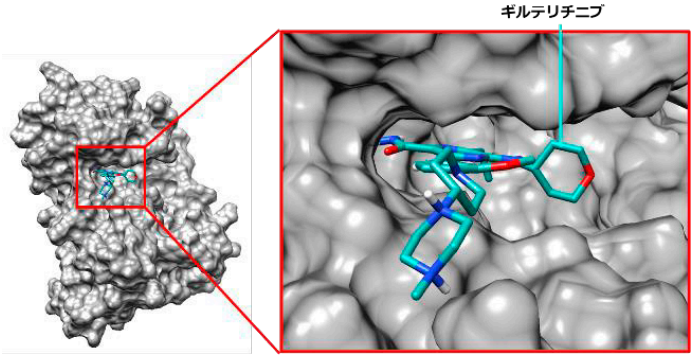
26　がん遺伝子産物の過剰活性化を応用した新規治療法探索	片山　量平

【目的】次世代シーケンサーを用いた包括的解析が進み、肺がんをはじめ様々ながんにおいて、がんの遺伝子変異の“カタログ”情報が蓄積されてきている。それにより、これまでも言われてきたことではあるが、一つのがんには概ね一つのドライバーがん遺伝子のみが存在し相互排他的である、ということも改めて確認されてきている。しかし、なぜドライバーがん遺伝子の存在が相互排他的であるかについての分子基盤はほとんど明らかになっていない。ドライバーがん遺伝子陽性の肺がんは、分子標的薬に著効を示す一方でほとんどの症例で耐性を獲得して再発してしまうが、我々は、EGFR 活性化変異や、ALK、ROS1 融合遺伝子陽性肺がんにおける各種 EGFR／ALK／ROS1 阻害薬耐性機構の研究を臨床サンプルと培養実験系の両方を対比させながら行い、種々の耐性機構を明らかにしてきた。これらの研究の過程で我々は、がんが「阻害薬」への耐性を獲得していく段階で逆に阻害薬に依存して生きている現象も発見してきた。そこで本研究では、肺がんを中心に、がんの治療薬抵抗性機構の探索しつつドライバーがん遺伝子の相互排他性に関わる分子基盤を解明し、ドライバーがん遺伝子産物の活性制御が治療へ応用できるかを探ることを目的とした。

【方法】肺がん、中でもドライバーがん遺伝子陽性の肺腺がんを中心に、EGFR 活性化変異、ALK、ROS1、NTRK 融合遺伝子陽性の患者由来がん細胞株（分子標的薬治療前および耐性獲得後の検体由来）や、購入可能なドライバーがん遺伝子陽性がん細胞株、Ba/F3 や NIH3T3 細胞にドライバーがん遺伝子を過剰発現させた細胞を作製し、細胞増殖試験、薬剤感受性試験、マウスゼノグラフトモデルでの抗腫瘍効果、シーケンス解析等の手法を用いて性状解析を行う。

【結果】本研究を遂行するために、がん分子標的薬による治療を計画されているまたは治療を受けている、治療を受けた患者からの検体（胸水や生検の残余検体など）を収集し、遺伝子変異等の解析を進めるとともに、細胞株を樹立してその性状解析、薬剤耐性時の検体の場合には耐性機構の探索、更には耐性克服法の探索を行った。そして、並行して分子標的薬が存在するときにより腫瘍増殖が促進される様な細胞株も発見し、背景にある分子機構の解析を進めた。その結果これまでに、*ALK* 融合遺伝子陽性肺がんにおいてあらゆる承認済み ALK 阻害薬に耐性を示す変異体にも有効な薬剤としてギルテリチニブを発見した。ギルテリチニブは、耐性変異のない ALK 融合タンパク質だけでなく、様々な単独および重複変異体にも高い阻害活性を示すこと、ALK と相同性の高い ROS1 や NTRK1 にも高い阻害活性を示すこと、AXL の過剰発現を介した ALK 阻害薬耐性にも単剤で抗腫瘍効果を示すことを発見した。また、EGFR 変異陽性肺がんにおいては、現在第 1 選択薬として使用されているオシメルチニブ（第 3 世代 EGFR 阻害薬）を、かつて使用されてきた 2 次治療以降での使用（第 1、2 世代 EGFR 阻害薬に耐性となり EGFR T790M 変異が確認された症例）の時に見られる獲得耐性変異のモニタリングと、未同定の耐性機構の探索を行い、血中モニタリングにより耐性変異が臨床画像評価に先んじて変動すること等を発見し報告した。また、低頻度に存在する EGFR 活性化変異（今回は L747P 変異）が、どのようにして EGFR を恒常的に活性化し、いくつかの EGFR 阻害薬に耐性を示すのかを、長時間の分子動力学シミュレーションにより明らかにすることができ、報告した。一方、薬剤存在下で増殖が促進する（薬剤非存在下でやや増殖が阻害される）耐性細胞やモデル細胞の樹立にも成功し、それらがある阻害薬に特異的に感受性を示すことにも成功し、そのメカニズムの詳細な理解と一般化可能性については今後さらなる検証を行う予定である。

