特別講演
総説

融合型 ALK キナーゼを標的とした新しい抗がん薬

間野 博行^{1), 2)}

要約：我々は独自の機能スクリーニング手法を開発し、それを用いて肺腺がん臨床検体から新しい融合型がん遺伝子 *EML4-ALK* を発見した。本来 *ALK* は受容体型チロシンキナーゼをコードするが、染色体転座 *inv(2)(p21p23)* が生じた結果 *EML4* 遺伝子と *ALK* 遺伝子が融合し、*EML4* タンパク質のアミノ末端側約半分が *ALK* のキナーゼドメインと融合したタンパク質が産生されるのである。*EML4-ALK* は *EML4* 内の coiled-coil ドメインを介して恒常的に二量体化され活性化されて発がんを誘導することが明らかになった。実際 *EML4-ALK* を肺胞上皮特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成すると同マウスは生後すぐに両肺に多数の肺腺がんを発症し、しかもこれらマウスに *ALK* 活性の特異的阻害薬を投与すると肺腺がんは速やかに消失した。すなわち *EML4-ALK* が同キナーゼ陽性肺がんの主たる発がん原因であり、だからこそその酵素活性を阻害する薬剤は *EML4-ALK* 陽性肺がんの全く新しい分子標的治療薬となる事が生体において証明されたのである。我々の *EML4-ALK* の論文公開は 2007 年であったが、翌年には *ALK* 特異的阻害薬による初めての臨床試験が開始され、2010 年にはその驚くべき治療効果が公表された。現在すでに世界中で計 5 種類の *ALK* 阻害薬による臨床試験が行われており、その数は増加の一途をたどっている。肺がんという極めて予後不良ながん腫に対して、このような特効薬とも言うべき治療薬が開発されつつあることは臨床に極めて意義のあることであり、大規模な第Ⅲ相試験を必要としない形で薬剤として認可され臨床に供されることが望ましい。そしてその時に最も重要なことは、正確かつ高感度に *EML4-ALK* 陽性肺がんを診断することであろう。

はじめに

肺がんは欧米および日本でがん死数の第 1 位を占める予後不良の疾患であり、日本だけでも年間 6 万人以上、また米国でも年間 16 万人ほどの患者が肺がんによって亡くなっている。肺がんは早期に発見することが困難なため、根治が期待できる外科手術が行える症例は極めて稀である。しかも旧来の抗がん薬による化学療法では延命効果が少なく、病因に基づいた新しい肺がんの治療法開発が待たれていた。

近年、肺がんの一部の症例に上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) 遺伝子の活性化型変異が生じていることが報告され、しかも *EGFR* 異常を有する症例の一部に対して *EGFR* のチロシンキナーゼ活性を阻害する gefitinib あるいは erlotinib が有効なことが明らかになった(1)。こうして肺がんにも分子標的療法の時代が訪れたのである。しかし不思議なことに *EGFR* 変異はアジア人、若年女性、非喫煙者に多く発症しており(2)、それ以外の症例がどのような活性化型がん遺伝子を有しているのかは全く不明であった。そこで我々は機能スクリーニング法を用いて、新たな肺がんの原因遺伝子を同定することを目指した。

1. *EML4-ALK* の発見

ー肺がんにおける初めての融合型がん遺伝子

患者検体で発現している遺伝子の機能を効率よくスクリーニングするためには、微量の細胞から cDNA を作成し、これを他の細胞に遺伝子導入する cDNA 発現スクリーニングシステムが有効であろう。我々はこの目的のために、cDNA 発現用組換えレトロウィスライブラリーを作成する手法を開発した。これを用いて、

キーワード：肺がん、チロシンキナーゼ、がん遺伝子、*EML4-ALK*、阻害薬耐性

¹⁾ 東京大学 大学院医学系研究科 ゲノム医学講座 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1) E-mail: hmano@m.u-tokyo.ac.jp

²⁾ 自治医科大学 ゲノム機能研究部 (〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1)

