



ALK/ROS1 陽性肺がんにおける治療抵抗性細胞は
「BMF」を減少させて生き延びる
～がん細胞の生き残り(DTP 細胞)を防ぐ新たな治療戦略へ～

1. ポイント

- ALK 融合遺伝子陽性肺がんにおいて、薬剤耐性獲得の温床となる薬剤抵抗性残存(DTP:Drug-Tolerant Persister)細胞(以下、DTP 細胞)の形成を制御する重要因子として、細胞死促進因子 BMF (Bcl-2-modifying factor) (以下、BMF) を同定しました。
- BMF の発現低下は DTP 細胞の生存を促進し、将来的な薬剤耐性につながることを明らかにしました。
- MCL-1 (抗アポトーシス因子) の阻害や、FOXO1 (転写因子) の制御によって DTP 細胞の細胞死を誘導できることを見出し、その効果は ROS1 融合遺伝子陽性肺がんでも確認されました。
- MCL-1 や FOXO1 を標的とした併用療法が、ALK 融合遺伝子陽性肺がんおよび ROS1 融合遺伝子陽性肺がんの治療成績向上につながる可能性を示しました。

2. 概要

肺がん患者の約4%で見つかる「ALK 融合遺伝子陽性」の非小細胞肺がん(NSCLC、以下「ALK 陽性肺がん」)に対しては、ALK チロシンキナーゼ阻害剤(ALK-TKI)による分子標的治療が極めて高い効果を示します。しかし、長期的な治療を続ける中で、がん細胞が薬に対して耐性(抵抗性)を獲得し、再発してしまうことが大きな臨床課題となっています。

本研究は、ALK 陽性肺がんにおいて、治療の初期段階を生き延びて耐性獲得の「温床」となる「薬剤抵抗性残存(DTP:Drug-Tolerant Persister)細胞」の形成に関わる因子を同定し、これを標的とした新たな治療戦略を確立することを目的に行われました。

患者由来の ALK 陽性肺がん細胞株を用いたゲノムワイドの CRISPR-Cas9 ノックアウトスクリーニングを実施した結果、細胞死(アポトーシス)促進因子の1つである「BMF (Bcl-2-modifying factor)」が、DTP 細胞の形成を制御する極めて重要な分子であることを突き止めました。興味深いことに、ALK-TKI や、その下流のシグナル経路(ERK および PI3K)の阻害剤を処理すると、細胞は死にゆく過程で経時的に BMF の発現を 50 倍以上に著しく上昇させることを確認しました。一方で、BMF をノックアウト(欠損)させたがん細胞では、ALK-TKI を投与しても十分な細胞死が誘導されず、生存する DTP 細胞の割合が有意に増加しました。このことから、BMF は ALK-TKI によって誘導される細胞死において中心的な役割を果たす因子の一つであることが示されました。

さらに、BMF 欠損による治療抵抗性を克服するアプローチとして、アポトーシス抑制因子である MCL-1 を阻害することが、DTP 細胞に効果的な細胞死を誘導することを見出しました。通常の培養条件では細胞死誘導因子である BMF の発現は低く維持されていますが、そのメカニズムとして、転写因子 FOXO1 が、定常状態での BMF の発現を低く抑えていること、そのために FOXO1 の発現を低下させると BMF の発現が誘導され、ALK-TKI 存在下で DTP 細胞に効果的な細胞死を誘導できることを見出しました。重要なことに、この BMF の役割は ALK 陽性肺がんだけでなく、類似の性質を持つ ROS1 融合遺伝子陽性肺がん（以下、「ROS1 陽性肺がん」）においても同様に再現されました。

本研究成果は、BMF の低下が薬剤存在下での DTP 細胞の生存を促すことで、将来的な薬剤耐性に寄与していることを証明したものであり、MCL-1 や FOXO1 を標的としたシグナル阻害剤との併用療法が、ALK/ROS1 陽性肺がんの治療成績を向上させる可能性を示唆しています。

3. 論文名、著者およびその所属

論文タイトル：BMF Deficiency Promotes Drug-Tolerant Persister Cell Formation in ALK/ROS1-Positive Lung Cancer

著者：Takahiro Utsumi^{1,2,7}, Mai Nagasaka^{1,7}, Hiroto Azuma^{1,3}, Khin KyaeMon Thwin¹, Ken Uchibori^{1,4}, Eisaku Miyauchi⁵, Hidetoshi Hayashi⁶, Makoto Nishio⁴, Isamu Okamoto², and Ryohei Katayama^{1,3,*}

所属機関：

¹ Division of Experimental Chemotherapy, Cancer Chemotherapy Center, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, 135-8550, JAPAN.