ALK にギルテリチニブが結合している様子の予測モデル



26. がん遺伝子産物の過剰活性化を応用した新規治療法探索

片山　量平

がん研究会 がん化学療法センター 基礎研究部

Key words：肺がん，ドライバーがん遺伝子，遺伝子変異，ALK，EGFR

緒　言

次世代シーケンサーを用いた包括的解析が進み、肺がんをはじめ様々ながんにおいて、がんの遺伝子変異の“カタログ”情報が蓄積されてきている。それにより、これまでも言われてきたことではあるが、一つのがんには概ね一つのドライバーがん遺伝子のみが存在し、相互排他的であるということも、改めて確認されてきている。肺線がんでは、ドライバーがん遺伝子の解析と治療薬開発が非常に良く進んでおり、ごく一部の例を除いて、やはりドライバーがん遺伝子が概ね相互排他的であるということが、1 万例を超える規模の研究でも示されてきている。しかし、なぜドライバーがん遺伝子の存在が相互排他的であるかについての分子基盤はほとんど明らかになっていない。ドライバーがん遺伝子陽性の肺がんは、分子標的薬に著効を示す一方でほとんどの症例で耐性を獲得して再発してしまうが、我々は、EGFR 活性化変異や、*ALK*、*ROS1* 融合遺伝子陽性肺がんにおける各種 EGFR／ALK／ROS1 阻害薬耐性機構の研究を臨床サンプルと培養実験系の両方を対比させながら行い、種々の耐性機構を明らかにしてきた。これらの研究の過程で我々は、がんが「阻害薬」への耐性を獲得していく段階で逆に阻害薬に依存して生きている現象を発見してきた。我々はそのメカニズムを詳細に明らかにしようと考え研究を進め、*ROS1* 融合遺伝子陽性のがんをモデルとして研究を行った。*ROS1* 融合遺伝子陽性の肺がんに対しては、ROS1 阻害薬として Crizotinib が臨床で承認されており、他にも複数の薬剤が開発されている。この ROS1 阻害薬耐性機構を調べていく過程で、ROS1 チロシンキナーゼの活性化変異が薬剤耐性を誘導するだけでなく、薬剤存在下でよく増殖するものの、ROS1 阻害薬を除去すると途端に増殖が停止し細胞死までを誘導することを見出した。この細胞は ROS1 阻害薬を除去すると、ROS1 チロシンキナーゼの過剰活性化が生じ、過剰なチロシンリン酸化シグナルカスケードの活性化が起こる。その際に、p38 経路の活性化などを介して ROS1 阻害薬除去時の細胞死誘導を起こしていることを見出してきた。このことは、これまでに知られてはいたが理由が明らかでな　かったドライバーがん遺伝子の相互排他性（二つ以上のドライバーがん遺伝子が一つのがんからはほとんど見つからないこと）の解明にも繋がる可能性がある発見といえる。すなわち、がんにとっても適切な量の細胞増殖シグナルがあり、過剰すぎるとがん細胞を傷害すると考えられ、二つ以上のドライバーがん遺伝子は、先に述べた *ROS1* 融合遺伝子での活性化変異などの時と同様に、過剰すぎる増殖シグナルが逆に増殖停止や細胞死を誘導してしまうために、ドライバーがん遺伝子の相互排他性があるとも考えられる。本研究では、肺がんを中心に、がんの治療薬抵抗性機構の探索を進めるとともに、ドライバーがん遺伝子の相互排他性に関わる分子基盤を解明し、ドライバーがん遺伝子産物の活性制御（抑制だけでなく過剰活性化も含めた制御）が治療へ応用できるかどうかの可能性等を探る研究である。

