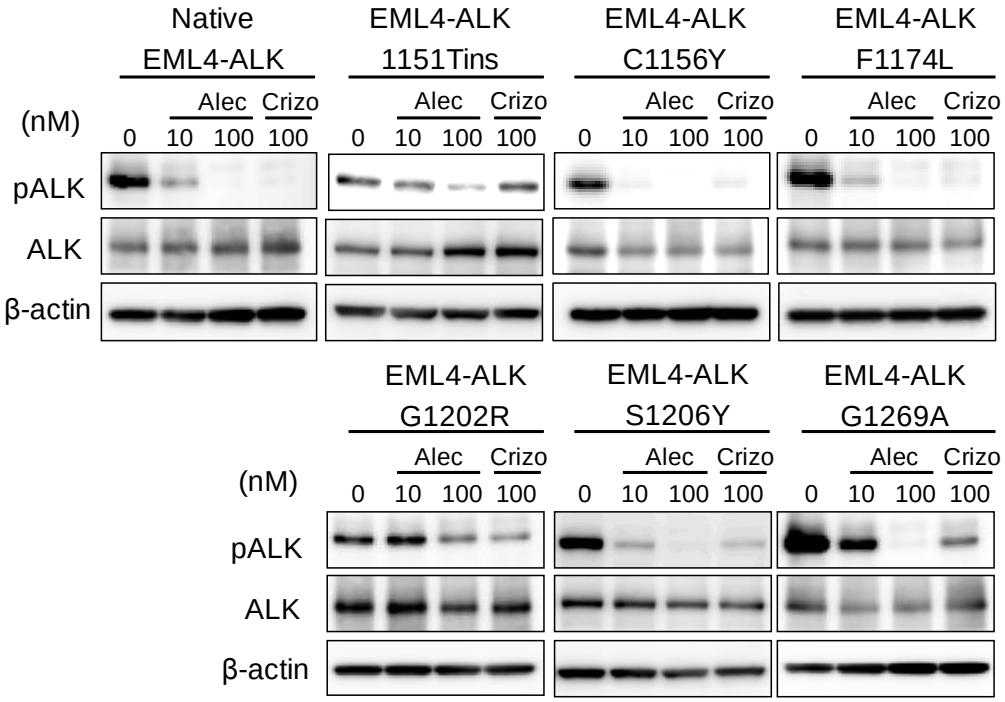

Figure 9. Inhibition of ALK phosphorylation by alectinib in the Ba/F3 cell lines expressing mutated EML4-ALK. Cells were treated with alectinib or crizotinib for 2 h at the indicated concentrations. Phosphorylated ALK (Tyr 1604), ALK, and β-actin were detected by immunoblot analysis using antibodies to each of them.

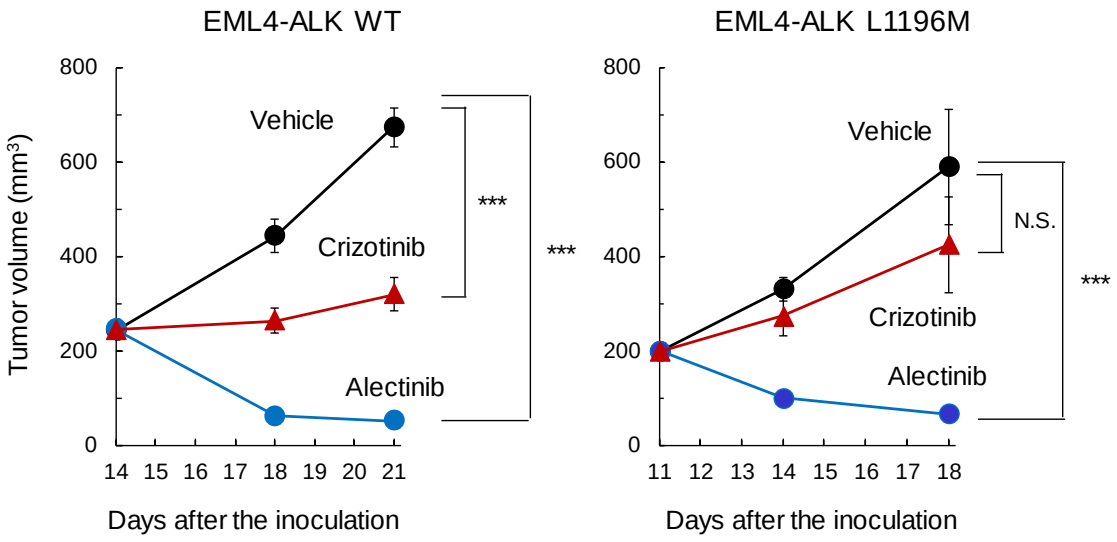

Figure 10. Antitumor activity of alectinib against EML4-ALK L1196M-driven tumors in a subcutaneous mouse model. Mice bearing Ba/F3-EML4-ALK WT or EML4-ALK-L1196M were treated with vehicle, alectinib, or crizotinib orally once daily for 7 days. Tumor volume for each dose group was measured. Data are shown as mean ± SD (n = 5 per group). Parametric Dunnett's test: ***, $p < 0.001$; N.S., not significant, versus vehicle treatment at final day.

ALK L1196M は，キナーゼのゲートキーパーに位置するアミノ酸残基の変異（ゲートキーパー変異）であり，ゲートキーパー変異は，キナーゼ阻害剤の獲得耐性メカニズムとしてよく知られている。例えば，ゲートキーパー変異である EGFR T790M[23] 及び ABL T315I[24] は，それぞれ EGFR 阻害剤や ABL 阻害剤の耐性変異として知られており，薬剤がこれらのゲートキーパー変異に対して阻害活性を示すことが，長く治療効果を維持するためにも重要であると考えられる（Figure 11）。そこで，アレクチニブがゲートキーパー変異 ALK L1196M に対して阻害効果を示した理由を明らかにするため，アレクチニブと ALK との共結晶（PDB ID: 3AOX）から，両者の結合様式を確認した。その結果，アレクチニブの 3 位シアノ基と ALK L1196 とが効果的な CH/π 相互作用をしていることが観察された（Figure 12）。また，この共結晶を基にした *in silico* モデルの解析により，ALK L1196M においてもこの効果的な CH/π 相互作用が維持されていることが示唆された（Figure 13）。一方，クリゾチニブにおいては，*in silico* モデルにおける ALK L1196M とクリゾチニブとの効果的な相互作用は認められなかった。よって，効果的な相互作用の維持により，アレクチニブが ALK のゲートキーパー変異である ALK L1196M に対して阻害活性を示すことが推察された。

Gatekeeper residue

ALK	L	P	R	F	I	L	L (1196)	E	L	M	A	G	G
ABL	P	P	F	Y	I	I	T (315)	E	F	M	T	Y	G
EGFR	S	T	V	Q	L	I	T (790)	Q	L	M	P	F	G
KIT	G	P	T	L	V	I	T (670)	E	Y	C	C	Y	G

Figure 11. Alignment of sequences around the gatekeeper regions of ALK and other protein tyrosine kinases. The amino acid sequences around the gatekeeper region of ALK, ABL, EGFR, and KIT were compared.

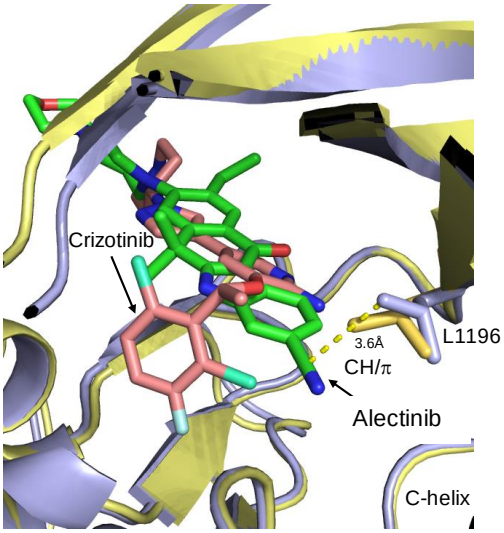

Figure 12. Superposition of alectinib-ALK and crizotinib-ALK (PDB ID 2XP2). The superposition was based on the Ca positions of the two complexes. Protein cartoon diagrams of alectinib complex are in light blue, and crizotinib is in pale yellow. Crizotinib molecule as a stick model (C in pink) is overlaid on alectinib. In each complex, L1196 is shown as a stick model.

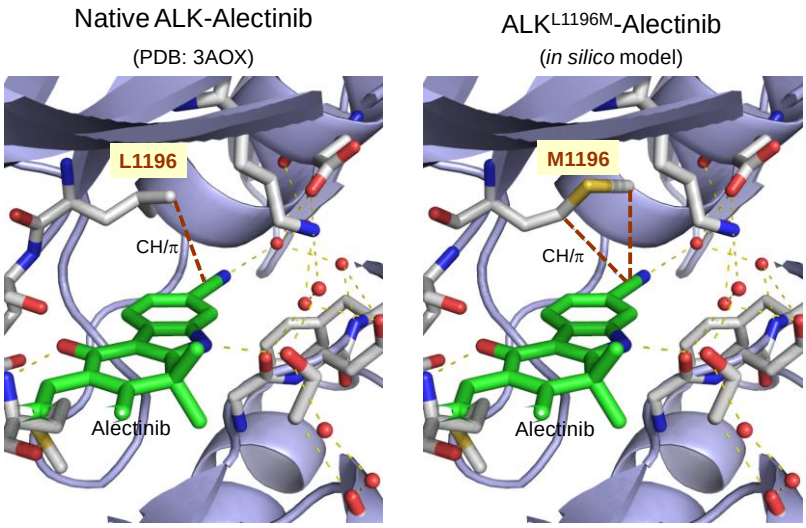

Figure 13. Superpositions of alectinib on ALK L1196M. The structure model of ALK L1196M with alectinib was generated from ALK with alectinib (PDB ID: 3AOX) using Discovery Studio 3.5 (Accelrys).

また，クリゾチニブ耐性変異として 2 番目に報告の多い ALK G1269A (Table 1) を有するマウスモデルに対しても，アレクチニブは強い薬効を示し，クリゾチニブは効果を示さなかった (Figure 14A)。一方，酵素阻害及び細胞増殖阻害実験でのアレクチニブの阻害効果が弱かった ALK G1202R を有するマウスモデルに対して，アレクチニブは顕著な薬効を示さなかった (Figure 14A)。薬剤投与後のこれらのモデルの腫瘍をウエスタンブロッティングにより解析したところ, ALK の下流因子である STAT3 のリン酸化の抑制効果は，抗腫瘍効果の結果と一致した (Figure 14B)。ALK G1269A を有するマウスモデルに対してアレクチニブが効果を示し，ALK G1202R を有するマウスモデルに対してアレクチニブが効果を示さなかった理由を調べるため，ALK とアレクチニブの共結晶を基にした *in silico* モデル解析を行った。その結果，アレクチニブは ALK G1269A に対して立体障害の影響を受けない一方, クリゾチニブはその影響を受けることが推察された (Figure 15)。また，ALK G1202R に対しては，アレクチニブを含む ALK 阻害剤は立体障害の影響を受けることが推察され (Figure 16), そのためアレクチニブ及びクリゾチニブは抗腫瘍効果を示さなかったと考えられる。さらには，ALK 1151Tins, F1174L 及び S1206Y を有するマウスモデルにおいてもアレクチニブは強い薬効を示した (Figure 17)。これらのことから，アレクチニブは現在までに同定されている大多数のクリゾチニブ耐性変異を有する癌に対しても抗腫瘍効果を示すことが示

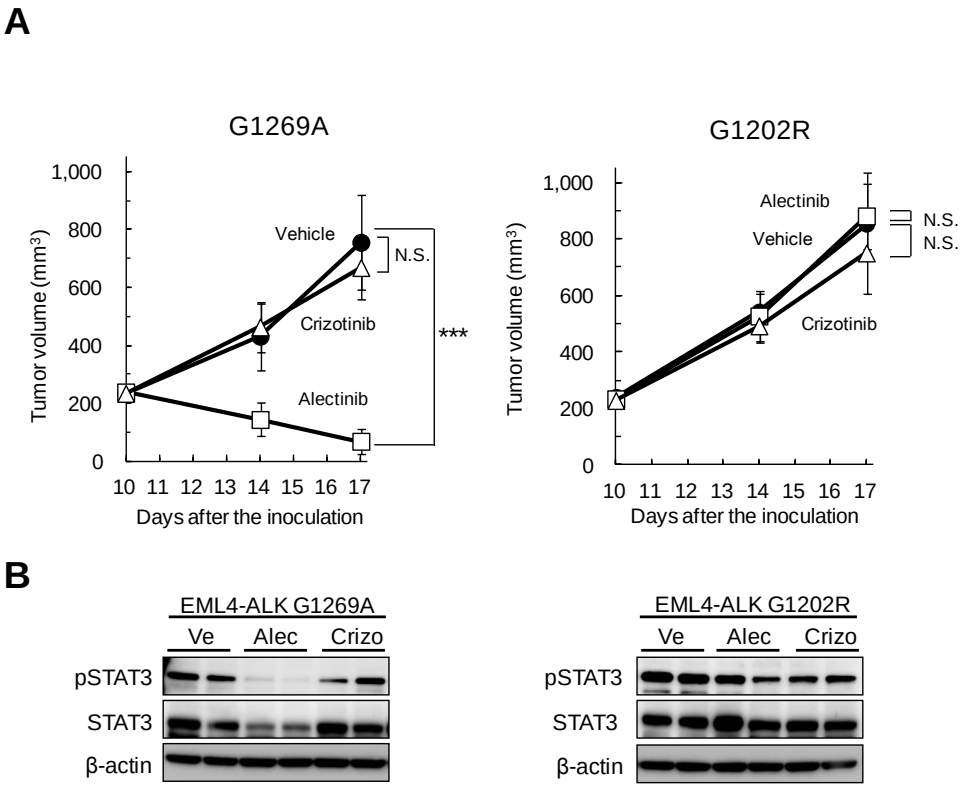

Figure 14. Antitumor activity of alectinib against EML4-ALK mutant-driven tumors in a subcutaneous mouse model. (A) Mice bearing Ba/F3-EML4-ALK G1269A, or -EML4-ALK G1202R were treated with vehicle, alectinib, or crizotinib orally once daily for 7 days. Tumor volume for each dose group was measured. Data are shown as mean ± SD (n = 5 per group). Parametric Dunnett's test: ***, $p < 0.001$; N.S., not significant, versus vehicle treatment at final day. (B) Pharmacodynamic response of EML4-ALK mutant-driven tumors to alectinib. Mice bearing Ba/F3-EML4-ALK G1269A, or -EML4-ALK G1202R were orally treated with a single dose of vehicle, alectinib, or crizotinib, and the tumors were collected and lysated at 4 h post-dosing. Phosphorylated STAT3 (Tyr 705), STAT3, and β-actin were detected by immunoblot analysis using antibodies against each of them (n = 2 per group).

唆された。現在，クリゾチニブに抵抗性を示す *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌患者に対するアレクチニブの臨床試験が進められており，55%の奏効率を示しているが [25]、現時点で奏効した患者における ALK 二次的変異の有無はわかっていない。今後，アレクチニブは ALK 二次的変異を有するクリゾチニブに耐性を示す患者に対しても臨床で効果を示す可能性があり，今後の臨床試験が期待される。

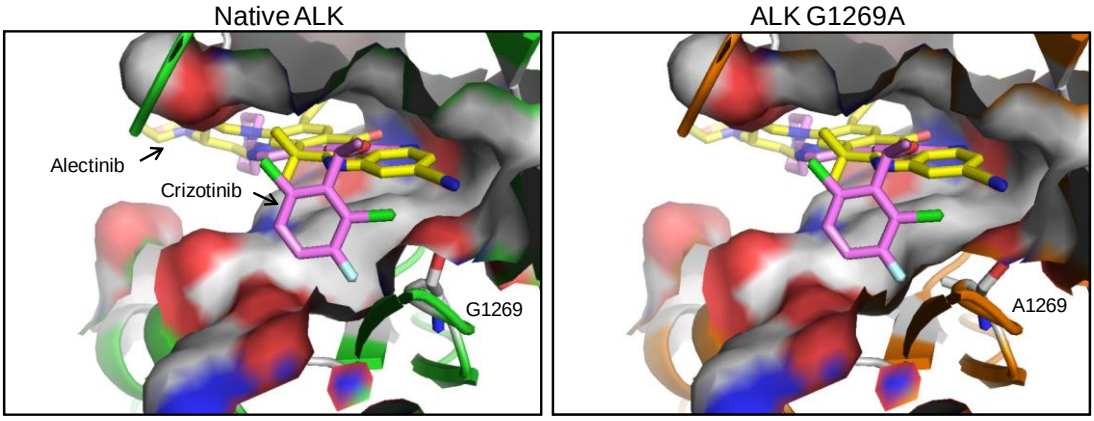

Figure 15. Superpositions of crizotinib and alecinib on ALK G1269A. ALK G1269A mutation was modeled by Discovery Studio 3.5 (Accelrys) and figures were drawn using PyMol software. The superposition was based on the Ca positions of the three complexes. Protein cartoon diagrams show crizotinib in pink and alectinib in yellow. Alectinib as a stick model (C in pink) is overlaid on ALK–crizotinib (PDB ID: 2XP2). ALK is shown as a surface model and both G1269 and A1269 are shown as a stick model.