² Department of Respiratory Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, JAPAN.

³ Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, JAPAN.

⁴ Department of Thoracic Medical Oncology, The Cancer Institute Hospital, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, JAPAN.

⁵ Department of Respiratory Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, JAPAN.

⁶ Department of Medical Oncology, Kindai University Faculty of Medicine, Osaka-Sayama, JAPAN.

⁷ 共筆頭著者

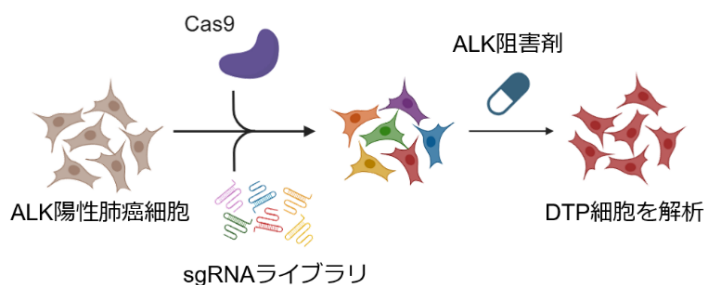
* 責任著者

掲載誌 *Cell Death & Disease*

4. 詳細な内容

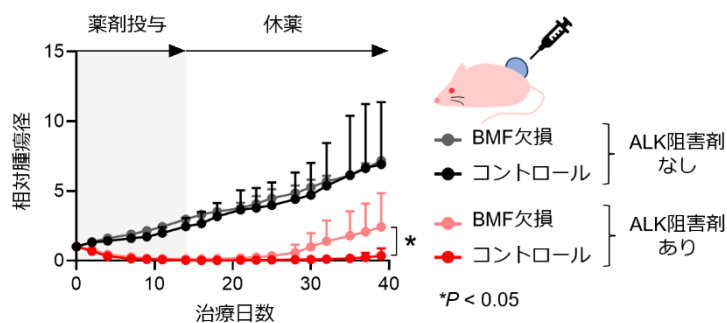
1. CRISPR スクリーニングによる「BMF」の同定と検証

我々はまず、ALK 阻害剤（アレクチニブやロルラチニブ）を投与した際に、どの遺伝子が欠損するとがん細胞が生き残りやすくなるかを網羅的に調べるため、ゲノムワイド CRISPR/Cas9 スクリーニングを実施しました。その結果、過去に報告のあるがん抑制遺伝子（MED12、PTEN、NF1、NF2 など）と並び、アポトーシス促進因子である「BMF」が、薬剤投与下で生き残った細胞群の最上位ヒットの1つとして検出されました。この結果を検証するため、複数の患者由来 ALK 陽性肺がん細胞株（JFCR-028-3、H3122、ALK1510）において BMF をノックアウト（欠損）させたところ、ALK 阻害剤投与時の生存率およびコロニー形成能が著しく上昇し、治療抵抗性の残存細胞（DTP 細胞）の集団が拡大することを実証しました。



2. 生体内（in vivo）モデルにおける早期再発の確認

次に、この BMF の欠損が実際の生体内（ヒト腫瘍のマウス移植モデル）で治療抵抗性にどう影響するかを評価しました。ヒト ALK 陽性肺がんを移植した免疫不全マウスに ALK 阻害剤を一定期間投与すると、コントロール群（通常の細胞）の腫瘍は薬の休薬後も持続的に縮小したままであったのに対し、BMF を欠損させた腫瘍では、休薬後早期に腫瘍が再増大しました。つまり、BMF の欠損は、生体内環境においても DTP 細胞の生存を促進し、早期の腫瘍再発を引き起こす原因であることが示されました。