方　法

1. 細胞株と培養条件

293FT 細胞株、Ba/F3 細胞株、NIH3T3 細胞株、ヒトがん細胞株（H2228、H3122、HCC78、KM12、HCC827、PC9、A549、H460）、がん研究会倫理審査委員会で承認されたプロトコールに則り樹立したがん患者由来細胞株（ALK 融合遺伝子陽性肺がん：JFCR-018-1、JFCR-028-3、MCC-003、ROS1 融合遺伝子陽性肺がん：JFCR-168、BRAF V600E 変異陽性肺がん：JFCR-256-3）を、それぞれの細胞に適した条件で培養するとともに、実験に使用した。

2. がん遺伝子発現細胞の樹立

*ALK*融合遺伝子や *ROS1* 融合遺伝子、*NTRK1* 融合遺伝子などを発現する細胞株（Ba/F3 細胞、NIH3T3 細胞など）を樹立するために、レンチウイルスベクター（pLenti-6.3）に目的の遺伝子（*EML4 - ALK* や *CD74 - ROS1*、*TPM3 - NTRK1* 融合遺伝子とその薬剤耐性変異体、KRAS、BRAF 活性化変異体など）をクローニングし、293FT 細胞にレンチウイルスパッケージングプラスミドとともに遺伝子導入することでレンチウイルスを産生させ目的の細胞に感染させた。感染後に細胞を Blastcidin 存在下で培養し、レンチウイルスによる遺伝子導入ができていない細胞を除去した。

3. 試薬と薬剤スクリーニング、細胞生存率の評価

各分子標的薬や、その候補化合物については、試薬会社より純度 98%以上のものを購入し、DMSO などの溶媒に希釈して実験に用いた。薬剤スクリーニングに際しては、阻害剤ライブラリー等を使用し、最終濃度を原則として 100 nM または 1 μM で細胞株を 72 時間処理し、CellTiter-Glo アッセイ試薬を用いて細胞生存率を測定することで評価した。各薬剤希釈下での細胞生存率は、薬剤を 10 μM 段階的に希釈して 72 時間処理して同様に評価した。

4. Immunobloting と抗体

薬剤処理等を施した細胞は冷やした PBS にて洗浄後、1×SDS Lysis バッファーにより溶解して 5 分間 95～100℃で熱処理した。細胞溶解液は BCA 法でタンパク定量し、等量を SDS-PAGE 法で電気泳動することで分離し、アクリルアミド泳動ゲルから PVDF 膜に転写した後、定法に則り各抗体をあてて、HRP 標識した 2 次抗体をあてた後、ECL 法にてシグナルを検出した。 使用した抗体は次のとおりで、概ね 1,000 倍希釈で使用した。total ALK (#3633、CST)、phospho-ALK（Y1604 ; #3341、CST、Y1282/1283 ; #9687、CST）、total S6 ribosomal protein（#2217、CST）、phospho-S6 ribosomal protein (#5364、CST)、total p42/44 ERK/MAPK (#9102、CST)、phospho-p42/44 ERK/MAPK（#9101、CST)、total AKT（#4691、CST)、phospho-AKT（#4060、CST)、total EGFR（#4267、CST)、phospho-EGFR (#ab5644、Abcam)、total MEK1/2 (#9122、CST)、phospho-MEK1/2 (#9121、CST)、PARP (#9542、CST)、total AXL (#4566、CST)、phospho-AXL (#5724、CST)、KRAS (#WH0003845M1、Sigma-Aldrich)、total NTRK1（#4609、CST)、phospho-NTRK1 (#4621、CST)、total STAT3 (#4904、CST)、phospho-STAT3 (#9145、CST)、GAPDH（MAB374、Millipore)。

