

200807023A

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

「新規融合型がん遺伝子を標的とした肺がんの分子
診断法および治療法の開発」

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成21(2009)年4月

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

「新規融合型がん遺伝子を標的とした肺がんの分子
診断法および治療法の開発」

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成21(2009)年4月

目 次

I.	総括研究報告書	
	「新規融合型がん遺伝子を標的とした肺がんの分子診断法および治療法の開発」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	1
II.	分担研究報告	
1.	「EML4-ALK がん化キナーゼの細胞内シグナル伝達」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	6
2.	「EML4-ALKトランスジェニックマウス作成」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・呼吸器内科学 杉山幸比古-----	9
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	12
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	15

「新規融合型がん遺伝子を標的とした肺がんの分子診断法および治療法の開発」
に関する研究

主任研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：間野らは完全長 cDNA を効率的に発現させるレトロウィルス cDNA 発現ライブラリー作成法を開発し、これを用いて肺腺がん切除検体から新たな融合型チロシンキナーゼ EML4-ALK を発見した。本研究計画において我々は EML4-ALK ががん化キナーゼの下流に働くシグナル伝達分子を同定し、同キナーゼの具体的ながん化メカニズムを解明することを目指した。まず EML4-ALK 陽性肺がんの高感度診断法を開発する目的で、EML4 が ALK 遺伝子エクソン 20 に in-frame で融合しうる全てのエクソンとの間の融合 cDNA を検出する multiplex RT-PCR 法を開発し、これを用いて肺がんの切除検体 360 例におけるスクリーニングを行った。その結果非小細胞肺がんの約 5% に同遺伝子が存在することが示された。さらに EML4-ALK が具体的に生体内において発がんの主たる原因であることを確認するために同遺伝子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した。EML4-ALK 発現トランスジェニックマウスは生後僅か 2~3 週で両肺に数百個の肺腺がんを発症したことから、EML4-ALK は例外的に強力ながん遺伝子であることが証明された。また本マウスに ALK 阻害剤を投与することでこれら肺腺がんは速やかに消失し、EML4-ALK が有効な分子標的治療対象であることも併せ確認された。

分担研究者

間野博行	自治医科大学医学部ゲノム機能研究部・教授
杉山幸比古	自治医科大学医学部呼吸器内科学・教授

などは何れも「悪性腫瘍の主要がん遺伝子を同定し、その阻害剤を開発すること」が治療上極めて重要であることを明示している。

そこで主任研究者らは肺がんにおける主要原因遺伝子を同定する目的で、独自に組換えレトロウィルスを用いた臨床検体のがん遺伝子スクリーニング法を開発した。我々の方法により喫煙歴を有する 62 才男性肺腺がん患者外科切除検体より cDNA 発現レトロウィルスライブラリーを構築し、マウス 3T3 細胞を用いて形質転換フォーカスのスクリーニングを行った結果、新規がん遺伝子 EML4-ALK を発見することに成功した (Nature 448: 561-566)。これはちょうど BCR-ABL のように、肺がんにおいても染色体転座の結果活性型チロシンキナーゼが生じることを示したものであり、今日の CML の診断と治療に BCR-ABL が本質的な役割を担うように、肺がんにおいても EML4-ALK の知見が臨床的に極めて大きな意味を持つことを意味している。

A 研究目的

肺がんは我が国及び欧米先進国におけるがん死数の第一位を占める予後不良の疾患であり、日本と米国だけでも年間 20 万人以上が肺がんのために亡くなっている。旧来の抗がん剤による化学療法は殆ど有効でなく、肺がん患者への延命効果が証明された治療剤は少ない。近年、主にアジア人の若年非喫煙者に発症する肺がんの 2~4 割において上皮成長因子受容体

(EGFR) 遺伝子変異が認められ、これら肺がんに対して EGFR 阻害剤であるゲフィチニブ (商品名イレッサ) が著効を示すことが報告された。一方 BCR-ABL チロシンキナーゼを有する慢性骨髄性白血病 (CML) に ABL 阻害剤である STI-571 (商品名グリベック) が著効を示すこと、また ErbB2 チロシンキナーゼの遺伝子重複がある乳がんに対抗 ErbB2 抗体である trastuzumab (商品名ハーセプチン) が有効なこ

本研究計画で我々は、EML4-ALK の肺がん原因遺伝子としての役割を証明すると共に、その下流シグナルの同定、さらに EML4-ALK を標的とした分子診断法および分子標的治療法の開発を目指す。

B 研究方法

1) 遺伝子診断法開発

ALK 遺伝子のエクソン 20 (チロシンキナーゼ領域の上流) に in-frame で融合しうる EML4 エクソンは計 6 種類存在する。そこでこれらのどの領域から ALK へ融合した cDNA も、全て検出可能なように複数の forward primer を組み合わせた multiplex RT-PCR を開発した。これを用いて大規模に肺がん患者喀痰および肺がん切除検体を用いた RT-PCR 解析を行った。

2) トランスジェニックマウスの作成

Surfactant protein-C (SPC) 遺伝子は II 型肺胞上皮特異的に発現するタンパクであり、そのプロモーターフラグメントは肺胞上皮特異的にトランスジーンを発現させるのに有効である。そこで SPC 遺伝子プロモーターの下流に EML4-ALK cDNA を挿入した発現ユニットを作製し、これらを用いたトランスジェニックマウスを作成する。また得られたマウスの病変の評価には、小動物用 CT 装置を用い、系時的に腫瘍サイズ・分布の変化を観察する。また IC50 が 10 nM 程度の経口接種可能な ALK 阻害剤をマウスに投与しその治療効果を検証する。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学の生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C 研究結果

1) EML4-ALK陽性肺がん診断法の開発

EML4 遺伝子のエクソン 2、11、17、24 を始め複数のエクソン上に設置した計 8 種類の forward primer と、ALK のエクソン 20 乗に設置した reverse primer を用いた RT-PCR プロトコルを開発し、これを用いて多数の肺がん検体 (喀痰 + 生検標本) から RNA を取り出して PCR を行った。計 253 種類の肺腺がんを解析したところ計 11 検体に EML4-ALK を検出した。さらに肺小細胞がん、他の臓器の腫瘍等 403 検体においても同様な解析を行ったが、いずれも EML4-ALK を検出できなかった。以上より EML4-ALK は肺がん固有な発がん遺伝子であると考えられた。

さらに我々は EML4-ALK キナーゼの下流に働くシグナル伝達機構を明らかにするべく、

EML4-ALK variant 1 を安定に発現するマウス 3T3 繊維芽細胞株を樹立し、さらに正常 ALK 全長あるいは NPM-ALK (悪性リンパ腫の原因となる ALK 融合キナーゼ) を発現する 3T3 細胞もそれぞれ独立に作成した。NPM-ALK も EML4-ALK もどちらも 3T3 細胞を形質転換させたが、両者の細胞内シグナル活性化は同一でなく、例えば STAT3 の活性化は後者においてのみ認められた。そこで各細胞群から細胞可溶画分を調整し、鉄イオンカラムおよび抗リン酸化チロシン抗体カラムによる段階的なタンパク純化を行った。得られた微量の純化タンパクを質量分析装置にかけ、チロシンリン酸化タンパクプロファイルを得た。これらを 3 者間で比較すると、何れも大きく異なった基質プロファイルを有することが明らかになった。

2) EML4-ALK トランスジェニックマウスの作成

SPC トランスジェニックマウス作成後、5 ラインの F1 を樹立し、それぞれにおいて一部のマウスを用いた EML4-ALK の発現確認を行った。Diploid genome あたりの EML4-ALK cDNA コピー数は 3~50 と様々であったが、何れの場合も EML4-ALK mRNA が肺特異的に発現することを確認した。また EML4-ALK の発現量はゲノム中のトランスジーンのコピー数に依存しておらず少ないコピー数でも十分な発現量が確認された。これらマウスは生後数週で両肺に数百個の肺腺がんを同時多発的に発症し、EML4-ALK の驚くべきがん化能が証明された。また生じた肺腺がんを抗 ALK 抗体による免疫組織染色解析をしたところ、弱いながらも特異的な ALK 発現陽性が確認できた。

