

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

肺がんにおける薬物排出トランスポーターの分子基盤研究による
がん幹細胞の性状解析と分子標的治療薬耐性についての研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者（研究代表者） 片山 量平

平成27（2015）年 3月

目 次

I . 委託業務成果報告（総括）

肺がんにおける薬物排出トランスポーターの分子基盤研究によるがん幹細胞 の性状解析と分子標的治療薬耐性についての研究 -----	2
片山 量平, 北園 聡	

II . 研究成果 -----	8
-----------------	---

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

肺がんにおける薬物排出トランスポーターの分子基盤研究によるがん幹細胞
の性状解析と分子標的治療薬耐性についての研究

業務主任者（研究代表者）片山 量平 公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター 研究員

研究要旨：

本研究では、がん幹細胞に過剰発現するとされる ABC トランスポーターなどの薬物排出トランスポーター（D-TPT）に着目し、肺がんにおける CSC の性状と分子標的治療薬抵抗性について明らかにすることを目的とし、研究を行っている。全体計画の初年度である平成 26 年度には培養細胞系を用いて各分子標的治療薬がどの D-TPT による細胞外排出を受けるかを明らかにし、さらに、実際に臨床上的耐性に寄与しているかどうかの検証をしており着実な成果を得ている。また D-TPT の発現とがん幹細胞性の検討については、細胞株を用いた検討では一部の細胞集団のみに D-TPT の高発現が見られる検体もしくは細胞株の同定に至っておらず、現在目下検討中である。D-TPT の免疫染色法については確立し、保存検体を用いた染色を進行中である。上記の様に当初の予定通り研究が進行しており、ほぼ計画通りに次年度の実施項目への取り組みを進める。

片山 量平（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 研究員）
北園 聡（公益財団法人がん研究会 有明病院 呼吸器内科 医員）

A．研究目的

進行肺がんの薬物療法は、近年になり EGFR 活性化型変異や融合遺伝子などの Driver Oncogene の発見と分子標的治療薬の登場により大きな変化を遂げている。それらの Driver Oncogene を標的としたチロシンキナーゼなどの分子標的薬は顕著な奏功を示すことが多い。しかし 1 年程度で耐性腫瘍が出現することが大きな問題である。その耐性機構として遺伝子変異や側副経路の活性化など様々な耐性機構が明らかになってきているが、これまでによく調べられてきている EGFR 変異陽性や ALK 融合遺伝子陽性肺がんにおいても約 3 割のメカニズムが未だ不明である。また耐性腫瘍の出現は、腫瘍内に治療前から遺伝子変異等を有する耐性細胞がわずかに存在しているという可能性と、治療

薬抵抗性の性質を有し造腫瘍性が高いとされるがん幹細胞(CSC)が存在する為という可能性等が考えられている。本研究では、CSC に過剰発現するとされる薬物排出トランスポーター(D-TPT)に着目し、肺がんにおける分子標的治療薬感受性・抵抗性と D-TPT, CSC の関係について明らかにすることを目的とする。さらに D-TPT 阻害薬併用療法等を探索し治療への応用を目指す。これまで我々は、ALK 陽性肺がんを中心に肺腺がんにおける分子標的治療薬耐性機構として複数の耐性機構を明らかにしてきた。本研究では、臨床検体と培養細胞の両方を用いて、初年度である平成 26 年度に、D-TPT が各分子標的薬耐性に関与するかを明らかにすることを目的に研究を進めている。さらに、D-TPT の発現を調べるための免疫染色法の確立を目指して検討を行い、現在保存検体や新鮮検体を用いて D-TPT 高発現の有無について検討を行っている。今後 27 年度には、本研究をさらに推進し肺腺がんにおける CSC と D-TPT の関係、CSC の性状について明らかにする。さらに耐性に関わる D-TPT 阻害薬を用いた併用療法の発見を目指す。

