

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	<a href="https://doi.org/10.18910/52259">https://doi.org/10.18910/52259</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 兒 玉 達 史 )	
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
論文内容の要旨	
<p><i>EML4-ALK</i>融合遺伝子は、2007年に同定された非小細胞肺癌の原因遺伝子であり、この遺伝子に起因する肺癌はALKの異常なキナーゼの活性化が関与していると考えられている。分子標的治療薬アレクチニブは、ALKのキナーゼ活性を選択的かつ強力に阻害できるALK阻害剤であり、2014年に日本で承認された<i>ALK</i>融合遺伝子陽性肺癌患者に対する新しい治療薬である。</p> <p>ALK阻害剤クリゾチニブは、2011年に米国で、2012年に日本で承認された<i>ALK</i>融合遺伝子陽性肺癌患者に対する治療薬であるが、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認められることが明らかになってきている。クリゾチニブ耐性を示した患者の腫瘍組織から同定されたALK二次的変異に加え、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、現時点で<i>ALK</i>融合遺伝子陽性肺癌において治療ニーズが十分満たされていないと考えられる。また、<i>ALK</i>融合遺伝子陽性肺癌患者は非小細胞肺癌の約5%程度と少なく、それに伴い<i>ALK</i>融合遺伝子陽性肺癌細胞株が少ない。そのため、ALK阻害剤の非臨床における薬効評価は十分ではないと考えられる。さらには、アレクチニブのALK阻害剤以外の治療薬としての可能性は見出されておらず、アレクチニブの新たな治療の可能性を見出すことが重要であると考えられる。そこで、本研究では上述の課題に対して、アレクチニブを用いた非臨床研究を行った。</p> <p>まず、クリゾチニブ耐性モデルとして、ALK二次的変異を有するモデル及び脳転移モデルを構築し、アレクチニブの薬効を評価した。ALK二次的変異を有するモデルとして、変異型<i>EML4-ALK</i>融合遺伝子 (ALK L1196M, G1269A, F1174L, 1151Tins, S1206Y及びG1202R) を安定的に発現するBa/F3細胞を樹立し、それらをマウスの皮下に移植したモデルを用いてアレクチニブの薬効を検証した。その結果、アレクチニブは、ALK L1196M, G1269A, F1174L, S1206Y及び1151Tinsを有するモデルに対して強い薬効を示し、ALK G1202Rを有するモデルに対しては薬効を示さないことが明らかになった。ALKとアレクチニブの共結晶 (PDB ID: 3AOX) を基にした<i>in silico</i>モデル解析を行った結果、アレクチニブはALK G1202Rに対しては立体障害の影響を受けることから、ALK G1202Rを有するモデルに対して抗腫瘍効果を示さなかったと推察された。次に、脳転移モデルとして、<i>EML4-ALK</i>融合遺伝子陽性肺癌細胞株NCI-H2228をマウスの頭蓋内に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。その結果、アレクチニブはこのモデルの腫瘍を縮小させ、生存期間をクリゾチニブ投与群やコントロール群と比較して延長させたことから、脳転移モデルに対して強い薬効を示すことが示唆された。ラットを用いた脳移行性評価において、アレクチニブは脳への移行性が高く、また、血液脳関門において薬剤排出に関わるP-glycoprotein (P-gp) を発現するCaco-2細胞を用いた評価において、アレクチニブはP-gpの基質にならないことから、アレクチニブは脳転移モデルに対して薬効を示したと考えられる。よって、アレクチニブは、大多数のクリゾチニブ耐性モデルに対して効果を示すことから、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効果を示す可能性があり、期待される。</p> <p>次に、新規<i>EML4-ALK</i>融合遺伝子陽性肺癌細胞株を樹立し、その細胞株の特徴の理解及びアレクチニブの薬効を評価した。<i>ALK</i>融合遺伝子陽性肺癌患者の腫瘍組織から樹立したJFCR-LC649細胞株は、免疫染色によりALKタンパク質を発現していることが分かり、また逆転写PCR及び塩基配列解析により、<i>EML4-ALK</i>融合遺伝子のmRNAを発現していることが分かった。また、comparative genomic hybridization (CGH) 及びfluorescent in situ hybridization (FISH) 解析により、JFCR-LC649細胞株は、NCI-H2228細胞株と異なり、<i>ALK</i>コピー数が正常より2倍増加していることに加え、JFCR-LC649細胞株の<i>EML4-ALK</i>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</p>	

より形成されたことが確認された。また、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抗腫瘍効果を検証したところ、アレクチニブは JFCR-LC649 細胞株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。よって、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効果を示すことが期待される。

さらに、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た。その結果、アレクチニブは RET 阻害能を有することが示唆された。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ことから、アレクチニブの RET 阻害剤として可能性を評価した。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、*RET* 融合遺伝子陽性肺癌細胞株を用いた細胞増殖阻害試験において、アレクチニブは *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 細胞の増殖を強く阻害した。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、アレクチニブは強い薬効を示すことが明らかとなった。次に、キナーゼを標的とした分子標的治療薬において、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となった。これらのことから、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 も阻害可能なことから、*RET* 融合遺伝子陽性肺癌に対して治療効果の優れた RET 阻害剤になり得る可能性が高く、臨床での効果が期待される。

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。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 児 玉 達 史 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 辻川 和丈 副 査 教授 水口 裕之 副 査 教授 中川 晋作
<p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>肺癌は、罹患者数、死亡者数のトップを占める悪性腫瘍であり、いくつかの分子標的治療薬が臨床使用され顕著な治療効果をあげている。しかし一方、それらの治療において耐性癌が出現することが問題となっている。よって耐性癌に対する新たな治療薬の創製が必要となっている。本研究は、非小細胞肺癌の原因遺伝子の1つであるALK融合遺伝子に対する新たな阻害剤アレクチニブの作用とその特徴を明らかにすることを目指した。その結果、</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ALK融合遺伝子陽性肺癌の治療薬アレクチニブは他のALK阻害剤クリゾチニブの獲得耐性モデル（ALK二次的変異や脳転移）に対して効果を示す。</li> <li>2. 肺癌細胞株を新規に樹立し、その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る。</li> <li>3. 上記作製肺癌細胞株に対してもアレクチニブは薬効を示す。</li> <li>4. アレクチニブは別の肺癌原因遺伝子であるRETに対しても酵素活性阻害能を有し、RET融合遺伝子陽性肺癌モデルに対しても抗腫瘍効果を示す。</li> </ol> <p>という知見を得た。</p> <p>よって本研究によりALK阻害剤アレクチニブは、クリゾチニブに耐性を示すALK融合遺伝子陽性肺癌やRET融合遺伝子陽性肺癌に対して治療効果が期待できることを初めて示すものであり、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものとする。</p>	