原稿受領日：2011 年 3 月 23 日、依頼原稿。 第 84 回日本薬理学会特別講演総説

Title: Molecular targeted drugs against ALK fusions. Author: Hiroyuki Mano

肺がんの臨床検体から cDNA 発現レトロウイルスライブラリーを構築し、3T3 繊維芽細胞によるフォーカスフォーメーションアッセイを行った。すなわちがん細胞内で発現している mRNA を繊維芽細胞で発現させ形質転換を誘導するがん遺伝子を単離することを目指したのである。

62 才の喫煙者に生じた肺腺がん検体から cDNA 発現ライブラリーを構築し 3T3 繊維芽細胞に導入したところ、2~3 週間の培養で形質転換した異常クローン（形質転換フォーカス）が数十種類生じた。そこでそれら異常 3T3 クローンから挿入 cDNA を回収したところ、驚くべき事に、ある cDNA の 5' 側と 3' 側は違う遺伝子由来であった。5' 側は微小管会合タンパク質の一種である EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) のアミノ末端側約半分をコードし、3' 側は受容体型チロシンキナーゼ ALK (anaplastic lymphoma kinase) の細胞内チロシンキナーゼドメインをコードしていたのである（図 1）(3)。さらに驚いたことに、本来 *EML4* と *ALK* 遺伝子はヒト 2 番染色体短腕内の近い場所（12 Mbp 離れている）に互いに反対向きに存在するのである。従って *EML4-ALK* 融合遺伝子が作られるためには、この 12 Mbp の領域が 2p 内で非常に小さな逆位を形成する必要がある。固形腫瘍は一般に染色体転座は稀であると言われてきたが、我々が腫瘍ゲノムを基質として *EML4* と *ALK* 上にそれぞれプライマーを設置して PCR を行ったところ単一の産物が得られ、その塩基配列を解析することで *EML4* 遺伝子と *ALK* 遺伝子内での切断点・融合点が決定された。すなわち実際に肺がん細胞において 2p 内の微少な逆位が生じていることが確認されたのである。*EML4* タンパク質内には二量体化に働く coiled-coil ドメインが存在するため、*EML4-ALK* は恒常的に二量体化され、活性化されて発がんを誘導することも明らかになった。

図1 EML4-ALK 融合キナーゼの発見

EML4 タンパク質は塩基性領域、HELP ドメインおよび WD リピートからなるが、その WD リピート領域の途中で *ALK* キナーゼの細胞内領域と融合した *EML4-ALK* タンパク質が非小細胞肺がんが生じていることが明らかになった。（文献 3 より改変）

2. *EML4-ALK* の分子診断

旧来の肺がん診断には喀痰の病理診断が重要な役割を果たしてきた。しかし肺がんの病理診断が正確に行われるためには、喀痰細胞内の少なくとも数%はがん細胞で占められている必要があり、その結果喀痰検査により肺がんが診断された時点ではすでにがんが進行している例が多い。従って「喀痰の病理診断」は肺がんの「早期診断」のためにはあまり有効ではなく、たとえば喀痰内の細胞中僅か 0.01% 程度しかがん細胞が存在しなくても診断可能な高感度分子診断法のようなものが早期発見のためには必要であった。

EML4, *ALK* 両遺伝子は共に正常細胞内で存在しているが、両者が融合した *EML4-ALK* 遺伝子は肺がん細胞内でしか存在しない。しかも両遺伝子は本来染色体内で反対向きに存在しているため、*EML4-ALK* の融合点を挟む様に設置したプライマーによる RT-PCR 法は、同融合遺伝子が存在しない限り決して PCR 産物を生じない。従って正常肺細胞あるいは 2p 逆位がない肺がん細胞においては決して PCR 反応は陽性とならないのである。それゆえ臨床試料を用いた RT-PCR 法により *EML4-ALK* mRNA を検出するシステムは、極めて鋭敏かつ精度の高い肺がんの分子診断法になると期待される。

実際我々が *EML4-ALK* 陽性細胞を喀痰 1 mL 中に 0~10,000 個と様々な濃度で混和し RT-PCR にて *EML4-ALK* cDNA の検出を試みたところ、図 2 に示すように、わずか 10 個/mL の細胞を含む喀痰からも明瞭なバンドが検出された(3)。以上より喀痰を用いた