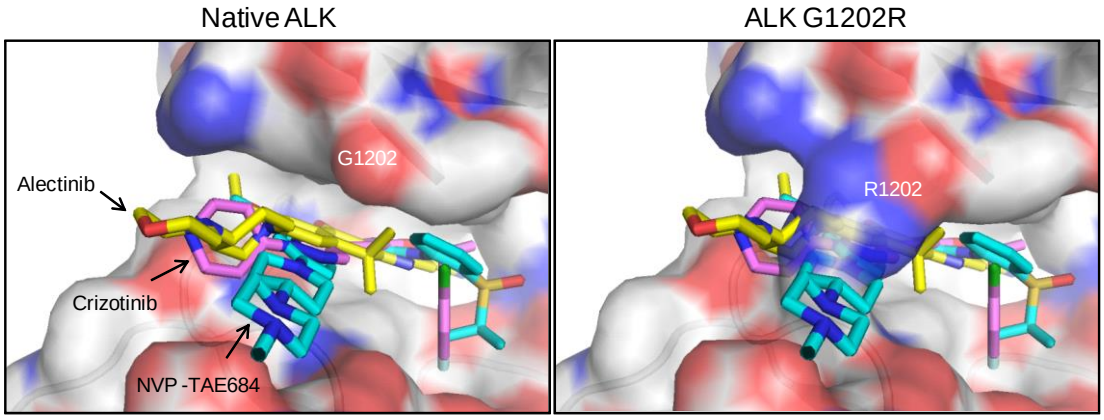

Figure 16. Superpositions of crizotinib, alectinib, and NVP-TAE684 on ALK G1202R. ALK G1202R mutation was modeled by Discovery Studio 3.5 and figures were drawn using PyMol software. The superposition was based on the Ca positions of the three complexes. Protein cartoon diagrams show crizotinib in pink, alectinib in yellow, and NVP-TAE684 in blue. Crizotinib and NVP-TAE684 as a stick model (C in pink) is overlaid on ALK–alectinib (PDB ID: 3AOX). ALK is shown as a surface model.

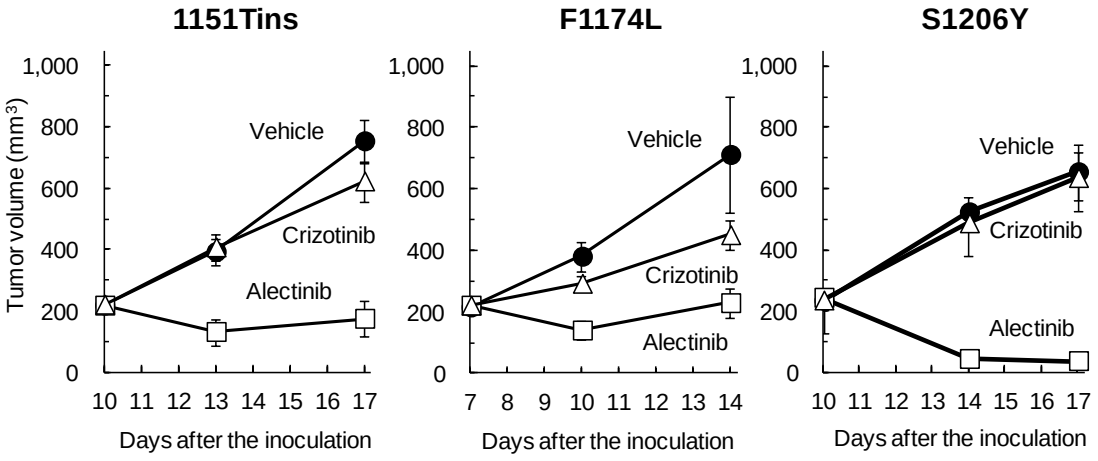

Figure 17. Antitumor activity of alectinib against EML4-ALK mutant-driven tumors in a subcutaneous mouse model. Mice bearing Ba/F3-EML4-ALK 1151Tins, -EML4-ALK F1174L, and -EML4-ALK S1206Y were treated with vehicle, alectinib, or crizotinib orally once daily for 7 days. Tumor volume for each dose group was measured. Data are shown as mean ± SD (n = 5 per group).

第三節　脳転移モデルに対するアレクチニブの効果

脳転移は 25-38%の非小細胞肺癌患者において出現し，また予後不良と相関することが報告されている[26, 27]。また，クリゾチニブの臨床試験において，46%の *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌患者の初発転移先が脳であると示されている[15]。その原因としてクリゾチニブは central nervous system (CNS) への移行性が低いこと[28]，ALK に対する阻害活性が低いことが考えられる (Figure 3)。そこで，アレクチニブの肺癌の脳転移に対する効果を予測するため，脳転移を模倣した薬効モデルとして，マウス頭蓋内に恒常的にルシフェラーゼを発現させた *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性細胞株 NCI-H2228 を移植したモデルを構築した。このモデルに対して，アレクチニブを経口で 4 日間投与し発光をモニターしたところ，顕著な癌の縮小がみられたが，コントロール群やクリゾチニブ投与群では顕著な薬効を示さなかった (Figure 18)。また，マウス頭蓋内に NCI-H2228 細

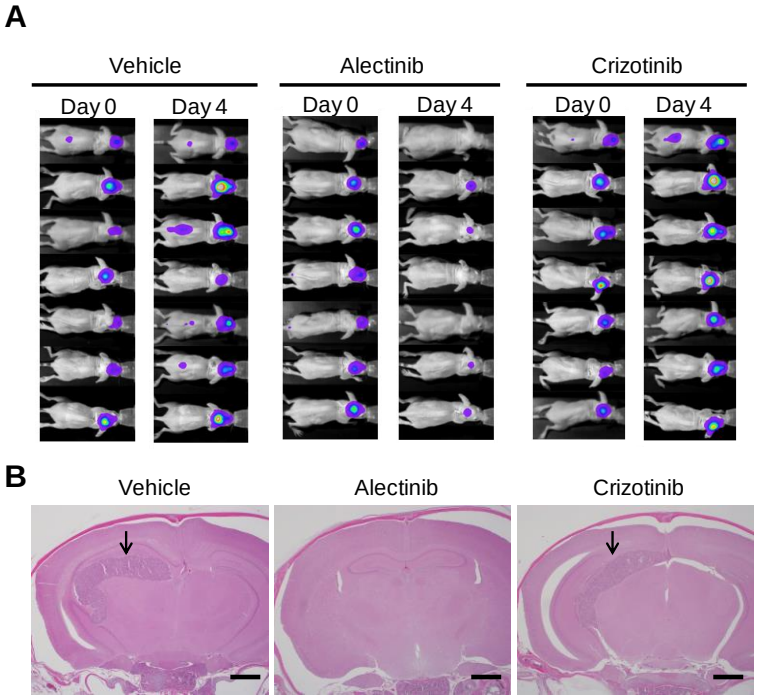

Figure18. Antitumor activity of alectinib in an intracranial tumor implantation mouse model. (A) Bioluminescent images after treatment with vehicle, alectinib, or crizotinib. Nude mice bearing intracranial luciferase-expressing NCI-H2228 cells were monitored live by a luciferase imaging system after oral once daily treatment with vehicle, alectinib at 60 mg/kg, or crizotinib at 100 mg/kg for 4 days. (B) Tumor burden was evaluated by H&E staining on day 4. Vertical arrows indicate the portion of tumor tissue developed in cerebrum. The length of horizontal lines shows 1 mm.

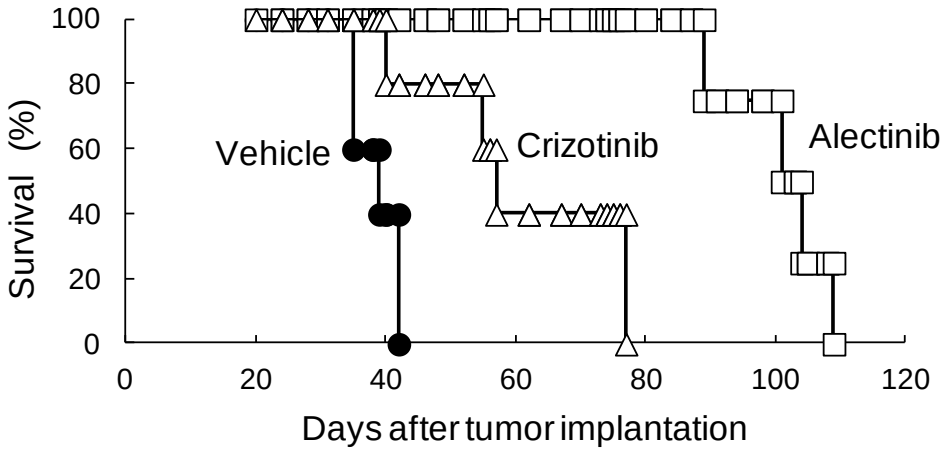

Figure 19. Prolonged survival by alectinib in mice with intracranial EML4-ALK-positive tumors. Kaplan-Meier plot shows the survival rate after intracranial implantation of NCI-H2228 cells. SCID mice bearing intracranial NCI-H2228 cells were orally treated once daily with vehicle (n = 5), crizotinib at 100 mg/kg (n = 5), or alectinib at 60 mg/kg (n = 4) from day 20 until death or to day 45. Statistical analyses were performed using log-rank test.

胞を移植したモデルに対して，薬剤を経口で 26 日間投与したところ，コントロール群(生存期間の中央値: 39 日）やクリゾチニブ投与群（57 日）に比べて，アレクチニブ投与群（103 日）では顕著な生存期間の延長が見られた（Figure 19)。以上のことから，アレクチニブは，*EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌を頭蓋内に移植したモデルに対して強い薬効を示すことが示唆された。

次に、抗癌剤の脳移行性が，脳転移に対する薬剤の効果に影響を及ぼす可能性が考えられるため，アレクチニブの脳移行性を評価した。放射性同位体で標識したアレクチニブ（^{14}C アレクチニブ) 1 mg/kg をラットに経口投与し，血漿，大脳及び小脳における薬剤濃度を測定したところ，大脳では投与後 8 時間後，小脳では投与後 12 時間後にアレクチニブの濃度が最大になった。その時点での血漿におけるアレクチニブ濃度に対する大脳及び小脳におけるアレクチニブ濃度の比はそれぞれ 0.94 及び 0.63 であり，いずれの組織においても高い比率を示したことから，アレクチニブは脳移行性があると考えられた（Figure 20)。薬剤の脳移行性は，薬剤の分子量，疎水性及びタンパク質結合率など様々な要因が影響すると考えられているが，血液脳関門に存在する膜タンパク質 P-glycoprotein (P-gp) は薬剤排出に関わっていることが良く知られている [29]。そこで，ア

レクチニブが P-gp の基質になるかどうかを評価するため，P-gp を発現している Caco-2 細胞を用いた両方向性トランスウェルアッセイにより efflux ratio を算出した。P-gp の基質であるジコキシンでは efflux ratio が 8.01 であり，P-gp 阻害剤ベラパミルを加えるとその ratio が 1.18 に減少した。一方アレクチニブでは，ベラパミルの有無で，efflux ratio がそれぞれ 1.32 及び 1.09 といずれにおいても小さかった（Figure 21）。FDA の基準では，efflux ratio が 2 以上で P-gp の基質として考えられていることから[30]，アレクチニブは P-gp の基質ではないと考えられた。以上より，アレクチニブは P-gp の基質にならないことから脳への移行性が高く，*ALK* 融合遺伝子陽性肺癌をマウスの脳に移植したモデルに対しても効果を示すことが示唆された。最近の知見において，アレクチニブは，クリゾチニブ再発後の脳転移を有する患者に対しても薬効を示し，また薬剤の脳移行性が高いことも確認されていることから[25]，臨床での肺癌脳転移に対する効果が期待されており，今後の動向に注目が集まっている。しかしながら，臨床における脳転移では，血液脳関門が破壊されているとの報告もあることから，ALK 阻害剤の脳転移に対する効果は，P-gp の基質にならないことだけではなく，別の要因が関与している可能性もあることから，今後詳細に調べていく必要がある。

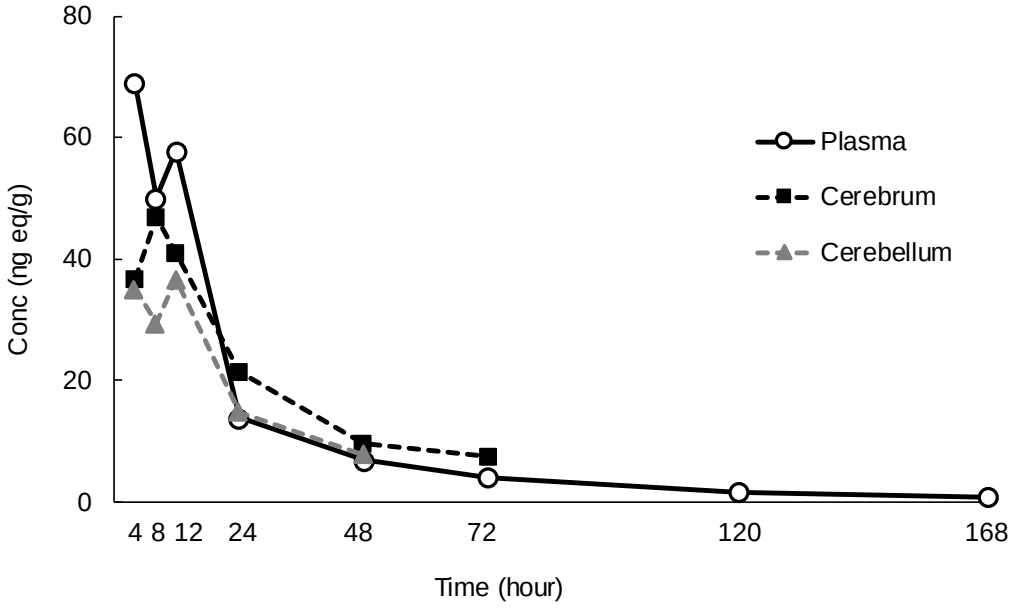

Figure 20. Brain permeability of alectinib in a rat. The radioactivity concentration in the plasma, cerebrum, and cerebellum after oral administration of ^{14}C-labeled alectinib at 1 mg/kg to one rat. The radioactivity concentration in tissues was quantified at 4, 8, 12, 24, 48, 72, 120, and 168 h after administration.

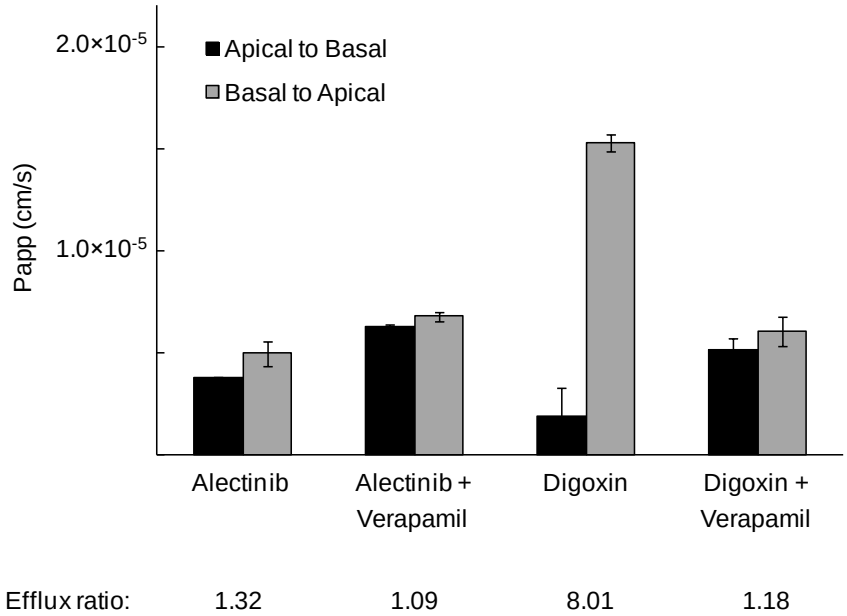

Figure 21. Bi-directional transport assay of alectinib in Caco-2 cells grown on Transwell . The apparent permeability coefficient values and efflux ratio of ^{14}C-labeled alectinib (1 μM) and ^{3}H-labeled digoxin (1 μM) in Caco-2 cells in the absence or presence of the P-gp inhibitor verapamil (100 μM) are shown. The permeability of directional transport from apical to basal is shown by black columns and from basal to apical was shown by the grey columns. Data are expressed as the mean ± SD (n = 3).