5. アポトーシスアッセイ

がん細胞株をそれぞれ 6 ウェルプレートに播種し、薬剤を処理した上で、24～72 時間培養した後、Alexa-Fluor647-labeled AnnexinV と propidium iodide で染色し、フローサイトメトリーで解析した。

6. 抗腫瘍効果の評価（マウスを用いた動物実験）

動物実験はがん研究会の動物実験委員会に承認されたプロトコールに則り、動物実験等取り扱い規定に則り実施した。チャールズリバー社より購入した免疫不全マウス皮下に腫瘍を移植し、腫瘍サイズが 100～200 mm^3に到達したところで群分けを行い、コントロール溶媒または薬剤での治療実験を実施した。腫瘍サイズが 1,000 mm^3を超過または 著しい体重減少が見られた等の際は、麻酔薬等による安楽死による人道的エンドポイントを設定した上で実験を実施した。

結果および考察

1. あらゆる ALK 阻害薬に耐性を有する ALK 複合変異体への耐性克服法の発見

我が国のがんによる死亡原因の 1 位である肺がんは、非小細胞肺がんと小細胞肺がんに分類され、約 85%を非小細胞肺がんが占めている。非小細胞肺がんの原因遺伝子としては *EGFR* や *KRAS* 遺伝子の異常が比較的高頻度に認められ、3～5%の患者では *ALK* 融合遺伝子が強力ながん遺伝子として見つかる。*EML4 - ALK* に代表される *ALK* 融合遺伝子では、恒常的な ALK チロシンキナーゼの活性化が誘導され、増殖シグナルを異常に亢進させがん化へとつながる。そのため、ALK 陽性肺がんには、分子標的薬である ALK 阻害薬が有効であり、現在までに、第 1 世代のクリゾチニブ、第 2 世代のアレクチニブ、セリチニブ、そして第 3 世代のロルラチニブが承認され、2021 年 1 月にはブリグチニブが 5 剤目として、承認されてきた。第 3 相臨床試験の結果に基づき、第 1 選択薬としてはアレクチニブが広く使用

されており、高い治療効果をもたらしているものの、薬剤耐性細胞の出現は避けられず、臨床上大きな問題となっている。アレクチニブ耐性化機構は主にALKの薬剤結合部位近傍における遺伝子変異によるアミノ酸置換の場合と、細胞内の他のキナーゼが活性化する場合［1］の二つに分けられるが、前者の場合、ロルラチニブによる逐次治療が有効であることが示されている。しかしながら、同一*ALK*遺伝子内に二つ以上の変異が生じることで、ロルラチニブに耐性を示す重複変異の出現が実際の患者検体から発見され報告されており、今後より一層増加してくる可能性がある。ロルラチニブ耐性を示す重複変異体の一部には既存の第1、2世代ALK阻害薬が再び有効になる場合もあるが［2］、一方でG1202R+L1196M重複変異体や、I1171N+F1174I重複変異体などはあらゆるALK阻害薬に耐性を示す。特にF1174に変異を有するALKは、これまでの我々の検討から、ALK阻害薬の低濃度処理により、薬剤非存在下に比べて増殖が亢進する（薬剤非存在下においてやや増殖が抑制されている）ということを見出していた（unpublished data）。そこで、IL-3依存的に増殖するマウス前駆Bリンパ球（Ba/F3細胞）にあらゆるALK阻害薬に耐性を示すI1171N+F1174I及びI1171N+L1198H重複変異型*EML4*-*ALK*をそれぞれ遺伝子導入し、変異型*EML4*-*ALK*に依存して増殖する細胞株を樹立して、その特性を調べるとともに、この細胞を用いて、既承認薬や臨床試験薬を中心に構成された阻害剤ライブラリーによるスクリーニングを行った。その結果、急性骨髄性白血病の既承認薬であるギルテリチニブが、これらの高度耐性変異体に対して高い細胞増殖抑制効果を示すことを発見した（図1左）。なお、ALK陽性細胞株に対するギルテリチニブ処理時のリン酸化プロテオーム解析を共同研究で実施し、ALKの精製キナーゼを用いた*in vitro* kinase assayを行った結果、ギルテリチニブは確かにALKを直接阻害することを示すことにも成功した。次に各種ALK阻害薬耐性変異体に対するギルテリチニブの阻害効果を検証するために、これまでに臨床及び前臨床研究で報告された耐性変異型*EML4*-*ALK*を導入したBa/F3細胞を用いて、細胞増殖試験、ウエスタンブロッティングを行った結果、G1202R、D1203N変異を除くあらゆる1アミノ酸変異体と、I1171N/S重複変異型*ALK*が、ギルテリチニブに高い感受性を示すことを確認した。そこでALK陽性患者由来細胞に*ALK*-I1171N+F1174I変異体を導入した細胞株を樹立し、動物実験を行ったところ、既承認薬であるアレクチニブやロルラチニブは投与開始から20日ほどで腫瘍の再増大が観察された一方で、ギルテリチニブは50日以上腫瘍縮小効果が継続した。さらに、アレクチニブやロルラチニブによる治療後に再増大してきた腫瘍も、ギルテリチニブへと変更することで、急速に腫瘍縮小する様子が観察された（図1右）。

