

**ALK 融合遺伝子陽性肺がんに対する薬剤耐性変異予測と、
既存薬を活用した耐性克服法の発見
～第 3 世代 ALK 阻害薬耐性の克服を目指す～**

1. 概要

ALK 融合遺伝子（注 1）をもつ肺がん（ALK 陽性肺がん）は非小細胞肺がんの患者さんの 3～5%程度に見つかるといわれています（日本では推定 2000 例/年）。ALK 融合遺伝子とは受容体型チロシンキナーゼ（注 2）をコードする ALK 遺伝子と EML4 などの多量体化する機能を持ったタンパク質をコードする遺伝子が染色体の逆位や転座により融合することでできる強力ながん遺伝子です。ALK 融合タンパク質は、恒常的に ALK チロシンキナーゼを活性化し、結果として細胞増殖シグナルを異常に活性化し続けることで細胞ががん化します。この ALK 陽性肺がんに対しては、ALK チロシンキナーゼを阻害する薬剤（ALK 阻害薬、注 3）が有効であることが実験的にまた臨床試験により明らかにされており、我が国では、これまでに 4 つの ALK 阻害薬が承認され臨床応用されています。これら 4 つの ALK 阻害薬の中で、ALK 陽性肺がんに対する一次治療薬としては、現在のところ、アレクチニブが最も多く使用されていますが、治療後、数年以内になん細胞が薬剤耐性化し、がんが再発してしまうことが問題となっています。これまでの研究からアレクチニブ耐性化機構として ALK の薬剤結合部位に存在する G1202R 変異（1202 番目のグリシン（G）がアルギニン（R）となる変異）や I1171N 変異が比較的高頻度に発見されています。これらのアレクチニブ耐性変異に対しても有効な薬剤として期待されているのが、昨年 9 月に本邦で承認された第 3 世代 ALK 阻害薬ロルラチニブです。しかしながら、アレクチニブ耐性後にロルラチニブで逐次治療した後も耐性が生じることが懸念されており、実際に米国のグループなどからは、ALK 阻害薬逐次治療後の耐性機構として 2 つ以上の変異が ALK に生じることが最近報告されました（重複変異）。しかし、それらの克服法はほとんど明らかになっていませんでした（図 1）。

図 1. 本研究の目的



がん研究会の片山量平（がん研究会 がん化学療法センター 基礎研究部 部長）、岡田康太郎（東京大学大学院 新領域創成科学研究科 大学院博士課程）らの研究グループは、ALK 陽性肺がんにおいて、アレクチニブ - ロルラチニブ逐次治療後の耐性機構として新規 ALK 重複変異体を複数発見し、また、1 塩基変異のみでロルラチニブ耐性を示す ALK-L1256F 変異を発見しました。これら耐性変異体の多くに対しては、既に臨床で使用されてきた ALK 阻害薬が再び効くようになること、一方で ALK 阻害薬全てに耐性を示した重複変異の 1 つは他のチロシンキナーゼ ABL を標的とする薬剤で克服が可能であることを実験的に証明しました。さらに京都大学の奥野恭史（京都大学大学院医学研究科 教授）、荒木望嗣（京都大学大学院医学研究科 准教授）らの研究グループとの共同研究により、スーパーコンピュータ「京」を用いて従来の耐性変異や今回発見された重複変異と各 ALK 阻害薬との結合自由エネルギーを MP-CAFFEE 法（注 4）により算出したところ、実験的なデータとシミュレーションで求めた結合親和性に高い相関があることを確認し、*in silico* における耐性変異予測の可能性を示すことに成功しました。

本研究の成果は、Lancet 誌と Cell 誌が共同でサポートするオープンアクセス誌 EBioMedicine に、2019 年 1 月 18 日に公開されました。

2. ポイント

- ALK 陽性肺癌において、アレクチニブ耐性変異 G1202R 変異や I1171N 変異後のロルラチニブ治療に耐性となるメカニズムとして G1202R や I1171N に新たに変異が蓄積する重複変異を多数発見しました。
- ロルラチニブ耐性を示す ALK 重複変異の大半が、既に臨床で使用されている ALK 阻害薬（クリゾチニブ、アレクチニブ、セリチニブ、brigatinib）に再感受性を示すこと、一方であらゆる ALK 阻害薬に耐性を示す G1202R+L1196M 重複変異体は、ABL チロシンキナーゼ阻害剤の AG-957 や Adaphostin に感受性を示すことを発見しました。
- ALK の L1256F 単独変異がロルラチニブに高度耐性を示す一方で、アレクチニブに高感受性を示すことを発見し、スパコン「京」を用いた構造シミュレーションから結合親和性低下の理由の一端を明らかにしました。
- スパコン「京」を用いた MP-CAFFEE 法などのシミュレーションにより、ALK 阻害薬と ALK 耐性変異体の結合親和性（結合自由エネルギー： ΔG ）の算出に成功しました。算出した ΔG は実際の薬剤感受性と高い相関関係を示し、シミュレーション精度の高さが示されました。
- 本研究から、様々な ALK 阻害薬耐性機構と耐性克服法の候補が示され、治療耐性時に耐性機構が明確にできると、そのメカニズムに合わせた更なる治療の可能性が示されました。将来的にはさらなるシミュレーションの予測精度向上により、コンピューター内で耐性変異と効果的な薬剤の予測が、可能となると期待されます。