小動物用 CT でこれらマウスを観察したところ、両肺に様々な大きさの腫瘍が生じており、さらに系時的に増大・播種が生じていくことが確認された。これら肺内腫瘍をヌードマウスの皮下に接種したところ皮下腫瘍が形成されたことから、ヌードマウスに生じた腫瘍は悪性であると考えられた。

次にこれらトランスジェニックマウスに経口接種可能な ALK 阻害剤を投与し、生体における治療モデル実験を行った。生後 4 週齢のトランスジェニックマウス計 20 匹を 2 群に分け、片方には ALK 阻害剤を、もう片方には溶媒のみを一日一度経口接種させた。腫瘍径の変化を CT

撮影にて系時的に観察したところ、薬剤投与群においてのみ腫瘍の著明な縮小を確認した。

D&E. 考察及び結論

我々の解析により非小細胞肺癌の約5%がEML4-ALKを有することが判り、これらの症例はALK阻害剤による分子標的治療の対象となると期待される。実際ALK阻害剤は複数の大手製薬企業により精力的に開発されつつあり、一部は既に第一相臨床試験に入ったものもある。これらの分子標的治療への導入の際にEML4-ALK陽性肺癌を正確かつ感度良く検出することは極めて重要であるが、今回の解析によりEML4遺伝子からALK遺伝子への融合ポイントは複数(計10種類以上)存在することが判った。従ってEML4-ALK陽性肺癌の検出のためにはこれら多数のバリエーションの何れも診断する必要がある、我々が確立したmultiplex RT-PCR法はその良い候補となる。

さらにトランスジェニックマウス実験によりEML4-ALKがん遺伝子が、同遺伝子陽性肺癌の主たる発がん原因であること、したがって同遺伝子産物の機能抑制剤が同肺癌の全く新しい分子標的療法となることを明らかにした。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

間野博行

1. Kato N, Miyata T, Tabara Y, Katsuya T, 1) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Sato Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y and Mano H. "KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinas identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer" *Clin Cancer Res* in press.
- 2) Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, Choi YL, Nonaka-Sarukawa M, Soda M, Misawa Y, Isomura T, Shimada K and Mano H. "Genome-wide histone methylation profile for heart failure" *Genes Cells* 14: 69-77, 2009.

- 3) Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Sato Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y and Mano H. "Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts" *Clin Cancer Res* 14: 6618-6624, 2008.
- 4) Takada S, Yamashita Y, Berezikov E, Hatanaka H, Fujiwara SI, Kurashina K, Watanabe H, Enomoto M, Soda M, Choi YL and Mano H. "MicroRNA expression profiles of human leukemias" *Leukemia* 22: 1274-1278, 2008.
- 5) Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, Haruta H, Hamada T, Yamashita Y, Ishikawa Y, Sugiyama Y and Mano H. "A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer" *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19893-19897, 2008.
- 6) Sato T, Toki T, Kanazaki R, Xu G, Terui K, Kanegane H, Miura M, Adachi S, Migita M, Morinaga S, Nakano T, Endo M, Kojima S, Kiyoi H, Mano H and Ito E. "Functional analysis of JAK3 mutations in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukaemia accompanying Down syndrome" *Br J Haematol* 141: 681-688, 2008.
- 7) Saga Y, Ohwada M, Suzuki M, Konno R, Kigawa J, Ueno S and Mano H. "Glutathione peroxidase 3 is a candidate mechanism of anticancer drug resistance of ovarian clear cell adenocarcinoma" *Oncol Rep* 20: 1299-1303, 2008.
- 8) Onimaru Y, Tsukasaki K, Murata K, Imaizumi Y, Choi YL, Hasegawa H, Sugahara K, Yamada Y, Hayashi T, Nakashima M, Taguchi T, Mano H, Kamihira S and Tomonaga M. "Autocrine and/or paracrine growth of aggressive ATLL cells caused by HGF and c-Met" *Int J Oncol* 33: 697-703, 2008.
- 9) Nagai K, Jinnai I, Hata T, Usui T, Sasaki D, Tsukasaki K, Sugahara K, Hishikawa Y, Yamada Y, Tanaka Y, Koji T, Mano H, Kamihira S and Tomonaga M. "Adhesion-dependent growth of primary adult

- T cell leukemia cells with down-regulation of HTLV-I p40Tax protein: a novel in vitro model of the growth of acute ATL cells" *Int J Hematol* 88: 551-564, 2008.
- 10) Mano H. "Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer" *Cancer Sci* 99: 2349-2355, 2008.
 - 11) Mano H. "Epigenetic abnormalities in cardiac hypertrophy and heart failure" *Environ Health Prev Med* 13: 25-29, 2008.
 - 12) Kurashina K, Yamashita Y, Ueno T, Koinuma K, Ohashi J, Horie H, Miyakura Y, Hamada T, Haruta H, Hatanaka H, Soda M, Choi YL, Takada S, Yasuda Y, Nagai H and Mano H. "Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-related genomic regions in colorectal carcinoma" *Cancer Sci* 99: 1835-1840, 2008.
 - 13) Kato N, Miyata T, Tabara Y, Katsuya T, Yanai K, Hanada H, Kamide K, Nakura J, Kohara K, Takeuchi F, Mano H, Yasunami M, Kimura A, Kita Y, Ueshima H, Nakayama T, Soma M, Hata A, Fujioka A, Kawano Y, Nakao K, Sekine A, Yoshida T, Nakamura Y, Saruta T, Ogihara T, Sugano S, Miki T and Tomoike H. "High-density association study and nomination of susceptibility genes for hypertension in the Japanese National Project" *Hum Mol Genet* 17: 617-627, 2008.
 - 14) Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, Okui M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Niki T, Mano H and Ishikawa Y. "EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers" *J Thorac Oncol* 3: 13-17, 2008.
 - 15) Fujiwara SI, Yamashita Y, Nakamura N, Choi YL, Ueno T, Watanabe H, Kurashina K, Soda M, Enomoto M, Hatanaka H, Takada S, Abe M, Ozawa K and Mano H. "High-resolution analysis of chromosome copy number alterations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified, with single nucleotide polymorphism-typing microarrays" *Leukemia* 22: 1891-1898, 2008.
 - 16) Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Ueno T, Takada S, Yamashita Y, Sugiyama Y, Ishikawa Y and Mano H. "Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer" *Cancer Res* 68: 4971-4976, 2008.
 - 17) Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H and Ogawa S. "Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma" *Nature* 455: 971-974, 2008.
- 杉山幸比古
- 1) Bando M, Takahashi M, Ohno S, Hosono T, Hironaka M, Okamoto H and Sugiyama Y. "Torque teno virus DNA titre elevated in idiopathic pulmonary fibrosis with primary lung cancer" *Respirology* 13: 263-269, 2008.
 - 2) Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Ueno T, Takada S, Yamashita Y, Sugiyama Y, Ishikawa Y and Mano H. "Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer" *Cancer Res* 68: 4971-4976, 2008.
 - 3) Kawakami M, Bando M, Mato N, Nakaya T, Ohno S and Sugiyama Y. "A case of paraneoplastic cerebellar degeneration associated with small cell lung cancer showing marked response to intravenous immunoglobulin" *Nihon Kokyoku Gakkai Zasshi* 46: 325-330, 2008.
 - 4) Kawakami M, Ohno S, Tsujita A, Hosono T, Kobayashi A, Yamasawa H, Bando M and Sugiyama Y. "Our clinical experiences of amrubicin hydrochloride monotherapy in extensive-disease small cell lung cancer" *Gan To Kagaku Ryoho* 35: 273-276, 2008.
 - 5) Mato N, Fujii M, Hakamata Y, Kobayashi E, Sato A, Hayakawa M, Ohto-Ozaki H, Bando M, Ohno S, Tominaga S and Sugiyama Y. "IL-1 R-related protein ST2 suppressed the initial

