

第 45 回研究助成金交付研究実績報告書
ALK 陽性肺癌/ALK 陽性肉腫細胞株の樹立と分子生物学的解析

愛知県がんセンター 外来部 堀尾芳嗣

1. 研究の背景・目的

ドライバー遺伝子変異をもつ肺癌は分子標的薬の登場にて生存期間の延長が見られている。ALK 転座陽性肺癌は非小細胞肺癌の約 5%にみられるが、進行・再発 ALK 転座陽性肺癌は ALK チロシンキナーゼ阻害剤 (ALK-TKI) にて 5 年生存率が 50%を超える程度にまで予後が改善している。しかしながら、慢性骨髄性白血病 (CML) のように treatment-free remission (TRF)/治癒がみられるようになるかどうかははっきりしていない。外科治療、放射線治療、薬物療法等の合併療法での TRF が得られたという症例報告があるのみである。

ALK-TKI として、Crizotinib、Alectinib、Ceritinib、Lorlatinib が保険承認されており、2021 年 4 月に Brigatinib が発売され、5 剤が使用可能となった。実験に通常用いられるヒト肺癌細胞株では H2228 と H3122 であるが、分子標的薬で耐性化した患者から樹立した細胞株は一般的に用いられる状況にはない。

今回、我々は分子標的薬で耐性化した患者からの非小細胞肺癌細胞株 2 株と縦隔原発の肉腫より樹立した細胞株 1 株を樹立した。そこで、本研究は当初の目的として、肺癌細胞株と肉腫細胞株の遺伝子変異を明らかにし、ALK-TKI の感受性を検討した。

2. 研究の対象ならびに方法

<細胞培養>

当院で樹立した ACCH-40 と ACCH-146 の肺癌細胞株と ACCH-183 肉腫細胞株を使用した。培養は 10%ウシ胎児血清 (Gibco) 入りの DMEM-high glucose (シグマアルドリッチ) を使用し、5%CO₂ インキュベーター内で実施した。

<FISH>

培養細胞株のセルブロックのパラフィン包埋切片を脱パラフィン、熱処理、ペプシン緩衝液で消化。変性後の切片を、それぞれのプローブペアとともに、加湿したチャンバーで一晩インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、切片をジアミノフェニンドールで染色し、マウントした。遺伝子異常の頻度は、100 個以上の腫瘍細胞を数えて決定した。ポジティブおよびネガティブコントロールも使用し、検査した細胞核の 10%以上 (平均±3 標準偏差 (SD)、切り上げ) が異常なシグナルを示した場合、サンプルは陽性とした。

<シーケンス>

シーケンス反応は、ABI PRISM 3100 (Thermo Fisher Scientific) で電気泳動した。PCR 産物のダイレクトシーケンスは、センスとアンチセンスの両方向で行った。

<細胞増殖アッセイ>

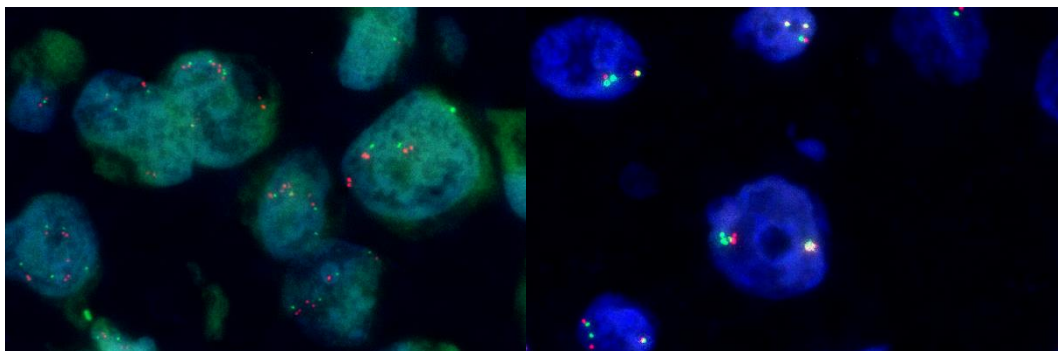
テトラゾリウム塩 (Cell Counting Kit-8 (発色基質 WST-8)) を使用して定量した。

<薬物感受性実験>

細胞を 96 プレートに 5000-20000 個/ウェルでプレートし、翌日 ALK-TKI を段階希釈にて添加、3 日後に増殖を WST-1 にて定量し、50%増殖阻止濃度を算出した。

3. 研究結果

(1)FISH で肺癌細胞株の陽性を確認した。(左 ACCH40、右 ACCH146)



(2) シーケンス

ACCH40 は EML4 exon6-ALK exon20 と EML4 exon13-ALK exon20 の 2 つの融合遺伝子が存在すること ACCH146 は EML4 exon13-ALK exon20 と L1196Q 変異があった。ACCH183 は FISH できれいに描出不可であったが、SCYL3 exon11-ALK exon20 との融合であった。

(3) ALK-TKI 感受性

	ACCH40	ACCH146	ACCH183
Crizotinib	約 100 nM	約 4 μM	約 3 μM
Alectinib	約 10 μM	約 10 μM	約 2 μM
Ceritinib	約 200 nM	約 2 μM	約 4 μM
Lorlatinib	約 30 nM	約 25 μM	約 40 μM
Brigatinib	約 40 nM	約 600 nM	約 1 μM

上記の如く、ACCH40 は Alectinib 耐性株、ACCH146 と ACCH183 は多剤耐性株と考えられた。

4. 考察

ALK 転座陽性肺癌細胞株として、H2228 と H3122 が一般的に知られているが、耐性株ではあるが 2 つの肺癌細胞株と 1 つの肉腫細胞株が樹立されたことは重要と考える。

5. 文献

(1) Tabbò F, Reale ML, Bironzo P, Scagliotti GV. Resistance to anaplastic lymphoma kinase inhibitors: knowing the enemy is half the battle won. Transl Lung Cancer Res. 2020 9:2545-

2556.

(2) Liu YM, Kuo CN, Liou JP. Anaplastic lymphoma kinase inhibitors: an updated patent review (2014-2018). *Expert Opin Ther Pat.* 2020 30:351-373.

(3) Horio Y, Mizuno T, Sakao Y, Inaba Y, Yatabe Y, Hida T. Successful salvage surgery following multimodal therapy in a patient who harboured ALK-rearranged advanced lung adenocarcinoma with multiple organ metastases. *Respirol Case Rep.* 2019 7:e00451

6. 論文

なし。

2020年9月の日本呼吸器病学会総会ポスターで一部のデータを発表した。