図2 喀痰を用いた肺がんの分子診断

慢性気管支炎患者より調整した喀痰 1 mL に、*EML4-ALK* 発現細胞を 0, 10, 100, 1,000, あるいは 10,000 個添加し、混和した後 *EML4-ALK* 融合点を挟むプライマーによる RT-PCR を行った。10 細胞/mL の検体から明瞭に *EML4-ALK* の PCR 産物が検出される。Marker (50 bp ladder, Invitrogen)。（文献 3 より改変）

EML4-ALK 陽性肺がんの分子診断は実現可能であり、PCR の増幅率を考えると喀痰内にごく僅かしか肺がん細胞が無くても診断可能なことが期待される。すなわち肺がんの早期発見が現実性を持ってくると言えよう。また解析対象としては喀痰だけでなく、胸水、肺胞洗浄液、肺生検試料もちろん適切であり、末梢血を用いる早期発見さえ可能性は存在する(4,5)。

我々が当初発見した *EML4-ALK* は *EML4* のイントロン 13 が *ALK* のイントロン 19 に結合したものであった。その結果 *EML4* cDNA のエクソン 13 が *ALK* cDNA のエクソン 20 に in-frame で融合したのである。しかしすぐに *EML4-ALK* には別の融合バリエーションが存在することが明らかになった。すなわち *EML4* のイントロン 20 で *ALK* のイントロン 19 で融合したものも見付き、これも in-frame で両遺伝子エクソンが融合する(3)。*ALK* のエクソン 20 に in-frame で結合しうる *EML4* 内のエクソンは計 6 種類有り、いずれの場合も *EML4* 内の coiled-coil ドメインをコードするエクソンより下流に相当するため、融合キナーゼはがん化能を有していると考えられる。そこで様々な *EML4-ALK* のバリエーションが存在する可能性を検証するために、*EML4* 内に複数のセンスプライマーを設置するマルチプレックス RT-PCR 法を開発した。本手法を用いて多検体をスクリーニングした結果、実際にヒト肺がんにおいて計 7 種類の異なる *EML4-ALK* バリエーションを発見することに成功し(4-6)、また同様なアプローチを用いることで別のバリエーションも国内外で複数報告されている(7-9)。従って臨床の場で *EML4-ALK* 陽性肺がんを検出する際には、これら様々な *EML4-ALK* バリエーションのいずれも検出可能な診断システムを用いることが重要である。

3. *EML4-ALK* に対する新しい分子標的療法

慢性骨髄性白血病において *ABL* チロシンキナーゼ遺伝子と *BCR* 遺伝子が融合した結果、活性型チロシンキナーゼ *BCR-ABL* が産生される事が知られている。慢性骨髄性白血病の発症には *BCR-ABL* 活性が中心的な役割を果たすが、このチロシンキナーゼ活性を阻害する低分子化合物 imatinib は今日の慢性骨髄性白血病の第一治療選択薬となっている(10)。すなわち発がんの中心的役割を担う異常チロシンキナーゼを抑制することは極めて有効な分子標的治療となるのである。では実際に、*BCR-ABL* と同様に *EML4-ALK* も肺がんにおける新たな治療薬のターゲットとなるのであろうか？

我々は、*EML4-ALK* キナーゼが実際の生体で肺がんの直接的な原因となることを証明する目的で、同キナーゼを肺胞上皮細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。Surfactant protein C (*SPC*) は肺胞上皮にのみ発現する遺伝子であり、これまでそのプロモーターフラグメントが様々な肺がんモデルマウスの作成に用いられてきた。そこで我々も *SPC* 遺伝子プロモーター下流に *EML4-ALK* cDNA を接続した発現ユニットを作成し、これを用いてトランスジェニックマウスラインを複数樹立した(11)。驚くべき事に、これらマウスはいずれも生後僅か数週で両肺に数百個の肺腺がんを多発発症したのである(図 3)。すなわち *EML4-ALK* は極めて強力ながん遺伝子であり、このマウスにおける肺がん発症時期の早さを考えると、同遺伝子陽性の肺がん症例における主たる原因遺伝子である可能性が極めて高いと予想される。

