



令和 5 年 11 月 6 日
公益財団法人がん研究会

**ALK および ROS1 融合遺伝子陽性肺がんの新たな分子標的薬抵抗性機構を発見
～MIG6 欠損による ALK/ROS1 阻害薬耐性機構～**

1. ポイント

- ALK 融合遺伝子陽性の非小細胞肺がんの患者さんより樹立したがん細胞株を用いて、ALK 阻害薬に対する薬剤抵抗性メカニズムを CRISPR/Cas9 によるスクリーニングで解析し、MIG6 の欠損が関与していることを明らかにしました。
- MIG6 を欠損した肺がん細胞では、ごく微量の EGF でも EGFR が活性化し、ALK 阻害薬や ROS1 阻害薬への抵抗性が生じることを明らかにしました。
- MIG6 の欠損による耐性は、抗 EGFR 抗体薬と ALK 阻害薬または ROS1 阻害薬を併用することで克服できる可能性を実験的に示しました。

2. 研究の概要

非小細胞肺がんは肺がんの 85%程度を占めますが、その中でも ALK（注 1）や ROS1（注 2）融合遺伝子が検出される症例がそれぞれ 4%および 1%程度存在します。これらの患者さんでは ALK や ROS1 を標的とした分子標的薬（ALK 阻害薬、ROS1 阻害薬：注 3）が高い効果を示すことが知られています。しかし、治療開始当初は腫瘍の大幅な縮小を認めても数年程度経過すると薬剤が効かなくなってしまう薬剤耐性を獲得し、がんは再び増悪・進行してしまいます。

がん研究会の片山量平（がん化学療法センター 基礎研究部 部長）、近藤信幸（同研究部所属、東京医科歯科大学医歯学総合研究科博士課程 大学院生）らの研究グループは、ALK 融合遺伝子陽性肺がん患者さんから樹立したがん細胞株を用いて、CRISPR/Cas9 によるスクリーニング（注 4）を実施し、ALK 阻害薬が存在してもがん細胞が生き延びてしまう現象に関わる遺伝子を探索しました。その結果、EGF 受容体（EGFR）に結合するタンパク質 MIG6 をコードする *ERRF1* 遺伝子を失うと、ALK 阻害薬が効きにくくなることを発見しました。詳細な解析によって MIG6 を欠損した ALK 肺がん細胞では、ごく低濃度の増殖因子（EGF など）によって EGFR の活性化が誘導され、ALK 阻害薬に抵抗性を生じることが明らかになりました。この MIG6 欠損による耐性は、ALK 阻害薬と抗 EGFR 抗体薬を併用することで、EGFR からの増殖シグナルが抑制されて耐性を克服できる可能性を確認し、動物実験でも十分な治療効果を認めました。さらに同様の薬剤耐性メカニズムは ROS1 融合遺伝子陽性の肺がん細胞でも生じることを実験的に示しました。

本研究から、ALK または ROS1 融合遺伝子陽性の肺がん における ALK/ROS1 阻害薬抵抗性メカニズムの 1 つとして MIG6 の欠損を見出しました。抗 EGFR 抗体薬と ALK/ROS1 阻害薬の併用療法により抵抗性を克服できる可能性が基礎研究レベルで

明らかにされ、今後の治療法開発に貢献しうる研究成果であると考えます。

3. 論文名、著者およびその所属

○論文名: **MIG6 loss confers resistance to ALK/ROS1 inhibitors in NSCLC through EGFR pathway by low-dose EGF**

○ジャーナル名

JCI insight

○著者

Nobuyuki Kondo^{1,2}, Takahiro Utsumi^{1,3}, Yuki Shimizu^{1,4}, Ai Takemoto¹, Tomoko Ohara¹, Ken Uchibori⁵, Sophia Subat-Motoshi^{6,7}, Hironori Ninomiya⁶, Kengo Takeuchi^{6,7}, Makoto Nishio⁵, Yasunari Miyazaki², and Ryohei Katayama^{1,4,*}

(* 責任著者)

○著者の所属機関

1. 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
2. 東京医科歯科大学 呼吸器内科
3. 九州大学 呼吸器内科
4. 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
5. 公益財団法人がん研究会 がん研有明病院 呼吸器内科
6. 公益財団法人がん研究会 がん研究所 病理部
7. 公益財団法人がん研究会 がん研究所 分子標的病理プロジェクト