第四節　小括

本章では, 臨床で報告されているクリゾチニブ耐性に対するアレクチニブの克服可能性を検証するため, クリゾチニブ耐性を模倣したモデルに対するアレクチニブの効果を調べた。

まず，*EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌細胞株 NCI-H2228 をマウスの皮下に移植したモデルに対して，アレクチニブは腫瘍退縮及び完全奏効を示し，投与終了後も腫瘍の増殖が認められなかった。一方，クリゾチニブはそのモデルの腫瘍退縮を示したが，完全奏効には至らず，投与終了後には腫瘍の再増殖が認められた。クリゾチニブ投与後の効果が不十分であった腫瘍に対して, アレクチニブは腫瘍を退縮させるほどの顕著な薬効を示すことが明らかにとなり, その理由はアレクチニブのアポトーシス誘導能の高さによると考えられた。

次に，クリゾチニブ耐性に関わる ALK 二次的変異を有するモデルに対して，アレクチニブの薬効を評価したところ, アレクチニブは大多数のクリゾチニブ耐性変異を有する肺癌モデルに対しても抗腫瘍効果を示すことが示唆された。しかし, ALK G1202R に対しては，アレクチニブは顕著な薬効を示さないことが確認された。

さらに，脳転移を模倣した薬効モデルとして，マウス頭蓋内に *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性細胞株 NCI-H2228 を移植したモデルを構築しアレクチニブの薬効を評価したところ，アレクチニブ投与により，クリゾチニブ投与と比較して顕著な癌の縮小及び生存期間の延長が認められた。その理由としては，アレクチニブは，血液脳関門において薬剤排出に関わる P-gp の基質にならないことから，脳への移行性が高いことが考えられた。

以上のことから，アレクチニブは，クリゾチニブ耐性に関わるマウスモデルに対して効果を示すことが示唆されたことから，臨床において ALK 二次的変異や脳転移を有するクリゾチニブ耐性患者に対しても持続的な効果を示す可能性があり，期待される。

第二章　新規 *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌株に対するアレクチニブの効果

本章では，新規 *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性細胞株を樹立し，その細胞株の ALK 発現などのプロファイリング及びその細胞株に対するアレクチニブの効果について述べる。

第一節では，肺癌患者由来の新規 *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性細胞株のプロファイリングについて，第二節では，樹立した *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性細胞株に対するアレクチニブの効果について述べる。

第一節　肺癌患者由来の新規 *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性細胞株のプロファイリング

EML4-ALK 融合遺伝子陽性の肺癌患者が肺癌の約 4-7%程度ほどしかおらず [1,3]，そ

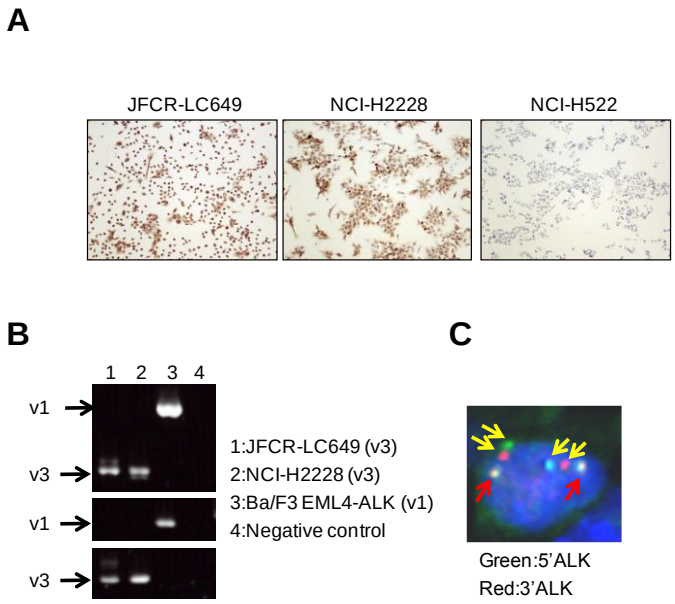

Figure 22. Characterization of patient-derived cell line JFCR-LC649. (A) In IHC analysis for ALK, both JFCR-LC649 and NCI-H2228 cells were positive for ALK. NCI-H522 cells were used as a negative control. (B) In EML4-ALK fusion-specific RT-PCR, JFCR-LC649 cells expressed EML4-ALK variant 3. NCI-H2228 cells harboring EML4-ALK variant 3, Ba/F3 cells transfectant EML4-ALK variant 1, and water as a negative control were used. (C) In the ALK break-apart FISH assay, separate 3'ALK signals (red) and 5'ALK signals (green) individually existed, indicating that JFCR-LC649 cells harbored ALK rearrangement. JFCR-LC649 cells contained two ALK fusion-positive chromosome 2 (indicated with yellow arrows) and two ALK fusion-negative chromosome 2 (indicated with red arrows).

れに伴い，非臨床で ALK 阻害剤の薬効を評価できる癌細胞株が少ない。そこで，新規 *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌細胞株を樹立し，その株の特徴を理解することにした。まず，化学療法未治療の *ALK* 融合遺伝子陽性の非小細胞肺癌患者（非喫煙者，女性）の手術検体から樹立した JFCR-LC649 細胞株を用いて，ALK タンパク質発現解析を試みた。抗 ALK 抗体を用いた immunohistochemistry（IHC）解析において JFCR-LC649 細胞株は NCI-H2228 細胞株と同様に ALK タンパク質を発現していることが確認された（Figure 22A）。*EML4-ALK* 融合遺伝子は融合点の異なる複数のバリアント（バリアント 1，2，3 など）[31] や *KIF5B-ALK* 融合遺伝子のように融合相手の異なる融合遺伝子 [32] も同定され報告されていることから，RT-PCR 及び遺伝子配列解析によりこの細胞株の *ALK* 融合遺伝子の種類の同定を試みた。その結果，JFCR-LC649 細胞株は，NCI-H2228 細胞株と同様に *EML4-ALK* 融合遺伝子バリアント 3 を発現していることが確認された（Figure 22B）。また，ALK break apart fluorescent in situ hybridization（FISH）法によりこの細胞株は *ALK* 融合遺伝子陽性であることに加え，*ALK* 遺伝子増幅を有することが示された（Figure 22C）。また，この細胞株の comparative genomic hybridization（CGH）解析により，*ALK* の遺伝子増幅の再確認に加えて，*ALK* 遺伝子

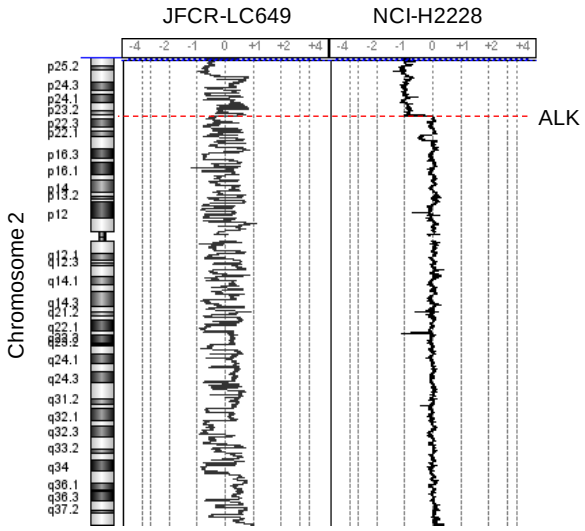

Figure 23. 244K array-based CGH analysis shows the ALK copy number gain and distinct chromosomal pattern in chromosome 2 of JFCR-LC649 and NCI-H2228 cells.

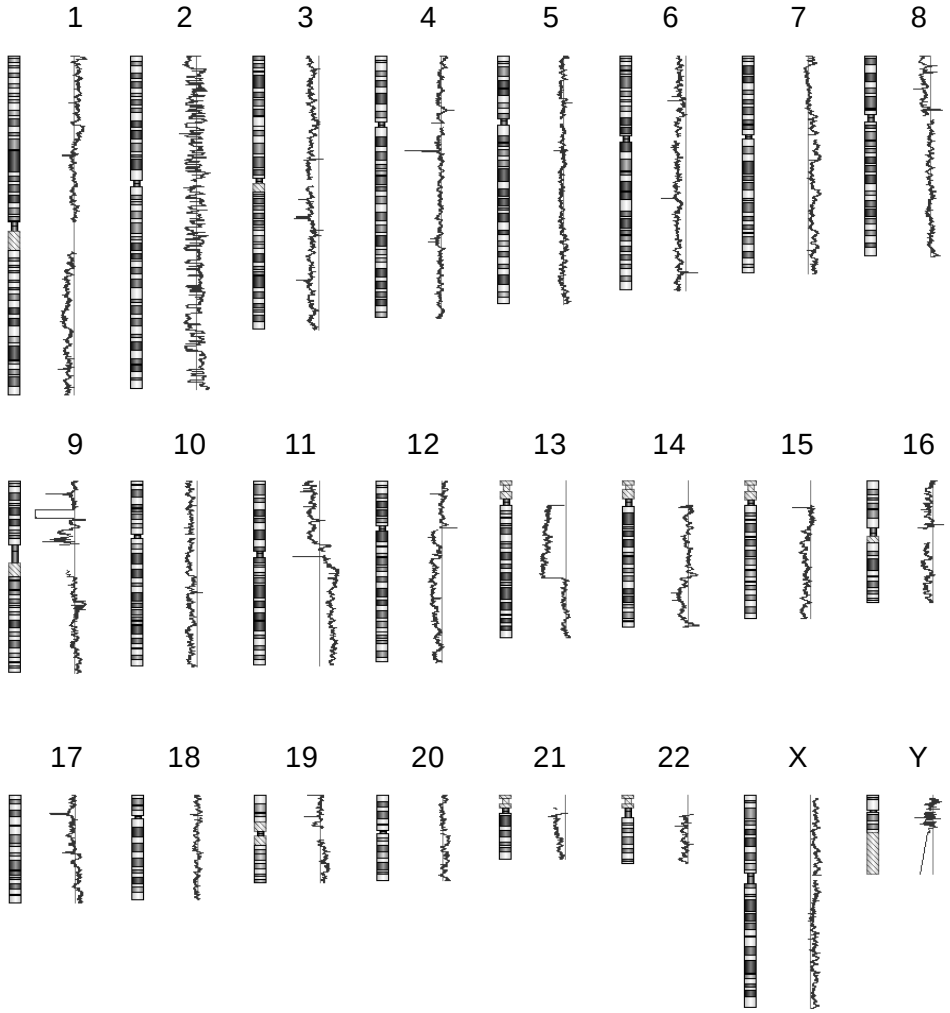

Figure 24. 244K array-based CGH analysis in JFCR-LC649 cells. Figures were drawn using the Genomic Workbench Standard Edition 5.0.14.

を有する 2 番染色体に異常なコピー数の変動が確認された（Figure 23)。一方で，この細胞株の 2 番染色体以外の染色体及び別の *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性細胞株である NCI-H2228 の 2 番染色体においては，そのような異常なコピー数の変動は見られなかった（Figure 23, 24)。この異常な染色体コピー数変動パターンは，一回のゲノムイベントにより染色体が断片化し，断片化した染色体が再結合する，クロモトリプシスと呼ばれる現象が認められる癌の染色体のコピー数変動パターンと一致した。クロモトリプシスは， Stephens らによって報告された染色体再形成メカニズムであり，少なくとも様々な癌の 2-3%ではそのような現象が認められており [18]，神経芽腫，多発性骨髄腫，大腸癌，髄芽腫などの様々な癌種で報告されている [18, 33-37]。しかしながら，*EML4-ALK* 融合遺伝子を含む癌遺伝子とクロモトリプシスとの詳細な関連性は検証されていなかった。そこで，クロモトリプシスに着目して，*EML4-ALK* 融合遺伝子の形成メカニズムを検証することにした。

まず，JFCR-LC649 細胞株においてクロモトリプシスによる染色体再形成が生じているかどうかを検証するため，高解像度の CGH (SurePrint G3 Human CGH マイクロアレイ 1M) 解析を行ったところ，クロモトリプシスのコピー数変動パターンと同様の 2 つのコピー数状態（2 コピー及び 4 コピー）の変動が確認された（Figure 25)。次に，2 番染色体の大きさや形を調べるため，JFCR-LC649 細胞の染色体標本（細胞分製中期の染色体伸展標本）を用いて，2 番染色体のセントロメア領域を認識するプローブ及び

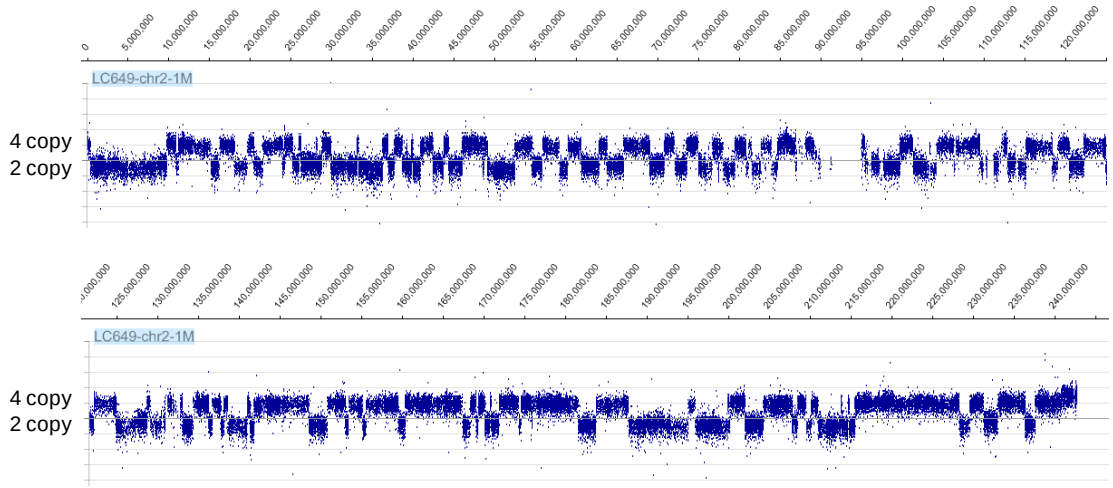

Figure 25. 1M array-based CGH profile of chromosome 2 in JFCR-LC649 cells. An oscillating pattern between two copy number states was observed within chromosome 2 of JFCR-LC649 cells.

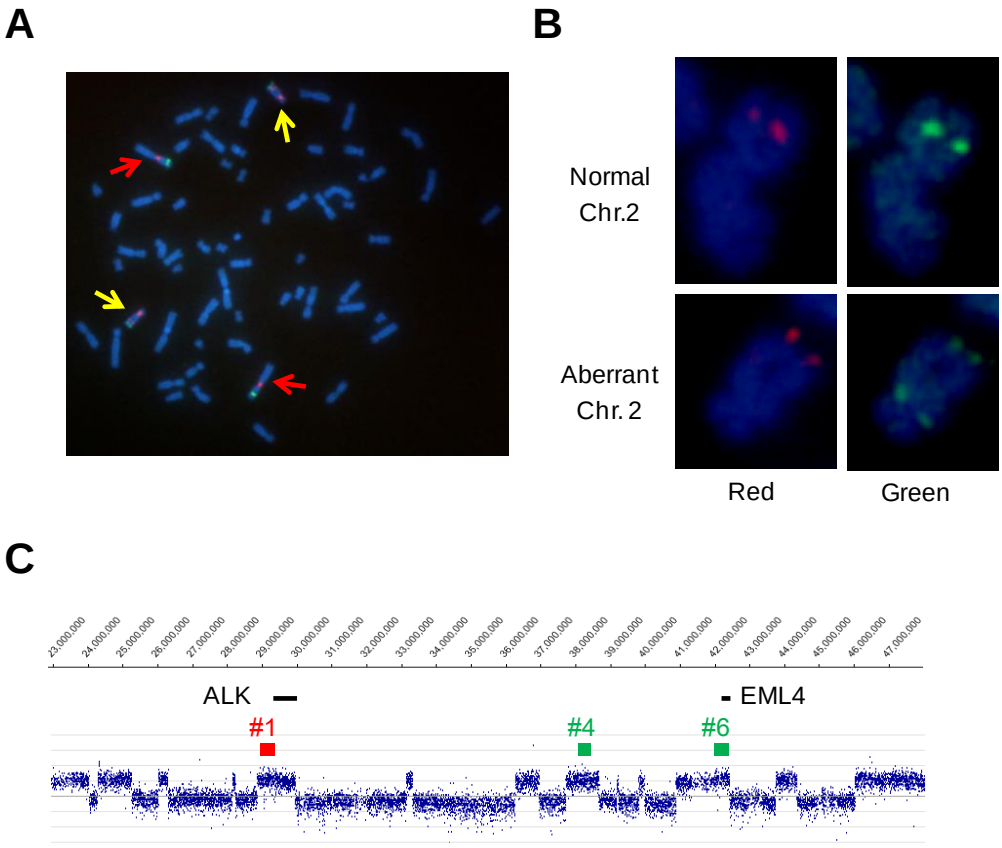

Figure 26. Chromosomal structure analysis of JFCR-LC649 cells. (A) FISH analysis of a metaphase chromosome spread in JFCR-LC649 cells using probes of the centromeric region of chromosome 2 (red) and 3'ALK (green). JFCR-LC649 cells contained two aberrant chromosome 2 (indicated with yellow arrows) and two normal chromosome 2 (indicated with red arrows). (B) FISH analysis of a metaphase chromosome spread in JFCR-LC649 cells using the dual color probe set (#1 probe, red; #4 and #6 probes, green). In normal chromosome 2, all signals existed in the same position but in aberrant chromosome 2 the green signal split, indicating fragmentation and scattering of the chromosome had occurred. (C) Schematic representation of the 3 kinds of FISH probes (#1, #4, and #6).

ALK を認識するプローブを用いた FISH 解析を行ったところ，この細胞株では，2 対の正常の染色体に加えて，2 対の短い 2 番染色体が存在することが明らかになった (Figure 26A)。さらに，この染色体標本に対して，2 番染色体の *ALK* や *EML4* 付近を認識する 3 種類のプローブを用いた FISH 解析を行ったところ，正常の 2 番染色体においてはすべてのシグナルが重なって見えるのに対し，短い 2 番染色体においては，そのシグナルが飛散したことから，2 番染色体は断片化し，再結合したことが考えられた（Figure 26B, C)。これらの結果より，JFCR-LC649 細胞株の *EML4-ALK* 融合遺伝子はクロモトリプシスにより形成されたことが示唆された（Figure 27)。*EML4-ALK* 融合遺伝子がクロモトリプシスにより形成された報告は過去にはなく，*EML4-ALK* 融合遺伝子陽性の臨床検体を用いた詳細な解析が望まれる。

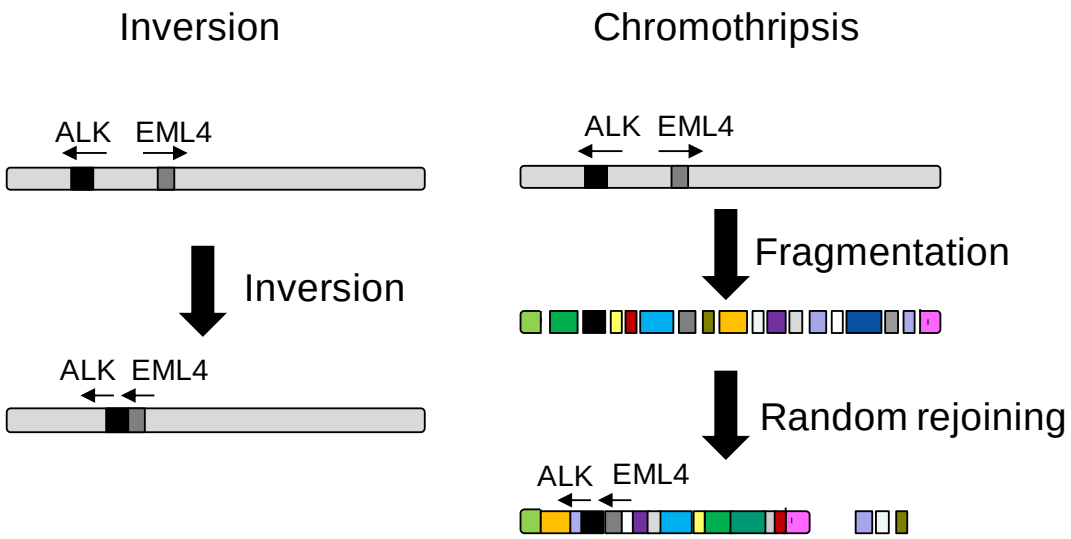

Figure 27. Model of EML4-ALK rearrangement mediated by inversion and chromothripsis. Chromothripsis causes a one-off catastrophic chromosome breakage and subsequent random reassembly of the chromosome fragments.

第二節　肺癌患者由来の新規 *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性細胞株に対するアレクチニブの効果

クロモトリプシスにより形成された *EML4-ALK* 融合遺伝子を有する肺癌細胞株に対して，他の *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌細胞株と同様に ALK 阻害剤が効果を示すかどうかを検証した。細胞増殖阻害試験において，アレクチニブ及びクリゾチニブは JFCR-LC649 細胞株の増殖を強く阻害したが，EGFR 阻害剤ゲフィチニブはその細胞増殖を強く阻害できなかった（Figure 28A）。また，アレクチニブはこの細胞株に対して，caspase-3/7 活性を上昇させたことから，アポトーシスによる細胞増殖阻害活性を示すことが示唆された（Figure 28B）。さらに，アレクチニブはこの細胞株に対して濃度依存的に ALK の自己リン酸化を阻害し，ALK の下流因子として考えられている STAT3 のリン酸化を阻害したが，AKT 及び ERK のリン酸化を阻害しなかった（Figure 28C）。よって，JFCR-LC649 細胞株の増殖には，ALK－STAT3 シグナル経路が必要である可能性が示唆された。一方，アレクチニブ処理した NCI-H2228 細胞株に

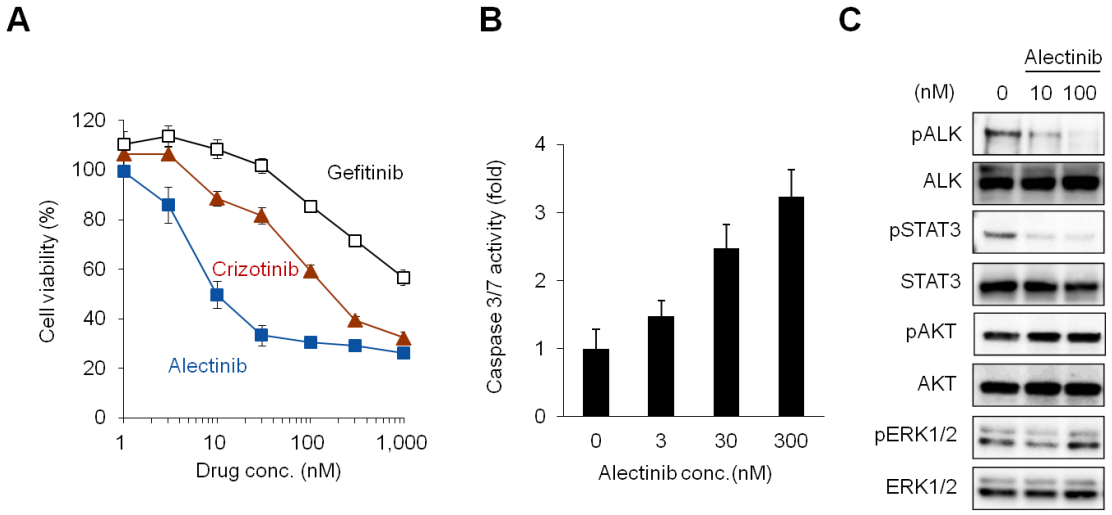

Figure 28. Efficacy of ALK inhibitor, alectinib against JFCR-LC649 cells. (A) Growth inhibition of JFCR-LC649 cells by alectinib. Both alectinib and crizotinib inhibited cell growth of JFCR-LC649. Data are shown as mean ± SD (n = 3 per group). (B) Increase in caspase 3/7 activity by alectinib in JFCR-LC649 cells. Alectinib induced caspase 3/7 activity of JFCR-LC649 cells in a concentration-dependent manner. Data are shown as mean ± SD (n = 3 per group). (C) Effect of alectinib on the phosphorylation levels of ALK, STAT3, AKT and ERK1/2 in JFCR-LC649 cells. Alectinib suppressed phosphorylation of ALK and STAT3 in a concentration-dependent manner but did not suppress phosphorylation of AKT and ERK1/2.

おいては，アレクチニブは ALK や STAT3 のリン酸化に加えて，AKT のリン酸化も阻害した（data not shown）。よって，細胞株により ALK の下流シグナル経路が異なる可能性があり，今後詳細に解析する必要がある。

次に，この細胞株をマウスの皮下に移植したモデルに対して ALK 阻害剤の抗腫瘍効果を調べたところ，アレクチニブのみならずクリゾチニブも強い薬効を示し（Figure 29A），薬剤を投与した腫瘍の解析から，いずれの薬剤も ALK のリン酸化を顕著に阻害した（Figure 29B）。これらを考慮すると，アレクチニブ及びクリゾチニブは，クロモトリプシスにより形成された *EML4-ALK* 融合遺伝子を有する肺癌細胞に対しても抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。臨床において，クロモトリプシスを有する *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌に対する ALK 阻害剤の効果に関する報告は現時点ではないが，今後の研究の進展が期待される。

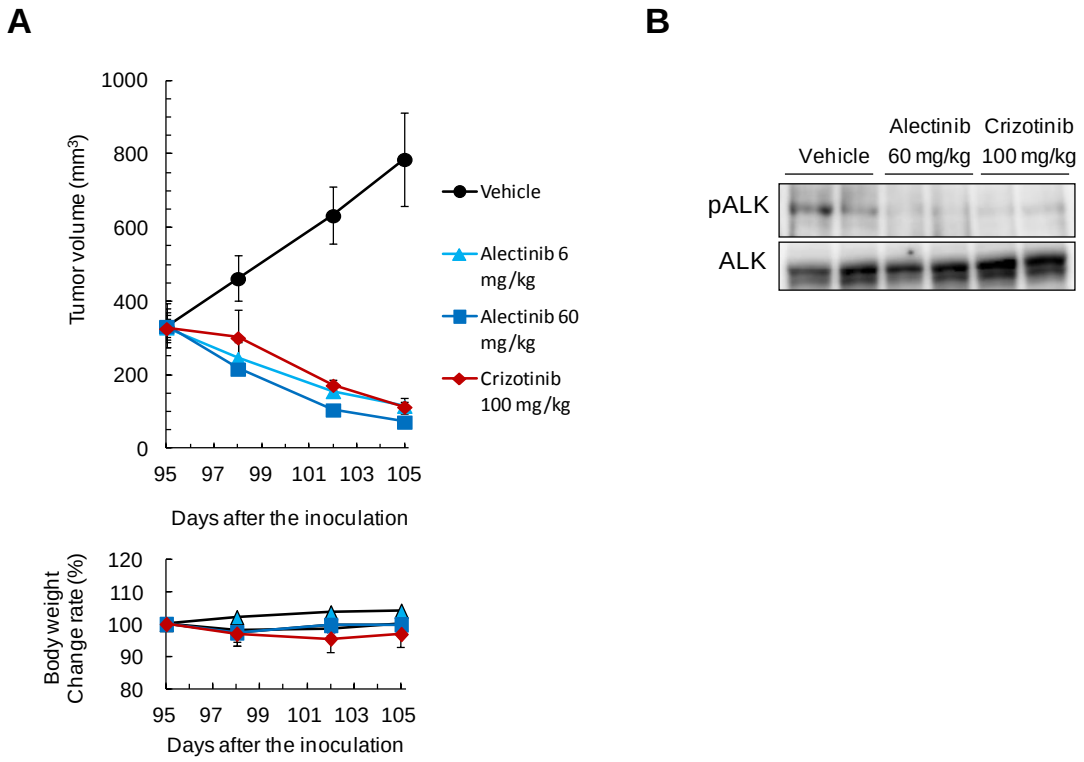

Figure 29. Antitumor activity of alectinib or crizotinib against a mouse xenograft model of JFCR-LC649 cells. (A) Alectinib or crizotinib once daily for 10 days at the indicated doses reduced the tumor volume without significant body weight change. Data are shown as mean ± SD (n = 4 per group). (B) Mice bearing JFCR-LC649 cells were orally administered a dose of 0 (vehicle), 60 mg/kg alectinib, or 100 mg/kg crizotinib and the tumors were collected and lysed at 4 hours post-dosing. Both alectinib and crizotinib suppressed phosphorylation of ALK.

第三節　小括

本章では，非臨床で評価できる *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌株が少ないため，まず，新規 *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌細胞株 JFCR-LC649 を樹立し，その細胞株の ALK 発現などのプロファイリングを行った。JFCR-LC649 細胞株は，既知の *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌細胞株 NCI-H2228 と同様，ALK タンパク質の発現及び *EML4-ALK* バリアント 3 の発現が確認された。また，JFCR-LC649 細胞株は，NCI-H2228 細胞株と異なり，*ALK* コピー数が 2 倍に増加していることに加え，JFCR-LC649 細胞株の *EML4-ALK* 融合遺伝子はクロモトリプシスと呼ばれる染色体再形成メカニズムにより形成されたことが確認された。

次に，クロモトリプシスにより形成された *EML4-ALK* 融合遺伝子を有する JFCR-LC649 細胞株に対するアレクチニブの効果を検証したところ，アレクチニブは，JFCR-LC649 細胞をマウスの皮下に移植したモデルに対して強い薬効を示すことが明らかになった。

以上のことから，アレクチニブは臨床において，クロモトリプシスにより形成された *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌に対しても効果を示すことが期待されている。また，今回樹立した JFCR-LC649 細胞株は，ALK 阻害剤の耐性メカニズムなどを解明するツールになり得るため，臨床を予測する新規 ALK 阻害剤の耐性メカニズムの解明が期待される。

第三章　アレクチニブの RET 阻害活性

本章では，アレクチニブの新たな治療薬としての可能性を見出すため，アレクチニブの網羅的なキナーゼ阻害活性を評価し，そこで見出されたアレクチニブの RET 阻害剤として評価について述べる。

第一節では，アレクチニブの ALK 以外のキナーゼを阻害できるかどうかを，451 種類のキナーゼを用いた網羅的な阻害解析により検証し，アレクチニブの新たな治療薬の可能性について言及する。第二節では，第一節で同定されたアレクチニブの RET 阻害剤としての可能性を，*RET* 融合遺伝子陽性肺癌モデルを用いて検証し，アレクチニブが，近年肺癌で同定された *RET* 融合遺伝子陽性肺癌の治療薬になり得るかどうかについて言及する。

第一節　アレクチニブが阻害可能なキナーゼの網羅的な探索

アレクチニブは，*ALK* 融合遺伝子陽性の肺癌において優れた薬効と高い安全性を示す分子標的治療薬であるが，この薬剤が *ALK* 融合遺伝子陰性の肺癌に対して効果を示すかどうかは不明であった。そこで，本研究では，アレクチニブのさらなる治療可能性を探索することにした。ALK 阻害剤クリゾチニブは，ALK 以外にも MET，RON 及び

Table 2. Kinase inhibitory activity of alectinib against RET, ROS1 and RON.

Kinase	IC_{50} (nM)
ALK	1.9
RET	4.8
ROS1	3700
RON	>5000
RET G691S	9.5
RET Y791F	14
RET V804L	32
RET V804M	53
RET S891A	8.3
RET M918T	5.7

NOTE: The *in vitro* kinase inhibitory assays of purified native RET and mutated RET (amino acids 658–1114), ROS1 (amino acids 1883–2347) and RON (amino acids 979–1400) fused to GST in the presence of alectinib were carried out as described in Materials and Methods.