3. 論文名、著者およびその所属

○論文名

[Prediction of ALK Mutations Mediating ALK-TKIs Resistance and Drug Re-purposing to Overcome the Resistance](#)

○ジャーナル名

EBioMedicine（Cell誌とLancet誌が共同でサポートする新規オープンアクセス誌）

（※2019年1月18日にオンラインに掲載されました。）

○著者

Koutaroh Okada^{1,2†}, Mitsugu Araki^{3,4†}, Takuya Sakashita¹, Biao Ma⁵, Ryo Kanada⁶, Noriko Yanagitani⁷, Atsushi Horiike⁷, Sumie Koike¹, Tomoko Oh-hara¹, Kana Watanabe⁸, Keiichi Tamai⁹, Makoto Maemondo⁸, Makoto Nishio⁷, Takeshi Ishikawa¹⁰, Yasushi Okuno^{3,4}, Naoya Fujita^{1,2}, Ryohei Katayama^{1*}

* 責任著者

○著者の所属機関

1. (公財) がん研究会 がん化学療法センター 基礎研究部
2. 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻
3. 理化学研究所計算科学研究センター
4. 京都大学大学院医学研究科
5. Research and Development Group for In Silico Drug Discovery, Pro-Cluster Kobe, Foundation for Biomedical Research and Innovation
6. RIKEN Compass to Healthy Life Research Complex Program
7. (公財) がん研究会 がん研有明病院 呼吸器内科
8. 宮城県立がんセンター 呼吸器内科
9. 宮城県立がんセンター 研究所 がん幹細胞研究部
10. 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科

4. 研究の詳細

背景と経緯

現在、わが国において肺がんは死亡率1位のがん腫であり、肺がんの約8割以上を占める非小細胞肺がんの3-5%に *ALK* 融合遺伝子が見つかります。この *ALK* 融合遺伝子は2007年に東京大学の間野博行 博士らのグループにより、強力ながん遺伝子として肺がん患者から発見されました。*ALK* は、受容体型チロシンキナーゼと呼ばれるたんぱく質であり、細胞増殖を促進する機能を有しますが、正常組織ではその発現と活性化が厳密に制御されています。しかし、*ALK* 融合遺伝子では、*ALK* 遺伝子が、恒常的に発現し多量体化能をもつ *ML4* などの遺伝子と、染色体逆位や転座により融合遺伝子を形成することで、*ALK* 融合たんぱく質が恒常的に発現すると共に多量体化を通じて異常に活性化し、がん化を強力に引き起こします。従って、*ALK* チロシンキナーゼを阻害することで *ALK* 陽性のがん細胞は増殖が抑制され顕著な腫瘍縮小効果が得られます。現在までに、我が国においては4つの *ALK* チロシンキナーゼ阻害薬が承認され、実臨床で使用されています。最初に *ALK* 阻害薬として開発・承認された第1世代 *ALK* 阻害薬クリゾチニブに比べて、第2世代 *ALK* 阻害薬アレクチニブは、1次治療薬として比較する臨床試験においてクリゾチニブの2倍以上の長さの無増悪生存期間 (PFS) を示したことから、現在ではアレクチニブが *ALK* 陽性肺がん患者の1次治療薬として使用されることが多くなっています。しかし、どれほど高い腫瘍縮小効果がみられても、治療開始から数年以内に耐性化してしまうことが临床上、問題となっています。アレクチニブ耐性化機構の約半数において、*ALK* の薬剤結合部位近傍に変異が認められます。特に1202番目のグリシン (G) がアルギニン (R) に変異する G1202R 変異や、1171番目のイソロイシン (I) がアスパラギン (N) に変異する I1171N 変異が高頻度で出現することが報告されています。現在、これら変異に対する耐性克服薬としては、昨年、我が国が世界に先駆けて臨床承認した第3世代 *ALK* 阻害薬ロルラチニブがあります。ロルラチニブはこれらの変異を有する *ALK* 肺がん症例にも有効であることが実験室レベルでも臨床試験においても示されています。しかしながら、アレクチニブ耐性後にロルラチニブで逐次治療した後も耐性が生じることが懸念されており、実際に米国のグループなどからは、逐次治療後の耐性機構として2つ以上の変異が *ALK* に生じ (重複変異)、ロルラチニブに耐性となることが報告されました。しかし、アレクチニブ・ロルラチニブ逐次治療の耐性機構の詳細とそれらの耐性克服法はほとんど明らかになっていません。