また、検索する臨床検体数を拡大し、D-TPT の臨床上の重要性を明らかにする。

これまで化学療法薬に対する耐性機構として D-TPT の過剰発現が示されてきたが、分子標的薬の耐性については一部の血液腫瘍を除き、D-TPT の関与は明らかでない。特に肺がん領域においては、分子標的薬耐性機構として遺伝子変異や増殖シグナル、細胞死についての研究が発展してきた。本研究では肺がんの分子標的治療における D-TPT の役割に新たに着目し、まだ詳細が明らかとなっていない肺がんにおける CSC を明らかにしようとする研究である。

B．研究方法

(1) 各 Driver Oncogene 変異 (EGFR 遺伝子変異、ALK 融合陽性など) 陽性肺がんを用い、各分子標的薬 (チロシンキナーゼ阻害薬 : TKI) への耐性細胞株を培養条件および Xenograft モデルで複数樹立し、遺伝子変異や他の増殖シグナルの活性化とともに薬物排出トランスポーター (D-TPT) を介した耐性について調べている。また、D-TPT のレンチウィルスベクターを作成し、過剰発現させた細胞株を作成し、各 TKI の感受性を検討する。

(2) 患者検体 (未治療・既治療 : 現在合計約 20 例) から細胞株の樹立と一部 Xenograft の作成を行うとともに、D-TPT の過剰発現について検討する。腫瘍細胞を豊富に含む胸水検体からは、D-TPT を過剰発現している細胞集団の有無をフローサイトメトリーにより確認する。また、各患者検体における分子標的薬耐性機構については、遺伝子変異の有無を次世代シーケンサー等により検索し、更に他の増殖シグナルの活性化や D-TPT による耐性の可能性等も検討する。

(3) D-TPT 高発現細胞集団の有無とそれらのがん幹細胞としての性状を解析する。

(4) D-TPT の免疫染色法を確立し、既保存検体 (FFPE 保存臨床検体等) を用いて D-TPT 過剰発現の有無を検索する。

(倫理面への配慮)

Xenograft モデルを用いた検討では、腫瘍の増殖の様子の観察や分子標的治療薬や化学療法薬の抗腫瘍効果などを検討するとともに、耐性腫瘍の樹立をする予定である。このような動物実験の取り扱いには公益財団法人がん研究会動物実験等取扱規定に則り最小限の実験動物を用いて行う。臨床検体を用いた体細胞変異解析を含む各種解析は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して実施する。(公財) がん研究会では公益財団法人がん研究会有明病院 臨床研究倫理審査委員会において承認された研究計画 (研究受付番号 : 2013-1093) に則り行う。

C．研究結果

(1) 細胞株を用いた D-TPT による TKI 耐性の検討 :

まず薬剤耐性とがん幹細胞に深く関与するとされるある D-TPT (D-TPT-A) のレンチウィルスベクターの作製に成功し、EGFR 変異陽性肺がん細胞株として HCC827 細胞株、ALK 融合遺伝子 (EML4-ALK) 陽性遺伝子陽性肺がん細胞株 H3122 細胞を用いて、恒常的に D-TPT-A を高発現する細胞株を作成した。それらの D-TPT-A 過剰発現細胞株はこれまでの報告通りに複数の従来の細胞障害性抗がん剤に対し強い抵抗性を獲得した。これらの細胞を用いて各種分子標的薬への感受性を検討した結果、EGFR 変異陽性肺がんでは、大きな薬剤感受性の変化は認められなかったが、ALK 陽性肺がん H3122 細胞では、薬剤によっては 10 倍以上の耐性を示すようになるものもあった。現在、そのほかの融合遺伝子陽性肺がん細胞株を利用し、D-TPT 過剰発現細胞株を作成し、同様の検討を行っている。