ROS1 などのキナーゼ活性を阻害することが分かっており[5]，特に *ROS1* 融合遺伝子を有する肺癌患者に対する本薬剤の治療効果がすでに報告されている[38-40]。先行研究により，アレクチニブは，ALK のキナーゼ活性を強く阻害するものの，MET のキナーゼ活性は阻害しないことが明らかになっているが，ROS1 及び RON に対する阻害活性については明らかではなかった[16]。そこで，まずアレクチニブの ROS1 及び RON に対する阻害効果を調べた。その結果，アレクチニブは，ROS1 のキナーゼ活性は強く阻害できず（IC_{50} = 3700 nM），また，RON のキナーゼ活性は阻害しなかった （IC_{50}, >5000 nM, Table 2)。クリゾチニブと同様，ALK 阻害剤セリチニブ（LDK378）も，ROS1 に対する阻害活性を示すことが報告されているが，他の ALK 阻害剤と異なりアレクチニブは ROS1 に対する阻害活性を示さなかった。その理由として，ALK と各 ALK 阻害剤の共結晶を基にした *in silico* モデル解析において，アレクチニブは ROS1 に対して立体障害の影響を受けるが，クリゾチニブやセリチニブはその立体障害の影響を受けないことが推察された（Figure 30B)。

次に，アレクチニブは ALK に対してキナーゼ選択的な阻害剤であることが示されているため[16]，ALK に対する強い阻害活性には劣るが，アレクチニブで阻害可能なキナーゼの同定を試みた。まず，アレクチニブの ALK 以外のキナーゼ阻害能を調べるため，451 種類のキナーゼに対する阻害効果を KINOME*scan* technology (DiscoveRx)を用いて評価した。10 nM のアレクチニブは，ALK, LTK 及び GAK を阻害し，100 nM のアレクチニブは，ALK 及び LTK に加えて，CHEK2，FLT3 (D835Y)，PHKG2，RET 及び RET (M918T) を強く阻害（95%以上）することが明らかとなった。近年，肺癌の新たな原因遺伝子として *RET* 融合遺伝子が同定され，注目を集めている[19-21]。そこで，アレクチニブの RET 阻害剤としての可能性を確かめることにした。酵素阻害実験において，アレクチニブは，RET のキナーゼ活性を強く阻害したが（IC_{50} = 4.8 nM)，ALK 阻害剤クリゾチニブは RET のキナーゼ活性をほとんど阻害できず（IC_{50} = 3200 nM)，ALK 阻害剤セリチニブは RET に対する阻害活性を示さなかった（IC_{50} , >5000 nM, Table 2)。RET キナーゼは ALK キナーゼとアミノ酸配列が 36.6%の相同性があること，また，ALK とアレクチニブの共結晶を基にした *in silico* モデル解析において，アレクチニブと ALK 間にある水素結合が，アレクチニブと RET にあると予想される水素結合と共通することから（Figure 30A)，アレクチニブは RET に対して阻害活性を示したと考えられる。一方，同様の *in silico* モデル解析において，クリゾチニブやセリチニブは立体障害の影響により RET を阻害できないと推察された（Figure 30B)。

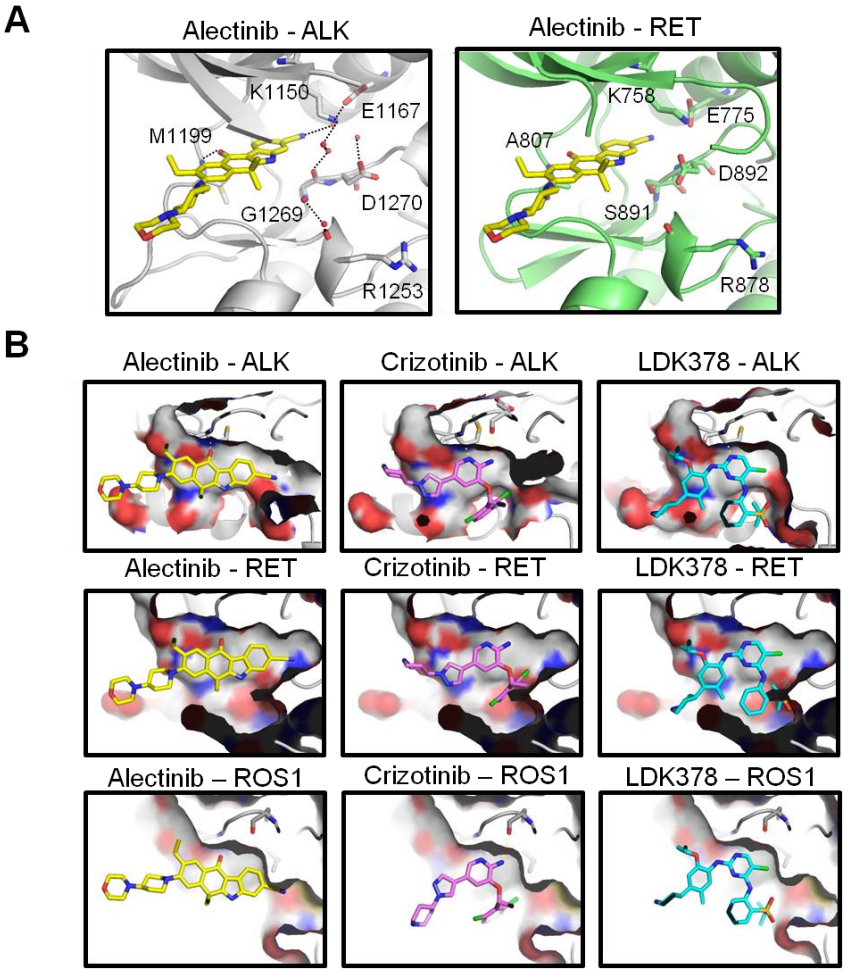

Figure 30. Structural model of alectinib with RET. (A) X-ray structure of alectinib with ALK at the ATP binding site and 3D model of alectinib with RET. Amino acid residues, which form hydrogen bonds to the ligand directly or via water molecules, are depicted. Alectinib and amino acid residues are shown in stick form (C in yellow, white, and green, O in red, and N in blue). (B) X-ray structure of alectinib with ALK (PDB ID: 3AOX), crizotinib with ALK (PDB ID: 2XP2), and LDK378 with ALK (PDB ID: 4MKC) and structural models of RET (PDB ID: 2K2K) with them. Alectinib (C in yellow), crizotinib (C in pink), and LDK378 (C in aqua) are shown in stick form.

第二節　アレクチニブの *RET* 融合遺伝子陽性肺癌モデルに対する効果

アレクチニブの *RET* 融合遺伝子陽性細胞に対する増殖阻害活性を評価するため，まず *CCDC6-RET* 融合遺伝子を有する LC-2/ad 肺癌細胞株に対する薬剤感受性を評価した。アレクチニブは，RET 阻害能を有するカボザンチニブ及びバンデタニブと同様，LC-2/ad 細胞株の増殖を強く阻害し，一方 ALK 阻害剤クリゾチニブ及びセリチニブ及び EGFR 阻害剤ゲフィチニブはその増殖を阻害しなかった（Figure 31A)。他の *RET* 融合遺伝子を有する細胞に対するアレクチニブの感受性を評価するため，マウス Ba/F3 細胞に *KIF5B-RET* 融合遺伝子を遺伝子導入した安定発現細胞株を作製した。*EML4-ALK* 融合遺伝子を導入した Ba/F3 細胞と同様に，*KIF5B-RET* 融合遺伝子を導入した Ba/F3 細胞は，IL-3 非依存的な増殖を示したことから，作製した細胞株は，*KIF5B-RET* 融合遺伝子に依存して増殖することが示唆された（data not shown)。細胞増殖阻害試験の結果，アレクチニブは，カボザンチニブ及びバンデタニブと同様 *KIF5B-RET* 融合遺伝子を導入した Ba/F3 細胞を強く阻害したが（Figure 31B)，クリゾチニブ，セリチ

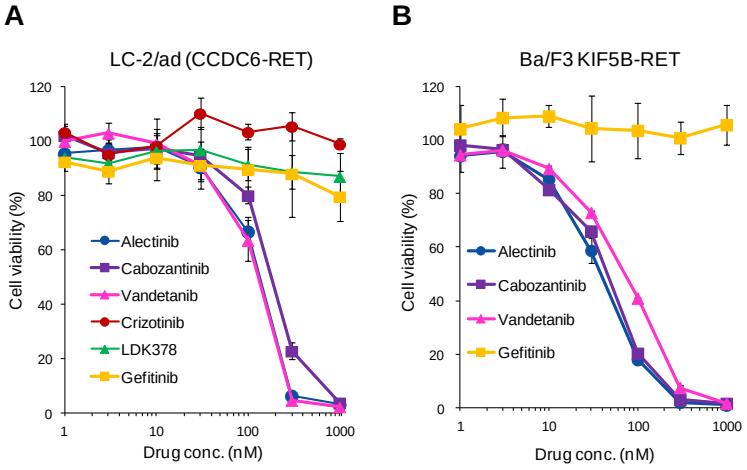

Figure 31. Inhibition of RET-driven tumors by alectinib. (A) Growth inhibition of LC-2/ad cells by alectinib. Cells were seeded in a spheroid culture plate and incubated overnight, and then treated with the indicated concentrations of alectinib, cabozantinib, vandetanib, crizotinib, LDK378, and gefitinib. The viable cells were measured using a CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay after 5 days of treatment. Data are shown as mean ± SD (n = 3). (B) Effect of alectinib against Ba/F3 cells expressing KIF5B-RET. Cells were seeded and then treated with various concentrations of alectinib, cabozantinib, vandetanib, and gefitinib for 2 days. The viable cells were measured using the CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay. Data are shown as mean ± SD (n = 3).

ニブ及びゲフィチニブはその増殖を阻害しなかった（data not shown）。また，アレクチニブによるアポトーシス誘導活性を評価したところ，アレクチニブ処理した LC-2/ad は，caspase-3/7 の活性化を誘導することから，アレクチニブはアポトーシスにより細胞死を誘導したと考えられた（Figure 32A）。LC-2/ad 細胞の増殖における RET 及び RET の下流因子の関与を調べるため，アレクチニブ処理した LC-2/ad 細胞の RET，STAT3，AKT 及び ERK のリン酸化をウエスタンブロットにより評価した。アレクチニブは，LC-2/ad 細胞において RET の自己リン酸化を濃度依存的に阻害したことに加え，ERK のリン酸化を阻害したが，STAT3 及び AKT のリン酸化を阻害しなかった（Figure 32B）。よって，LC-2/ad 細胞の増殖には，RET－MAPK シグナル経路が必要である可能性が示唆された。しかしながら，LC-2/ad 細胞におけるアレクチニブによる RET のリン酸化阻害効果と比較して ERK のリン酸化阻害効果が弱かったことから，この株における RET の下流シグナル経路には MAPK 以外のシグナルの関与も考えら

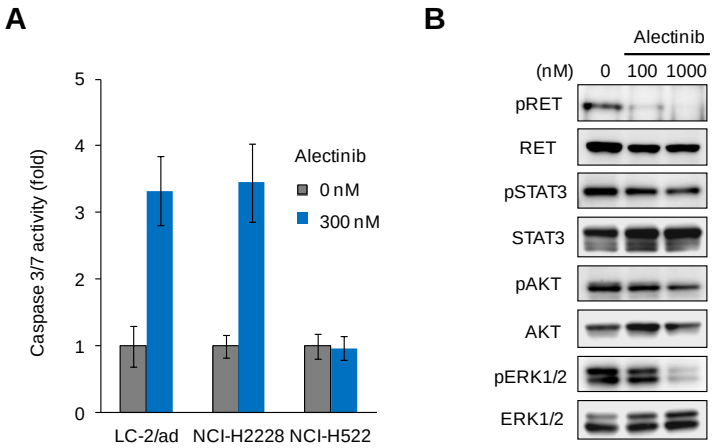

Figure 32. Effect of alectinib against RET-driven tumors. (A) Alectinib-mediated increase in caspase 3/7 activity. Cells were seeded in a spheroid culture plate and incubated overnight, then treated with alectinib at the indicated concentrations. The viable cells were measured using a Caspase-Glo® 3/7 assay kit after 2 days of treatment. Data are shown as mean ± SD (n = 3 per group). (B) Effects of alectinib on the phosphorylation of RET, STAT3, AKT and ERK1/2 in LC-2/ad cells. LC-2/ad cells were treated with alectinib for 2 hours at the indicated concentrations. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-phosphorylated tyrosine antibodies, and the level of RET phosphorylation was detected by immunoblot analysis using anti-RET antibody. The expression levels of RET, phospho-STAT3 (Tyr 705), STAT3, phospho-AKT (Ser 473), AKT, phospho-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204), and ERK1/2 were detected by immunoblot analysis with the appropriate antibodies.

れる。これらを考慮すると，アレクチニブは，*RET* 融合遺伝子を有する癌に対して RET のリン酸化を阻害することで強い細胞増殖阻害活性を示すことが示唆された。次に，CCDC6-RET 融合タンパク質の下流シグナル伝達経路を詳細に調べるため，500 nM のアレクチニブを 24 時間処理した後の LC-2/ad 細胞の遺伝子発現解析を Illumina HiSeq 2000 next-generation sequencing により解析した。その結果，アレクチニブ処理により遺伝子発現が抑制された遺伝子の多くは，ERK を負に制御する因子である *DUSP6*[41]，*DUSP2*[42]，MAPK の下流因子である *ETV1*，*ETV4*，*ETV5*，*FOS*[43] 及び *EREG*[44] であった（data not shown）。これらの網羅的な解析結果を確認するため，定量的 RT-PCR で mRNA 発現解析を行ったところ，アレクチニブ処理による *DUSP2*，*EREG*，*ETV5* 及び *FOS* の遺伝子発現の低下が見られた（Figure 33A）。Suzuki らによると，LC-2/ad 細胞の *RET* 遺伝子をノックダウンすることで，MAPK 関連遺伝子である *DUSP6* 及び

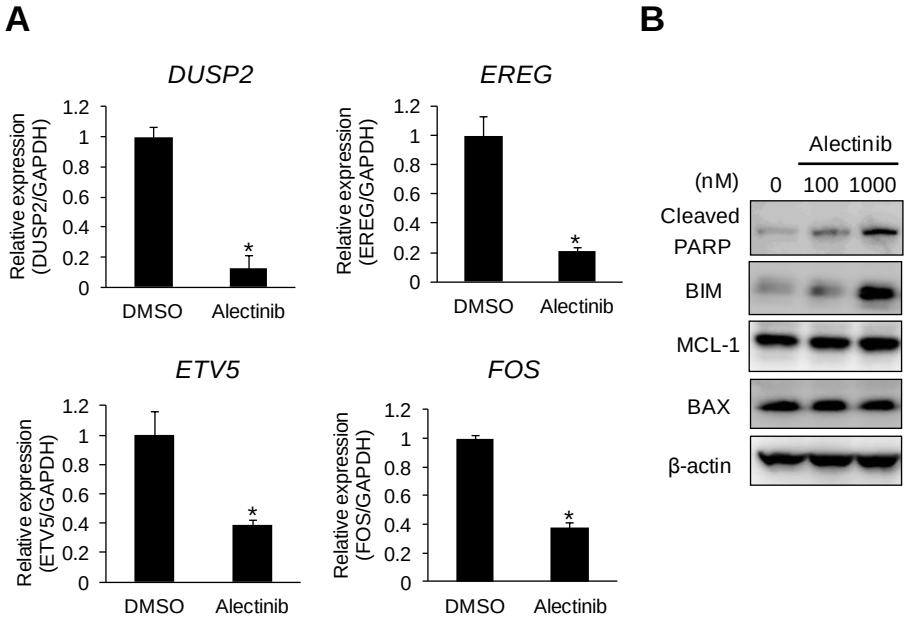

Figure 33. Downstream signaling pathway in LC-2/ad cells harboring CCDC6-RET. (A) Levels of each transcript were measured by quantitative RT-PCR. Data are shown as mean ± SD (n = 2). Student's t test: *, $p < 0.05$, versus DMSO treatment. (B) Effects of alectinib on the expression levels of cleaved PARP, BIM, MCL-1, and BAX in LC-2/ad cells. LC-2/ad cells were treated with alectinib (500 nM) for 24 hours at the indicated concentrations. The expression level of cleaved PARP, BIM, MCL-1, BAX, and β-actin were detected by immunoblot analysis using the appropriate antibodies.