- stage of bleomycin-induced lung injury" *Eur Respir J* 2009.
- 6) Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, Haruta H, Hamada T, Yamashita Y, Ishikawa Y, Sugiyama Y and Mano H. "A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer" *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19893-19897, 2008.
 - 7) Tajima S, Bando M, Ishii Y, Hosono T, Yamasawa H, Ohno S, Takada T, Suzuki E, Gejyo F and Sugiyama Y. "Effects of edaravone, a free-radical scavenger, on bleomycin-induced lung injury in mice" *Eur Respir J* 32: 1337-1343, 2008.
 - 8) Tajima S, Soda M, Bando M, Enomoto M, Yamasawa H, Ohno S, Takada T, Suzuki E, Gejyo F and Sugiyama Y. "Preventive effects of edaravone, a free radical scavenger, on lipopolysaccharide-induced lung injury in mice" *Respirology* 13: 646-653, 2008.
 - 9) Yamasawa H, Ohno S, Nakaya T, Ishii Y, Hosono T, Tsujita A, Bando M and Sugiyama Y. "Case of minocycline-induced acute eosinophilic pneumonia accompanied by marked neutrophilia in the peripheral blood" *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 46: 820-824, 2008.
 - 10) Yamasawa H, Sugiyama Y, Bando M and Ohno S. "Drug-induced pneumonitis associated with imatinib mesylate in a patient with idiopathic pulmonary fibrosis" *Respiration* 75: 350-354, 2008.
 - 11) Ohno S, Nakaya T, Bando M, Sugiyama Y. "Idiopathic pulmonary fibrosis-results from a Japanese nationwide epidemiological survey using individual clinical records" *Respirology* 13: 926-928, 2008
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

分担研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：間野らは完全長 cDNA を効率的に発現させるレトロウイルス cDNA 発現ライブラリー作成法を開発し、これを用いて肺腺がん切除検体から新たな融合型チロシンキナーゼ EML4-ALK を発見した。本研究計画において我々は EML4-ALK がん化キナーゼの下流に働くシグナル伝達分子を同定し、同キナーゼの具体的ながん化メカニズムを解明することを目指した。EML4-ALK および正常完全長 ALK さらに NPM-ALK キナーゼそれぞれをマウス 3 T3 繊維芽細胞株に導入させ、それぞれの細胞において特異的にチロシンリン酸化されるタンパク群のプロファイル解析を行った。米国マサチューセッツ工科大学の Forest White 教授らとの共同研究で鉄イオンカラムさらにチロシンリン酸化抗体カラムを用いて、各細胞株の細胞内タンパクを純化し、それを超微量質量分析装置によりリン酸化解析した。その結果、ALK や NPM-ALK とは完全に異なる細胞内シグナル分子を EML4-ALK はリン酸化しがん化を導くことが判った。さらに EML4-ALK の存在を多数のがん検体で解析したところ、複数の新たなバリエーションが存在することが明らかになっただけでなく、EML4-ALK 以外の新規 ALK 融合キナーゼも発見することに成功した。

A 研究目的

肺がんは我が国及び欧米先進国におけるがん死数の第一位を占める予後不良の疾患であり、旧来の抗がん剤による化学療法で延命効果が証明された治療剤は少ない。近年、主にアジア人の若年非喫煙者に発症する肺がんの 2~4 割において上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異が認められ、これら肺がんに対して EGFR 阻害剤であるゲフィチニブが著効を示すことが報告された。一方 BCR-ABL チロシンキナーゼを有する慢性骨髄性白血病に ABL 阻害剤である STI-571 が著効を示すことなども、「悪性腫瘍の主要がん遺伝子を同定し、その阻害剤を開発すること」が有効な治療剤開発の上で極めて重要であることを明示している。そこで申請者は肺がんにおける主要原因遺伝子を同定する目的で、独自に組換えレトロウイルスを用いた臨床検体のがん遺伝子スクリーニング法を開発した。本法を用いて喫煙歴を有する 62 才男性肺腺がん患者外科切除検体より cDNA 発現レトロウイルスライブラリーを構築し、マウス 3T3 細胞を用いて形質転換フォーカスのスクリーニングを行った結果、新規がん遺伝子 EML4-ALK を発見することに成功した (*Nature* 448: 561-566)。本研究ではこれらの知見を用いて、肺がんの高感度分子診断法および有効な分子標的療法の開発を目指す。

B 研究方法

ALK 遺伝子のエクソン 20 (チロシンキナーゼ領域の上流) に in-frame で融合しうる EML4 エクソンは計 6 種類存在する。そこでこれらのどの領域から ALK へ融合した cDNA も、全て

検出可能なように複数の forward primer を組み合わせた multiplex RT-PCR を開発した。これを用いて大規模に肺がん患者喀痰および肺がん切除検体を用いた RT-PCR 解析を行った。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学の生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C 研究結果

「EML4-ALK の分子診断」

EML4 遺伝子のエクソン 2、11、17、24 を始め複数のエクソン上に設置した計 8 種類の forward primer と、ALK のエクソン 20 乗に設置した reverse primer を用いた RT-PCR プロトコルを開発し、これを用いて多数の肺がん検体 (喀痰 + 生検標本) から RNA を取り出して PCR を行った。計 253 種類の肺腺がんを解析したところ計 11 検体に EML4-ALK を検出した。さらに肺小細胞がん、他の臓器の腫瘍等 403 検体においても同様な解析を行ったが、いずれも EML4-ALK を検出しなかった。以上より EML4-ALK は肺がん固有な発がん遺伝子であると考えられた。

「EML4-ALK の細胞内シグナル伝達機構」

EML4-ALK variant 1 を安定に発現するマウス 3 T3 繊維芽細胞株を樹立し、さらに正常 ALK 全長あるいは NPM-ALK (悪性リンパ腫の原因となる ALK 融合キナーゼ) を発現する 3 T3 細胞もそれぞれ独立に作成した。NPM-ALK も EML4-ALK もどちらも 3 T3 細胞を形質転換させたが、両者の細胞内シグナル活性化は同一でなく、例えば STAT3 の活性化は後者においての

み認められた。そこで各細胞群から細胞可溶画分を調整し、鉄イオンカラムおよび抗リン酸化チロシン抗体カラムによる段階的なタンパク純化を行った。得られた微量の純化タンパクを質量分析装置にかけ、チロシンリン酸化タンパクプロファイルを得た。これらを3者間で比較すると、何れも大きく異なった基質プロファイルを有することが明らかになった。

D&E. 考察及び結論

我々の解析により非小細胞肺がんの約5%がEML4-ALKを有することが判り、これらの症例はALK阻害剤による分子標的治療の対象となると期待される。実際ALK阻害剤は複数の大手製薬企業により精力的に開発されつつあり、一部は既に第一相臨床試験に入ったものもある。これらの分子標的治療への導入の際にEML4-ALK陽性肺がんを正確かつ感度良く検出することは極めて重要であるが、今回の解析によりEML4遺伝子からALK遺伝子への融合ポイントは複数(計10種類以上)存在することが判った。従ってEML4-ALK陽性肺がんの検出のためにはこれら多数のバリエーションの何れも診断する必要がある、我々が確立したmultiplex RT-PCR法はその良い候補となる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Sato Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y and Mano H. "KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinasase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer" *Clin Cancer Res* in press.
- 2) Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, Choi YL, Nonaka-Sarukawa M, Soda M, Misawa Y, Isomura T, Shimada K and Mano H. "Genome-wide histone methylation profile for heart failure" *Genes Cells* 14: 69-77, 2009.
- 3) Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y and Mano H. "Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts" *Clin Cancer Res* 14: 6618-6624, 2008.
- 4) Takada S, Yamashita Y, Berezikov E, Hatanaka H, Fujiwara SI, Kurashina K, Watanabe H, Enomoto M, Soda M, Choi YL and Mano H. "MicroRNA expression profiles

of human leukemias" *Leukemia* 22: 1274-1278, 2008.