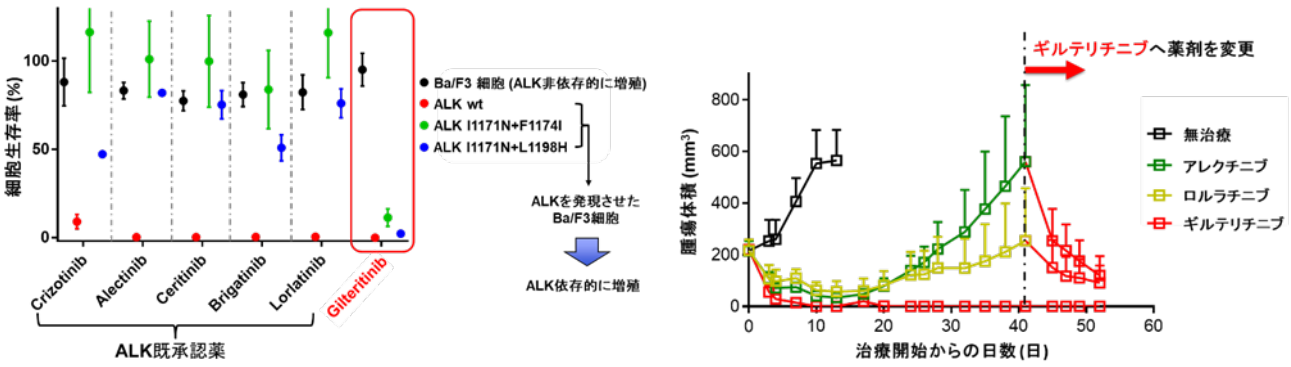


図1. 耐性克服薬候補としてギルテリチニブを同定

Ba/F3細胞に*EML4*-*ALK*野生型および多剤耐性重複変異型を導入し、ALK阻害薬またはギルテリチニブを50 nMで処理し72時間後の細胞生存率を示した。EML4-ALK陽性肺がん細胞株にI1171N+F1174I変異型*EML4*-*ALK*を導入しマウス皮下に移植して治療実験を実施。ギルテリチニブ治療により長期にわたる抗腫瘍効果が認められた。

また、*ALK*遺伝子変異を伴わない耐性化機構に対するギルテリチニブの有効性を検証するために、EGFR活性化によりALK阻害薬に耐性化した患者由来細胞や、活性化型*KRAS*（*KRAS*G12C変異）を遺伝子導入したALK陽性肺

がん細胞を用いた実験により、それぞれギルテリチニブと EGFR 阻害薬または *KRAS* G12C 阻害薬の併用療法により、耐性克服が可能になった。一方で、AXL の活性化による耐性については、ギルテリチニブは AXL をも阻害できるため、アレクチニブでは抑制できなかった AXL 発現腫瘍の再増大を、ギルテリチニブは強力に抑制した。

さらに、ALK と比較的高い相同性を有する受容体型チロシンキナーゼ *ROS1*、*NTRK1* の融合遺伝子を有する肺がん、大腸がんに対しても、ギルテリチニブは高い抗腫瘍効果を示した［3］。