EREG の発現が抑制されることから[43]，アレクチニブの RET 阻害により，LC-2/ad 細胞の MAPK 関連遺伝子の遺伝子発現が抑制されることが示唆された。MAPK 関連遺伝子である *DUSP6* 及び *EREG* の発現が抑制されることから[43]，アレクチニブの RET 阻害により，LC-2/ad 細胞の MAPK 関連遺伝子の発現が抑制されることが示唆された。また，アレクチニブ処理した LC-2/ad 細胞においてウエスタンブロッティングを行っ

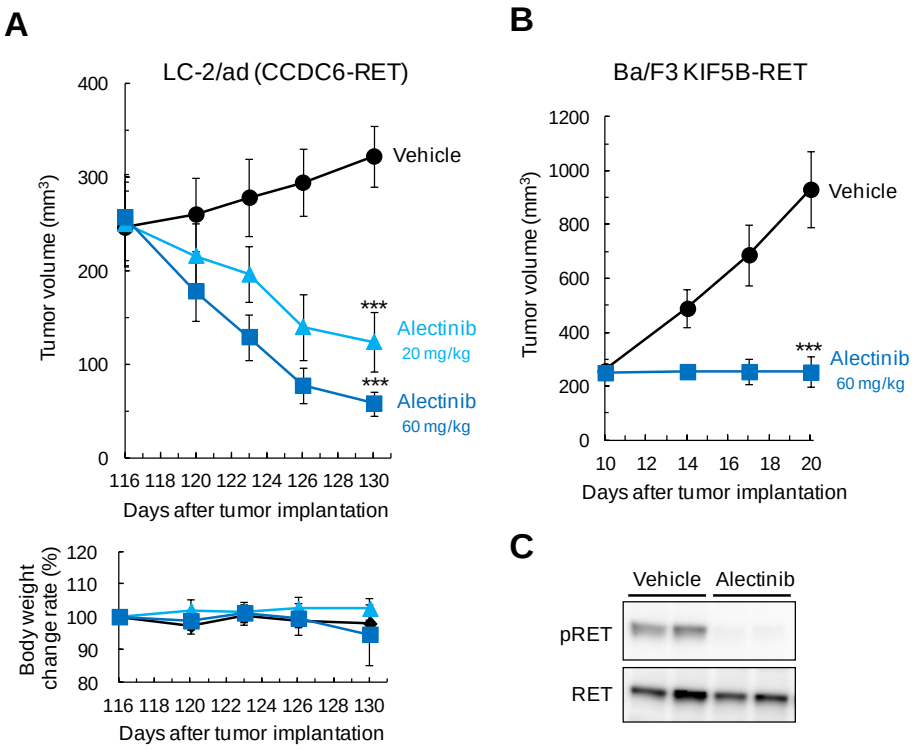

Figure 34. Antitumor activity of alectinib against RET-fusion driven tumors. (A) Mice bearing LC-2/ad cells were administered alectinib or vandetanib orally at the indicated doses, once daily for 14 days. Tumor volume and changes in body weight were measured for each dose group. Data are shown as mean ± SD (n = 5 per group). Parametric Dunnett's test: ***, $p < 0.001$; versus treatment with vehicle of alectinib on the final day of the experiment. (B) Mice bearing Ba/F3 cells expressing KIF5B-RET were treated with vehicle, 60 mg/kg of alectinib orally once daily for 10 days. Tumor volume was measured for each dose group. Data are shown as mean ± SD (n = 5 per group). Parametric Dunnett's test: ***, $p < 0.001$, versus vehicle treatment on the final day of the experiment. (C) Mice bearing Ba/F3 cells expressing KIF5B-RET were orally administered a dose of 0 (vehicle) or 60 mg/kg alectinib, and the tumors were collected and lysed at 4 hours post-dosing. The expression levels of phospho-RET and RET were detected by immunoblot analysis using the appropriate antibodies.

たところ，アレクチニブによる PARP の切断及び BIM の蓄積が見られたことから，アレクチニブは MAPK シグナル経路の阻害を通して，アポトーシスを誘導していることが示唆された（data not shown)。これらのことから，アレクチニブは，LC-2/ad 細胞に対し，EGFR 活性化変異を有する細胞株に対する EGFR 阻害剤で見られた現象と同様に，MAPK シグナル経路の阻害を通して，アポトーシスを誘導していることが示唆された[46]。

さらに，アレクチニブの抗腫瘍効果を，*RET* 融合遺伝子陽性細胞株をマウスの皮下に移植したモデルを用いて評価した。LC-2/ad を移植したマウスにおいては，腫瘍が生着するのに長い時間を必要としたが，RET break apart FISH 法により *RET* 融合遺伝子を有していることが確認された（data not shown)。このモデルを用いてアレクチニブの薬効を評価したところ，いずれの用量においても腫瘍の退縮が認められたが，体重減少は認められなかった（Figure 34A)。また，*KIF5B-RET* 融合遺伝子を導入した Ba/F3 細胞をマウスに移植したモデルにおいてもアレクチニブは強い薬効を示した (Figure 34B)。このモデルにおいて， RET のリン酸化阻害活性を調べたところ，アレクチニブは RET の自己リン酸化を阻害した。以上のことから，アレクチニブは，RET のリン酸化を阻害することで *RET* 融合遺伝子陽性肺癌に対して抗腫瘍効果を示すことが示唆された。低分子薬剤の獲得耐性メカニズムとしてよく知られているゲートキーパー変異に対して阻害活性を持つことが，長く治療効果を維持するためにも重要であると考えられる。RET のゲートキーパー部位は，他のキナーゼとの相同性から V804 と考えられており，RET V804L 及び V804M が予想される変異である[47]。まず，RET V804L 及び V804M を用いた酵素阻害実験から，アレクチニブはこれらの酵素のキナーゼ活性を強く阻害することが明らかになった（Table 2)。これらの変異を有する細胞に対する感受性を評価するため，マウス Ba/F3 細胞に *KIF5B-RET* V804L 及び V804M 融合遺伝子を遺伝子導入した安定発現細胞株を作製し，細胞の感受性評価を行ったところ，アレクチニブはこれらの細胞株に対して強く細胞増殖を阻害した（Figure 35A)。アレクチニブの阻害活性は，野生型 *KIF5B-RET* を発現する Ba/F3 細胞と比較して，KIF5B-RET V804L 及び V804M 発現する Ba/F3 細胞では 6.5-8.1 倍の減弱であり，ゲートキーパー変異を有する細胞株に対しての感受性が維持されたのに対し，カボザンチニブは 15-25 倍，バンデタニブは 50-75 倍の減弱であり，これらの薬剤のゲートキーパー変異を有する細胞株に対しての感受性は低かった（Figure 35A)。また，アレクチニブは，野生型 *KIF5B-RET* を発現する Ba/F3 細胞と同様，*KIF5B-RET* V804L 及び V804M を

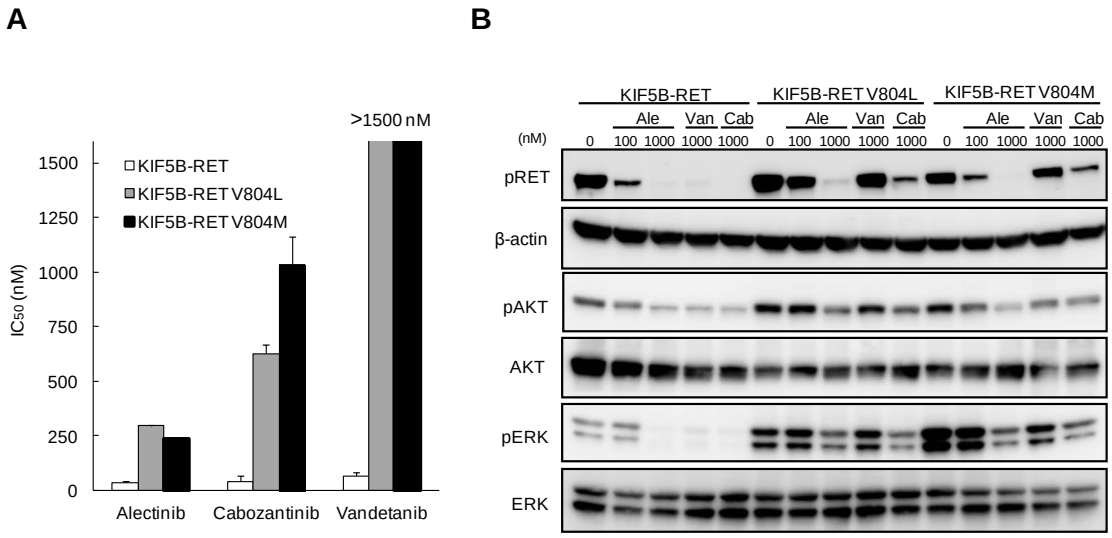

Figure 35. Inhibition of RET gatekeeper mutants by alectinib, vandetanib, or cabozantinib. (A) Effect of alectinib, vandetanib, or cabozantinib against Ba/F3 cells expressing KIF5B-RET and its gatekeeper mutations (V804L and V804M). Cells were seeded and then treated with various concentrations of alectinib, vandetanib or cabozantinib for 2 days. The viable cells were measured using a CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay. IC_{50} values were determined by plotting the drug concentration versus the percentage of cell growth inhibition. Data are shown as mean ± SD (n = 3). (B) Effects of alectinib on the phosphorylation levels of RET in Ba/F3 cells expressing KIF5B-RET and its gatekeeper mutations (V804L and V804M). Ba/F3 cells expressing KIF5B-RET were treated with alectinib, vandetanib, or cabozantinib for 2 hours at the indicated concentrations. The expression levels of phospho-RET, phospho-AKT, AKT, phospho-ERK1/2, ERK1/2, and β-actin were detected by immunoblot analysis using the corresponding antibodies.

有する細胞株においても RET のリン酸化を強く阻害したが，カボザンチニブ及びバンデタニブの RET のリン酸化阻害は，細胞増殖阻害の程度と一致し，ほとんど阻害できなかった（Figure 35B)。野生型 *KIF5B-RET* を発現する Ba/F3 細胞において，アレクチニブは，RET 及び ERK のリン酸化阻害に加えて，AKT のリン酸化も阻害したのに対し（Figure 35B)，LC-2/ad 細胞においては，アレクチニブは AKT のリン酸化を阻害しなかった（Figure 32B)。その理由として，用いる細胞あるいは発現する *RET* 融合遺伝子の種類の違いにより，関与する下流シグナル経路が異なる可能性があると考えられる。

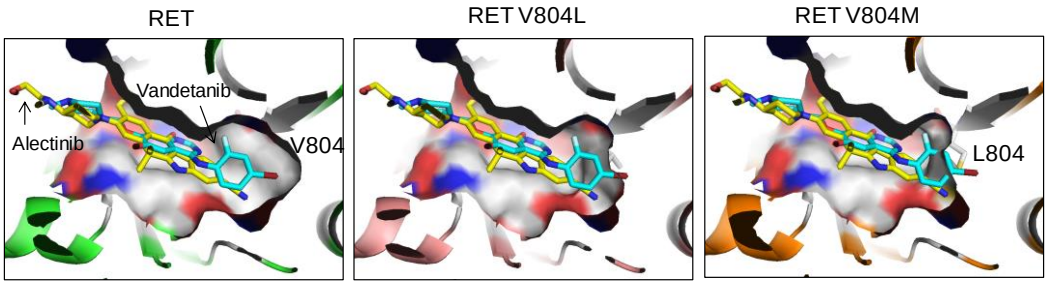

Figure 36. Structures of RET, RET V804L, and V804M with alectinib and vandetanib. The structure models of RET, RET V804L, and V804M with alectinib and vandetanib were generated from RET with vandetanib (PDB ID: 2IVU) using Discovery Studio 3.5 (Accelrys). The corresponding figures were drawn using PyMol software. Alectinib (C in yellow) and vandetanib (C in cyan) are shown as stick models. RET V804, L804, and M804 are shown as surface models.

RET V804L 及び V804M 変異に対する RET 阻害剤の感受性の違いを考察するために，アレクチニブと ALK の共結晶（PDB ID: 3AOX）を基にした *in silico* モデル解析を行ったところ，バンデタニブでは RET V804L 及び V804M に対して立体障害の影響を受けるが，アレクチニブはその影響を受けないことが推察された（Figure 36）。これらを考慮すると，アレクチニブは RET ゲートキーパー変異を有する肺癌に対しても抗腫瘍効果を示すことが考えられる。

非小細胞肺癌患者から *RET* 融合遺伝子が発見されて以来，RET 阻害活性を有する複数のマルチキナーゼ阻害剤の臨床試験が，*RET* 融合遺伝子陽性肺癌に対する治療効果を調べるために進められている。本研究に用いたバンデタニブ（Trial registration ID: NCT01823068）やカボザンチニブ（NCT01639508）に加え，スニチニブ（NCT01829217），レンバチニブ（NCT01877083），ドビチニブ（NCT01831726）及びポナチニブ（NCT01813734）の *RET* 融合遺伝子陽性肺癌に対する臨床試験が進められているが，現時点でそれらの詳細な試験結果は報告されていない。少数例の報告ではあるが，カボザンチニブは，*RET* 融合遺伝子陽性肺癌患者の 2 人に部分奏効，1 人に病勢安定を示したことが報告されていることから [48]，RET 阻害剤は *RET* 融合遺伝子陽性肺癌に対して有効な治療薬になる可能性が高いと考えられる。しかし，これら 3 人の患者において，グレード 3 の有害事象（疲労，タンパク尿，高血圧）が確認され，そのうち 2 人の患者では投与量の減量を余儀なくされた [48]。そこで，アレクチニブと RET 阻害能を有するマルチキナーゼ阻害剤の違いを理解するため，酵素阻害活性を指標にした

キナーゼ選択性を評価した。バンデタニブ，カボザンチニブ，スニチニブ，ソラフェニブ，ポナチニブ，レンバチニブ及びドビチニブは，RET のみならず血管新生に関わる VEGF の受容体である KDR を強く阻害する一方，アレクチニブの KDR 阻害効果は弱かった（Figure 37）[49,50]。臨床において，KDR 阻害剤を含む血管新生阻害剤を投与することにより，タンパク尿及び高血圧の有害事象を発症することが報告されている[51,52]。アレクチニブの *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌を対象にした臨床試験においては，用量制限毒性は認められず，また KDR 阻害に関連する毒性（タンパク尿及び高血圧）はほとんど観察されなかった。以上のことから，KDR 阻害効果の低い RET 阻害剤は，*RET* 融合遺伝子陽性肺癌患者に対して高い薬効及び安全性を示す可能性があり，KDR 阻害活性の低いアレクチニブが期待される。

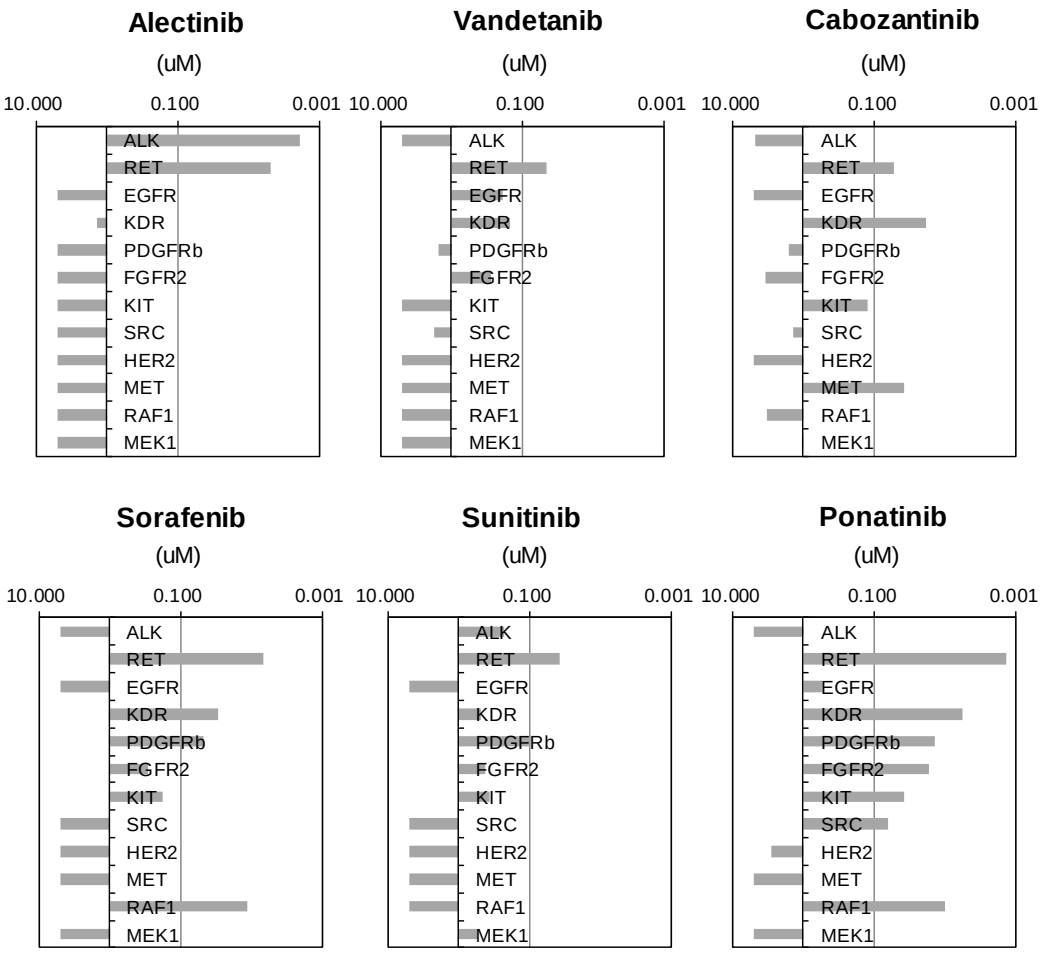

Figure 37. Kinase selectivity of alectinib, vandetanib, cabozantinib, sorafenib, sunitinib, and ponatinib against several kinases including RET. The *in vitro* kinase inhibitory assays of each purified kinase fused to GST in the presence of each inhibitor were carried out as described in Materials and Methods.

