

## 論文内容の要旨

Overcoming Drug-Tolerant Cancer Cell Subpopulations Showing  
AXL Activation and Epithelial-Mesenchymal Transition  
is Critical in Conquering ALK-positive Lung Cancer

ALK 陽性肺癌根絶に向けた AXL 活性化および EMT を示す  
薬物耐性癌細胞亜集団の制御

日本医科大学大学院医学研究科  
呼吸器内科学分野

大学院生 中道 真仁

*Oncotarget* 2018 年 掲載予定

## 【背景】

ALK (Anaplastic lymphoma kinase) 遺伝子転座は、非小細胞肺癌の 3-5%に認められる。ALK チロシンキナーゼ阻害剤 (ALK-TKI) は、ALK 遺伝子転座陽性肺癌に対して良好な治療効果を示すが、耐性克服が大きな課題である。ALK-TKI 耐性メカニズムとして二次変異やバイパス経路活性化が報告されているが、治癒に向けた新規治療戦略が求められている。

## 【目的】

ALK-TKI 新規耐性メカニズムを明らかにし、ALK 遺伝子転座陽性肺癌治癒に向けた新規治療戦略を構築することを目的とした。

## 【方法】

ALK 遺伝子転座陽性肺癌細胞株 H2228 を用いて、3 種類の ALK-TKI (クリゾチニブ、アレクチニブ、セリチニブ) を高濃度暴露法とステップワイズ法を組み合わせ、ALK-TKI 耐性細胞 (H2228-CRR、H2228-ALR、H2228-CER) を樹立した。H2228 と ALK-TKI 耐性細胞を用いて、cDNA アレイによる網羅的遺伝子発現解析、リン酸化抗体アレイ解析、マイクロ RNA アレイ解析およびタンパク発現解析等にて、ALK-TKI 耐性に関わる因子の同定を行った。耐性因子に対して、*in vitro*、*in vivo*における機能解析を行い、耐性克服を試みた。ALK 遺伝子転座陽性肺癌組織を用いて、免疫染色にて耐性因子の発現を検証した。

## 【結果】

H2228-CRR、H2228-ALR、H2228-CER は、FISH (fluorescence in situ hybridization) にて ALK 融合遺伝子の減少およびウェスタンブロット解析にて ALK、p-ALK タンパク質発現の低下を認め、ALK 非依存的な耐性細胞であった。網羅的遺伝子発現解析では、上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition:EMT) 関連因子である E-cadherin をコードする CDH1 の低下、AXL、vimentin をコードする VIM、ZEB1 の上昇を認めた。マイクロ RNA 解析では、EMT 抑制因子である miR-200 family の発現低下を認めた。リン酸化抗体アレイ解析では、p-AXL 活性化を認めた。ウェスタンブロット解析においても p-AXL/vimentin/ZEB1 発現上昇、E-cadherin 発現低下を認め、形態学的にも EMT 変化を有することを確認した。スフィアフォーメーションアッセイでは、ALK-TKI 耐性細胞でスフィア数増加を認め、癌幹細胞 (cancer-stem cell : CSC) の特徴を有することが示唆された。TGF- $\beta$ 1 刺激による H2228 ALK-TKI 耐性細胞においても、AXL 過剰発現が EMT および ALK-TKI 耐性に関わることを認めた。以上より、AXL 過剰発現が、EMT 変化および ALK-TKI 耐性に関与していることを明らかにした。H2228-CRR、H2228-ALR、H2228-CER に対し、AXL 発現を siRNA、AXL 阻害剤 (R428) および HSP90 阻害剤 (ガネテスピブ) にて抑制したところ、EMT の解除および増殖抑制効果を認めた。H2228-CER を用いたゼノグラフトマウスにおいてもセリ

チニブとガネテスピブの併用群で高い抗腫瘍効果を認めた。臨床検体を用いた検討では、クリゾチニブで1次治療が施行されたALK陽性肺癌患者7名の治療前の組織検体を用いて、免疫染色法にてAXL発現を評価し、クリゾチニブが無効または効果が乏しい患者においてAXL高発現を認め、AXLがALK-TKI初期耐性にも関与している可能性が示唆された。

#### 【考察】

ALK陽性肺癌に対するALK-TKI耐性克服に向けて、様々な耐性メカニズムの解明および耐性克服法が検討されているが、未だ治癒には至っていないのが現状である。本研究にて、ALK非依存的でEMTおよびAXL活性化を有するdrug-tolerant cancer cell subpopulations (DTC)が3種類のALK-TKIに対する薬剤耐性に共通するメカニズムであり、AXL阻害剤とHSP90阻害剤がDTCに有効であることを見出した。AXLはTAMサブファミリーに属し、EMTに関連する受容体チロシンキナーゼであり、HSP90のクライアントタンパクの1つである。ALK陽性肺癌患者に対するALK-TKI治療後残存するDTCを標的としたAXL阻害剤やHSP90阻害剤は、ALK肺癌根絶に向けた新規治療法となり得る可能性が示唆された。

#### 【結論】

ALK非依存性でEMTおよびAXL活性化を有するDTCはALK-TKI耐性の根幹であり、ALK-TKIとAXL阻害剤またはHSP90阻害剤の併用は、ALK陽性肺癌治癒に向けての新規治療戦略になり得る。