- 5) Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, Haruta H, Hamada T, Yamashita Y, Ishikawa Y, Sugiyama Y and Mano H. "A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer" *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19893-19897, 2008.
- 6) Sato T, Toki T, Kanezaki R, Xu G, Terui K, Kanegane H, Miura M, Adachi S, Migita M, Morinaga S, Nakano T, Endo M, Kojima S, Kiyoi H, Mano H and Ito E. "Functional analysis of JAK3 mutations in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukaemia accompanying Down syndrome" *Br J Haematol* 141: 681-688, 2008.
- 7) Saga Y, Ohwada M, Suzuki M, Konno R, Kigawa J, Ueno S and Mano H. "Glutathione peroxidase 3 is a candidate mechanism of anticancer drug resistance of ovarian clear cell adenocarcinoma" *Oncol Rep* 20: 1299-1303, 2008.
- 8) Onimaru Y, Tsukasaki K, Murata K, Imaizumi Y, Choi YL, Hasegawa H, Sugahara K, Yamada Y, Hayashi T, Nakashima M, Taguchi T, Mano H, Kamihira S and Tomonaga M. "Autocrine and/or paracrine growth of aggressive ATLL cells caused by HGF and c-Met" *Int J Oncol* 33: 697-703, 2008.
- 9) Nagai K, Jinnai I, Hata T, Usui T, Sasaki D, Tsukasaki K, Sugahara K, Hishikawa Y, Yamada Y, Tanaka Y, Koji T, Mano H, Kamihira S and Tomonaga M. "Adhesion-dependent growth of primary adult T cell leukemia cells with down-regulation of HTLV-I p40Tax protein: a novel in vitro model of the growth of acute ATL cells" *Int J Hematol* 88: 551-564, 2008.
- 10) Mano H. "Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer" *Cancer Sci* 99: 2349-2355, 2008.
- 11) Mano H. "Epigenetic abnormalities in cardiac hypertrophy and heart failure" *Environ Health Prev Med* 13: 25-29, 2008.
- 12) Kurashina K, Yamashita Y, Ueno T, Koinuma K, Ohashi J, Horie H, Miyakura Y, Hamada T, Haruta H, Hatanaka H, Soda M, Choi YL, Takada S, Yasuda Y, Nagai H and Mano H. "Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-related genomic regions in colorectal carcinoma" *Cancer Sci* 99: 1835-1840, 2008.
- 13) Kato N, Miyata T, Tabara Y, Katsuya T, Yanai K, Hanada H, Kamide K, Nakura J, Kohara K, Takeuchi F, Mano H, Yasunami M, Kimura A, Kita Y, Ueshima H, Nakayama T, Soma M, Hata A, Fujioka A, Kawano Y, Nakao K, Sekine A, Yoshida T, Nakamura Y, Saruta T, Ogihara T, Sugano S, Miki T and Tomoike H.

- “High-density association study and nomination of susceptibility genes for hypertension in the Japanese National Project” *Hum Mol Genet* 17: 617-627, 2008.
- 14) Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, Okui M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Niki T, Mano H and Ishikawa Y. “*EML4-ALK* fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers” *J Thorac Oncol* 3: 13-17, 2008.
- 15) Fujiwara SI, Yamashita Y, Nakamura N, Choi YL, Ueno T, Watanabe H, Kurashina K, Soda M, Enomoto M, Hatanaka H, Takada S, Abe M, Ozawa K and Mano H. “High-resolution analysis of chromosome copy number alterations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified, with single nucleotide polymorphism-typing microarrays” *Leukemia* 22: 1891-1898, 2008.
- 16) Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Ueno T, Takada S, Yamashita Y, Sugiyama Y, Ishikawa Y and Mano H. “Identification of novel isoforms of the *EML4-ALK* transforming gene in non-small cell lung cancer” *Cancer Res* 68: 4971-4976, 2008.
- 17) Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H and Ogawa S. “Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma” *Nature* 455: 971-974, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書
「EML4-ALK トランスジェニックマウス作成」に関する研究

分担研究者： 杉山 幸比古 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：EML4-ALK は我が国において発見された肺腺がんの新規がん遺伝子であり、染色体転座 inv(2p)の結果、EML4 遺伝子と ALK 遺伝子とが融合することにより生じる。本来 ALK 遺伝子は受容体型チロシンキナーゼをコードしているが、EML4 と融合することでその酵素活性が恒常的に上昇し、がん化を導くと考えられる。本研究計画において我々は、EML4-ALK が具体的に生体内において発がんの主たる原因であることを確認するために同遺伝子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した。EML4-ALK 発現トランスジェニックマウスは生後僅か2~3週で両肺に数百個の肺腺がんを発症したことから、EML4-ALK は例外的に強力ながん遺伝子であることが証明された。また本マウスに ALK 阻害剤を投与することでこれら肺腺がんは速やかに消失し、EML4-ALK が有効な分子標的治療対象であることも併せて確認された。

A 研究目的

肺がんは我が国及び欧米におけるがん死因の第一位を占める極めて予後不良の疾患である。近年「非喫煙者・女性・アジア人」の非小細胞肺がん上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異が発見され、同遺伝子異常を有する症例の一部に EGFR 阻害剤である gefitinib が有効であることが示された。しかしながら肺がんの主体を占める喫煙者における同疾患の具体的ながん化機構は殆ど不明であった。申請者らは完全長 cDNA を効率的に発現させるレトロウィルス cDNA 発現ライブラリーを構築する手法を開発し、これを用いて喫煙者に生じた肺腺がん切除検体から新たな融合型がん遺伝子 EML4-ALK を発見した (*Nature* 448:561-566, 2007)。本遺伝子はヒト 2 番染色体短腕中の短い逆位のために生じた融合型新規遺伝子であり、微小管結合タンパク EML4 の N 末側約半分と受容体型チロシンキナーゼ ALK の細胞内領域 (キナーゼドメインを含む) とが融合したタンパクを産生する事になる。また EML4 と融合することで ALK のキナーゼ酵素活性が著明に上昇し、極めて強いがん化能を獲得することも確認された。

本研究計画ではこれらの知見に基づいて、本融合遺伝子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し、成体における EML4-ALK のがん化能を検証することを目指す。

B 研究方法

Surfactant protein-C (SPC) 遺伝子は II 型肺胞上皮特異的に発現するタンパクであり、その

プロモーターフラグメントは肺胞上皮特異的にトランスジーンを発現させるのに有効である。そこで SPC 遺伝子プロモーターの下流に EML4-ALK cDNA を挿入した発現ユニットを複製し、これらを用いたトランスジェニックマウスを作成する。また得られたマウスの病変の評価には、小動物用 CT 装置を用い、系時的に腫瘍サイズ・分布の変化を観察する。また IC50 が 10 nM 程度の経口接種可能な ALK 阻害剤をマウスに投与しその治療効果を検証する。

(倫理面への配慮)

該当しない

C 研究結果

SPC トランスジェニックマウス作成後、5 ラインの F1 を樹立し、それぞれにおいて一部のマウスを用いた EML4-ALK の発現確認を行った。Diploid genome あたりの EML4-ALK cDNA コピー数は 3-50 と様々であったが、何れの場合も EML4-ALK mRNA が肺特異的に発現することを確認した。また EML4-ALK の発現量はゲノム中のトランスジーンのコピー数に依存しておらず少ないコピー数でも十分な発現量が確認された。これらマウスは生後数週で両肺に数百個の肺腺がんを同時多発的に発症し、EML4-ALK の驚くべきがん化能が証明された。また生じた肺腺がんを抗 ALK 抗体による免疫組織染色解析をしたところ、弱いながらも特異的な ALK 発現陽性が確認できた。

小動物用 CT でこれらマウスを観察したところ、両肺に様々な大きさの腫瘍が生じており、

さらに系時的に増大・播種が生じていくことが確認された。これら肺内腫瘍をヌードマウスの皮下に接種したところ皮下腫瘍が形成されたことから、ヌードマウスに生じた腫瘍は悪性であると考えられた。

次にこれらトランスジェニックマウスに経口接種可能な ALK 阻害剤を投与し、生体における治療モデル実験を行った。生後 4 週齢のトランスジェニックマウス計 20 匹を 2 群に分け、片方には ALK 阻害剤を、もう片方には溶媒のみを一日一度経口接種させた。腫瘍径の変化を CT 撮影にて系時的に観察したところ、薬剤投与群においてのみ腫瘍の著明な縮小を確認した。

D&E. 考察及び結論

我々の解析により EML4-ALK がん遺伝子が、同遺伝子陽性肺がんの主たる発がん原因であること、したがって同遺伝子産物の機能抑制剤が同肺がんの全く新しい分子標的療法となることを明らかにした。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bando M, Takahashi M, Ohno S, Hosono T, Hironaka M, Okamoto H and Sugiyama Y. "Torque teno virus DNA titre elevated in idiopathic pulmonary fibrosis with primary lung cancer" *Respirology* 13: 263-269, 2008.
- 2) Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Ueno T, Takada S, Yamashita Y, Sugiyama Y, Ishikawa Y and Mano H. "Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer" *Cancer Res* 68: 4971-4976, 2008.
- 3) Kawakami M, Bando M, Mato N, Nakaya T, Ohno S and Sugiyama Y. "A case of paraneoplastic cerebellar degeneration associated with small cell lung cancer showing marked response to intravenous immunoglobulin" *Nihon Kogyaku Gakkai Zasshi* 46: 325-330, 2008.