(2) 患者検体を用いた D-TPT の発現の検討と

TKI 感受性等との相関の解析：

公益財団法人がん研究会 臨床研究倫理審査委員会において承認された研究計画（研究受付番号：2013-1093）に則り、同意取得済み患者の検査・診療時の残余検体（胸水・心嚢水の穿刺液，生検検体と生検実施時の針の洗浄液など）から細胞株の培養を行い、TKI 感受性・耐性と、耐性であった場合にはその耐性機構を検索した。その結果、ALK 陽性肺がん検体では新たな耐性変異を含めた新規耐性機構の同定に成功した。TKI 治療前およびTKI 治療後の検体から合わせて30以上の細胞株の樹立に成功した。一部の検体においては、あるD-TPT の過剰発現があることを発見し、現在その耐性との関与等について詳細な解析を進めている。また、これまでの検討において、TKI 治療前の検体でのD-TPT の過剰発現は見つけていないものの、現在ごくわずかな細胞集団においてD-TPT 過剰発現集団がないかどうかを詳細に検討中である。

（3）D-TPT の発現とがん幹細胞性の解析：

これまでの検討の結果、培養細胞株では、D-TPT の基質の1つである核酸蛍光染色色素 Hoechst33342 に染まりにくい細胞集団（SP：Side Population 細胞）にがん幹細胞性（高い造腫瘍性と治療薬抵抗性）があることを見出している。本研究においては培養細胞株においてのSP 解析はまだ行っていないが、必要に応じて今後検討する予定である。これまでに、D-TPT の過剰発現が見られた臨床検体由来の細胞を含めて各臨床検体由来細胞株を用いて造腫瘍性を検討した結果、特にD-TPT 発現の有無と造腫瘍性の関係は見られなかった。しかし、D-TPT 過剰発現する細胞株では、あるTKI に対して顕著な治療抵抗性を認めた。現在までに、1症例の臨床検体や培養細胞株からD-TPT 高発現細胞集団と低発現細胞集団の両方を認めるケースが得られていないが、今後そのようなケースがあるかどうかを検索し、発見した際にはD-TPT の発現とがん幹細胞性について検討する。

（4）D-TPT の免疫染色法の確立と保存検体を用いたD-TPT 発現の検討：

まずはFFPE の切片を用いたD-TPT-A の免疫染色法（IHC）の確立を、がん研究会 竹内賢吾博士のご協力の下検討し、染色法の確立に成功した。そこで、ALK 陽性のTKI 未治療の保存検体（Tissue Micro Array）を用いて免疫染色法による検討を行った結果、D-TPT-A 陽性症例は認められなかった。次に、遺伝子変異を限らず、規模を肺がん手術検体のTissue Micro Array（約1500検体）に拡大した上で検討した結果、強陽性となる症例を確認した。これらについて今後詳細な解析を検討する予定である。また、TKI 治療後でD-TPT の過剰発現を確認した症例において、そのほかの時点でのD-TPT の発現を検討した結果、驚くべきことに治療前の検体にはD-TPT 発現細胞が確認されなかったが、TKI 耐性後の検体はどの時点の検体でもD-TPT の発現が確認された。この症例については今後より詳細に解析を進める。

D．考察

（1）細胞株を用いたD-TPT によるTKI 耐性の検討：

本研究から新たにあるD-TPT を介した薬剤耐性の可能性を発見した。このことは、分子標的薬特にTKI の耐性機構治療抵抗性のD-TPT 高発現細胞の出現が耐性に深くかかわる可能性を強く示唆している。TKI 耐性機構としてほとんど注目されてこなかったD-TPT であるが、今後の本継続課題において他のD-TPT の関与についても詳細に検討し、D-TPT による耐性機構について詳細に明らかにしていく。