本研究により新規 ALK 薬剤耐性克服薬としてギルテリチニブの可能性が示されたものの、ギルテリチニブは急性骨髄性白血病に対して承認されている薬剤であるため、今後、肺がん患者へ投与した際の安全性や ALK 陽性肺がんへの有効性を明らかにするための臨床試験による検討が必須であると考えられる。

2. EGFR 変異肺がんにおける抵抗性機構のモニタリングと薬剤抵抗性克服薬候補の発見

非小細胞肺がんの半数近くの患者では EGFR の活性化変異（exon19 の 5 アミノ酸欠失と L858R 変異がその 9 割を占める）が、ドライバーがん遺伝子であり、EGFR 阻害薬が有効とされ我が国では五つの EGFR 阻害薬が承認されている。中でも第 3 世代 EGFR 阻害薬オシメルチニブは、初回治療としても、第 1、第 2 世代 EGFR 阻害薬を用いた後に EGFR - T790M 耐性変異が出現した後でも高い有効性が認められている。そこで、T790M 陽性が確認され、オシメルチニブによる治療を受けた日本人の EGFR 変異陽性肺がん患者を対象に、オシメルチニブに対する耐性変異 C797S をデジタル PCR（ddPCR）で調べるとともに、他の耐性機構の有無についても検討した［4, 5］。併せて、耐性検体からの培養株樹立も行い、低濃度薬剤の存在下で薬剤無しよりも増殖が亢進するかを含めてその性状解析も検討した。最初のコホートでは、オシメルチニブ耐性変異として知られている C797S 変異を検出するために、T790M と C797S 変異が *cis* と *trans* のどちらで存在するかを確認できるカスタム設計の ddPCR プローブをデザインし、26 人の患者からの腫瘍標本または血漿サンプルを用いて検証した。2 番目のコホートでは、オシメルチニブをこれから開始予定の EGFR - T790M 変異陽性患者 18 名より、毎月血漿サンプルを収集し、血漿中の cfDNA（血中循環 DNA）を ddPCR 法にてモニタリングした。最初のコホートでは、C797S が患者の 15.4%で検出され、C797S と T790M が *cis* または *trans* で存在するか区別できた。2 番目のコホートでは、毎月採取した cfDNA からの EGFR 変異の評価により、変異の割合が病状によって変化し、疾患進行と診断される数か月前に変異の増加が検出されることが明らかになった（図 2）。最初のコホートと同じように、ddPCR によって、C797S および T790M が *cis* または *trans* の変異かも判別できた。また興味深いことに、最初のコホートの症例から次世代シーケンシング解析により、NRAS Q61K 変異が検出された。同じ NRAS Q61K 変異は細胞株を用いたオシメルチニブ耐性細胞の樹立からも発見されており、NRAS 変異による耐性は MEK 阻害薬（トラメチニブ）とオシメルチニブの併用によって克服されうる可能性が示唆された。しかし、NRAS 変異では薬剤低濃度存在下で増殖更新するといった現象は認められなかった。また、2 番目のコホートでは、発見しにくい骨転移病変の早期発見やそれに対する局所放射線療法の評価にも有用である可能性が示された［4］。