4. 研究の詳細

背景

ALK、および ROS1 融合遺伝子^{1,2} は非小細胞肺癌のそれぞれ約 4%、1% で存在することが知られています。多くの症例では分子標的薬である ALK、ROS1 チロシンキナーゼ阻害薬³ により高い治療効果が認められます。しかし、数年以内に薬剤耐性がんの出現により再増悪してしまうことが問題となっています。薬剤耐性のメカニズムとしては阻害薬が結合する ALK や ROS1 チロシンキナーゼ領域の二次変異と、EGFR や MET に代表されるバイパス経路の活性化が知られています。また NF2 や MED12 などのがん抑制遺伝子が喪失することで耐性が生じることも報告されています。一方で耐性メカニズムが不明である症例も多く、一部のチロシンキナーゼ領域の二次変異を除いて耐性時にも有効な治療法は確立していません。そこで本研究グループでは独自に患者検体から樹立した ALK 陽性肺がん細胞株を用いて CRISPR/Cas9 によるゲノムワイドスクリーニング⁴ を実施し、新規の薬剤耐性メカニズムの探索と克服法の解明を目指して研究を行いました。

研究内容

はじめに、がん研究会の倫理審査委員会承認済みのプロトコールに則り同意の得られた肺がん患者さんから、検査などの残余組織検体を頂き、がん細胞株の樹立を行いました。樹立したがん細胞株の1つである JFCR-028-3 細胞は、ALK 阻害薬に高い感受性を示しました。ALK 陽性肺がんにおける ALK 阻害薬抵抗性のメカニズムを新たに探索するため、レンチウイルスベクターを用いて Cas9 を安定的に発現する細胞株を樹立しました。網羅的に全ゲノム遺伝子を欠損させるガイド RNA(sgRNA) ライブラリを導入し、ALK 阻害薬を9日間処理した後に生き残った細胞から DNA を抽出し、sgRNA を次世代シーケンサで解析しました。ALK 阻害薬を処理していない細胞が保持していた sgRNA と比較して ALK 阻害薬の処理によって濃縮された sgRNA の標的遺伝子を探索したところ、既知のがん抑制遺伝子である NF2 や MED12 に加えて、新たに ERFFI1 遺伝子が同定されました。ERFFI1 がコードする MIG6 タンパク質は、EGFR に結合しその活性を負に制御することが知られています。そこで、本研究では特に MIG6 に着目して研究を行いました。

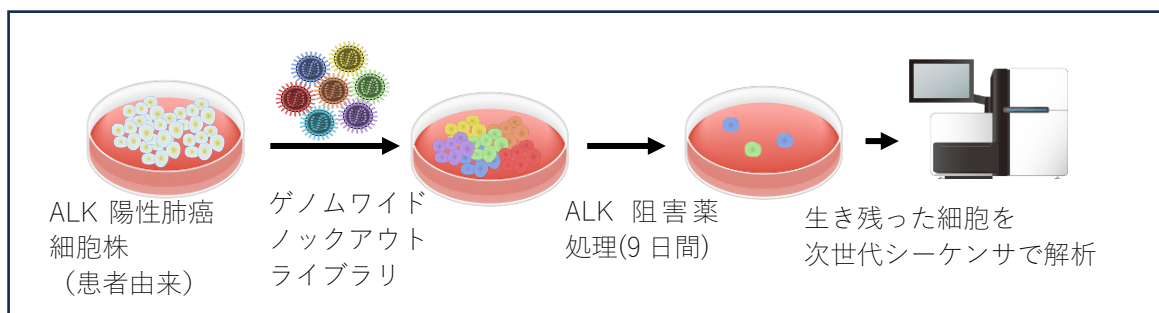


図 1 . CRISPR/Cas9 スクリーニングの概要

TogoTV (© 2016 DBCLS TogoTV, CC-BY-4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ja>) のイラストを使用しました。

スクリーニングで同定された MIG6 について、複数の sgRNA を用いてノックアウト細胞をそれぞれ樹立したところ、いずれも ALK 阻害薬にやや抵抗性を認めました。MIG6 は EGFR のチロシンキナーゼ領域に結合することで活性を阻害することが知られているため、次に、EGFR に結合する増殖因子である EGF や TGF α を用いて刺激し、下流シグナルの変化や薬剤感受性の変化等の解析を行いました。健常人の血中濃度に相当する微量の EGF で刺激してもコントロールの ALK 陽性肺がん細胞株 JFCR-028-3 細胞では ALK 阻害薬感受性に変化はありませんでした。しかし MIG6 を欠損させた JFCR-028-3 細胞では、微量の EGF を添加するだけで EGFR 下流の腫瘍増殖に関連するシグナルが活性化し、著明に ALK 阻害薬耐性となることが明らかになりました。

