

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

候補標的分子の分子生物学的解析

研究分担者 江成 政人 国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究要旨

神経芽腫の約10%程度において、ALK 遺伝子の遺伝子増幅や変異活性化が起こっていることが知られており、ALK 阻害剤が ALK 陽性神経芽腫の分子標的薬候補として考えられている。また、神経芽腫において、p53 遺伝子の変異はほとんどないことが知られている。そこで、本研究では、ALK 遺伝子の遺伝子増幅や活性化変異を持つ神経芽腫において p53 経路の活性化が ALK 阻害剤耐性を減弱させるか調べた。その結果、ALK 阻害剤や p53 活性化剤単独に比べ、併用処理が ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性を著しく減弱させることがわかった。更に、特殊な細胞培養用の培地を用いて、がん幹細胞様の細胞をスフェア形成させ、その際の ALK 阻害剤耐性についても調べたところ、ALK 阻害剤と p53 活性化剤との併用が有効であることが分かった。

A．研究目的

ALK 遺伝子は神経芽腫の約10%程度で遺伝子増幅や変異活性化が見られるがん遺伝子で、ALK 阻害剤が ALK 陽性神経芽腫の分子標的薬候補として考えられている。しかしながら、多くの場合 ALK 阻害剤に対する治療抵抗性が問題となるが、その基本的な分子メカニズムやがん幹細胞様性質との関連性など、不明な点が多い。また、ほとんどの神経芽腫において、p53 遺伝子の変異はなくどのようなメカニズムで p53 経路が不活化されているのか詳細にわかっていない。以前の私達の研究から、ALK 融合を持つリンパ腫や肺腺がんにおいて、p53 遺伝子の変異がほとんどなく ALK による p53

のリン酸化が p53 経路を不活化すること、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が、ALK 融合陽性リンパ腫に対して非常に有効であることを見出した。

そのような背景のもと、本研究では、ALK の遺伝子増幅あるいは活性化変異を持つ神経芽腫において、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が、神経芽腫のがん幹細胞様性質を持つ細胞の増殖を効果的に抑制するか検討するとともに、ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性メカニズムを解明することを目的とする。

B．研究方法

ヒト神経芽腫 NB39-nu 細胞及び SHSY-5Y 細胞は10%牛胎児血清(FBS)

と抗生物質ペニシリン及びソトレプトマイシンを含む PRMI-1640 培地で、37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。スフェア形成能のアッセイ系には、20 ng/ml 上皮成長因子 (EGF)、10 ng/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 及び B27 添加物を含む DMEM/F-12 培地を用い、NB39-nu 細胞及び SHSY-5Y 細胞を低細胞結合プレート中で培養した。ALK 阻害剤には、Crizotinib、CH5424802 及び TAE684 を用い、様々な濃度で神経芽腫由来の細胞を処理した。一方、p53 活性化剤には、Nutlin-3a を用い、単剤あるいは ALK 阻害剤と併用で細胞を処理した。細胞生存率の測定には、WST-8 をベースとした Cell counting kit を用いた。(倫理面への配慮)

臨床由来の検体を使用しておらず、該当しない。

### C . 研究結果

ALK 遺伝子の遺伝子増幅を持つ神経芽腫 NB39-nu 細胞において、p53 活性化剤 Nutlin-3a が ALK 阻害剤に対する薬剤耐性を軽減させるか調べた。その結果、ALK 阻害剤や p53 活性化剤単剤と比較して、併用処理が NB39-nu 細胞の ALK 阻害剤耐性を著しく減弱させることがわかった。また、ALK 遺伝子の活性化変異を持つ神経芽腫 SHSY-5Y 細胞においても、同様な結果を得た。次に、がん幹細胞様形質の特徴としてスフェア形成能の有無が用いられている。そこで、上記神経芽