- 4) Kawakami M, Ohno S, Tsujita A, Hosono T, Kobayashi A, Yamasawa H, Bando M and Sugiyama Y. "Our clinical experiences of amrubicin hydrochloride monotherapy in extensive-disease small cell lung cancer" *Gan To Kagaku Ryoho* 35: 273-276, 2008.
- 5) Mato N, Fujii M, Hakamata Y, Kobayashi E, Sato A, Hayakawa M, Ohto-Ozaki H, Bando M, Ohno S, Tominaga S and Sugiyama Y. "IL-1 R-related protein ST2 suppressed the initial stage of bleomycin-induced lung injury" *Eur Respir J* 2009.
- 6) Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, Haruta H, Hamada T, Yamashita Y, Ishikawa Y, Sugiyama Y and Mano H. "A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer" *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19893-19897, 2008.
- 7) Tajima S, Bando M, Ishii Y, Hosono T, Yamasawa H, Ohno S, Takada T, Suzuki E, Gejyo F and Sugiyama Y. "Effects of edaravone, a free-radical scavenger, on bleomycin-induced lung injury in mice" *Eur Respir J* 32: 1337-1343, 2008.
- 8) Tajima S, Soda M, Bando M, Enomoto M, Yamasawa H, Ohno S, Takada T, Suzuki E, Gejyo F and Sugiyama Y. "Preventive effects of edaravone, a free radical scavenger, on lipopolysaccharide-induced lung injury in mice" *Respirology* 13: 646-653, 2008.
- 9) Yamasawa H, Ohno S, Nakaya T, Ishii Y, Hosono T, Tsujita A, Bando M and Sugiyama Y. "Case of minocycline-induced acute eosinophilic pneumonia accompanied by marked neutrophilia in the peripheral blood" *Nihon Kogyaku Gakkai Zasshi* 46: 820-824, 2008.
- 10) Yamasawa H, Sugiyama Y, Bando M and Ohno S. "Drug-induced pneumonitis associated with imatinib mesylate in a patient with idiopathic pulmonary fibrosis" *Respiration* 75: 350-354, 2008.
- 11) Ohno S, Nakaya T, Bando M, Sugiyama Y. "Idiopathic pulmonary fibrosis-results from a Japanese nationwide epidemiological survey

using individual clinical records" *Respirology*

13: 926-928, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kaneda, R., Takada, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Nonaka-Sarukawa, M., Soda, M., Misawa, Y., Isomura, T., Shimada, K. and Mano, H.	Genome-wide histone methylation profile for heart failure	Genes Cells	14	69-77	2009
Takeuchi, K., Choi, Y.L., Soda, M., Inamura, K., Togashi, Y., Hatano, S., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Ishikawa, Y. and Mano, H.	Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts	Clin. Cancer Res.	14	6618-6624	2008
Takada, S., Yamashita, Y., Berezikov, E., Hatanaka, H., Fujiwara, S.I., Kurashina, K., Watanabe, H., Enomoto, M., Soda, M., Choi, Y.L. and Mano, H.	MicroRNA expression profiles of human leukemias	Leukemia	22	1274-1278	2008
Soda, M., Takada, S., Takeuchi, K., Choi, Y.L., Enomoto, M., Ueno, T., Haruta, H., Hamada, T., Yamashita, Y., Ishikawa, Y., Sugiyama, Y. and Mano, H.	A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer	Proc. Natl. Acad. Sci. U S A	105	19893-19897	2008
Sato, T., Toki, T., Kanezaki, R., Xu, G., Terui, K., Kanegane, H., Miura, M., Adachi, S., Migita, M., Morinaga, S., Nakano, T., Endo, M., Kojima, S., Kiyoi, H., Mano, H. and Ito, E.	Functional analysis of JAK3 mutations in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukaemia accompanying Down syndrome	Br. J. Haematol.	141	681-688	2008
Saga, Y., Ohwada, M., Suzuki, M., Konno, R., Kigawa, J., Ueno, S. and Mano, H.	Glutathione peroxidase 3 is a candidate mechanism of anticancer drug resistance of ovarian clear cell adenocarcinoma	Oncol. Rep.	20	1299-1303	2008
Onimaru, Y., Tsukasaki, K., Murata, K., Imaizumi, Y., Choi, Y.L., Hasegawa, H., Sugahara, K., Yamada, Y., Hayashi, T., Nakashima, M., Taguchi, T., Mano, H., Kamihira, S. and Tomonaga, M.	Autocrine and/or paracrine growth of aggressive ATLL cells caused by HGF and c-Met	Int. J. Oncol.	33	697-703	2008
Nagai, K., Jinnai, I., Hata, T., Usui, T., Sasaki, D., Tsukasaki, K., Sugahara, K., Hishikawa, Y., Yamada, Y., Tanaka, Y., Koji, T., Mano, H., Kamihira, S. and Tomonaga, M.	Adhesion-dependent growth of primary adult T cell leukemia cells with down-regulation of HTLV-I p40Tax protein: a novel in vitro model of the growth of acute ATL cells	Int. J. Hematol.	88	551-564	2008
Mano, H.	Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer	Cancer Sci.	99	2349-2355	2008
Mano, H.	Epigenetic abnormalities in cardiac hypertrophy and heart failure	Environ. Health Prev. Med.	13	25-29	2008
Kurashina, K., Yamashita, Y., Ueno, T., Koinuma, K., Ohashi, J., Horie, H., Miyakura, Y., Hamada, T., Haruta, H., Hatanaka, H., Soda, M., Choi, Y.L., Takada, S., Yasuda, Y., Nagai, H. and Mano, H.	Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-related genomic regions in colorectal carcinoma	Cancer Sci.	99	1835-1840	2008
Kato, N., Miyata, T., Tabara, Y., Katsuya, T., Yanai, K., Hanada, H., Kamide, K., Nakura, J., Kohara, K., Takeuchi, F., Mano, H., Yasunami, M., Kimura, A., Kita, Y., Ueshima, H., Nakayama, T., Soma, M., Hata, A., Fujioka, A., Kawano, Y., Nakao, K., Sekine, A., Yoshida, T., Nakamura, Y., Saruta, T., Ogiwara, T., Sugano, S., Miki, T. and Tomoike, H.	High-density association study and nomination of susceptibility genes for hypertension in the Japanese National Project	Hum. Mol. Genet.	17	617-627	2008
Inamura, K., Takeuchi, K., Togashi, Y., Nomura, K., Ninomiya, H., Okui, M., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Soda, M., Choi, Y.L., Niki, T., Mano, H. and Ishikawa, Y.	EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers	J. Thorac. Oncol.	3	13-17	2008