（2）患者検体を用いたD-TPT の発現の検討とTKI 感受性等との相関の解析：

本研究において患者検体由来の細胞におけるD-TPT の発現検討と、TKI 感受性・耐性、耐性機

構の解析を行い、初めてある D-TPT が TKI 治療耐性検体で確認され、さらにそれがその TKI 耐性に強く関係することを示唆するデータが得られた。今後より詳細に D-TPT を介した耐性が他の Driver 変異陽性のがんや他の分子標的治療薬に対して認められるかといったことを明らかにしていく必要がある。このほかにも、TKI 耐性機構を臨床検体由来の組織を用いて調べることで、新たな TKI 耐性機構の発見を行うことができた。さらに、TKI 耐性機構を発見するだけでなく、その耐性機構の解明から新規治療法の探索へとつなげるために、検体から樹立した培養細胞が大きく活かされ、併用療法などの治療法の検討が効率よく行えるようになった。この研究から得られた手法は、今後のオーダーメイドとなりつつある治療において、より有効な治療法選択の上でも非常に重要なツールとなることが期待される。

(3) D-TPT の発現とがん幹細胞性の解析 :

D-TPT 発現細胞が臨床検体由来の細胞等においても認められ、非発現細胞と造腫瘍性等について比較した結果、今のところの小規模な数では、検体が違う人の違う腫瘍由来では一概に比較できないが、D-TPT 発現量と造腫瘍性に相関等は認められていない。一方、高発現細胞ではがんの治療抵抗性は明確に示すことができ、今後よりがん幹細胞性との関係について、1つの腫瘍のごくわずかな集団に D-TPT 強発現細胞がいる様な検体を検索し用いることで明らかにしていきたい。今後より検体数を増やして検討するとともに、TKI 治療前においては、やや D-TPT の発現が上昇している画分(中程度の D-TPT 発現細胞)をきれいに分離できるように研究手法の改善を行い、D-TPT の発現とがん幹細胞性について検討する。

(4) D-TPT の免疫染色法の確立と保存検体を用いた D-TPT 発現の検討 :

本研究により、まずある D-TPT の染色方法の確

立に成功し、非常に多くの検体での D-TPT の発現の解析を行うことができた。TKI 治療前の ALK 肺がん手術検体では高発現例は認められなかったが、一部の肺がん手術検体で D-TPT が高発現している例を発見することができた。今後、その他の D-TPT の発現状態を免疫染色する方法を検討するとともに、D-TPT 発現症例の特徴等についても解析を進めていく予定である。

E . 結論

平成 26 年 7 月に開始した本研究では、肺がんにおける TKI 等の分子標的薬耐性機構、D-TPT の発現の解析、そして、TKI 耐性と D-TPT と耐性との関係についての解析が順調に進行し、新たに分子標的薬耐性機構としての D-TPT の関与を示唆することができた。今後より詳細にがん幹細胞性等との関係や、D-TPT による分子標的薬の耐性克服方法の発見をめざし、研究を継続し推進していく。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1: RB Loss in Resistant EGFR Mutant Lung Adenocarcinomas that Transform to SCLC. Niederst MJ, Sequist LV, Poirier JT, Mermel CH, Lockerman EL, Garcia AR, **Katayama R**, Costa C, Ross KN, Moran T, Howe E, Fulton LE, Mulvey HE, Bernardo LA, Mohamoud F, Miyoshi N, VanderLaan PA, Costa DB, Jänne PA, Borger DR, Ramaswamy S, Shioda T, Iafrate AJ, Getz G, Rudin CM, Mino-Kenudson M, Engelman JA. **Nature Communications**. 2015 Mar 11;6:6377

2: Cabozantinib Overcomes Crizotinib Resistance in

ROS1 Fusion-Positive Cancer.

Katayama R, Kobayashi Y, Friboulet L, Lockerman EL, Koike S, Shaw AT, Engelman JA, Fujita N. **Clin Cancer Res.** 2015 Jan 1;21(1):166-74.

3: Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer.

Crystal AS, Shaw AT, Sequist LV, Friboulet L, Niederst MJ, Lockerman EL, Frias RL, Gainor JF, Amzallag A, Greninger P, Lee D, Kalsy A, Gomez-Caraballo M, Elamine L, Howe E, Hur W, Lifshits E, Robinson HE, **Katayama R**, Faber AC, Awad MM, Ramaswamy S, Mino-Kenudson M, Iafrate AJ, Benes CH, Engelman JA. **Science.** 2014 Dec 19;346(6216):1480-6.