そこで、MIG6 欠損による耐性には EGF と EGFR の結合が重要であると考え、そのリガンド - 受容体結合を阻害し EGFR 活性化を抑制することで ALK 阻害薬抵抗性を

克服できるのではないかと考えました。抗 EGFR 抗体薬であるパニツムマブと ALK 阻害薬を併用することで、ALK 阻害薬感受性が回復し、耐性を克服できることが実験的に明らかになりました。マウスゼノグラフトモデルを用いた動物実験でも MIG6 を欠損させることで ALK 阻害薬の 1 つであるアレクチニブへの耐性が生じやすくなり、EGFR 抗体薬パニツムマブを同時に投与することで高い治療効果を発揮し、耐性腫瘍の出現を遅らせられることが確認されました。さらに臨床検体を解析した結果、ALK 阻害薬に耐性となった後に採取された検体では、ALK 阻害薬未治療時の検体と比較して MIG6 の発現が低下している症例も存在することが判明しました。

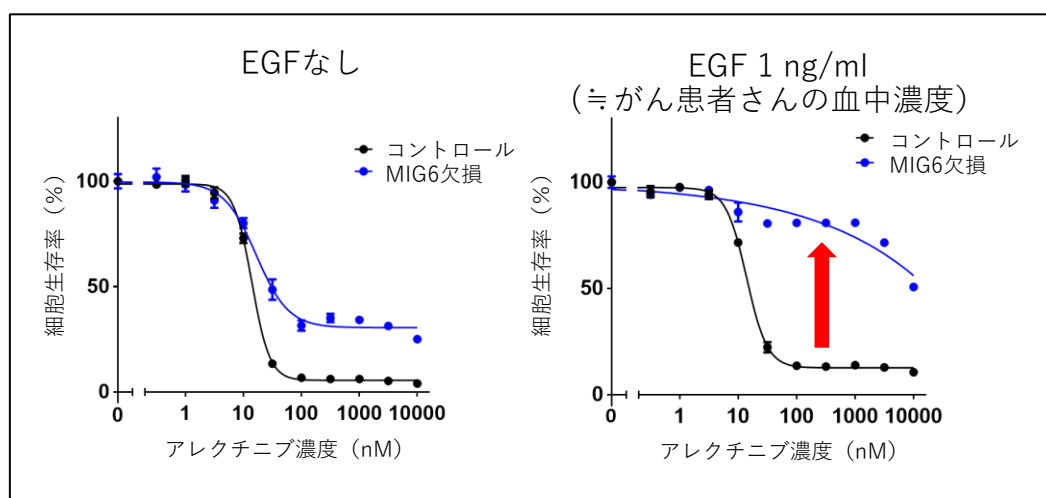


図 2 . EGF 刺激による ALK 阻害薬感受性の変化

最後に、ALK と ROS1 のチロシンキナーゼ領域の構造は非常によく似ているため、MIG6 欠損の治療抵抗のメカニズムが ROS1 陽性の非小細胞がんでも生じるのではないかと予想しました。ROS1 陽性肺がん患者さんより樹立した細胞株でも同様の実験を行ったところ MIG6 を欠損させることで ROS1 阻害薬抵抗性を生じ、パニツムマブとの併用療法が有効であることが確認されました。MIG6 の発現が低い ROS1 陽性肺がん細胞株では、低濃度の EGF による刺激でも治療抵抗性を生じやすい傾向でしたが、MIG6 を過剰発現させることで耐性を生じにくくなることが明らかになりました。

本研究から、ALK、および ROS1 融合遺伝子陽性肺がんにおいて、MIG6 の欠損が EGFR シグナルの活性化を介して ALK、ROS1 阻害薬抵抗性に関与する可能性を基礎研究レベルで示し、抗 EGFR 抗体薬併用による耐性克服の可能性について報告しました。