3. ALK 阻害剤による BMF の転写誘導メカニズム

次に、ALK 阻害剤（アレクチニブ）の曝露による Bcl-2 ファミリータンパク質の動態を解析しました。アレクチニブを ALK 陽性肺がん細胞に処理すると複数の因子が変動する中、特に「BMF」と「BIM」という2つのアポトーシス促進因子が、時間・濃度依存的に顕著に発現上昇することが確認されました。興味深いことに、BIM の発現上昇は主にタンパク質の安定化（分解抑制）によるものであったのに対し、BMF は mRNA レベルで 10 倍以上の発現上昇を示しました。このことから、ALK 阻害剤処理によって ALK 陽性肺がん細胞が死にゆく過程で、BMF が強力に転写誘導されることが明らかになりました。

4. ALK 下流シグナル（ERK/PI3K）による BMF 発現制御

BMF の転写がどのように制御されているかを突き止めるため、ALK の下流にある主要なシグナル経路を阻害する実験を行いました。AKT 阻害剤、PI3K 阻害剤、ERK 阻害剤を単独で投与した場合は部分的な上昇にとどまりましたが、**ERK 阻害剤と PI3K 阻害剤を同時に処理することで**、ALK 阻害剤を投与したときと同等の強力な BMF の発現上昇（タンパク質および mRNA）が再現されました。通常状態ではこれらの経路が BMF の転写を負に制御（ブレーキ）しており、ALK 阻害剤や ERK + PI3K 阻害剤の投与によって、そのブレーキが外れることで BMF の発現が急増し、がん

細胞にアポトーシスを促すという分子メカニズムが明らかになりました。

5. BMF 欠損による ALK 阻害剤耐性を克服する新たな治療戦略：MCL-1 阻害

BMF を欠損した ALK 陽性肺がん細胞は、ALK 阻害剤だけでは死ににくくなっているため、この抵抗性を克服するために、抗アポトーシス因子である Bcl-2 ファミリータンパク質を標的とした薬剤スクリーニングを行いました。その結果、**MCL-1 阻害剤（MIK665 や AZD5991）**を ALK 阻害剤と併用することで、BMF 欠損がん細胞に対しても効果的にアポトーシスを誘導し、DTP 細胞を減少させることに成功しました。つまり、BMF が欠損した環境下でも、MCL-1 を阻害することで、DTP 細胞の生存にも効果的に細胞死が誘導できることが示されました。

6. BMF 誘導により ALK 阻害剤の効果を高める新たな治療戦略：FOXO1 阻害

BMF の発現を制御する因子をさらに探索したところ、**FOXO1** をノックダウンすると BMF の発現が上昇することを発見しました。ルシフェラーゼレポーター解析などから、FOXO1（またはその関連分子）も BMF の転写にブレーキをかける役割を担っていることが明らかになりました。さらに、ALK 阻害剤に FOXO1 のノックダウンを組み合わせると、アポトーシスがより強く誘導され、ALK 阻害剤の治療後に生き残る DTP 細胞が減少しました。これらの結果から、FOXO1 を標的とした治療により BMF を誘導することで、ALK 阻害剤の治療効果を高める新たな治療法につながる可能性が示されました。

7. ROS1 陽性肺がんへの展開と臨床的意義

最後に、ALK と構造が類似している「**ROS1 融合遺伝子陽性**」の肺がん細胞株においても同様の検証を行いました。ROS1 阻害剤（クリゾチニブ）の投与によっても BMF の発現が誘導され、BMF の発現を低下させると DTP 細胞が増加することが確認されました。また、FOXO1 の発現抑制によって、ROS1 阻害剤への感受性が高まることも同様に示されました。つまり、BMF を介した細胞死制御機構は、ALK 陽性肺がんだけでなく少なくとも ROS1 陽性肺がんにおいても共通する重要なメカニズムであり、「がん細胞の細胞死スイッチ」であることが明らかになりました。

また、同一患者から治療の経過（治療前・治療中・治療抵抗性獲得後）を追って樹立された ALK 陽性肺がん細胞株の解析からは、耐性を獲得した後の細胞で BMF の発現が著しく低下していることが確認され、BMF 発現低下細胞が治療中も生き延びることで、臨床における治療抵抗性の獲得に関与している可能性が示されました。