Fujiwara, S.I., Yamashita, Y., Nakamura, N., Choi, Y.L., Ueno, T., Watanabe, H., Kurashina, K., Soda, M., Enomoto, M., Hatanaka, H., Takada, S., Abe, M., Ozawa, K. and Mano, H.	High-resolution analysis of chromosome copy number alterations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified, with single nucleotide polymorphism-typing microarrays	Leukemia	22	1891-1898	2008
Choi, Y.L., Takeuchi, K., Soda, M., Inamura, K., Togashi, Y., Hatano, S., Enomoto, M., Hamada, T., Haruta, H., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Ueno, T., Takada, S., Yamashita, Y., Sugiyama, Y., Ishikawa, Y. and Mano, H.	Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer	Cancer Res.	68	4971-4976	2008
Chen, Y., Takita, J., Choi, Y.L., Kato, M., Ohira, M., Sanada, M., Wang, L., Soda, M., Kikuchi, A., Igarashi, T., Nakagawara, A., Hayashi, Y., Mano, H. and Ogawa, S.	Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma	Nature	455	971-974	2008

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Bando, M., Takahashi, M., Ohno, S., Hosono, T., Hironaka, M., Okamoto, H. and Sugiyama, Y.	Torque teno virus DNA titre elevated in idiopathic pulmonary fibrosis with primary lung cancer	Respirology	13	263-269	2008
Choi, Y.L., Takeuchi, K., Soda, M., Inamura, K., Togashi, Y., Hatano, S., Enomoto, M., Hamada, T., Haruta, H., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Ueno, T., Takada, S., Yamashita, Y., Sugiyama, Y., Ishikawa, Y. and Mano, H.	Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer	Cancer Res	68	4971-4976	2008
Kawakami, M., Bando, M., Mato, N., Nakaya, T., Ohno, S. and Sugiyama, Y.	A case of paraneoplastic cerebellar degeneration associated with small cell lung cancer showing marked response to intravenous immunoglobulin	Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi	46	325-330	2008
Kawakami, M., Ohno, S., Tsujita, A., Hosono, T., Kobayashi, A., Yamasawa, H., Bando, M. and Sugiyama, Y.	Our clinical experiences of amrubicin hydrochloride monotherapy in extensive-disease small cell lung cancer	Gan To Kagaku Ryoho	35	273-276	2008
Mato, N., Fujii, M., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Sato, A., Hayakawa, M., Ohto-Ozaki, H., Bando, M., Ohno, S., Tominaga, S. and Sugiyama, Y.	IL-1 R-related protein ST2 suppressed the initial stage of bleomycin-induced lung injury	Eur Respir J			2009
Soda, M., Takada, S., Takeuchi, K., Choi, Y.L., Enomoto, M., Ueno, T., Haruta, H., Hamada, T., Yamashita, Y., Ishikawa, Y., Sugiyama, Y. and Mano, H.	A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer	Proc Natl Acad Sci U S A	105	19893-19897	2008
Tajima, S., Bando, M., Ishii, Y., Hosono, T., Yamasawa, H., Ohno, S., Takada, T., Suzuki, E., Gejyo, F. and Sugiyama, Y.	Effects of edaravone, a free-radical scavenger, on bleomycin-induced lung injury in mice	Eur Respir J	32	1337-1343	2008
Tajima, S., Soda, M., Bando, M., Enomoto, M., Yamasawa, H., Ohno, S., Takada, T., Suzuki, E., Gejyo, F. and Sugiyama, Y.	Preventive effects of edaravone, a free radical scavenger, on lipopolysaccharide-induced lung injury in mice	Respirology	13	646-653	2008
Yamasawa, H., Ohno, S., Nakaya, T., Ishii, Y., Hosono, T., Tsujita, A., Bando, M. and Sugiyama, Y.	Case of minocycline-induced acute eosinophilic pneumonia accompanied by marked neutrophilia in the peripheral blood	Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi	46	820-824	2008
Yamasawa, H., Sugiyama, Y., Bando, M. and Ohno, S.	Drug-induced pneumonitis associated with imatinib mesylate in a patient with idiopathic pulmonary fibrosis	Respiration	75	350-354	2008

A mouse model for *EML4-ALK*-positive lung cancer

Manabu Soda^{a,b}, Shuji Takada^a, Kengo Takeuchi^c, Young Lim Choi^a, Munehiro Enomoto^a, Toshihide Ueno^a, Hidenori Haruta^a, Toru Hamada^a, Yoshihiro Yamashita^a, Yuichi Ishikawa^c, Yukihiko Sugiyama^b, and Hiroyuki Mano^{a,d,1}

Divisions of ^aFunctional Genomics and ^bPulmonary Medicine, Jichi Medical University, Tochigi 329-0498, Japan; ^cDivision of Pathology, The Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo 135-8550, Japan; and ^dCore Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, Saitama 332-0012, Japan

Edited by John D. Minna, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, and accepted by the Editorial Board October 17, 2008 (received for review June 2, 2008)

EML4-ALK is a fusion-type protein tyrosine kinase that is generated in human non-small-cell lung cancer (NSCLC) as a result of a recurrent chromosome inversion, *inv*(2)(p21p23). Although mouse 3T3 fibroblasts expressing human *EML4-ALK* form transformed foci in culture and s.c. tumors in nude mice, it has remained unclear whether this fusion protein plays an essential role in the carcinogenesis of NSCLC. To address this issue, we have now established transgenic mouse lines that express *EML4-ALK* specifically in lung alveolar epithelial cells. All of the transgenic mice examined developed hundreds of adenocarcinoma nodules in both lungs within a few weeks after birth, confirming the potent oncogenic activity of the fusion kinase. Although such tumors underwent progressive enlargement in control animals, oral administration of a small-molecule inhibitor of the kinase activity of ALK resulted in their rapid disappearance. Similarly, whereas i.v. injection of 3T3 cells expressing *EML4-ALK* induced lethal respiratory failure in recipient nude mice, administration of the ALK inhibitor effectively cleared the tumor burden and improved the survival of such animals. These data together reinforce the pivotal role of *EML4-ALK* in the pathogenesis of NSCLC in humans, and they provide experimental support for the treatment of this intractable cancer with ALK inhibitors.

transgenic mouse | surfactant protein C | molecular targeted therapy

Lung cancer remains the leading cause of cancer deaths, with almost 1.3 million people dying annually from this condition worldwide (www.who.int/cancer/en). Although a variety of chemotherapeutic regimens have been developed to treat this intractable disease, their efficacy is limited and depends on cancer subtype. Non-small-cell lung cancer (NSCLC) accounts for 80–85% of all lung cancer cases and is less sensitive to cytotoxic drugs than is small cell lung cancer. Unless tumor cells are surgically resected at an early clinical stage, individuals with NSCLC can expect a median survival time of less than 1 year (1).

A subset of individuals with NSCLC (mostly nonsmokers, young females, and those of Asian ethnicity) have been shown to harbor mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene (2–4). Such mutations result in constitutive activation of the EGFR tyrosine kinase, the oncogenic potential of which has been demonstrated in a transgenic mouse system (5). Small-molecule drugs that specifically inhibit the catalytic activity of EGFR have been found to exhibit clinical efficacy in the treatment of NSCLC patients, especially in those with an activated EGFR (6, 7).

We recently developed a system for the construction of retroviral cDNA libraries from small quantities of clinical specimens (8–10), and we applied this technology to NSCLC to screen for oncogenes that might be potential drug targets (11). With the use of a focus-formation assay performed with mouse 3T3 fibroblasts, we identified a fusion-type oncogene, *EML4-ALK*, in an NSCLC specimen of a smoker (12). A small inversion within the short arm of chromosome 2 was found to result in the ligation of *EML4* and *ALK*, leading to the production of a fusion protein consisting of the amino-terminal portion of *EML4* and the intracellular region of the protein tyrosine kinase ALK. The

coiled-coil domain within this portion of *EML4* mediates the constitutive dimerization and activation of *EML4-ALK*, which is responsible for the generation of transformed cell foci in culture and the formation by these cells of s.c. tumors in nude mice. Although the *inv*(2)(p21p23) rearrangement responsible for the fusion event occurs recurrently in NSCLC patients, it remains to be demonstrated that *EML4-ALK* plays an essential role in the carcinogenesis of NSCLC harboring the fusion gene.