第三節　小括

本章では，アレクチニブの ALK 阻害剤以外の新たな治療薬としての可能性を見出すため，アレクチニブの網羅的なキナーゼ阻害活性を評価し，その結果見出されたアレクチニブの RET 阻害剤としての可能性を評価した。アレクチニブは，ALK 阻害活性には劣るものの，RET に対しても強く阻害でき，*CCDC6-RET* 融合遺伝子陽性肺癌細胞株 LC-2/ad 及び *KIF5B-RET* 融合遺伝子を安定的に発現させた Ba/F3 細胞に対して強く細胞増殖を阻害することが明らかになった。また，これらの細胞をマウスの皮下に移植したモデルに対しては，アレクチニブは強い薬効を示すことが明らかとなった。さらには，キナーゼを標的にした分子標的利用薬において，標的キナーゼのゲートキーパー変異が薬剤獲得耐性として，問題になっていることから，RET のゲートキーパー変異 V804L 及び V804M を有するモデルに対してアレクチニブの効果を調べた。その結果，*KIF5B-RET* V804L 及び V804M をそれぞれ安定的に発現する Ba/F3 細胞株に対してもアレクチニブは強く細胞増殖を阻害できることが明らかになった。

以上のことから，アレクチニブは，*RET* 融合遺伝子陽性肺癌モデルに対して抗腫瘍効果を示し，薬剤耐性変異として想定される RET V804L 及び V804M に対しても強く阻害できることから，*RET* 融合遺伝子陽性肺癌に対しても持続性の高い RET 阻害剤になり得る可能性が高く，今後の臨床試験などが期待される。

総括

アレクチニブは，2014 年に日本国内で承認された *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌患者に対する新しい治療薬である。他の ALK 阻害剤クリゾチニブは，2011 年に米国で，2012 年に日本国内で承認されているが，獲得耐性が問題視されていることから，本研究ではクリゾチニブ耐性モデルを構築し，アレクチニブの効果を評価した。クリゾチニブ耐性モデルとして，クリゾチニブ投与後の *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌モデル，ALK 二次的変異モデル及び脳転移モデルを構築し，それらのモデルに対してアレクチニブが強い薬効を示すことを明らかにした。臨床試験において，クリゾチニブに抵抗性を示した *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌患者に対してアレクチニブは効果を示しつつあるが，今後のさらなる臨床試験の結果が期待されている。アレクチニブは，クリゾチニブ耐性に関わる大多数の ALK 二次的変異を克服できることが示唆された一方，ALK G1202R に対して効果を示さなかった。また，最近の知見において，臨床におけるアレクチニブの耐性メカニズムが明らかにされつつあり，ALK G1202R 及び I1171T/N/S がアレクチニブに抵抗性を示した患者から新たに同定された[53-56]。よって，これらの ALK 二次的変異に対して強い効果を示す薬剤が求められているのは言うまでもない。

ALK 融合遺伝子陽性肺癌株が少ないことから，*EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌細胞株 JFCR-LC649 を新規に樹立した。この細胞株の *EML4-ALK* 融合遺伝子は，クロモトリプシスと呼ばれる染色体性形成メカニズムにより形成されたことを見出し，この細胞株をマウスの皮下に移植したモデルに対してもアレクチニブは強い薬効を示すことが明らかになった。クロモトリプシスと癌遺伝子との関連性は詳細に調べられてはいないが，クロモトリプシスは癌の 1-2%程度で生じていることがわかっていることから，クロモトリプシスに着目することで癌の原因遺伝子を同定し，癌治療薬の開発に貢献できる可能性がある。また，新たに樹立した JFCR-LC649 細胞株を用いて ALK 阻害剤の効果や耐性メカニズムを調べることは，非臨床研究と臨床を結び付けて考えるうえで，重要であると考えられる。特に，ALK 阻害剤の耐性メカニズムは現時点ですべて理解されてはおらず，その理解は薬剤耐性を示した患者に対する新しい治療の機会の提供につながると考えられる。臨床における ALK 阻害剤の耐性メカニズムの解明は，ALK 阻害剤治療の再発患者サンプルを用いて行われているが，複数の耐性メカニズムの可能性を評価することは，評価できるサンプル数に限りがあり，その数を増やすことは患者の負担の増大につながる。そのため，非臨床において細胞株を用いた薬剤耐性メカニズム

を解明することで, 臨床の ALK 阻害剤の耐性メカニズムを予測することが可能になり, 前述の問題点の解決に貢献できる。

アレクチニブの ALK 阻害以外の治療の可能性を評価するため，アレクチニブの阻害可能なキナーゼを網羅的に探索した。その結果，アレクチニブは RET 阻害能を有することが新たに判明した。アレクチニブは，*RET* 融合遺伝子肺癌モデルに対して，*ALK* 融合遺伝子陽性肺癌モデルと同様に強い薬効を示すことが明らかになった。*RET* 融合遺伝子陽性肺癌に対して，複数のマルチキナーゼ阻害剤の臨床試験が進められ，少数例での薬効も認められているが，それらの中で *RET* 融合遺伝子陽性肺癌に対する治療薬として承認された薬剤は現時点ではない。また，アレクチニブの *RET* 融合遺伝子陽性肺癌に対する臨床試験はいまだ進められていないが，毒性が懸念される KDR 阻害をほとんど示さない RET 阻害剤であるアレクチニブは, *RET* 融合遺伝子陽性肺癌に対する治療薬になりうると考えられる。近年，*ALK* 融合遺伝子及び *RET* 融合遺伝子に加え，*ROS1* 融合遺伝子 [20,38-40] や *NTRK1* 融合遺伝子 [57] などが, 肺癌の原因遺伝子として報告されている。これら肺癌の原因遺伝子を有する肺癌の治療薬として，複数の化合物が臨床試験によりその効果を調べられており，結果が期待されている。今後も新しい肺癌の原因遺伝子が同定され，肺癌の治療薬の開発が進むことを願っている。

結論

本博士論文では, 非小細胞肺癌における分子標的治療薬アレクチニブに関する知見として，以下の有用な結論を得た。

1. アレクチニブは，ALK に対して強力かつ高いキナーゼ選択性を有する ALK 阻害剤であり, 他の ALK 阻害剤クリゾチニブ耐性を示す ALK 二次的変異を有するモデルに対して，強い薬効を示した。
2. アレクチニブは，クリゾチニブ再発患者に多く認められる脳転移を模倣したモデルに対しても強い薬効を示した。
3. *EML4-ALK* 融合遺伝子形成には，クロモトリプシスと呼ばれる一回のゲノムイベントによる染色体の再形成メカニズムが関わっていることを見出し，クロモトリプシスにより形成された *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性肺癌モデルにおいてもアレクチニブは薬効を示すことが明らかとなった。
4. アレクチニブは，*ALK* 融合遺伝子陽性肺癌のみならず，*RET* 融合遺伝子陽性肺癌モデルに対しても薬効を示した。

実験材料及び方法

化合物と細胞株

アレクチニブは，WO2010143664 の合成手順に従って中外製薬で合成した。クリゾチニブは，Selleck Chemicals 社から購入，あるいは WO2006021884 の合成手順に従って中外製薬で合成した。カボザンチニブ及びバンデタニブは，Selleck Chemicals 社から購入し，LDK378 は，Active Biochemicals 社から購入した。^{14}C アレクチニブは，PerkinElmer 社により合成した。ジコキシン及び ^{3}H ジコキシンは，PerkinElmer 社から購入した。NCI-H2228 細胞株及び NCI-H522 細胞株は ATCC から購入し，Ba/F3 細胞株，Caco-2 細胞株及び LC-2/ad 細胞株は理研から購入した。これらの細胞株の培養は，購入元の推奨に従った。JFCR-LC649 細胞株は，化学療法未治療の非小細胞肺癌患者の手術検体の一部を，10 ng/mL hEGF (R&D)，1×ITS (ナカライテスク) 及び 1% 透析済み FBS (Life technologies) を加えた Medium 6052/DM160 (コージンバイオ) を用いて培養し，樹立した。JFCR-LC649 細胞株の樹立・使用は，がん研究所及び中外製薬のヒト倫理委員会の承認を得た後に実施した。

酵素阻害アッセイ

リコンビナント野生型 ALK, 野生型 RET, 野生型 RON, 変異型 ALK (ALK 1151Tins, L1152R, C1156Y, F1174L, L1196M, G1202R 及び G1269A)，変異型 RET (RET G691S, Y791F, V804L, V804M, S891A 及び M918T) はカルナバイオサイエンス社あるいは Merck 社から購入した。各々のキナーゼに対する酵素阻害活性は TR-FRET assay により，薬剤及び 30 μM の ATP 存在下で，ビオチン化した基質のリン酸化を測定することで評価した。IC_{50} 値は，XLfit software (ID Business Solutions) を用いて算出した。

EML4-ALK 及び KIF5B-RET を発現する Ba/F3 細胞の樹立

野生型 *EML4-ALK* 及び変異型 *EML4-ALK* 融合遺伝子(1151Tins, C1156Y, F1174L, L1196M, G1202R, S1206Y 及び G1269A)を導入したプラスミド cDNA3.1/hygro (Life technologies) は，QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technogies) を用いて作製した。また，野生型 *KIF5B-RET* 及び変異型 *KIF5B-RET* 融合遺伝子 (V804L 及び V804M) を遺伝子導入したプラスミドは，Genecopoeia 社から購入した。それぞれのプラスミドは，Nucleofector device (Amaxa)を用いて Ba/F3 細胞に遺伝子導入し，各遺伝子を安定的に発現する Ba/F3 細胞株を樹立した。

ルシフェラーゼを発現する NCI-H2228 細胞株の樹立

Luc2 レンチウイルスの構築には，EX-hLUC2-Lv105 plasmid (GeneCopoeia) 及び Lenti-Pac™ HIV Expression Packaging Kit (GeneCopoeia) を用いた。構築した Luc2 レンチウイルスを NCI-H2228 細胞に感染させ，ルシフェラーゼを安定的に発現する NCI-H2228 細胞株を樹立した。

細胞増殖阻害試験

96-well plate に細胞培養し，様々な濃度の薬剤を添加した。薬剤添加 48-120 時間後，CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 試薬を添加し，発光を Envison (PerkinElmer) により定量した。IC_{50} 値は，XLfit software (ID Business Solutions) を用いて算出した。

Caspase 3/7 試験

96-well plate に細胞培養し，様々な濃度の薬剤を添加した。薬剤添加 48 時間後，Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) 試薬を添加し，発光を Envison (PerkinElmer) により定量した。

ウエスタンブロッテインング

10 cm ディッシュに癌細胞を播種し，薬剤を添加した。細胞は，1 mM PMSF, 1%v/v phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma), 1%v/v phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma), Complete Mini EDTA-free (Roche) を含む Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology) で可溶化した。細胞可溶化液を SDS-PAGE により分離後，タンパク質をメンブレンに転写した。Blocking One を用いたブロッキング反応後，1 次抗体として，anti-ALK (Life Technologies, #51-3900), anti-Phospho-ALK (Tyr 1604) (Cell Signaling Technology, #3341), anti-STAT3 (Cell Signaling Technology, #9132), anti-Phospho-STAT3 (Tyr 705) (Cell Signaling Technology, #9131), anti-p44/42 MAP Kinase (ERK1/2; Cell Signaling Technology, #9102), anti-Phospho-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204; Cell Signaling Technology, #9101), anti-BIM (Cell Signaling Technology, #2819), anti-MCL-1 (Cell Signaling Technology, #4572), anti-BAX (Cell Signaling Technology, #2774), anti-PARP (Cell Signaling Technology, #9542) あるいは anti-β-

actin (Sigma, A5441) を用いて 4°C で抗体反応させた。その後，メンブレンを TBS-T (ナカライテスク) で洗浄後，二次抗体として，anti-rabbit HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology) あるいは anti-mouse IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology) を用いて室温で抗体反応させた。その後，メンブレンを TBS-T で洗浄後，Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク)を添加し，LAS-4000 (富士フイルム) により撮影した。

RNA シーケンシング解析

RNeasy mini-kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出し，TruSeq RNA sample preparation kit (Illumina) を用いて，cDNA を合成した。作製した cDNA library は Illumina HiSeq 2000 により配列解析した。得られた配列を RSEM software[56] を用いてマッピングし，各遺伝子の発現量を網羅的に解析した。

RT-PCR 解析

RT-PCR 解析は，QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) を用いて実施した。プライマーは，*EML4-ALK* Fw (5'-GATAGCCGTAATAAATTGTCG-3'), *EML4-ALK* Rv (5'-TCTTGCCAGCAAAGCAGTAGTTGG-3'), *EML4-ALK*_v1 Fw (5'-GACCTAAAGTGTACCGCCGG-3'), *EML4-ALK*_v1,v3 Rv (5'-GATGGTCGAGGTGCGGAGC-3'), *EML4-ALK*_v1 Fw (5'-CAGCCAAGTGTACCGCCGG-3') を用いた。

定量的 RT-PCR 解析は，QuantiFast Multiplex RT-PCR (Qiagen) 及び LightCycler System (Roche) を用いて実施した。プライマーセットは，*DUSP2* Fw (5'-GACTCCAGGGCTCCTGTCTAC-3'), *DUSP2* Rv (5'-GCAGGTCTGACGAGTGACTG-3'), *EREG* Fw (5'-TTTTGGGCTATTGCATAAGGA-3'), *EREG* Rv (5'AGGAGCCTCCCATAAAATCC-3'), *ETV5* Fw (5'-TGACTACACTGTTCCTCGTATGTG-3'), *ETV5* Rv (5'-CAAAGCACGTGTCTCACACTC-3'), *FOS* Fw (5'-TAGCAAAACGCATGGAGTGT-3'), 及び *FOS* Rv (5'-GCCTGGCTCAACATGCTACT-3') を用いた。内部コントロールとして Universal ProbeLibrary Human GAPD Gene Assay (Roche) を用いた。

マウスモデルでの薬効試験

SCID マウス (日本クレア) の皮下に細胞懸濁液を移植した後，腫瘍径が 200 mm^3 程度になった時点 (Day 0) でランダマイズし，アレクチニブ及びクリゾチニブを一日一

回経口投与し，腫瘍体積及び体重を測定した。溶媒の最終濃度は，0.02 N HCl, 10% DMSO, 10% Cremophor EL, 15% PEG400, and 15% HPCD（2-hydroxypropyl-ß-cyclodextrin）とした。腫瘍体積（TV）は，腫瘍の長径(L) 及び短径（W）とし，$TV = (L \times W^2)/2$ で算出した。マウスの体重の変化率は，投与初日の体重に対する実験日の体重の比により算出した。

頭蓋内移植マウスモデルの構築

ルシフェラーゼ遺伝子を発現する NCI-H2228 細胞あるいは NCI-H2228 細胞株をマウスの頭蓋内に移植し，薬効及び生存期間を評価した。簡潔に述べると，麻酔下で固定したマウスの bregma から 1.0 mm 後部側で，そこから外側に 2.0 mm の位置に直径 0.5 mm の穴を空け，そこに，深さ 3.0 mm で細胞懸濁液を大脳皮質に注入した。その後，ボーンワックスを用いて穴を埋めた後に，留め金を用いて固定した。さらに，手術後の鎮痛薬であるリマダイル 5 mg/kg を皮下に注射した。発光によるイメージングの評価は，マウスの腹腔内に VivoGlo Luciferin（Promega）を投与した後に，麻酔下で NightOWL II LB983（Berthold Technologies）を用いて行った。マウスの生存期間を指標にした評価では，腫瘍移植時点を Day 0 とし，2 日ごとに行動及び健康を評価した。

ラット用いた血漿及び脳の薬剤濃度

血漿及び脳（大脳及び小脳）における薬剤濃度の測定は，^{14}C アレクチニブ 1 mg/kg をラットに経口で投与後 4 時間から 168 時間後のサンプルを用いた。血漿中の放射能は，液体シンチレーションカウンターを用いて測定し，脳組織内の放射能は，定量的オートラジオグラフィーを用いて測定した。組織内の放射能濃度は，^{14}C アレクチニブ標準溶液をブランク血液に加えて調製した検量線血液試料の放射能濃度と比較し，組織 1g あたりのアレクチニブの ng 当量（ng eq./g）とした。

P-gp を発現する Caco-2 細胞を用いた双方向の細胞膜透過試験

双方向の細胞膜透過試験は, Transwell 24 に播種した Caco-2 細胞を用いて評価した。評価の際には，transport buffer (HBSS containing 10 mM HEPES and 1 % (w/v) BSA, pH 7.4）を使用した。Caco-2 細胞に ^{14}C アレクチニブ 1 µM あるいは ^{3}H ジゴキシン 1 µM を，P-gp 阻害剤ベラパミル 100 µM 存在下あるいは非存在下で添加し，37°C で 2-