【用語解説】本研究を理解するためのキーワード

- **ALK / ROS1 融合遺伝子**

受容体型チロシンキナーゼをコードする ALK（Anaplastic lymphoma kinase）や ROS1（ROS proto-oncogene 1）が、染色体転座や逆位などにより別の遺伝子と融合することで生じるがん遺伝子です。融合遺伝子の形成により ALK や ROS1 のチロシンキナーゼが恒常的に活性化し、細胞のがん化を誘導します。

- **分子標的薬（チロシンキナーゼ阻害剤：TKI）**

がん細胞の増殖や生存に重要な特定の分子を選択的に阻害する薬剤を分子標的薬と呼びます。ALK/ROS1 陽性肺がんでは、ALK や ROS1 のチロシンキナーゼ活性を阻害する阻害剤（TKI）が高い治療効果を示しますが、治療を続ける中で薬剤耐性が生じることがあります。

- **薬剤抵抗性残存（DTP）細胞**

がん細胞を標的とした薬剤を投与すると、多くのがん細胞は死滅しますが、ほとんどの場合、ごく少数のがん細胞

が、死滅せずに生体内で生存し続けます。これらの細胞は、薬剤耐性細胞とは異なり、薬剤存在下で急速に増殖することはないものの、長期間薬剤にさらされる中で耐性機構を獲得し、薬剤耐性細胞へと進化することで、がんの再発につながると考えられています。いわば、薬剤耐性細胞の芽となるような細胞です。

- **アポトーシス（細胞死）**

細胞があらかじめ備わったプログラムに従って、自ら死ぬ仕組みです。多くの抗がん薬は、がん細胞にアポトーシスを誘導することで治療効果を発揮します。一方、これを回避する仕組みを獲得したがん細胞は、薬剤に対して生き残りやすくなります。

- **CRISPR-Cas9（クリスパー・キャスナイン）スクリーニング**

CRISPR-Cas9 は、Cas9 タンパク質と sgRNA を用いた遺伝子編集技術です。標的遺伝子に対応する sgRNA を細胞に導入すると、Cas9 が標的 DNA を切断し、目的遺伝子からのタンパク質発現を喪失させることができます。この仕組みを利用した CRISPR-Cas9 スクリーニングでは、ヒトの全遺伝子（約 2 万）を対象にノックアウト細胞を作成し、薬剤処理後に生き残る細胞を比較することで、薬剤耐性に関与する遺伝子を網羅的に探索することができます。

- **BMF（Bcl-2-modifying factor）**

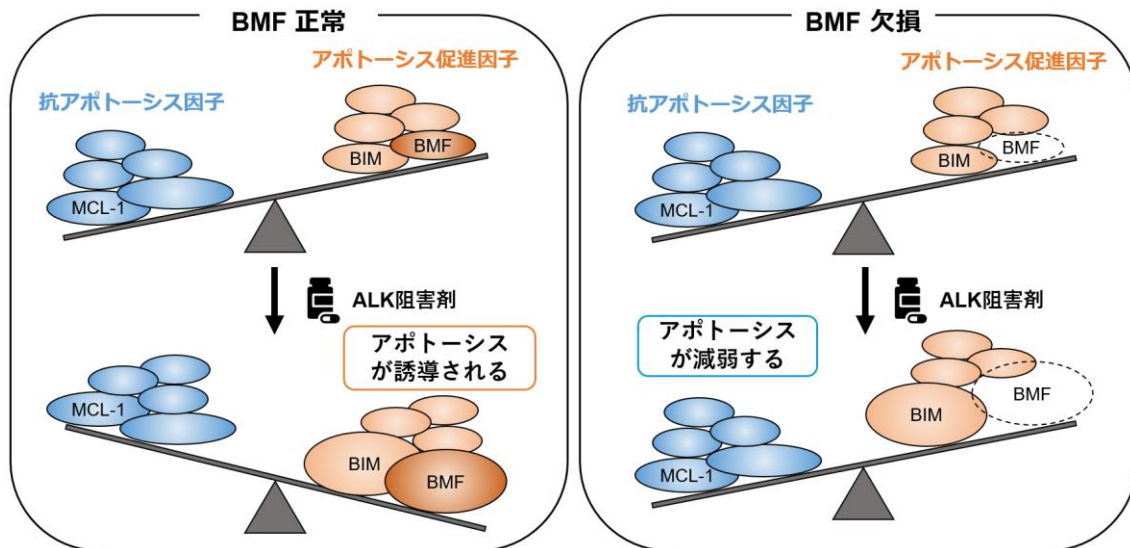
アポトーシスを促進する BCL-2 ファミリーのタンパク質です。細胞死を抑えるタンパク質の働きを阻害することで、薬剤などのストレスに応じたアポトーシスを促進します。がん細胞の薬剤感受性を左右する因子の一つと考えられています。