To address this issue, we have now engineered the expression of *EML4-ALK* in lung epithelial cells of transgenic mice. The surfactant protein C gene (*SPC*) is specifically expressed in type 2 alveolar epithelial cells, and a fragment of its promoter has been used widely for establishment of mouse lines that express transgenes specifically in lung epithelial cells (13–15). We therefore generated independent mouse lines in which *EML4-ALK* expression is driven by the *SPC* promoter, and we found that all such mice develop hundreds of adenocarcinoma nodules in both lungs within only a few weeks after birth. Furthermore, inhibition of *EML4-ALK* activity with a small-molecule drug induced rapid death of the tumor cells.

Results

Generation of *EML4-ALK* Transgenic Mice. To generate mice with lung-specific expression of *EML4-ALK*, we ligated a fragment of the *SPC* promoter (~3.7 kbp) to a cDNA for *EML4-ALK* variant 1 with an amino-terminal FLAG epitope tag (12). The cDNA was, in turn, attached to an RNA splicing cassette and a polyadenylation signal (Fig. 1A). The transgene construct (~8.3 kbp) was then injected into pronuclear-stage embryos of C57BL/6J mice, and the resulting progeny were screened for the presence of the transgene by Southern blot analysis. Seven founder mice positive for incorporation of the transgene (copy number per diploid genome ranging from 1 to 30) were obtained (Fig. 1B and data not shown). Two transgenic lines (501-3 and 502-4, with 10 and 30 copies of the transgene per genome, respectively) were independently maintained by backcrossing to C57BL/6J mice. To confirm the lung-specific expression of the transgene, we performed RT-PCR analysis to detect *EML4-ALK* mRNA in an F₁ mouse of the 502-4 line. The transgene was expressed in lung tissue (containing adenocarcinoma nodules, see below) but not in liver, esophagus, stomach, colon, brain, kidney, or uterus (Fig. 1C).

Detection of Multiple Lung Adenocarcinoma Nodules in the Transgenic Mice. One founder mouse (503-6, with 3 copies of the transgene per genome) (Fig. 1B) died 3 weeks after birth. Postmortem

Author contributions: Y.I., Y.S., and H.M. designed research; M.S., S.T., K.T., Y.L.C., M.E., T.U., H.H., T.H., Y.Y., and Y.I. performed research; and H.M. wrote the paper.

Conflict of interest statement: K.T. is a consultant for Dako.

This article is a PNAS Direct Submission. J.D.M. is a guest editor invited by the Editorial Board.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: hmano@jichi.ac.jp.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0805381105/DCSupplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

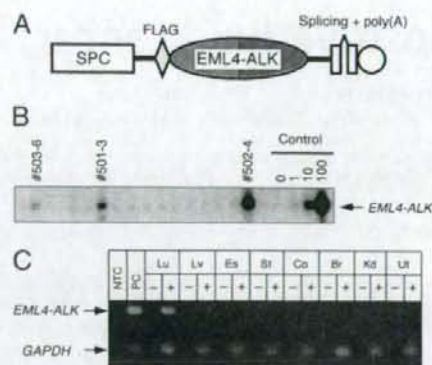


Fig. 1. Generation of transgenic mouse lines for *EML4-ALK*. (A) A cDNA for FLAG-tagged *EML4-ALK* was inserted between the *SPC* promoter and both splicing and polyadenylation [poly(A)] signal sequences. (B) Genomic DNA was isolated from the tail of founder mice generated from pronuclear-stage C57BL/6J embryos and was subjected to Southern blot analysis with full-length *EML4-ALK* cDNA as a probe. Control samples on the right comprised mouse genomic DNA with 0, 1, 10, or 100 copies of the transgene per diploid genome. The ID numbers of founder mice positive for the transgene are shown at the top. (C) Oligo(dT)-primed cDNA was synthesized from total RNA isolated from lung (Lu), liver (Lv), esophagus (Es), stomach (St), colon (Co), brain (Br), kidney (Kd), and uterus (Ut) of an F₁ mouse of the 502-4 line, with the reaction being performed in the presence (+) or absence (-) of reverse transcriptase. The cDNA preparations were then subjected to PCR with primer sets for *EML4-ALK* or for *GAPDH*, and the PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. The positions of the PCR products are indicated on the left. RT-PCR was also performed for a no-template control (NTC) and for a human NSCLC specimen harboring *EML4-ALK* variant 1 as a positive control (PC).

examination revealed hundreds of nodules in both lungs of this animal (Fig. 2A) and that these nodules were filled with adenocarcinoma cells (Fig. 2B). Immunohistochemical analysis with antibodies to ALK showed a diffuse cytoplasmic staining with granular accentuations in the neoplastic cells (Fig. 2C), consistent with the results of a similar analysis of *EML4-ALK*-positive human tumors (16). The level of immunoreactivity in the lungs of the transgenic mouse, however, was substantially lower than that in *EML4-ALK*-positive human specimens, suggestive of a lower level of expression for the *EML4-ALK* protein.

Detection of *EML4-ALK* by immunoblot analysis with antibodies to the FLAG tag confirmed a low-level but lung-specific expression of the kinase (Fig. 2D). Pathology and computed tomography (CT) examinations (see below) of the progeny of the maintained transgenic mouse lines (501-3 and 502-4) also revealed the development of multiple adenocarcinoma nodules in their lungs at only a few weeks after birth, demonstrating an essential role for the *EML4-ALK* kinase in NSCLC carcinogenesis. There was no discernable difference in tumor-forming activity between the 2 transgenic lines. We thus used both of these lines for further analyses.

Treatment of NSCLC-Positive Transgenic Mice with an ALK-Specific Inhibitor. To observe the development of NSCLC in the transgenic mice, we performed a series of CT scans of the chest. Multiple large nodules, some with infiltrative profiles of NSCLC, were detected in the lungs of progeny mice [Fig. 3A; also see supporting information (SI) Movie S1]. Other progeny with similar CT findings were subjected to pathology examination, confirming that such CT profiles reflected tumor expansion and infiltration in the lungs (data not shown). Examination of other organs of these mice failed to detect metastatic tumor nodules. Several chemical compounds that specifically inhibit the ty-

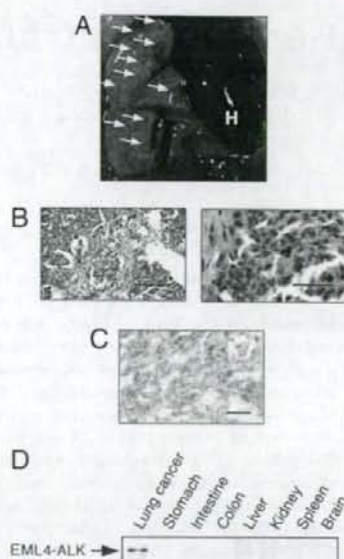


Fig. 2. Development of lung adenocarcinoma in *EML4-ALK* transgenic mice. (A) Hundreds of adenocarcinoma nodules (arrows) were apparent in the lungs of a founder mouse (503-6) that died 3 weeks after birth. H, heart. (B) Microscopic examination of the nodules shown in A after staining with H&E. Images at low (Left) and high (Right) magnification are shown with scale bars of 200 and 40 μ m, respectively. Some tumors exhibited obvious scar formation, suggesting that they were invasive carcinomas. (C) Immunohistochemical analysis with antibodies to ALK of one of the nodules shown in A revealed a pattern of cytoplasmic staining with granular accentuations. (Scale bar, 50 μ m.) (D) Immunoprecipitates prepared with antibodies to FLAG from the indicated tissues of an F₁ mouse of the 502-4 line were subjected to immunoblot analysis with the same antibodies. The position of *EML4-ALK* is shown at the left.

rosine kinase activity of ALK have been identified (17–19). One such 2,4-pyrimidinediamine derivative has a median inhibitory concentration for ALK of <10 nM and a high specificity to ALK (Fig. S1) (20). We therefore examined whether peroral treatment with this compound (10 mg per kg of body weight per day) might inhibit the growth or induce the death of the adenocarcinoma cells in the transgenic mice. CT scans were performed after 0, 11, and 25 days of treatment for all 10 mice in each of the treatment and control (vehicle) groups, and a sequential examination of CT profiles was undertaken for each animal. The tumor mass developed rapidly in both lungs for most of the animals in the control group (Fig. 3A; also see Movie S2). Multiple nodules of various sizes newly appeared in the lungs, and the existing nodules became enlarged. In contrast, treatment with the ALK inhibitor greatly reduced the tumor burden in all mice (Fig. 3B). A large tumor in the lower lobe of the right lung in mouse 373, for instance, was reduced to ~30% of its original size (based on the cross-section at the chest level in Fig. 3B) after only 11 days of the drug treatment and was almost undetectable by CT after treatment for 25 days (Movie S3). Sequential CT examination of another mouse (381) confirmed the pronounced activity of the ALK inhibitor (Fig. 3B; also see Movie S4 and Movie S5).