4: Tivantinib (ARQ 197) Exhibits Antitumor Activity by Directly Interacting with Tubulin and Overcomes ABC Transporter-Mediated Drug Resistance.

Aoyama A[†], **Katayama R**[†], Oh-Hara T, Sato S, Okuno Y, Fujita N. **Mol Cancer Ther.** 2014 Dec;13(12):2978-90. [†]: equal contribution.

5: Two Novel ALK Mutations Mediate Acquired Resistance to the Next-Generation ALK Inhibitor Alectinib.

Katayama R, Friboulet L, Koike S, Lockerman EL, Khan TM, Gainor JF, Iafrate AJ, Takeuchi K, Taiji M, Okuno Y, Fujita N, Engelman JA, Shaw AT. **Clin Cancer Res.** 2014 Nov 15;20(22):5686-96.

6: The ALK Inhibitor Ceritinib Overcomes Crizotinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer.

Friboulet L[†], Li N[†], **Katayama R**[†], Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, Michellys PY, Awad MM, Yanagitani N, Kim S, Pferdekamper AC, Li J, Kasibhatla S, Sun F, Sun X, Hua S, McNamara P, Mahmood S, Lockerman EL, Fujita N, Nishio M, Harris JL, Shaw AT, Engelman JA. **Cancer Discov.** 2014 Jun;4(6):662-73.,

[†]: equal contribution

2. 学会発表

1. 片山 量平 : (International Session 招待講演) Resistance Mechanisms to ALK-TKIs , 第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会 , 福岡 , 2014.7.17-19

2. 片山 量平 , 藤田直也 : (International Symposium 招待講演) Acquired resistance in ALK rearranged NSCLC: Mechanisms of and strategies to overcome resistance , 第 73 回日本癌学会学術集会 , 横浜 , 2014.9.25-27

3. 小池 清恵 , 片山 量平 , 藤田直也 : (口演) ALK 陽性肺がんにおける Alectinib 獲得耐性機構の同定 , 第 73 回日本癌学会学術集会 , 横浜 , 2014.9.25-27

4. 小林 由佳 , 片山 量平 , 藤田直也 : (口演) ROS1 融合遺伝子陽性肺がんにおけるクリゾチニブ耐性機構とその克服法 , 第 73 回日本癌学会学術集会 , 横浜 , 2014.9.25-27

5. 坂下 卓也 , 片山 量平 , 藤田直也 : (口演) ALK 融合遺伝子陽性肺がんにおける新規 Ceritinib 耐性機構の同定 , 第 73 回日本癌学会学術集会 , 横浜 , 2014.9.25-27

6. 青山 暁 , 片山 量平 , 藤田直也 : (口演) Tivantinib (ARQ197) shows antitumor activity by reduced tubulin polymerization and overcomes tubulin binder-resistance , 第 73 回日本癌学会学術集会 , 横浜 , 2014.9.25-27

7. 片山 量平 : (Symposium 招待講演) New mechanisms of acquired resistance to ALK inhibitors , 19th Japanese Foundation for Cancer

Research-International Symposium on Cancer
Chemotherapy (JFCR-ISCC) , 東京 , 2014.12.10-11

H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「肺がんにおける薬物排出トランスポーターの分子基盤研究による
がん幹細胞の性状解析と分子標的治療薬耐性についての研究」