- **MCL-1 / FOXO1**

MCL-1 は、アポトーシスを抑えてがん細胞の生存を促進する BCL-2 ファミリーのタンパク質です。FOXO1 は、細胞の生存や増殖、ストレス応答に関わる遺伝子の発現を調節する転写因子です。これらは、薬剤によるストレス下でのがん細胞の生存や、その後の薬剤耐性獲得に関与すると考えられています。

5. 結論

本研究は、ALK/ROS1 陽性肺がんの分子標的治療において、がん細胞が治療薬存在下でなんとか生き延びる（DTP 細胞になる）か、それとも死滅するかを左右する決定的な因子として「BMF」を同定しました。今後は、ALK/ROS1 阻害剤に MCL-1 阻害剤や FOXO1 シグナル制御剤を組み合わせることができると、耐性の原因となる DTP 細胞を減少させ、肺がんの再発を遅らせるまたは予防する画期的な併用療法の開発につながることが期待されます。



6. 本研究への支援

本研究は以下の支援を受けて実施されました。

- 日本学術振興会 科学研究費助成事業
 - 基盤研究 (B) (24K02333、研究代表者：片山量平)、
 - 挑戦的研究 (開拓) (22K187383、研究代表者：片山量平)
 - 若手研究 (25K18946、研究代表者：長坂真衣)
 - 若手研究 (22K16205、研究代表者：内堀健)
- JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム (JPMJSP2136、研究代表者：内海太裕)
- 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 次世代がん医療加速化研究事業 (研究課題「難治性がん治療のための 3 次元積層共培養システムの臨床応用と生体適合性高分子抗がん剤の開発」「がん臨床検体と革新的 3D 培養技術を応用した治療抵抗性機構と克服法の探索」、「インターフェロン応答異常によるがん免疫療法耐性機構の解明と新規耐性克服併用療法の開発」研究開発代表者：片山量平)
- 中外創薬科学財団 特別研究助成金 (研究課題「がん分子標的療法残存腫瘍における宿主免疫細胞と間質細胞の役割と新規複合療法の探索」、研究代表者：片山量平)
- 小林がん学術振興会 (研究課題「側副経路抑制因子の発現喪失を介したがん分子標的薬耐性出現機構とその克服法の探索」、研究代表者：片山量平)
- 三菱財団助成 (研究課題「がん増殖シグナルの局在制御機構解明と新規治療標的の探索」、研究代表者：片山量平)
- 日本財団助成 (研究課題「腫瘍細胞社会の構築機構解明と新世代がん治療薬の開発」、研究分担者：片山量平)
- 中外製薬株式会社との共同研究費 (研究課題「ALK 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌患者に対するアレクチニブの多施設共同観察研究：ALCURE 研究」、研究代表者：片山量平)

7. がん研究会について

がん研究会は 1908 年に日本初のがん専門機関として発足して以来、100 年以上にわたり日本のがん研究・がん医療において主導的な役割を果たしてきました。基礎的ながん研究を推進する「がん研究所」や、新薬開発やがんゲノム医療研究を推進する「がん化学療法センター」「がんプレシジョン医療研究センター」、さらに新しい医療の創造をする「がん研有明病院」を擁し、一体となってがんの克服を目指しています。

ウェブサイト：<https://www.jfcr.or.jp/>

8. 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

部長　片山　量平

〒135-8550　東京都江東区有明 3-8-31

TEL：03-3520-0111

E-mail：ryohei.katayama@jfcr.or.jp

＜報道に関すること＞

公益財団法人がん研究会　広報課

〒135-8550　東京都江東区有明 3-8-31

TEL：03-3570-0775

E-mail：ganken-pr@jfcr.or.jp