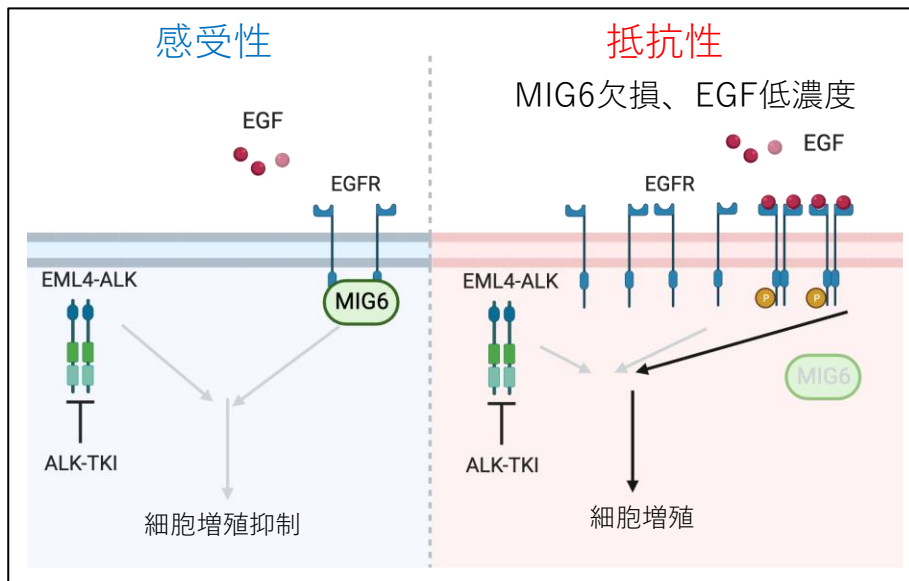


図3. 本研究の概要 BioRenderにより作成しました。

5. 本研究への支援

本研究は、下記機関・財団より資金的支援等を受けて実施されました。

- ・ 国立研究開発法人 日本医療研究開発機構（AMED） 次世代がん医療加速化研究事業（P-PROMOTE）
 - ・ JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム 研究助成
 - ・ 日本学術振興会 科学研究費
 - ・ 日本財団研究助成
 - ・ 公益財団法人 中外創薬科学財団 特別研究助成
- ほか

6. 用語解説

(*1) ALK 融合遺伝子

未分化リンパ腫キナーゼ（Anaplastic lymphoma kinase :ALK）遺伝子がコードする ALK タンパク質は受容体型チロシンキナーゼです。がん細胞の中には染色体転座や逆位などの現象により、EML4 などの遺伝子と ALK 遺伝子が融合遺伝子を形成する場合があります。融合遺伝子形成により恒常的に ALK 融合タンパク質が発現するとともに、多量体形成を介して、恒常的に ALK キナーゼが活性化されることでがん化が促進されると考えられています。

(*2) ROS1 融合遺伝子

ROS1 (ROS proto-oncogene 1) 遺伝子がコードする ROS1 タンパク質は受容体型チロシ

ンキナーゼとして知られています。ALK 融合遺伝子と同様、CD74 などの遺伝子と染色体転座や逆位などの現象により融合遺伝子を形成する場合があります、恒常的発現の誘導と多量体形成などを介して、恒常的に ROS1 キナーゼが活性化され、がん化が促進されると考えられています。

(*3) ALK、ROS1 阻害薬

ALK、ROS1 融合タンパク質のキナーゼ活性を抑制する分子標的薬です。本邦においては、ALK 阻害薬としてクリゾチニブ、アレクチニブ、セリチニブ、ブリグチニブ、ロルラチニブの 5 剤が承認されています。ROS1 阻害薬としてクリゾチニブ、エヌトレクチニブの 2 剤が承認されています。ALK と ROS1 のチロシンキナーゼ領域の構造は非常によく似ているため、一部の薬剤、例えばクリゾチニブでは ALK と ROS1 の両方のキナーゼ活性を阻害することが可能です。

(*4) CRISPR/Cas9 スクリーニング

CRISPR/Cas9 は大腸菌由来の Cas9 タンパク質と sgRNA を組み合わせた遺伝子編集技術です。標的遺伝子の配列に合わせた sgRNA を設計することで Cas9 タンパク質が sgRNA と結合した二本鎖 DNA を切断します。それにより、簡便かつ高精度に目的遺伝子からのたんぱく質発現を喪失させることが可能です。この技術を応用してヒトの全遺伝子（約 2 万）を対象にノックアウト細胞を作成し、薬剤処理などの介入後に次世代シーケンサで sgRNA を解析することにより原因遺伝子を特定するといったことが可能となる研究手法です。

以上

本件に関するお問い合わせ先

公益財団法人がん研究会 調達・社会連携部 広報課

住所:東京都江東区有明 3-8-31 TEL:03-3570-0775 E-mail: ganken-pr@jfcrr.or.jp