がん研究会の片山量平 (がん研究会 がん化学療法センター 基礎研究部 部長)、岡田康太郎 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 大学院博士課程) らの研究グループはアレクチニブ耐性を示す G1202R 変異や I1171N 変異後のロルラチニブ治療に耐性となるメカニズムとして G1202R や I1171N に新たに変異が蓄積する重複変異を複数発見しました。そして、その克服法を探索し、これら重複変異の大半が、既に臨床で使用されている *ALK* 阻害薬 (クリゾチニブ、アレクチニブ、セリチニブ、brigatinib) に感受性を示すこと、一方であらゆる *ALK* 阻害薬に耐性を示す G1202R + L1196M 重複変異体は、ABL チロシンキナーゼ阻害剤の AG-957 や Adaphostin に感受性を示すことを発見しました。さらにはスーパーコンピュータ「京」を用いた分子動力学シミュレーションと MP-CAFE 法により、*ALK* 阻害薬と *ALK* 耐性変異体の結合親和性 (結合自由エネルギー: ΔG) の算出に成功しました。算出した ΔG は実際の薬剤感受性と高い相関関係を示し、シミュレーション精度の高さが示されました。

研究内容

我々はまず、がん研有明病院において十分なインフォームド・コンセントを受けた *ALK* 陽性肺がん患者のアレクチニブ耐性腫瘍から培養細胞株の樹立を行うと共に、*ALK* の耐性変異の有無を確認しました。その結果、I1171N 変異を有する JFCR-043 細胞や G1202R 変異を有する JFCR-041-2 細胞の樹立に成功しました。培養細胞レベル (*in vitro*)、および動物実験レベルにおいて (*in vivo*) ロルラチニブはこれら2種の患者由来 *ALK* 融合遺伝子陽性がん細胞に有効であり、JFCR-043 細胞

6. 用語解説

(注1) ALK 融合遺伝子

通常、細胞膜上に発現するチロシンキナーゼ受容体であり、胚発生時の神経システムの発達に関わっています。増殖因子が結合すると2量体化を形成後、活性化し、細胞増殖シグナルを活性化することで、細胞を生存・増殖させます。しかしながら、ALK 融合遺伝子陽性肺癌細胞においてはALK 遺伝子が他の遺伝子と染色体逆位や転座により融合遺伝子を形成することで、恒常的に活性化し、がん化を誘導します。そのため、臨床では ALK 融合タンパク質の働きを抑制することができる ALK 阻害薬が使用されています。

(注2) チロシンキナーゼ

キナーゼとは基質をリン酸化する酵素の総称であり、そのうちチロシンキナーゼは基質タンパク質のチロシン残基をリン酸化する酵素のことです。一般にその活性化は私たちの細胞の増殖を正に誘導します。

(注3) ALK 阻害薬

現在、我が国においては、クリゾチニブ、アレクチニブ、セリチニブが1次治療やそれ以降の治療において使用することができ、昨年、ロルラチニブが世界に先駆けて我が国で臨床承認されました。また、現在は brigatinib が ALK 融合遺伝子陽性肺癌に対して第Ⅲ相臨床試験中です。

(注4) MP-CAFEE 法

東京大学の藤谷秀章博士らが開発したコンピュータシミュレーションによりたんぱく質とリガンド(阻害薬など)の結合親和性(結合自由エネルギー)を高精度に計算する方法です。Massively Parallel Computation of Absolute binding Free Energy methodの略。計算量が膨大であり、スパコン「京」のような大規模並列計算が可能なスーパーコンピュータが必要です。

7. お問い合わせ先

<本研究に関すること>

公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター 基礎研究部
片山量平
〒135-8550 東京都江東区有明3-8-31
TEL : 03-3520-0111

<取材等に関すること>

公益財団法人がん研究会 広報部
TEL 03-3570-0775

<がん対策全般についてのお問い合わせ>

厚生労働省健康局 がん・疾病対策課
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2
TEL : 03-5253-1111 (内線 4605)

<次世代がん医療創生研究事業に関するお問い合わせ>

国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 戦略推進部 がん研究課
〒100-0004 東京都千代田区大手町一丁目7番1号
TEL : 03-6870-2221 E-mail : cancer @ amed.go.jp