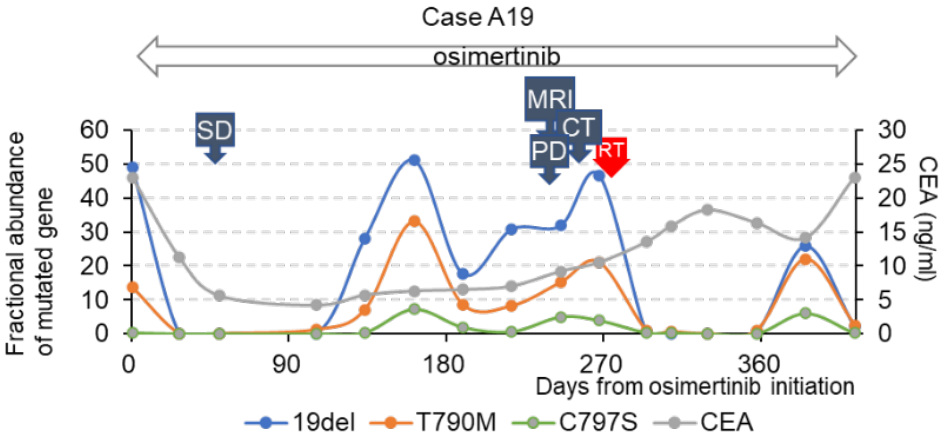


図 2. 血中循環 DNA 中の EGFR 変異の推移と臨床経過
本症例では、骨転移が顕在化する前から血中循環 DNA 中の EGFR 変異が高値を示し、骨転移巣の放射線治療により急減した。

これに対し、EGFR 変異肺がんの 10%では、様々な種類の EGFR 変異があることが明らかにされつつあるものの、それらの特性、EGFR 活性化機構、および様々な EGFR 阻害薬に対する感受性については十分明らかでない。我々は診断用の EGFR 変異検査により、EGFR - del19 変異と診断されたものの、次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析から EGFR - L747P 変異であることが判明した症例を経験した。診断用の EGFR 変異検査 2 種類を用いて患者検体由来 DNA を再度試験した結果、いずれの検査方法でも EGFR - L747P 変異は EGFR - del19 と判定されてしまうことが確認された。この EGFR - L747P 変異について薬剤感受性並びに活性化機構等を、京都大学の奥野博士、荒木博士らとの共同研究により、スパコンを用いた高精度コンピュータシミュレーションにより解析した。結合自由エネルギー計算とマイクロ秒タイムスケールの長時間分子動力学（MD：Molecular Dynamic）シミュレーションを実行し、L747P 変異体では EGFR 活性化構造に重要な 745 番目のリジン（K）と 762 番目のグルタミン酸（E）残基の間の塩橋が形成された安定な結合を常に維持していることが推定された（図 3）。さらに MD シミュレーションと結合自由エネルギー計算により、EGFR - L747P 変異体はアロステリック阻害剤を含むいくつかの EGFR 阻害剤に耐性であった理由が、構造面から明らかにすることができた。また、薬剤ライブラリーを用いたスクリーニングから、EGFR - L747P 選択的に阻害活性を示す化合物を発見することにも成功した。この研究で使用した高精度 MD シミュレーションは、結晶構造解析がなされていない変異体の構造予測に強力なツールとなり、新たな創薬に活用できる可能性が示された［6］。

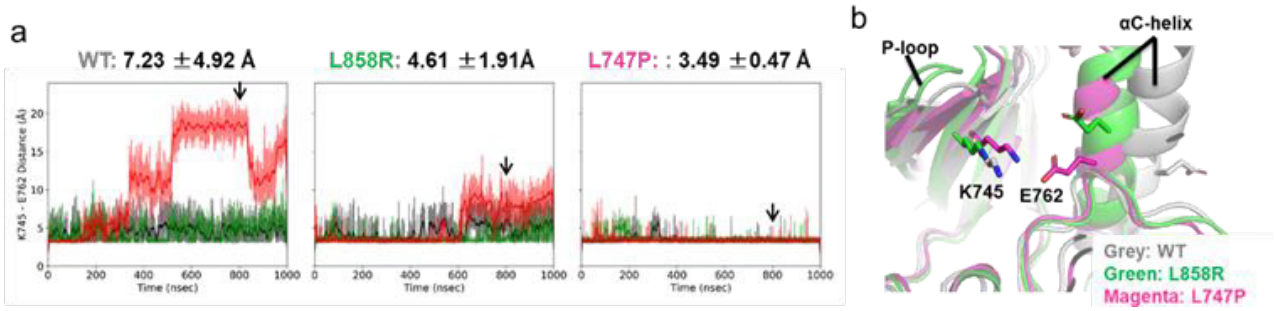


図 3. EGFR キナーゼ領域（野生型並びに変異体）の長時間 MD シミュレーション。
野生型 EGFR では、構造が時折ダイナミックに変化する様子がとらえられ（a 左）、EGFR-L747P 変異では K745 と E762 の間の塩橋（b）が形成され安定な構造を長時間とっている可能性が明らかにされた（a 右）。a における矢印は b で示した各構造状態の時点を示す。a の赤、緑、グレーの線はそれぞれ異なる試行回の長時間 MD シミュレーション結果を示す。