ではそのような肺がん発症マウスに対して *ALK* の酵素阻害薬を投与すると治療効果はあるのであろう

図 3 治療モデル実験の成功

EML4-ALK 発現マウスに *ALK* 活性阻害薬である 2,4-pyrimidinediamine (10 mg/kg/日) を 1 日 1 回経口投与した。治療前と治療開始後 25 日目の時点で CT スキャンを行い、腫瘍サイズの変化を計測した。左肺にあった巨大な 2 個の腫瘍が、治療後はほぼ消失していることが明らかである。(文献 11 より改変)

か？ 我々は経口摂取可能な ALK 特異的阻害薬 2,4-pyrimidinediamine を同肺がん発症マウスに 1 日 1 回投与し、その治療効果を経時的 CT スキャンにて評価した。図 3 に示されるように、治療開始前には左肺に存在した巨大な 2 個の腫瘍が、僅か 25 日間経口接種するだけでほぼ消失していることが判る。他のマウスでも同様な治療効果が確認された(11)。すなわち EML4-ALK 融合キナーゼを標的とする治療法は同キナーゼ陽性腫瘍に著明な臨床効果が期待できるのである。

4. ALK 阻害薬の臨床応用

我々の発見を受けてほぼ全ての巨大製薬会社が ALK 阻害薬の開発に乗り出している。中でもファイザー社は他に先駆けて、2008 年から独自の ALK 阻害薬 (crizotinib) による肺がんの第 I / II 相臨床試験を国外で開始した。Crizotinib は本来 MET キナーゼの阻害薬として開発されたものであり、MET の遺伝子増幅を有する消化器腫瘍に対して第 I 相試験がすでに開始されていた。ファイザー社は我々の論文を見て、crizotinib が ALK にも強い阻害活性をもっていることから、急遽治験対象を肺がんに変え新たな臨床試験を開始したのである。その成果は 2010 年の米国臨床腫瘍学会 (ASCO) 総会にて、第 I / II 相試験の結果発表としては例外的にプレナリー発表として報告された(12)。またほぼ同じ内容は 2010 年末に New England Journal of Medicine 誌に公開されている(13)。

その結果は、FISH と他の検査法で EML4-ALK が証明された計 31 例の治療において奏率が $27/31 = 87\%$ におよび、しかも完全寛解症例が含まれるという目覚ましいものであった。Crizotinib 投与に伴う副作用の多くは悪心・嘔吐であったが、多くの症例において治療の経過と共に副作用の症状は軽快したとのことである。現在 crizotinib の治験は国際第 III 相に移行しており、幸いにも日本も治験対象国に加わり、我が国の患者も国内で crizotinib 治療を受けることができるようになった。また crizotinib のみならずアステラス製薬社、中外製薬・ロッシュ社、ノバルティス社、Infinity Pharmaceuticals 社もそれぞれ独自の ALK 阻害薬による臨床試験を開始しており、その治療成績に興味を持たれる。

5. ALK 阻害薬耐性変異の発見

変異 EGFR 陽性肺がんに対する gefitinib/erlotinib や BCR-ABL 陽性白血病に対する imatinib はいずれも有効なキナーゼ阻害薬であるが、どちらの場合も薬剤抵

抗性となる二次変異が出現することが知られている(14, 15)。では同様に EML4-ALK の場合も耐性変異は出現するのであろうか？

我々は、EML4-ALK 陽性肺腺がん症例で crizotinib の臨床試験に参加し当初は著効したものの、約半年後突然再発し crizotinib 不応性となった症例を経験した。本症例の治療前と再発後の肺がん検体を次世代シーケンサーによって解析する事により、再発時にのみ EML4-ALK のキナーゼドメイン内に新たな付加変異を 2 種類発見したのである(16)。これら変異の 1 つは ALK 内の 1156 番目のシステインをチロシンに置換し、もう 1 つは 1196 番目のロイシンをメチオニンに置換する。興味深いことにこれら 2 種類の変異は互いに別々の cDNA 上に存在していたことから、腫瘍内に新たに独立した 2 種類の細胞クローンが出現したと考えられた。