3 時間インキュベーションした後に，液体シンチレーションカウンターを用いて薬剤濃度を測定した。ジゴキシンの評価では，30，60，90 及び 120 分間インキュベーションしたサンプルを，アレクチニブの評価では，90，120，150 及び 180 分間インキュベーションしたサンプルを測定に用いた。各条件下での透過物質の透過量を縦軸に，インキュベーション時間を横軸にプロットし直線回帰し，その傾きを単位時間あたりの経細胞輸送量（nmol/s)とし，見かけの透過係数（Papp: apparent permeability coefficient）を，Papp = dQ/dt × 1/(C0 × S）により算出した。dQ/dt は見かけの透過速度（nmol/s)，C0 は初期濃度（nmol/mL)，S は単層膜の表面積（cm）である。また，Efflux ratio は，Efflux ratio = $Papp_{basal\ to\ apical}/Papp_{apical\ to\ basal}$ により算出した。

FISH 解析

ALK break-apart FISH 解析においては，まず JFCR-LC649 ゼノグラフト腫瘍を FFPE 検体とし，4 μm の組織切片スライドを作製した。スライドを脱パラフィン後，前処理を行い Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart Rearrangement プローブ (Abbott Molecular）をスライドに添加した。75°C で 10 分間変性させた後に，37°C で終夜ハイブリダイゼーションさせた。スライドを洗浄後，DAPI を含む封入剤をスライドに滴下した。シグナルは蛍光顕微鏡（ニコン, エクリプス E600）を用いて観察した。

細胞分製中期の染色体伸展標本を用いた FISH 解析では，まず JFCR-LC649 細胞株にコルセミド（Life Technologies）を添加し，37°C で終夜インキュベーションさせた。細胞をトリプシン処理後，低浸透圧処理を行った。カルノア固定液を用いて細胞を固定させた後に，スライドに滴下して染色体伸展標本を作製した。標本は 2× SSC/70% ホルムアミドを用いて変性させた。プローブは FITC 標識した 3'ALK プローブ（GSP Laboratory）及びスペクトラムオレンジ標識した 2 番染色体のセントロメアを認識するプローブ（Abbott Molecular）のセット，あるいはビオチン標識あるいはジゴキシゲニン標識した Table 3 に示したプローブセットを用いた。プローブを変性処理後，標本に滴下して 37°C で終夜ハイブリダイゼーションさせた。ビオチン標識プローブを用いた実験では，蛍光標識したアビジン (Roche Applied Science) 及び蛍光標識した抗アビジン抗体 (Vector Laboratories) を用いてシグナルを検出した。ジゴキシゲニン標識したプローブを用いた実験では，抗ジゴキシゲニン抗体 (Roche Applied Science) 及び Alexa 568 標識した抗マウス IgG (Molecular Probes) を用いてシグナルを検出した。ス

ライドを洗浄後に DAPI を含む封入剤をスライドに滴下した。シグナルは，蛍光顕微鏡を用いて観察した。

Table 3. FISH probes on metaphase probe-FISH analysis to verify the evidence of chromothripsis

Probe name	Sequence(5'→3')
FISH probe#1-2F	TTAACTAGACTCTGTTCATGCCAGTATTCC
FISH probe#1-2R	TTCTACAGGTCAGGTTATCATCTTCTTCAG
FISH probe#1-3F	GTATAAGATGGTCAATTACTTTGGTGCTTG
FISH probe#1-3R	GCAAACAGCAGTACTCAACATTCTTACATAC
FISH probe#1-4F	ACAGGTAAATTTTCTTAGACACGAAAGGAG
FISH probe#1-4R	GTGACTAAAGACAGACACATTTTTCAAAC
FISH probe#4-2F	TGACTTCTTAAAAGCTTATTTCAGCCTAGC
FISH probe#4-2R	TCAGTATCAATAGCGAGACTTGGTTAACAG
FISH probe#4-3F	TTGTACTAGTGCCTATAAACCCACAGTAAGG
FISH probe#4-3R	AAATAAGAACTTACCGCCATTTCTTCTAGC
FISH probe#4-4F	CCACTCAAATGAATAAAATGGTATGAACAC
FISH probe#4-4R	AGGAAAGAACATTTGCAGTTTTATGATTTC
FISH probe#6-2F	TCATGAGACATATTACGAAGTCAAAATTCC
FISH probe#6-2R	CTCAGTCTACCTTTTGCCTCTAATTGAAAC
FISH probe#6-3F	TCAGCGTGATTATTGGTTACATTCTAAAAG
FISH probe#6-3R	TGACACCAAAGGTTTCTAATATGCTTAAATC
FISH probe#6-4F	GAAGTTGATGAGTTTTGCTGATATAGCTTG
FISH probe#6-4R	TCTCTTCTGTAAAAGTAGATGGGGGATATG

IHC 解析

ALK IHC は，ALK detection kit（ニチレイ）を用いて推奨の染色方法に従い実施した。JFCR-LC649 をチャンバースライド（イワキ）で培養し，70%エタノールを用いて固定した後に，0.2% Triton X100/PBS を用いて透過処理した。その後，抗 ALK 抗体（5A4）を用いて室温で 30 分インキュベーションした。HRP 標識したエンパワー試薬を用いた後に，DAB を発色させてシグナルを検出した。

CGH 解析

Cy5-dUTP を用いた PCR により，目的の癌細胞株のゲノム DNA を Cy5 標識した。また，Cy3-dUTP を用いた PCR により正常ゲノム DNA を Cy3 標識した。これら蛍光標識した DNA を，Human Genome CGH マイクロアレイ 244K あるいは SurePrint G3 human CGH マイクロアレイ 1M（Agilent Technologies）にハイブリダイズさせた。正常ゲノム DNA に対する目的の細胞株のゲノム DNA の蛍光シグナル強度の比は，Genomic Workbench ソフトウエア（Agilent Technologies）及び SignalMap ソフトウエア（Nimblegen Systems）を用いて測定した。

X 線共結晶及び *in silico* モデル解析

培養昆虫細胞 SF9 に発現させ精製したヒト ALK キナーゼドメイン及びアレクチニブを用いて，シッティングドロップ法により結晶化を行った。液体窒素により瞬間凍結した結晶から 1.75 Å 分解能の X 線回折データを取得した。*In silico* モデル解析は，Discovery Studio 3.5（Accelrys）を用いて行った。立体構造の可視化は，PyMol software（Schrödinger K.K.）を用いた。

参考文献

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. Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:19893-7.
3. Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, Kabraji S, Awad MM, Katayama R, et al. 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;19:4273-81.
4. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. J Clin Oncol. 2009;27:4247-53.
5. Insights into ALK-driven cancers revealed through development of novel ALK　tyrosine kinase inhibitors. Cancer Res. 2011;71:4920-31.
6. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. Lancet Oncol 2012;13:1011-9.
7. Lovly CM, Pao W. Escaping ALK inhibition: mechanisms of and strategies to overcome resistance. Sci Transl Med. 2012;4:120ps2.
8. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. Sci Transl Med 2012;4:120ra17.
9. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, Kutateladze TG, Le AT, Weickhardt AJ, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2012;18:1472-82.
10. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK

inhibitors. N Engl J Med 2010;363:1734-9.

11. Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, Yanagita M, Nikiforow S, Zheng W, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. Cancer Res 2011;71:6051-60.

12. Sasaki T, Okuda K, Zheng W, Butrynski J, Capelletti M, Wang L, et al. The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. Cancer Res 2010;70:10038-43.

13. Kim S, Kim TM, Kim DW, Go H, Keam B, Lee SH, et al. Heterogeneity of Genetic Changes Associated with Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancer. J Thorac Oncol 2013;8:415-22.

14. Huang D, Kim DW, Kotsakis A, Deng S, Lira P, Ho SN, et al. Multiplexed deep sequencing analysis of ALK kinase domain identifies resistance mutations in relapsed patients following crizotinib treatment. Genomics 2013;S0888-7543:00034-7.

15. Weickhardt AJ, Scheier B, Burke JM, Gan G, Doebele RC, Bunn PA, et al. Continuation of EGFR/ALK inhibition after local therapy of oligoprogressive disease in EGFR mutant (Mt) and ALK+ non-small cell lung cancer (NSCLC). J Clin Oncol 30: 2012 (suppl; abstr 7526).

16. Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, Kodama T, Kobayashi T, Fukami TA, et al. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. Cancer Cell. 2011;19:679-90.

17. Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, et al. CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. Lancet Oncol. 2013;14:590-8.

18. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. Cell. 2011;144:27-40.

19. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. Nat Med. 2012;18:375-7.

20. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. Nat Med. 2012;18:378-81.
21. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. Nat Med. 2012;18:382-4.
22. Kuromitsu S, Mori M, Shimada I, Kondoh Y, Shindoh N, Soga T, et al. Anti-tumor activity of ASP3026, -A novel and selective ALK inhibitor. Cancer Res 71: 2011 (suppl; abstract 2821).
23. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. Sci Transl Med 2011;3:75ra26.
24. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A, et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. Clin Cancer Res. 2006;12:7374-9.
25. Gadgeel SM, Gandhi L, Riely GJ, Chiappori AA, West HL, Azada MC, et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. Lancet Oncol. 2014;15:1119-28.
26. Mujoomdar A, Austin JH, Malhotra R, Powell CA, Pearson GD, Shiau MC, et al. Clinical predictors of metastatic disease to the brain from non-small cell lung carcinoma: primary tumor size, cell type, and lymph node metastases. Radiology 2007;242:882-8.
27. Zimm S, Wampler GL, Stablein D, Hazra T, Young HF. Intracerebral metastases in solid-tumor patients: natural history and results of treatment. Cancer 1981;48:384-94.
28. Costa DB, Kobayashi S, Pandya SS, Yeo WL, Shen Z, Tan W, et al. CSF concentration of the anaplastic lymphoma kinase inhibitor crizotinib. J Clin Oncol. 2011;29:e443-5.
29. Mealey KL, Greene S, Bagley R, Gay J, Tucker R, Gavin P, et al. P-

glycoprotein contributes to the blood-brain, but not blood-cerebrospinal fluid, barrier in a spontaneous canine p-glycoprotein knockout model. Drug Metab Dispos. 2008;36:1073-9.

30. US FDA. Guidance for Industry. Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling Recommendations, Rockville, USA, (2012)

31. 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.

32. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. Clin Cancer Res. 2009;15:3143-9.

33. Molenaar JJ, Koster J, Zwijnenburg DA, van Sluis P, Valentijn LJ, van der Ploeg I, et al. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. Nature. 2012;483:589-93.

34. Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Munshi NC, Minvielle S. Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients. Blood. 2011;118:675-8.

35. Kloosterman WP, Hoogstraat M, Paling O, Tavakoli-Yaraki M, Renkens I, Vermaat JS, et al. Chromothripsis is a common mechanism driving genomic rearrangements in primary and metastatic colorectal cancer. Genome Biol. 2011;12:R103.

36. Rausch T, Jones DT, Zapatka M, Stutz AM, Zichner T, Weischenfeldt J, et al. Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. Cell. 2012;148:59-71.

37. Northcott PA, Shih DJ, Peacock J, Garzia L, Morrissy AS, Zichner T, et al. Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. Nature. 2012;488:49-56.

38. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. J Clin Oncol. 2012;30:863-70.

39. Davies KD, Le AT, Theodoro MF, Skokan MC, Aisner DL, Berge EM, et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2012;18:4570-9.

40. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2014;371:1963-71.

41. Arkell RS, Dickinson RJ, Squires M, Hayat S, Keyse SM, Cook SJ. DUSP6/MKP-3 inactivates ERK1/2 but fails to bind and inactivate ERK5. Cell Signal. 2008;20:836-43.

42. Chu Y, Solski PA, Khosravi-Far R, Der CJ, Kelly K. The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. J Biol Chem. 1996;271:6497-501.

43. Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q, Viale A, Sander C, Solit DB, et al. V600EBRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106:4519-24.

44. Ben-Ami I, Armon L, Freimann S, Strassburger D, Ron-El R, Amsterdam A. EGF-like growth factors as LH mediators in the human corpus luteum. Hum Reprod. 2009;24:176-84.

45. Suzuki M, Makinoshima H, Matsumoto S, Suzuki A, Mimaki S, Matsushima K, et al. Identification of a lung adenocarcinoma cell line with CCDC6-RET fusion gene and the effect of RET inhibitors in vitro and in vivo. Cancer Sci. 2013;104:896-903

46. Okamoto K, Okamoto I, Okamoto W, Tanaka K, Takezawa K, Kuwata K, et al. Role of survivin in EGFR inhibitor-induced apoptosis in non-small cell lung cancers positive for EGFR mutations. Cancer Res. 2010;70:10402-10.

47. Houvras Y. Completing the Arc: targeted inhibition of RET in medullary thyroid cancer. J Clin Oncol. 2012;30:200-2.

48. Drilon A, Wang L, Hasanovic A, Suehara Y, Lipson D, Stephens P, et al. Response to cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. Cancer Discovery. 2013;3:630-5.

49. Matsui J, Yamamoto Y, Funahashi Y, Tsuruoka A, Watanabe T, Wakabayashi T, et al. E7080, a novel inhibitor that targets multiple kinases, has potent antitumor activities against stem cell factor producing human small cell lung cancer H146, based on angiogenesis inhibition. Int J Cancer. 2008;122:664-71.

50. Trudel S, Li ZH, Wei E, Wiesmann M, Chang H, Chen C, et al. CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. Blood. 2005;105:2941-8.

51. Gild ML, Bullock M, Robinson BG, Clifton-Bligh R. Multikinase inhibitors: a new option for the treatment of thyroid cancer. Nat Rev Endocrinol. 2011;7:617-24.

52. Robinson ES, Matulonis UA, Ivy P, Berlin ST, Tyburski K, Penson RT, et al. Rapid development of hypertension and proteinuria with cediranib, an oral vascular endothelial growth factor receptor inhibitor. Clin J Am Soc Nephrol. 2010;5:477-83.

53. Toyokawa G, Hirai F, Inamasu E, Yoshida T, Nosaki K, Takenaka T, et al. Secondary Mutations at I1171 in the ALK Gene Confer Resistance to Both Crizotinib and Alectinib. J Thorac Oncol. 2014;9:e86-7.

54. Katayama R, Friboulet L, Koike S, Lockerman EL, Khan TM, Gainor JF, et al. Two Novel ALK Mutations Mediate Acquired Resistance to the Next-Generation ALK Inhibitor Alectinib. Clin Cancer Res. 2014;20:5686-96.

55. Ignatius Ou SH, Azada M, Hsiang DJ, Herman JM, Kain TS, Siwak-Tapp C, et al. Next-generation sequencing reveals a Novel NSCLC ALK F1174V mutation and confirms ALK G1202R mutation confers high-level resistance to alectinib (CH5424802/RO5424802) in ALK-rearranged NSCLC patients who progressed on crizotinib. J Thorac Oncol. 2014;9:549-53.

56. Ou SH, Klempner SJ, Greenbowe JR, Azada M, Schrock AB, Ali SM, et al. Identification of a Novel HIP1-ALK Fusion Variant in Non-Small-Cell Lung

Cancer (NSCLC) and Discovery of ALK I1171 (I1171N/S) Mutations in Two ALK-Rearranged NSCLC Patients with Resistance to Alectinib. J Thorac Oncol. 2014;9:1821-5.

57. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. Nat Med. 2013;19:1469-72.

58. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics. 2011;12:323.

謝辞

本論文の作成及び研究発表にあたり，懇切丁寧なご指導を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授の辻川和丈先生に心より御礼申し上げます。

学位審査を引き受けていただきました大阪大学大学院薬学研究科教授の水口裕之先生，中川晋作先生に深く御礼申し上げます。

学生時代よりご指導，ご鞭撻を賜りました慶應義塾大学大学院理工学研究科教授の柳川弘志先生，同研究科准教授の土居信英先生に感謝の意を表します。

本論文提出の機会を与えていただくとともに，本研究に対してご指導，ご助言を賜りました中外製薬株式会社の服部有宏博士，青木雅弘博士，根東攝博士，坂本洋博士に深く御礼申し上げます。

投稿論文の共著者であり，本研究に対してご助言頂きましたがん研究会の石川雄一博士，畠清彦博士，二宮浩範博士，元井紀子博士，松阪諭博士，長野裕子氏，野村起美恵氏，中外製薬株式会社の石井暢也博士，北田邦雄博士，長谷川雅巳博士，塚口敏之氏，吉田美幸氏，佐藤靖子氏，渡辺佳晃氏，高梨賢二氏，櫻井裕治氏に厚く御礼申し上げます。

本研究にあたり，中外製薬株式会社の先輩同僚の皆様をはじめとする多くの方々にご協力とご支援を頂きました。深く感謝いたします。

最後に，学位取得に際し，常に温かく見守り支えてくれた妻の歩美に深く感謝いたします。