機関名 公益財団法人 がん研究会

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Resistance Mechanisms to ALK-TKIs（口頭）	片山 量平	第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会，福岡	2014 年 7 月	国内
Acquired resistance in ALK rearranged NSCLC: Mechanisms of and strategies to overcome resistance（口頭）	片山 量平，藤田直也	第 73 回日本癌学会学術集会 横浜	2014 年 9 月	国内
ALK 陽性肺がんにおける Alectinib 獲得耐性機構の同定（口頭）	小池 清恵，片山 量平，藤田直也	第 73 回日本癌学会学術集会 横浜	2014 年 9 月	国内
ROS1 融合遺伝子陽性肺がんにおけるクリゾチニブ耐性機構とその克服法（口頭）	小林 由佳，片山 量平，藤田直也	第 73 回日本癌学会学術集会 横浜	2014 年 9 月	国内
ALK 融合遺伝子陽性肺がんにおける新規 Ceritinib 耐性機構の同定（口頭）	坂下 卓也，片山 量平，藤田直也	第 73 回日本癌学会学術集会 横浜	2014 年 9 月	国内

Tivantinib (ARQ197) shows antitumor activity by reduced tubulin polymerization and overcomes tubulin binder-resistance (口頭)	青山 暁, 片山 量平, 藤田直也	第73回日本癌学会学術集会 横浜	2014年9月	国内
New mechanisms of acquired resistance to ALK inhibitors (口頭)	片山 量平	19th Japanese Foundation for Cancer Research-International Symposium on Cancer Chemotherapy (JFCR-ISCC), 東京	2014年12月	国内 (国際学会)

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
RB Loss in Resistant EGFR Mutant Lung Adenocarcinomas that Transform to SCLC.	Niederst MJ, Sequist LV, Poirier JT, Mermel CH, Lockerman EL, Garcia AR, Katayama R, Costa C, Ross KN, Moran T, Howe E, Fulton LE, Mulvey HE, Bernardo LA, Mohamoud F, Miyoshi N, VanderLaan PA, Costa DB, Jänne PA, Borger DR,	Nature Communications	2015年3月	国外

	Ramaswamy S, Shioda T, Iafrate AJ, Getz G, Rudin CM, Mino-Kenudson M, Engelman JA.			
Cabozantinib Overcomes Crizotinib Resistance in ROS1 Fusion-Positive Cancer.	Katayama R, Kobayashi Y, Friboulet L, Lockerman EL, Koike S, Shaw AT, Engelman JA, Fujita N.	Clinical Cancer Research	2015年1月	国外
Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer.	Crystal AS, Shaw AT, Sequist LV, Friboulet L, Niederst MJ, Lockerman EL, Frias RL, Gainor JF, Amzallag A, Greninger P, Lee D, Kalsy A, Gomez-Caraballo M, Elamine L, Howe E, Hur W, Lifshits E, Robinson	Science	2014年12月	国外

	HE, Katayama R, Faber AC, Awad MM, Ramaswamy S, Mino-Kenudson M, Iafrate AJ, Benes CH, Engelman JA.			
Tivantinib (ARQ 197) Exhibits Antitumor Activity by Directly Interacting with Tubulin and Overcomes ABC Transporter-Mediated Drug Resistance.	Aoyama A, Katayama R, Oh-Hara T, Sato S, Okuno Y, Fujita N.	Molecular Cancer Therapeutics	2014年12月	国外
Two Novel ALK Mutations Mediate Acquired Resistance to the Next-Generation ALK Inhibitor Alectinib.	Katayama R, Friboulet L, Koike S, Lockerman EL, Khan TM, Gainor JF, Iafrate AJ, Takeuchi K, Taiji M, Okuno Y, Fujita N, Engelman JA, Shaw AT.	Clinical Cancer Research	2014年11月	国外

<p>The ALK Inhibitor Ceritinib Overcomes Crizotinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer.</p>	<p>Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, Michellys PY, Awad MM, Yanagitani N, Kim S, Pferdekamper AC, Li J, Kasibhatla S, Sun F, Sun X, Hua S, McNamara P, Mahmood S, Lockerman EL, Fujita N, Nishio M, Harris JL, Shaw AT, Engelman JA.</p>	<p>Cancer Discovery</p>	<p>2014年6月</p>	<p>国外</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------	----------------	-----------