EML4-ALK を導入した BA/F3 細胞は EML4-ALK の活性依存性に増殖するが、培養上清に crizotinib を添加するとその濃度依存性に細胞死が誘導される。ところが C1156Y あるいは L1196M を有する EML4-ALK はどちらも crizotinib 耐性になる。以上より肺がん内で crizotinib に耐性となる 2 種類の細胞クローンが独立に進化を遂げたことになる。さらに本症例の治療には用いられなかった別の ALK 阻害薬にも両変異は耐性であることも確認され、今回発見された変異は ALK 阻害薬に対するユニバーサルな耐性獲得機構であると考えられた。

ALK の酵素活性領域の三次構造は、ATP 結合ポケットを挟む 2 種類の球形の領域からなる (図 4A)。ATP が結合すると酵素活性はオンになり細胞の無限増殖が誘導される。しかしその ATP 結合ポケットに競合阻害する形で crizotinib が結合すると酵素活性がキャンセルされて、がんの細胞死が誘導される。C1156 は ATP 結合ポケットの上端に位置しており、そこにアミノ酸置換が生じると結合ポケットの形が変化して crizotinib が結合できなくなるのではないかと思われる (図 4B)。一方 L1196 は ATP 結合ポケットの最も奥に位置しており、この部位に大きな側鎖を持つアミノ酸が挿入されるとやはり crizotinib が結合できなくなって阻害薬耐性になると予想される (図 4B)。極めて興味深いことに、この L1196 部位は、BCR-ABL が imatinib に耐性になる原因変異部位 T790 や EGFR が gefitinib に耐性になる原因変異部位 T315 と全く同じ位置であった(16)。従ってこの gatekeeper 部位は、キナーゼの共通の耐性獲得部位であると考えられる。

図4 二次変異による ALK 阻害薬耐性メカニズム

(A) ALK 酵素活性領域の3次元構造を模式的に示す。ATP 結合ポケットに ATP (緑色図形) が挿入されると酵素活性はオンになるが、ATP に競合阻害する形で阻害薬 (青色図形) が挿入されると酵素活性はキャンセルされる。(B) しかし C1156Y あるいは L1196M 変異が生じるとそれぞれ図に示すような ATP 結合ポケットの変形が生じ、阻害薬が結合できなくなって耐性が生じると予想される。

おわりに

2007 年の論文報告から僅か数年で ALK 阻害薬による第Ⅲ相試験が行われる状況になり、日本ではすでに 2 社の ALK 阻害薬試験が並行して走っている。我々が ALK 肺がん研究会 (ALCAS) を独自に立ち上げ、我が国の EML4-ALK 陽性患者を救うべくボランティア活動を開始したのは僅か 1 年半前であるが、すでに隔世の感がある。今後さらに他の製薬会社からも ALK 阻害薬の臨床試験が開始されると予想されており、やがては次々と薬剤として認可・販売されるものが出てくると期待される。

文 献

- 1) Lynch TJ, et al. N Engl J Med. 2004;350:2129-2139.
- 2) Shigematsu H, et al. J Natl Cancer Inst. 2005;97:339-346.
- 3) Soda M, et al. Nature. 2007;448:561-566.
- 4) Choi YL, et al. Cancer Res. 2008;68:4971-4976.
- 5) Takeuchi K, et al. Clin Cancer Res. 2008;14:6618-6624.
- 6) Takeuchi K, et al. Clin Cancer Res. 2009;15:3143-3149.
- 7) Takahashi T, et al. Ann Surg Oncol. 2010;17:889-897.
- 8) Wong DW, et al. Cancer. 2009;115:1723-1733.
- 9) Koivunen JP, et al. Clin Cancer Res. 2008;14:4275-4283.
- 10) Druker BJ, et al. N Engl J Med. 2001;344:1031-1037.
- 11) Soda M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:19893-19897.
- 12) Bang Y, et al. J Clin Oncol. 2010;28:18s (Suppl; Abstr 13).
- 13) Kwak EL, et al. N Engl J Med. 2010;363:1693-1703.
- 14) Kobayashi S, et al. N Engl J Med. 2005;352:786-792.
- 15) Deininger M, et al. Blood. 2005;105:2640-2653.
- 16) Choi YL, et al. N Engl J Med. 2010;363:1734-1739.