Mice in both groups were killed for pathology analysis after drug or vehicle administration for 2 months. Although multiple large tumor nodules were readily identified in the lungs of control mice, such nodules were apparent only occasionally in the treated animals (Fig. 3C), confirming the marked therapeutic effect of the ALK inhibitor. However, several small nodules were detected in the

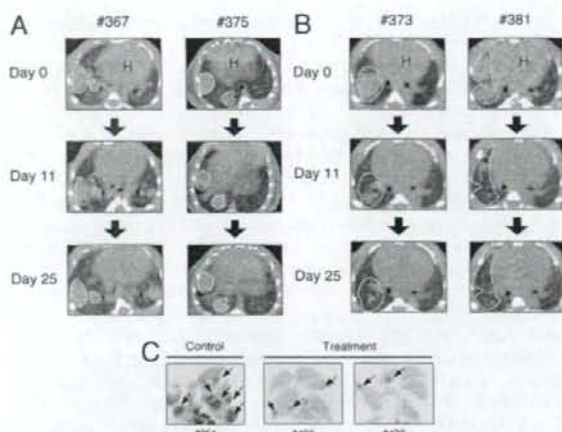


Fig. 3. Treatment of *EML4-ALK* transgenic mice with a specific ALK inhibitor. (A and B) Transgenic mice were subjected to daily peroral administration of vehicle (A) or ALK inhibitor (B) beginning at 4 weeks of age and were examined by CT scanning of the chest on days 0, 11, and 25. The ID numbers of the mice are shown at the top. H, heart. Tumors (indicated by broken lines) in both lungs underwent progressive enlargement in all control mice but became progressively smaller in all treated animals. (C) Macroscopic examination of the lungs from mice of the control and treatment groups at 2 months after the onset of treatment. The tissue was stained with H&E. The ID numbers of the mice are shown at the bottom. Cancer nodules are indicated by arrows. Thy, thymus.

treated mice. Microscopic examination of the lungs of control and treated mice confirmed the changes observed by CT scanning and macroscopic analysis (data not shown). Even at this time point, we did not detect metastatic nodules in organs other than the lungs in either control or treated mice, and all animals in these cohorts survived the observation period.

Treatment of Mice Injected with 3T3 Cells Expressing *EML4-ALK*.

Given that transgenic mice with lung cancer did not die by 6 months of age (with the exception of the one shown in Fig. 2A and another that died at 6 months after birth), we were not able to examine statistically the possible effect of the ALK inhibitor on survival in these animals. We therefore adopted another approach—that of loading mice with a large number of *EML4-ALK*-positive cells. We previously showed that mouse 3T3 fibroblasts expressing *EML4-ALK* (*EML4-ALK/3T3*) undergo transformation and generate s.c. tumors when injected into *nu/nu* mice (12). Such *EML4-ALK/3T3* cells (2×10^5) were therefore injected i.v. into *nu/nu* mice ($n = 20$), and the ALK inhibitor was administered to half of these animals.

A total of 9 of the 10 untreated mice died within 1 month of injection with the *EML4-ALK/3T3* cells (Fig. 4A). Postmortem examination of these mice revealed extensive dissemination of *EML4-ALK*-positive cells into the lungs (>60% of lung tissue was occupied with the transformed *EML4-ALK/3T3* cells in all mice) (Fig. 4B). Pathology examination of the lungs revealed many nodules of various sizes that were filled with the *EML4-ALK/3T3* fibroblasts (Fig. 4C). In a separate experiment, we confirmed that injection of parental 3T3 cells did not induce the formation of such nodules in the lungs or affect the survival of mice (data not shown).

To verify that the injected *EML4-ALK/3T3* cells continued to express *EML4-ALK*, we stained tissue sections of the lungs of control mice with antibodies to ALK. All cells within nodules reacted with the antibodies (Fig. 4D), giving rise to a diffuse pattern of cytoplasmic staining with granular accentuations. Although the staining profile was similar to that observed for the transgenic mice,

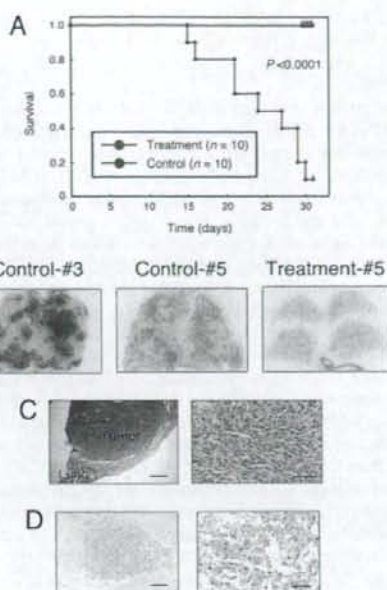


Fig. 4. Treatment with the ALK inhibitor of mice injected with *EML4-ALK/3T3* cells. (A) Nude mice were injected i.v. with 2×10^5 3T3 cells expressing *EML4-ALK* variant 1 and were then immediately subjected to daily peroral administration of vehicle (control, $n = 10$) or ALK inhibitor (treatment, $n = 10$). Survival of the 2 cohorts is shown as a Kaplan–Meier plot and was compared by the log-rank test, with the calculated *P* value indicated. (B) Macroscopic examination of lungs isolated from mice of the control group at death or of the treatment group after treatment for 31 days. The tissue was stained with H&E. Most of the lungs in both control animals were occupied with transformed *EML4-ALK/3T3* cells, whereas such cells were rarely observed in the treated animal. (C) Microscopic examination of lung tissue from a mouse of the control group after H&E staining. Images of low (Left) and high (Right) magnification are shown with scale bars of 500 and 50 μ m, respectively. (D) Immunohistochemical analysis with antibodies to ALK of the nodules of *EML4-ALK/3T3* cells that formed in the lungs of a mouse in the control group. Images of low (Left) and high (Right) magnification are shown with scale bars of 200 and 50 μ m, respectively.

the staining intensity in the *EML4-ALK/3T3* cell-injected animals was greater than that in the transgenic animals.

Similar to the results obtained with transgenic mice, transformed *EML4-ALK/3T3* cells were not detected in any organs other than the lungs of the injected mice, with the exception of 2 animals in the control group (nos. 3 and 7). Given the massive infiltration of *EML4-ALK/3T3* cells in the lungs of all mice in the control cohort, these mice likely died from respiratory failure. In the control no. 7 mouse, we detected pronounced infiltration of *EML4-ALK/3T3* cells into both the mediastinum (Fig. S2A) and the diaphragm (Fig. S2B). Given that both of these structures are adjacent to the lungs and that this mouse had an exceptionally high tumor burden in the lungs (>90% of the lungs were occupied with *EML4-ALK/3T3* cells; Fig. S2C), the presence of *EML4-ALK/3T3* cells in the mediastinum and diaphragm was likely the result of direct invasion from the lungs rather than of distant metastasis.

Peroral administration of the ALK inhibitor markedly improved the outcome of mice injected with the transformed *EML4-ALK/3T3* cells, with all 10 animals in the treatment group surviving the 1-month observation period ($P < 0.0001$, log-rank test) (Fig. 4A). The treated mice also were subjected to pathology analysis after this period, revealing the absence of *EML4-*