共同研究者・謝辞

本研究を進める上では、がん研究会有明病院呼吸器内科の西尾誠人博士をはじめとする先生方、がん研究会がん化学療法センター所長藤田直也博士、同基礎研究部のメンバーの皆様、慶應義塾大学理工学部応用化学科の清水史郎博士、京都大学大学院医学研究科の奥野恭史博士、荒木望嗣博士、フランス Gustave Roussy Cancer Campus の Luc Friboulet 博士、学校法人東邦大学医療センター大森病院呼吸器内科の岸一馬博士らのご協力なしでは遂行できませんでした。そして、何よりもがん患者の皆様、ご家族様が、貴重な腫瘍組織検体の研究への利用をご快諾くださいましたお陰です。この場をお借りして心より御礼申し上げます。

文 献

1) Yanagitani N, Uchibori K, Koike S, Tsukahara M, Kitazono S, Yoshizawa T, Horiike A, Ohyanagi F, Tambo Y, Nishikawa S, Fujita N, *Katayama R, *Nishio M. Drug resistance mechanisms in Japanese anaplastic lymphoma kinase-positive non-small cell lung cancer and the clinical responses based on the resistant mechanisms. Cancer Sci. 2020 Mar;111(3):932-939. doi: 10.1111/cas.14314.

2) Takahashi K, Seto Y, Okada K, Uematsu S, Uchibori K, Tsukahara M, Oh-Hara T, Fujita N, Yanagitani N, Nishio M, Okubo K, Katayama R. Overcoming resistance by ALK compound mutation (I1171S + G1269A) after sequential treatment of multiple ALK inhibitors in non-small cell lung cancer. Thorac Cancer. 2020 Mar;11(3):581-587. doi: 10.1111/1759-7714.13299. PMID: 31943796

3) Mizuta H, Okada K, Araki M, Adachi J, Takemoto A, Kutkowska J, Maruyama K, Yanagitani N, Oh-Hara T, Watanabe K, Tamai K, Friboulet L, Katayama K, Ma B, Sasakura Y, Sagae Y, Kukimoto-Niino M, Shirouzu M, Takagi S, Simizu S, Nishio M, Okuno Y, Fujita N, *Katayama R. Gilteritinib overcomes lorlatinib resistance in ALK-rearranged cancer. Nat Commun. 2021 Feb 24;12(1):1261. doi: 10.1038/s41467-021-21396-w.

4) Ariyasu R, Uchibori K, Sasaki T, Tsukahara M, Kiyotani K, Yoshida R, Ono Y, Kitazono S, Ninomiya H, Ishikawa Y, Mizukami Y, Yanagitani N, Fujita N, Nishio M, *Katayama R. Monitoring EGFR C797S mutation in Japanese NSCLC patients with serial cell free DNA evaluation using digital droplet PCR. Cancer Sci. 2021 Mar 8. doi: 10.1111/cas.14879.

5) Ariyasu R, Yanagitani N, Tadokoro K, Yamaguchi T, Uchibori K, Kitazono S, Fujita N, Katayama R, Nishio M. Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients having EGFR-activating mutations with or without BIM polymorphisms. Cancer Chemother Pharmacol. 2020 Oct;86(4):517-525. doi: 10.1007/s00280-020-04136-7. PMID: 32948919

6) Yoshizawa T, Uchibori K, Araki M, Matsumoto S, Ma B, Kanada R, Seto Y, Oh-Hara T, Koike S, Ariyasu R, Kitazono S, Ninomiya H, Takeuchi K, Yanagitani N, Takagi S, Kishi K, Fujita N, Okuno Y, Nishio M, *Katayama R. Microsecond-timescale MD simulation of EGFR minor mutation predicts the structural flexibility of EGFR kinase core that reflects EGFR inhibitor sensitivity. NPJ Precis Oncol. 2021 Apr 16;5(1):32. doi: 10.1038/s41698-021-00170-7.