腫由来の細胞におけるスフェア形成能の実験系の構築を試みた。様々な培養条件を用いて検討したところ、20 ng/ml 上皮成長因子 (EGF)、10 ng/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 及び B27 添加物の存在下、NB39-nu 細胞及び SHSY-5Y 細胞共にスフェア形成能を示した。そのスフェア形成のアッセイ系を用いて、がん幹細胞様形質を持つ細胞塊を形成させ、ALK 阻害剤耐性における p53 活性化剤の影響について調べた。2次元平面培養の時と同様、この実験系を用いた解析からも p53 活性化剤が ALK 阻害剤耐性を軽減させるのに有効であることがわかった。

### D . 考察

本研究において、p53 活性化剤である Nutlin-3a が ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性を軽減させることがわかった。特にがん幹細胞様性質を持つ神経芽腫に対しても ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が相乗効果を示し、ALK 陽性神経芽腫に対してきわめて有効であることが示唆された。しかしながら、ALK 陽性神経芽腫において p53 経路がどのようにして不活化しているのか、併用処理がなぜ有効なのかについての分子メカニズムや神経芽腫における ALK 阻害剤耐性の分子メカニズム等理解に乏しく、今後の解析が必要であろう。

### E . 結論

以上の結果、p53 活性化は、がん幹細胞様性質を持つ ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性を軽減させ、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が ALK 陽性神経芽腫に対し、きわめて有効的な治療法になり得ることが期待できる結果を導き出した。

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

1) Ryo otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Matsushima-Hibiya, Makoto Miyazaki, Fumio Tashiro, Hitoshi Ichikawa, Takashi Kohno, Takahiro Ohiya, Uun Yokota, Hitoshi Nakagawa, Yoichi Taya, and Masato Enari: TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. **Proseedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 111, 18691-18696, 2014

2) Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Hitoshi Ichikawa, Kouya Shiraishi, Hiromi Sakamoto, Masato Enari, Koh Furuta, Yoko Shimada, Hideaki Ogiwara, Shunichi Watanabe, Hiroshi Nokihara, Kazuki Yasuda, Masaki Hiramoto, Takao Nammo, Aaron J. Schetter, Hirokazu Okayama, Curtis C. Harris, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida and Takashi Kohno: Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung

Adenocarcinoma. **Clinical Cancer Reserch.** 20, 3087-3093, 2014

3) Chihiro Otsubo, Ryo Otomo, Makoto Miyazaki, Yuko Matsushima-Hibiya, Takashi Kohno, Reika Iwakawa, Fumitaka Takeshita, Hirokazu Okayama, Hitoshi Ichikawa, Hideyuki Saya, Tohru Kiyono, Takahiro Ochiya, Fumio Tashiro, Hitoshi Nakagama, Jun Yokota, and Masato Enari: TSPAN2 is Involved in cell Invasion and Motility during Lung Cancer Progression. **Cell Reports**, 7, 527-538, 2014

### 2. 学会発表

1) TSPAN2 is a factor responsible for promotion of invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. Makoto Miyazaki, Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari. 第37回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014年11月25日

2) TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Makoto Miyazaki, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari. 第37回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014年11月25日

3) CD74-NRG1 はがん幹細胞性を促進する可能性のある腫瘍性タンパク質である。Tkahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsnori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu

Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh. 第37回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014年11月25日

4) Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. Takashi Nakaoku, Hitoshi Ichikawa, Kouya Shiraishi, Hiromi Sakamoto, Masato Enari, Hideaki Ogiwara, Hiroshi Nokihara, Hirokazu Okayama, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida, Takashi Kohno. 第73回日本癌学会学術総会、口頭発表、横浜、2014年9月26日

5) CD74-NRG1 is a potential oncoprotein that promotes cancer stem cell properties. Takahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsunori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh. 第73回日本癌学会学術総会、ポスター発表、横浜2014年9月27日

6) INACTIVATION OF P53 PATHWAY IN ALK FUSION-POSITIVE TUMORS THROUGH DIRECT TYROSINE PHOSPHORYLATION OF P53: Masato Enari. the 16th International p53 Workshop, ポスター発表、sweden, 2014年6月16日

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし