

201007003A

厚生労働科学研究費補助金

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」に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成23 (2011) 年5月

厚生労働科学研究費補助金

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」に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成23(2011)年5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 陽性肺がん診断システムの開発」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 -----	7
2.	「EML4-ALK陽性肺がん治療剤開発」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-----	10
3.	「EML4-ALKの発がんメカニズム解析」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・呼吸器外科学 遠藤俊輔 -----	12
4.	「がん細胞における TGF β シグナル伝達解析」に関する研究	
	東京大学大学院医学系研究科 鯉沼代造 -----	14
5.	「大規模検体におけるFISHスクリーニング」に関する研究	
	癌研究会癌研究所病理部 竹内賢吾 -----	16
6.	「環状DNAを介するがん細胞のテロメア維持機構」に関する研究	
	京都大学大学院生命科学研究科 鍋谷彰 -----	19
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	21
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	29

「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：我々は新たな肺がんの原因遺伝子 EML4-ALK を発見したが、これはヒト 2 番染色体内の微小な逆位によって ALK チロシンキナーゼの酵素活性領域が EML4 タンパクと融合するものであり、非小細胞肺がんの 4-5% に認められる。EML4-ALK がん化チロシンキナーゼに対する特異的阻害剤による臨床試験が 3 種類行われているがそのうち 1 種類 (crizotinib) は既に第 I/II 相臨床試験を終了し、奏効率約 9 割という驚くべき治療効果が確認された。この様な ALK 阻害剤の急速な臨床応用に対し、本研究計画で我々は、EML4-ALK 陽性肺がん診断法の確立、EML4-ALK チロシンキナーゼによる発がんメカニズムの解明、さらに ALK 阻害剤耐性メカニズムを解明することに成功した。中でも ALK 阻害剤耐性原因となる EML4-ALK の二次変異の発見は世界で初めての報告であり、「第二世代の ALK 阻害剤」開発のための本質的な基盤情報となるものである。

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
遠藤俊輔	自治医科大学医学部呼吸器外科学・教授
鯉沼代造	東京大学大学院医学系研究科・講師
竹内賢吾	癌研究会癌研究所病理部・主任研究員
鍋谷彰	京都大学大学院生命科学研究所・助教

ある imatinib (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抗 ErbB2 抗体である trastuzumab (商品名ハーセプチン) が有効なことなどは何れも「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。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)。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。

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、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

B 研究方法

1) 診断システムの開発

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 を設計した。さらに我々が独自に発見した KIF5B-ALK 遺伝子も検出可能なように KIF5B 上にも 4 種類の forward primer を設計した。これら 8 種類の forward primer に 1 種類の reverse primer (ALK のエクソン 20 上に設計) を混和して、EML4-ALK および KIF5B-ALK のいずれにおいても全ての融合バリエーションを検出可能なシステムを構築した。

さらに免疫組織染色法により EML4-ALK を検出可能にするべく、1 次抗体に加えて、抗イディオタイプ 2 次抗体を添加する intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP) 法を開発した。iAEP により上記 RT-PCR 陽性例を全て検出可能にする抗 ALK 抗体を選別し、iAEP 法によるパラフィン包埋標本の大規模スクリーニングを行った。

2) 遺伝子改変マウスの作成

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した。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・分布の変化を観察した。また経口接種可能な ALK 阻害剤をマウスに投与しその治療効果を検証した。

3) ALK 阻害剤耐性原因の解明

ALK 阻害剤 (crizotinib) を使用した EML4-ALK 陽性患者においてその初回診断時 (crizotinib 治療前) と再発後より ALK cDNA を RT-PCR 法で回収し、イルミナ社ゲノムアナライザーによって変異の有無を探索した。

(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

1) EML4-ALK 陽性肺がん診断システムの開発

我々が当初発見した EML4-ALK は EML4 cDNA のエクソン 13 が ALK cDNA のエクソン 20 に融合したものであったが、ALK のエクソン 20 に in-frame で融合しうる EML4 のエクソンには 2、6、18、20、21 も存在する。そこでこれらのエクソンで ALK に融合した cDNA も全て検出可能なように、EML4 遺伝子のエクソン 1、3、13、20 上にそれぞれ forward primer を設計した。

同様に KIF5B のエクソン 2、11、17、24 それぞれにも別の 4 種類の forward primer を設計し、これら 8 種類の primer と ALK のエクソン 20 上に設置した reverse primer とを混和した multiplex RT-PCR 法による検出プロトコールを開発した。

2) 遺伝子改変マウスの解析

EML4-ALK 発現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。これら腫瘍を取り出し別のヌードマウス皮下に接種したところ腫瘍は継代されたことから、トランスジェニックマウスに生じた腫瘍は良性でなく、肺腺がんであると確認された。次にこれらマウスを CT 装置により系時的に観察したところ、両肺に生じた腫瘍がやがて増大・播種し、胸水も産生されることが確認された。ただし少なくとも 3 ヶ月の観察期間中には、肺周囲への直接浸潤を除き、遠隔臓器への転移巣は確認されなかった。さら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、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速やかな消失を確認した。

ただし CT 上肺腫瘍が完全に消失したマウス群に一旦 ALK 阻害剤投与を中止し、観察を続けると約 1-2 ヶ月後に腫瘍の再増殖が確認された。従って、少なくとも今回投与した ALK 阻害剤については、使用した投与量では腫瘍細胞を完全に撲滅することは困難であることが明らかになった。

3) ALK 阻害剤耐性原因の解明

Crizotinib 治療症例の初回診断時 (喀痰) および再発時 (胸水) の各試料から RNA を抽出

し、RT-PCR 法により ALK cDNA を増幅回収した。得られた PCR 産物を次世代シーケンサー（イルミナ社ゲノムアナライザー）によってシーケンスし、ALK キナーゼドメイン領域の cDNA について各塩基を平均約 3000 回の重複度で解析した。その結果再発時にのみ G4374A と C4493A 変異を発見した。これら変異はそれぞれ Cys1156 をチロシンへ (C1156Y)、Leu1196 をメチオニンへ (L1196M) 置換した。興味深いことに両変異を同時に持つ cDNA は検出されなかったため、両変異は別々のがん細胞クローン上に出現したと考えられる。

BAF3細胞にEML4-ALKを導入するとIL-3の非存在下でも細胞増殖が可能になるが、その細胞の培養上清にcrizotinibを添加すると濃度依存性に細胞死が誘導された。しかし発現するEML4-ALKがC1156Y変異を有していると約10倍の濃度のcrizotinibを添加しないと細胞死が生じなくなり、L1196M変異の場合はさらに高濃度のcrizotinibが必要になった。すなわち両変異共にcrizotinib耐性原因であると考えられた。しかもこれら変異を有するEML4-ALKは、患者治療に用いていないALK阻害剤に対しても耐性となる事から、我々が発見した二次変異は、広くALK阻害剤の耐性原因となると考えられた。

D&E. 考察及び結論

我々の解析により、キナーゼ阻害剤の第I/II相臨床試験の途中に既に薬剤耐性原因が明らかにされたことになる。広く臨床で用いられているキナーゼ阻害剤のうち、imatinib治療に耐性となる変異としてBCR-ABLのT315Iが知られ、またgefitinib耐性原因としてEGFRのT790M変異が知られる。興味深いことに我々が発見した耐性変異部位の一つL1196は、タンパクの構造上、上記ABL(T315)やEGFR(T790)と全く同じ場所に位置していた。すなわち全く異なるキナーゼに対する阻害剤であるにもかかわらず、キナーゼ側が阻害剤耐性を獲得する部位は共通なのである。我々の発見は直接「第二世代のALK阻害剤」開発の基盤情報となるものであり、世界中で既にその開発競争が始まっている。

F. 健康危険情報
無し

G. 研究発表

1. 論文発表

間野博行

- 1) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Ota Y, Sekiguchi Y, Hatano S, Asaka R, Noguchi M & Mano H. "Identification of a novel fusion, SQSTM1-ALK, in ALK-positive large B-cell lymphoma" *Haematologica*, in press.
- 2) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez V, Hayashi T, Yanagihara K, Moriwaki Y, Miyazaki Y, Kamihira S & Yamada Y. "Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy" *Haematologica*, in press.
- 3) Iida A, Shinoe T, Baba Y, Mano H & Watanabe S. "Dicer plays essential roles for retinal development by regulation of survival and differentiation" *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.
- 4) Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, Takeuchi K, Hamada T, Haruta H, Ishikawa Y, Kimura H, Mitsudomi T, Tanio Y & Mano H. "EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors" *N Engl J Med* **363**: 1734-1739, 2010.
- 5) Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A & Mano H. "Array-based genomic resequencing of human leukemia" *Oncogene* **29**: 3723-3731, 2010.
- 6) Zhang MJ, Franklin S, Li Y, Wang S, Ru X, Mitchell-Jordan SA, Mano H, Stefani E, Ping P & Vondriska TM. "Stress signaling by Tec tyrosine kinase in the ischemic myocardium" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**: H713-722, 2010.
- 7) Susaki K, Kitanaka A, Dobashi H, Kubota Y, Kittaka K, Kameda T, Yamaoka G, Mano H, Mihara K & Ishida T. "Tec protein tyrosine

- kinase inhibits CD25 expression in human T-lymphocyte" *Immunol Lett* **127**: 135-142, 2010.
- 8) Sakairi Y, Nakajima T, Yasufuku K, Ikebe D, Kageyama H, Soda M, Takeuchi K, Itami M, Iizasa T, Yoshino I, Mano H & Kimura H. "EML4-ALK Fusion Gene Assessment Using Metastatic Lymph Node Samples Obtained by Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration" *Clin Cancer Res* **16**: 4938-4945, 2010.
 - 9) Osoegawa A, Nosaki K, Miyamoto H, Kometani T, Hirai F, Ondo K, Seto T, Sugio K, Choi YL, Soda M, Mano H & Ichinose Y. "Incidentally proven pulmonary "ALKoma"" *Intern Med* **49**: 603-606, 2010.
 - 10) Nakajima T, Kimura H, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Yasufuku K & Iizasa T. "Treatment of Lung Cancer with an ALK Inhibitor After EML4-ALK Fusion Gene Detection Using Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration" *J Thorac Oncol* **5**: 2041-2043, 2010.
 - 11) Mano H & Takeuchi K. "EML4-ALK fusion in lung" *Am J Pathol* **176**: 1552-1553, 2010.
 - 12) Hatanaka H, Tsukui M, Takada S, Kurashina K, Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Haruta H, Hamada T, Ueno T, Tamada K, Hosoya Y, Sata N, Yasuda Y, Nagai H, Sugano K & Mano H. "Identification of transforming activity of free fatty acid receptor 2 by retroviral expression screening" *Cancer Sci* **101**: 54-59, 2010.
 - 13) Hatanaka H, Takada S, Tsukui M, Choi YL, Kurashina K, Soda M, Yamashita Y, Haruta H, Hamada T, Tamada K, Hosoya Y, Sata N, Nagai H, Yasuda Y, Sugano K & Mano H. "Identification of the transforming activity of Indian hedgehog by retroviral expression screening" *Cancer Sci* **101**: 60-64, 2010.
- 杉山幸比古
- 1) Mizushina Y, Bando M, Hosono T, Mato N, Nakaya T, Ishii Y, Yamasawa H & Sugiyama Y. "Clinical features of lymphangioliomyomatosis complicated by renal angiomyolipomas" *Intern Med* **50**:285-289, 2011.
 - 2) Tanaka K, Ishihara T, Azuma A, Kudoh S, Ebina M, Nukiwa T, Sugiyama Y, Tasaka Y, Namba T, Ishihara T, Sato K, Mizushima Y & Mizushima T. "Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis" *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **298**:L348-L360, 2010.
 - 3) Bando M, Hosono T, Mato N, Nakaya T, Yamasawa H, Ohno S & Sugiyama Y. "Long-term efficacy of inhaled N-acetylcysteine in patients with idiopathic pulmonary fibrosis" *Intern Med* **49**:2289-2296, 2010.
- 遠藤俊輔
- 1) Yamamoto S, Endo T, Tetsuka K & Endo S. "A new technique for the examination of tracheal tumors the bronchoscopic turned around procedure" *J Bronchol Intervent Pulmonol* **17**: 273-275, 2010.
 - 2) Nakano T, Endo S, Tsubochi H, Nokumi M, Wanatabe Y & Koyama S. "Tymic clear cell carcinoma" *General Thoracic Cardiovasc Surg* **58**: 98-100, 2010.
 - 3) Yamamoto S, Tetsuka K, Sato Y & Endo S. "Unsuspected tracheal web inhibits endotracheal intubation: report of a case" *J Anesth* **24**: 132-133, 2010.
 - 4) 三輪千尋, 渡辺恭考, 白石守, 工藤史明, 遠藤俊輔, 小山信一郎. 「経気管支肺生検で診断したpulmonary epithelioid hymangioendotheliomaの一例」 *気管支学* **32**: 72-76, 2010.
 - 5) 中野知之, 金井義彦, 手塚憲志 坪地宏嘉, 小山信一郎, 遠藤俊輔. 「無症候性の後天性左上葉気管閉鎖症の1手術例」 *気管支学* **32**: 314-317, 2010.
 - 6) 足立広幸, 前原孝光, 安藤耕平, 益田宗孝, 遠藤俊輔, 岸本晃司. 「多発原発性肺癌手術例の検討」 *胸部外科* **63**: 347-353, 2010.
 - 7) 遠藤俊輔, 板東政司, 杉山幸比古. 「びまん性肺疾患と外科的肺生検」 *日本胸部臨床* **69**: S33-S39, 2010.
- 鯉沼代造

- 1) K Miyazono and D Koinuma. "Arkadia--beyond the TGF- β pathway" *J Biochem* **149**: 1-3, 2011.
 - 2) S Ehata, E Johansson, R Katayama, S Koike, A Watanabe, Y Hoshino, Y Katsuno, A Komuro, D Koinuma, MR Kano, M Yashiro, K Hirakawa, H Aburatani, N Fujita, and K Miyazono. "Transforming growth factor-b decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells" *Oncogene* in press.
 - 3) Y Nagano, D Koinuma, K Miyazawa, and K Miyazono. "Context-dependent regulation of the expression of c-Ski protein by Arkadia in human cancer cells" *J Biochem* **147**: 545-554, 2010.
- 竹内賢吾
- 1) Tachibana T, Tomita N, Furuya M, Yamanaka S, Takeuchi K, Nakamura N, Fujita H, Ishigatsubo Y. Aberrant CD20 expression in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Internal Medicine*. in press.
 - 2) Watanabe N, Noh JY, Narimatsu H, Takeuchi K, Yamaguchi T, Kameyama K, Kobayashi K, Kami M, Kubo A, Kunii Y, Shimizu T, Mukasa K, Otsuka F, Miyara A, Minagawa A, Ito K, Ito K. Clinicopathological features of 171 cases of primary thyroid lymphoma: a long-term study involving 24,553 patients with Hashimoto's disease. *Br J Haematol*. in press.
 - 3) Okuda C, Kim YH, Takeuchi K, Togashi Y, Masago K, Sakamori Y, Mio T, Mishima M. Successful treatment with pemetrexed in a patient with mucinous bronchioloalveolar carcinoma: long-term response duration with mild toxicity. *J Thorac Oncol*. 2011;6:641-642.
 - 4) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Ota Y, Sekiguchi Y, Hatano S, Asaka R, Noguchi M, Mano H. Identification of a novel fusion, SQSTM1-ALK, in ALK-positive large B-cell lymphoma. *Haematologica*. on line.
 - 5) Nakajima T, Kimura H, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Yasufuku K, Iizasa T. Treatment of Lung Cancer with an ALK Inhibitor After EML4-ALK Fusion Gene Detection Using Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration. *J Thorac Oncol*. 2010;5:2041-2043.
 - 6) Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, Takeuchi K, Hamada T, Haruta H, Ishikawa Y, Kimura H, Mitsudomi T, Tanio Y, Mano H. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med*. 2010;363:1734-1739.
 - 7) Nishimori H, Takahashi S, Kiura K, Ennishi D, Kobayashi T, Sano K, Shinozaki E, Yokoyama M, Mishima Y, Terui Y, Chin K, Mizunuma N, Ito Y, Nishimura S, Takeuchi K, Ishikawa Y, Oguchi M, Tanimoto M, Hatake K. Cancer of unknown primary site: a review of 28 cases and the efficacy of cisplatin/docetaxel therapy at a single institute in Japan. *Acta Med Okayama*. 2010;64:285-291.
 - 8) Jokoji R, Yamasaki T, Minami S, Komuta K, Sakamaki Y, Takeuchi K, Tsujimoto M. Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2010;63:1066-1070.
 - 9) Sakairi Y, Nakajima T, Yasufuku K, Ikebe D, Kageyama H, Soda M, Takeuchi K, Itami M, Iizasa T, Yoshino I, Mano H, Kimura H. EML4-ALK fusion gene assessment using metastatic lymph node samples obtained by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *Clin Cancer Res*. 2010;16:4938-4945.
 - 10) Takeuchi K, Yokoyama M, Ishizawa S, Terui Y, Nomura K, Marutsuka K, Nunomura M, Fukushima N, Yagyuu T, Nakamine H, Akiyama F, Hoshi K, Matsue K, Hatake K, Oshimi K. Lymphomatoid gastropathy: a distinct clinicopathologic entity of self-limited pseudomalignant NK-cell proliferation. *Blood*. 2010;116:5631-5637.
 - 11) Kodaira M, Takahashi S, Takeuchi K, Yuasa T, Saotome T, Yonese J, Fukui I, Hatake K. Sorafenib-induced erythema multiforme for metastatic renal cell carcinoma. *Ann Oncol*.

- 2010;21:1563-1565.
- 12) Asai H, Yokoyama M, Terui Y, Ennishi D, Takeuchi K, Hatake K. Is statin use really associated with efficacy of rituximab? *J Clin Oncol*. 2010;28:e424-425; author reply e427-428.
- 13) Hoshi R, Furuta N, Horai T, Takeuchi K, Ishikawa Y, Satoh Y. Implications for differential diagnosis of lung cancer-associated lymphadenopathy in lymphoepithelioid cell lymphoma (Lennert's lymphoma) arising simultaneously with lung cancer: a case report. *Acta Cytol*. 2010;54:197-201.
- 14) Ichinohasama R, Oji Y, Yokoyama H, Takeuchi K, Fujiwara T, Ishizawa K, Taniguchi O, Tsuboi A, Oka Y, Sugiyama H. Sensitive immunohistochemical detection of WT1 protein in tumors with anti-WT1 antibody against WT1 235 peptide. *Cancer Sci*. 2010;101:1089-1092.
- 15) Tsuji H, Tamura M, Yokoyama M, Takeuchi K, Mimura T. Ocular involvement by epstein-barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a new disease entity in the world health organization classification. *Arch Ophthalmol*. 2010;128:258-259.
- 16) Hiramatsu M, Ninomiya H, Inamura K, Nomura K, Takeuchi K, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Yamori T, Matsuura M, Morikawa T, Ishikawa Y. Activation status of receptor tyrosine kinase downstream pathways in primary lung adenocarcinoma with reference of KRAS and EGFR mutations. *Lung Cancer*. 2010;70:94-102.
- 17) Mano H, Takeuchi K. EML4-ALK fusion in lung. *Am J Pathol*. 2010;176:1552-1553; author reply 1553-1554.
- 18) Watanabe R, Tomita N, Takeuchi K, Sakata S, Tateishi U, Tanaka M, Fujita H, Inayama Y, Ishigatsubo Y. SUVmax in FDG-PET at the biopsy site correlates with the proliferation potential of tumor cells in non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2010;51:279-283.
- 19) Kodaira M, Takahashi S, Yamada S, Ueda K, Mishima Y, Takeuchi K, Yamamoto N, Ishikawa Y, Yokoyama M, Saotome T, Terui Y, Hatake K. Bone metastasis and poor performance status are prognostic factors for survival of carcinoma of unknown primary site in patients treated with systematic chemotherapy. *Ann Oncol*. 2010;21:1163-1167.
- 20) Ennishi D, Asai H, Maeda Y, Shinagawa K, Ikeda K, Yokoyama M, Terui Y, Takeuchi K, Yoshino T, Matsuo K, Hatake K, Tanimoto M. Statin-independent prognosis of patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. *Ann Oncol*. 2010;21:1217-1221.
- 21) Hyo R, Tomita N, Takeuchi K, Aoshima T, Fujita A, Kuwabara H, Hashimoto C, Takemura S, Taguchi J, Sakai R, Fujita H, Fujisawa S, Ogawa K, Motomura S, Suzuki R, Ishigatsubo Y. The therapeutic effect of rituximab on CD5-positive and CD5-negative diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol*. 2010;28:27-32.

鍋谷彰

- 1) Nabetani, A. and Ishikawa, F. "Alternative lengthening of telomeres pathway: Recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells." *J. Biochem*. 149(1): 5-14, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

- ・ PCT 出願：
 - 出願番号：PCT/US11/023690
 - 発明名称：Identification, Assessment, and Therapy of Cancers with Innate or Acquired Resistance to ALK Inhibitors
 - 出願人：CureGene Co., Ltd.
 - 出願日：2011年2月4日

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 陽性肺がん診断システムの開発」に関する研究

分担研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：我々は完全長 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 陽性肺がんの感度・精度共に良い診断システムを構築するべく、RT-PCR 法と高感度免疫組織染色法の組み合わせによる EML4-ALK 陽性肺がんの診断プロトコルを検討した。RT-PCR は高感度であるが、EML4 が ALK と融合するポイントは多岐にわたるため全ての融合バリエーションを等しく検出する必要がある。そこで ALK のエクソン 20 へ in-frame で融合可能な EML4 エクソンのいずれで融合した場合も検出可能な用に 4 種類の forward primer を加えた PCR 法を開発した。さらに肺がんでは我々が発見した別の ALK 融合型がん遺伝子である KIF5B-ALK に対して 4 種類の forward primer をデザインし、これら 8 種類の forward primer プラス 1 種類の reverse primer からなる multiplex RT-PCR 法を開発した。

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)。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 を設計した。さらに我々が独自に発見した KIF5B-ALK 遺伝子 (*Clin Cancer Res* 15:3143) も検出可能なように KIF5B 上に 4 種類の forward primer を設計した。これら 8 種類の forward primer に 1 種類の reverse primer (ALK のエクソン 20 上に設計) を混和して、EML4-ALK および KIF5B-ALK のいずれにおいても全ての融合バリエーションを検出可能なシステムを構築した。

(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

我々が当初発見した EML4-ALK は EML4 cDNA のエクソン 13 が ALK cDNA のエクソン 20 に融合したものであったが、ALK のエクソン 20 に in-frame で融合しうる EML4 のエクソンには 2、6、18、20、21 も存在する。そこでこれらのエクソンで ALK に融合した cDNA も検出可能なように、EML4 遺伝子のエクソン 1、3、13、20 上にそれぞれ forward primer を設計した。

同様に KIF5B のエクソン 2、11、17、24 それぞれにも別の 4 種類の forward primer を設計し、これら 8 種類の primer と ALK のエクソン 20 上に設置した reverse primer とを混和した multiplex RT-PCR 法による検出プロトコル

を開発した。

さらに本法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。実際の解析は、我々のボランティア診断活動「ALK肺がん研究会：ALK Lung Cancer Study Group (ALCAS)」において、上記RT-PCR法を用いて前向き診断を行った。2009年3月から開始し、参加施設は各施設における倫理委員会承諾を得た後、喀痰・胸水・凍結生標本などの検体をRLTバッファ（Qiagen社）に溶解して凍結し、自治医科大学ゲノム機能研究部に送付した。

これらの活動を通して数十例のEML4-ALK陽性例を検出し、そのうち15名が韓国ソウル大学で行われたALK阻害剤（crizotinib）による第一相臨床試験に参加することができた。なお我々が検出したEML4-ALKには新規バリエーションが存在しただけでなく、本ラインin-frameに融合しないエキソンからでもALKエキソン20の内部にスプライシングが飛び形で最終的にin-frameの癒合キナーゼが産生される異型バリエーションも2種類発見された。

D&E. 考察及び結論

我々の解析により喀痰・胸水・気管支洗浄液・凍結生標本などRNAを抽出可能な試料からmultiplex RT-PCR法によりEML4-ALKを検出可能なことが前向きスタディで証明された。EML4-ALKは肺腺がんの4-5%に存在し、若年者、非喫煙者、軽度喫煙者に多く見られることが確認された。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。

現在ALK阻害剤は複数の製薬企業により臨床試験が行われており、特にcrizotinibは第I/II相試験が終了し、既に国際第三相に入っている。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存在することが判った。我々が開発したmultiplex RT-PCR法を利用することは、上記正確な分子診断に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Ota Y, Sekiguchi Y, Hatano S, Asaka R, Noguchi M & Mano H. "Identification of a novel fusion, SQSTM1-ALK, in ALK-positive large B-cell lymphoma" *Haematologica*, in press.
- 2) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez V, Hayashi T, Yanagihara K, Moriwaki Y, Miyazaki Y, Kamihira S & Yamada Y. "Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy" *Haematologica*, in press.
- 3) Iida A, Shinoe T, Baba Y, Mano H & Watanabe S. "Dicer plays essential roles for retinal development by regulation of survival and differentiation" *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.
- 4) Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, Takeuchi K, Hamada T, Haruta H, Ishikawa Y, Kimura H, Mitsudomi T, Tanio Y & Mano H. "EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors" *N Engl J Med* **363**: 1734-1739, 2010.
- 5) Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A & Mano H. "Array-based genomic resequencing of human leukemia" *Oncogene* **29**: 3723-3731, 2010.
- 6) Zhang MJ, Franklin S, Li Y, Wang S, Ru X, Mitchell-Jordan SA, Mano H, Stefani E, Ping P & Vondriska TM. "Stress signaling by Tec tyrosine kinase in the ischemic myocardium" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**: H713-722, 2010.
- 7) Susaki K, Kitanaka A, Dobashi H, Kubota Y, Kittaka K, Kameda T, Yamaoka G, Mano H, Mihara K & Ishida T. "Tec protein tyrosine kinase inhibits CD25 expression in human

T-lymphocyte" *Immunol Lett* **127**: 135-142, 2010.

出願人：CureGene Co., Ltd.

出願日：2011年2月4日

- 8) Sakairi Y, Nakajima T, Yasufuku K, Ikebe D, Kageyama H, Soda M, Takeuchi K, Itami M, Iizasa T, Yoshino I, Mano H & Kimura H. "EML4-ALK Fusion Gene Assessment Using Metastatic Lymph Node Samples Obtained by Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration" *Clin Cancer Res* **16**: 4938-4945, 2010.
- 9) Osoegawa A, Nosaki K, Miyamoto H, Kometani T, Hirai F, Ondo K, Seto T, Sugio K, Choi YL, Soda M, Mano H & Ichinose Y. "Incidentally proven pulmonary "ALKoma"" *Intern Med* **49**: 603-606, 2010.
- 10) Nakajima T, Kimura H, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Yasufuku K & Iizasa T. "Treatment of Lung Cancer with an ALK Inhibitor After EML4-ALK Fusion Gene Detection Using Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration" *J Thorac Oncol* **5**: 2041-2043, 2010.
- 11) Mano H & Takeuchi K. "EML4-ALK fusion in lung" *Am J Pathol* **176**: 1552-1553, 2010.
- 12) Hatanaka H, Tsukui M, Takada S, Kurashina K, Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Haruta H, Hamada T, Ueno T, Tamada K, Hosoya Y, Sata N, Yasuda Y, Nagai H, Sugano K & Mano H. "Identification of transforming activity of free fatty acid receptor 2 by retroviral expression screening" *Cancer Sci* **101**: 54-59, 2010.
- 13) Hatanaka H, Takada S, Tsukui M, Choi YL, Kurashina K, Soda M, Yamashita Y, Haruta H, Hamada T, Tamada K, Hosoya Y, Sata N, Nagai H, Yasuda Y, Sugano K & Mano H. "Identification of the transforming activity of Indian hedgehog by retroviral expression screening" *Cancer Sci* **101**: 60-64, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- ・ PCT 出願：

出願番号：PCT/US11/023690

発明名称：Identification, Assessment, and Therapy of Cancers with Innate or Acquired Resistance to ALK Inhibitors

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 陽性肺がんの治療モデル動物を作成する目的で、EML4-ALK を 2 型肺胞上皮特異的に発現する遺伝子改変マウスを作成した。EML4-ALK 発現マウスは生後すぐに両肺に数百個の肺腺がんを多発発症し、しかも同マウスに ALK 酵素活性阻害剤を経口摂取すると肺がんは速やかに消失した。以上より EML4-ALK が同遺伝子陽性肺がんの主たる発がん原因であること、またそのため EML4-ALK の酵素活性阻害剤は著明な治療効果をもたらすことが生体において証明された。しかし CT 上腫瘍が消失したように見えるマウスに ALK 阻害剤投与を中止すると 1-2 ヶ月の後に腫瘍の再増殖が確認された。従って少なくともこの治療実験に用いた ALK 阻害剤単剤治療は腫瘍の完全な撲滅には至らなかったことが明らかになった。

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イルス 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、微少管結合タンパク 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遺伝子改変マウスを作成し、モデル動物による治療実験を行うことを目指した。

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。さらに長期観察後の肺がんの遠隔転移の有無についても検討した。また CT 上腫瘍が完全に消失した場合は一旦治療を中止し、残存腫瘍の再増殖の有無を検討する。
(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 が肺特異的に発現していることを確認した。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。

これら腫瘍を取り出し別のヌードマウス皮下に接種したところ腫瘍はヌードマウスにおいて継代されたことから、トランスジェニックマウスに生じた腫瘍は良性でなく、肺腺がんであると確認された。次にこれらマウスをCT装置により系時的に観察したところ、両肺に生じた腫瘍がやがて増大・播種し、胸水も産生されることが確認された。ただし少なくとも3ヶ月の観察期間中には、肺周囲への直接浸潤を除き、遠隔臓器への転移巣は確認されなかった。

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速やかな消失を確認した。またEML4-ALK陽性細胞をヌードマウスの尾静脈より投与すると両肺に播種し、全てのマウスは1ヶ月以内に死亡してしまうが、同じ処理をしたマウスにALK阻害剤を投与すると肺の播種は生じず、全てのマウスが生存可能となった。

ただしCT上肺腫瘍が完全に消失したマウス群に一旦ALK阻害剤投与を中止し、観察を続けると約1-2ヶ月後に腫瘍の再増殖が確認された。従って、少なくとも今回投与したALK阻害剤については、使用した投与量では腫瘍細胞を完全に撲滅することは困難であ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だけでなく、実際に同遺伝子産物の酵素活性を抑制する化合物が、EML4-ALK陽性肺がんの全く新しい分子標的療法となる事を直接証明した。またそれのみならず、ALK阻害剤単剤では少量の肺がん細胞が残存する事が明らかになり、実際の臨床応用の際にも薬剤投与中止に再発の危険性が伴う事を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizushima Y, Bando M, Hosono T, Mato N, Nakaya T, Ishii Y, Yamasawa H & Sugiyama Y. "Clinical features of lymphangioleiomyomatosis complicated by renal angiomyolipomas" *Intern Med* **50**:285-289, 2011.
- 2) Tanaka K, Ishihara T, Azuma A, Kudoh S, Ebina M, Nukiwa T, Sugiyama Y, Tasaka Y, Namba T, Ishihara T, Sato K, Mizushima Y & Mizushima T. "Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis" *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **298**:L348-L360, 2010.
- 3) Bando M, Hosono T, Mato N, Nakaya T, Yamasawa H, Ohno S & Sugiyama Y. "Long-term efficacy of inhaled N-acetylcysteine in patients with idiopathic pulmonary fibrosis" *Intern Med* **49**:2289-2296, 2010.

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 の発がんメカニズム解析」に関する研究

分担研究者： 遠藤 俊輔 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。また既に実際の肺がん症例を対象とした ALK 阻害剤(crizotinib)による第 I/II 相臨床試験も終了し、劇的とも言える治療効果が確認された。ALK 阻害剤治療に伴い薬剤耐性例が出現する可能性が予想されるが、我々は実際に crizotinib に対して耐性になった症例を経験し、同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で比較することで薬剤耐性の直接原因となる EML4-ALK 内の二次変異を 2 種類発見することに成功した。今回の発見・知見を基にした「第二世代の ALK 阻害剤」が開発されることが期待される。

A 研究目的

2007 年に間野らは肺腺がんの一部において 2 番染色体内に微小な逆位が生じ、ALK チロシンキナーゼの酵素活性領域が EML4 タンパクのアミノ末端側約半分と融合した新しい活性型チロシンキナーゼが産生されることを報告した (*Nature* 448:561)。EML4-ALK は肺腺がんの約 4-5% に出現し、若年、非〜軽度喫煙者に好発するという特徴を有する。病理学的にも signet ring cell を認める特徴的な形態を示し、また興味深いことに肺がんの他の原因遺伝子である変異 EGFR 遺伝子や活性型 KRAS 遺伝子とは互いに相互排他的である。以上より EML4-ALK 陽性肺がんは、肺腺がん内の新たなサブグループとして定義されると言える。

2008 年より ALK 阻害剤 (crizotinib) による第 I/II 相臨床試験が米国/韓国/オーストラリアにおいて開始され、単剤投与によって約 9 割が部分寛解あるいは完全寛解となるという驚くべき治療効果が確認された (*NEJM* 363:1693)。また別の製薬会社による ALK 阻害剤の第 I 相試験が既に日本でも開始され、またそれとは別の ALK 阻害剤による第 I 相試験も米国で開始されている。

これら ALK 阻害剤が今後急速に普及・臨床応用されるに従い、薬剤耐性症例の出現が予想される。臨床上広く使われているチロシンキナーゼ阻害剤に imatinib (慢性骨髄性白血病の BCR-ABL キナーゼを阻害) と gefitinib (肺がんの変異 EGFR を阻害) があるが、いずれの場合も一部の症例で薬剤耐性となる事が知られる。またその際の耐性メカニズムとしては標的キナーゼ自体における二次変異の出現が最も頻度が高い。本研究計画で我々は EML4-ALK 陽性肺が

んが ALK 阻害剤耐性になるメカニズムを解明することを目指した。

B 研究方法

ALK 阻害剤 (crizotinib) を使用した EML4-ALK 陽性患者においてその初回診断時 (crizotinib 治療前) と再発後より ALK cDNA を RT-PCR 法で回収し、イルミナ社ゲノムアナライザーによって変異の有無を探索した。同定された変異については Sanger シーケンサーによって検証し、そこで確認されたものについては完全長 cDNA の発現ベクターを作成し、IL-3 依存性細胞株 BAF3 へ安定導入した。また導入細胞株の培養上清に対して crizotinib あるいは別の ALK 阻害剤を添加し、濃度依存性の細胞死を検討した。また ALK の自己リン酸化ペプチドを基質とした in vitro キナーゼアッセイも行い、各変異体の酵素活性を確認した。

(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

初回診断時 (喀痰) および再発時 (胸水) の各試料から RNA を抽出し、RT-PCR 法により ALK cDNA を増幅回収した。得られた PCR 産物を次世代シーケンサー (イルミナ社ゲノムアナライザー) によってシーケンスし、ALK キナーゼドメイン領域の cDNA について各塩基を平均約 3000 回の重複度で解析した。その結果両サンプル共に一塩基多型 (rs379585) を検出すると共に、初回診断時にのみ T4230C 変異が、また再発時にのみ G4374A と C4493A 変異を発

見した。これらをキャピラリーシークエンサーで検証したところ、T4230C 変異は検出されなかった。これは次世代シークエンサーのエラーと考えられた。一方再発時にのみ検出されたG4374A と C4493A 変異はキャピラリーシークエンサーによってもそれぞれ 42% および 14% の頻度で確認された。またこれら変異はそれぞれ Cys1156 をチロシンへ (C1156Y)、Leu1196 をメチオニンへ (L1196M) 置換した。興味深いことに両変異を同時に持つ cDNA は検出されなかった。両変異は別々のがん細胞クローン上に出現したと考えられる。

BAF3 細胞に EML4-ALK を導入すると IL-3 の非存在下でも細胞増殖が可能になるが、その細胞の培養上清に crizotinib を添加すると濃度依存性に細胞死が誘導された。しかし発現する EML4-ALK が C1156Y 変異を有していると約 10 倍の濃度の crizotinib を添加しないと細胞死が生じなくなり、L1196M 変異の場合はさらに高濃度の crizotinib が必要になった。すなわち両変異共に crizotinib 耐性原因であると考えられた。しかもこれら変異を有する EML4-ALK は、患者治療に用いていない ALK 阻害剤に対しても耐性となる事から、我々が発見した二次変異は、広く ALK 阻害剤の耐性原因となると考えられた。

D&E. 考察及び結論

我々の解析により、キナーゼ阻害剤の第I/II相臨床試験の途中に既に薬剤耐性原因が明らかにされたことになる。広く臨床で用いられているキナーゼ阻害剤のうち、imatinib治療に耐性となる変異としてBCR-ABLのT315Iが知られ、またgefitinib耐性原因としてEGFRのT790M変異が知られる。興味深いことに我々が発見した耐性変異の一つL1196は、タンパクの構造上、上記ABL(T315)やEGFR(T790)と全く同じ場所に位置していた。すなわち全く異なるキナーゼに対する阻害剤であるにもかかわらず、キナーゼ側が阻害剤耐性を獲得する部位は共通なのである。我々の発見は直接「第二世代のALK阻害剤」開発の基盤情報となるものであり、世界中で既にその開発競争が始まっている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto S, Endo T, Tetsuka K & Endo S. "A new technique for the examination of tracheal tumors the bronchoscopic turned around procedure" *J Bronchol Intervent Pulmonol* **17**: 273-275, 2010.
- 2) Nakano T, Endo S, Tsubochi H, Nokumi M, Wanatabe Y & Koyama S. "Tymic clear cell carcinoma" *General Thoracic Cardiovasc Surg* **58**: 98-100, 2010.
- 3) Yamamoto S, Tetsuka K, Sato Y & Endo S. "Unsuspected tracheal web inhibits endotracheal intubation: report of a case" *J Anesth* **24**: 132-133, 2010.
- 4) 三輪千尋, 渡辺恭考, 白石守, 工藤史明, 遠藤俊輔, 小山信一郎. 「経気管支肺生検で診断したpulmonary epithelioid hymangioendotheliomaの一例」 *気管支学* **32**: 72-76, 2010.
- 5) 中野知之, 金井義彦, 手塚憲志, 坪地宏嘉, 小山信一郎, 遠藤俊輔. 「無症候性の後天性左上葉気管閉鎖症の1手術例」 *気管支学* **32**: 314-317, 2010.
- 6) 足立広幸, 前原孝光, 安藤耕平, 益田宗孝, 遠藤俊輔, 岸本晃司. 「多発原発性肺癌手術例の検討」 *胸部外科* **63**: 347-353, 2010.
- 7) 遠藤俊輔, 板東政司, 杉山幸比古. 「びまん性肺疾患と外科的肺生検」 *日本胸部臨床* **69**: S33-S39, 2010.

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
「がん細胞における TGF- β シグナル伝達解析」に関する研究

分担研究者： 鯉沼 代造 東京大学大学院医学系研究科 講師

研究要旨：Transforming growth factor- β (TGF- β)シグナルは腫瘍の進展に対して正と負の相反する作用を有する。その伝達経路の異常は膵臓がんや大腸がんで良く知られている。このシグナル伝達経路はまた、p53 や RAS をはじめとして肺がんとも関係の深い分子との相互作用が明らかになっている。しかしながら肺がんにおいて TGF- β シグナルが病態に及ぼす影響を与えるのか、診断法及び分子標的治療法確立の対象となり得るのかはいまだ解析途上である。本研究では細胞種、コンテキストの違いによって TGF- β シグナルに対しがん細胞がどのように細胞応答を来すのかに着目して検討を行った。

A 研究目的

Transforming growth factor- β (TGF- β)シグナルは腫瘍細胞に対して細胞増殖抑制やアポトーシスを引き起こす一方で epithelial to mesenchymal transition (EMT)を介する細胞浸潤を促進するなど、がんの進展にとって正と負の相反する作用を有する。その伝達経路の異常は大腸がんや膵臓がんで良く知られている。このシグナル伝達経路はまた、p53 や RAS をはじめとして、肺がんとも関係の深い分子との相互作用が明らかになっている。

しかしながら肺がんにおいて TGF- β シグナルの異常が病態に及ぼす影響を与えるのか、診断法及び分子標的治療法確立の対象となり得るのかはいまだ不明である。また、TGF- β シグナルはしばしば有効な肺がんの治療を妨げる肺線維化とのかかわりも深く、呼吸器腫瘍領域における同シグナル経路の病態への関与の探索と理解は、将来の治療戦略上重要であると考えられる。

分担研究者のこれまでの TGF- β シグナル伝達経路の制御機構に着目した解析の結果、網羅的な転写因子結合部位同定手法と遺伝子発現解析手法を用いることで、細胞種・コンテキストの違いによって如何に TGF- β シグナルに対して異なる細胞応答が引き起こされるのかが明らかになりつつある。こうした背景に本研究計画では高密度ゲノムタイリングアレイとクロマチン免疫沈降法(ChIP-chip 法)を用い、正常上皮細胞と比較した、がん細胞での TGF- β 下流転写因子 Smad2/Smad3 の結合ゲノム領域を網羅的に同定した。またがん細胞パネルを用いて、シグナル制御因子 Arkadia の発現

解析とその基質蛋白質発現量への影響について解析を行った。

B 研究方法

1) 肺がんを含むがん細胞株パネルを用い、TGF- β シグナル制御因子 Arkadia とその基質蛋白 c-Ski の発現を中心に RNA およびタンパクレベルで比較検討し、がん細胞の TGF- β 応答性と合わせて評価を行う。

2) がん細胞における TGF- β シグナルの転写制御機構について、がん細胞株を用いて Smad2/Smad3 の結合部位を ChIP-chip 法により同定して、これまでに報告した正常上皮細胞株での結合部位との比較を行う。合わせて新規の標的遺伝子を同定してその制御機構について解析する。

(倫理面への配慮)

本研究ではがん細胞株を解析の対象とし倫理委員会での審査を必要とするサンプル等を検討に用いていない。

C 研究結果

1) がん細胞パネルによる TGF- β 制御因子の発現解析

分担研究者が以前報告した Arkadia は TGF- β シグナルを増強する唯一の E3 ユビキチンリガーゼとして知られる

(Koinuma et al, EMBO J 2003)。これまで Arkadia により分解が誘導される基質の一つとしてがん遺伝子 c-Ski が知られている。

本研究でのがん細胞パネルを用いた Arkadia と c-Ski の mRNA およびタンパク発現レベルの解析の結果、がん細胞株によって大きく c-Ski タンパクの発現レベルに

違いが認められ、mRNA の発現レベルとは必ずしも相関が認められなかった。一方 Arkadia の発現レベルは比較的普遍的に認められた。一部の細胞株での Arkadia のノックダウンでは c-Ski タンパク発現が亢進したのに対し、OCUM-2MLN のようなスキルス胃がん細胞株ではその効果が認められず、Arkadia の作用は細胞コンテキストの影響を受けていることが示唆された。

2) がん細胞における Smad2/Smad3 結合部位の網羅的同定解析

分担研究者のこれまでの解析により、TGF- β のシグナル伝達研究領域において初めて ChIP-chip 法を用いることで、いかなる制御因子が TGF- β シグナル下流の転写調節にかかわっているのかを同定することができ、また直接の Smad2/Smad3 の標的遺伝子を同定することが可能となった。

本研究ではがん細胞株を用いて同様の手法を用い、網羅的に Smad2/Smad3 結合部位を同定することができた。その結果正常上皮細胞と比較して実に 8 割に及ぶ結合部位が、解析を行ったがん細胞特異的に存在することが明らかとなった。このことはこれまで知られていた細胞特異的な TGF- β の作用発現が、少なくとも一部は選択的な Smad2/Smad3 の結合によりもたらされていることを示唆するものである。またこうしたがん細胞特異的な結合部位に特徴的な DNA 配列を解析することで、その選択的結合のメカニズムを説明できる可能性のある転写因子が同定された。

D&E. 考察及び結論

本研究では TGF- β の制御因子 Arkadia のがん遺伝子 c-Ski 分解作用ががん細胞のコンテキストの違いにより異なることを見出した。それを説明するメカニズムの同定は TGF- β シグナル伝達における Arkadia の重要性からも今後の重要な課題と考えられた。

がん種により如何にこのような違いが起こるのか、今後はコンテキストの違いに注目した肺がん細胞における TGF- β シグナル制御機構の解析が重要になると考えられる。今研究で用い、分担研究者が報告

してきたタイリングオリゴヌクレオチドアレイに加え、次世代シーケンサーを用いた網羅的転写因子結合部位解析と miRNA を含めた転写制御解析が今後非常に有効な手段になると考えられた。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K Miyazono and D Koinuma.
“Arkadia--beyond the TGF- β pathway” *J Biochem* **149**: 1-3, 2011.
- 2) S Ehata, E Johansson, R Katayama, S Koike, A Watanabe, Y Hoshino, Y Katsuno, A Komuro, D Koinuma, MR Kano, M Yashiro, K Hirakawa, H Aburatani, N Fujita, and K Miyazono.
“Transforming growth factor- β decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells” *Oncogene* in press.
- 3) Y Nagano, D Koinuma, K Miyazawa, and K Miyazono. “Context-dependent regulation of the expression of c-Ski protein by Arkadia in human cancer cells” *J Biochem* **147**: 545-554, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

分担研究者：竹内賢吾 癌研究会癌研究所病理部

研究要旨：ALK 陽性肺癌に対する最適な病理診断法には諸説ある。ALK 融合遺伝子検索のコンサルテーション目的で送られてきた 300 例のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）病理未染標本に対して行われた multiplex RT-PCR 法，高感度免疫染色法 iAEP 法，FISH 法の結果を解析し，統合的診断アルゴリズムの検証を行った。HE 染色と抗 ALK iAEP 免疫染色法により病理組織学的検討を行い，免疫染色は陽性(3+)，擬陽性(2+)，擬陰性(1+)，陰性(0)の 4 段階の判定とした。0 であれば総合判定を陰性とし，それ以外に対しては FISH 法（ときに RT-PCR 法）の結果により総合判定を行った。3+においては 63/67 例が総合判定陽性となった。3 例は FISH による確認不能で，1 例は全長 ALK が発現している症例と考えられた。2+においては 2/15 例が総合判定陽性，12 例は FISH 陰性で総合判定陰性，1 例は FISH 不能であった。1+はすべて FISH 陰性であった。iAEP 免疫染色法を 1 次スクリーニングとし，FISH（又は RT-PCR）法により確認を行うという ALK 陽性肺癌に対する統合的診断アルゴリズムは，FFPE 検体に対し施行でき信頼性も高いと考えられた。

A. 研究目的

主任研究者らは 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）。

これを受け，病理診断医である分担研究者らは，ALK 陽性肺癌の簡便な診断法として multiplex RT-PCR 法（Clin Cancer Res. 2008;14:6618-6624.），高感度免疫染色法 intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP)法（Clin Cancer Res. 2009;15:3143-3149.），FISH 法を開発した。

本分担研究の目的は，これら独自に開発した診断法を統合的に用いた ALK 陽性肺癌に対する病理診断アルゴリズムの検証を行うことである。

B. 研究方法

2010 年 12 月までに，分担研究者の元に ALK 融合遺伝子検索コンサルテーション目的で送付されてきた検体に関してその内訳をまとめた。当コンサルテーションは，通常の病理診断コンサルテーションの要領に準じて以下のように行われている。検体は，ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）病理未染標本の形で担当医より分担研究者に送られる。HE 染色

と抗 ALK iAEP 免疫染色法により病理組織学的検討を行い，免疫染色の判定は陽性(3+)，擬陽性(2+)，擬陰性(1+)，陰性(0)の 4 段階とする。抗 ALK iAEP 免疫染色陰性であればその結果を，それ以外の症例に対しては原則的に FISH 法にて ALK 融合遺伝子の存在を確認した上で依頼者に最終報告する。2010 年の症例解析が確定した時点で集計を行った。

C. 研究結果

2008 年 11 月より 2010 年 12 月までに分担研究者に送られた症例は 300 例であり，検体数としては 305 件であった。

抗 ALK iAEP 法免疫染色の結果は 3+ 67 例，2+ 15 例，1+ 24 例，0 192 例，および判定不能 2 例（それぞれ，検体がはがれてしまう，検体僅少）であった。陰性以外の症例において追加検索が行われた。

3+の 67 例のうち 57 例は EML4-ALK fusion FISH assay にて陽性であった。5 例は RT-PCR 法にて EML4-ALK の存在が確認された（うち 3 例は split FISH 陽性）。3 例は FISH 不能であった（それぞれ，細胞診検体，検体僅少，検体不良）。1 例は FISH 陰性であったが神経内分泌癌であったため全長 ALK を発現していると考えられた。1 例は新規 ALK 融合パートナーを有することが確認された。

2+ 15 例のうち 1 例は EML4-ALK fusion

FISH assay, ALK split FISH assayにて陽性であった。1例は検体僅少にてALK split assayのみ施行し陽性であった。12例はALK split FISH assay陰性。1例は検体僅少のためFISH不能であった。

1+ 24例にはALK split FISH assayが施行され、全例陰性であった。

D&E. 考察&結論

3+で追加検索可能であった64例のうち63例が、総合判定陽性であった。陽性例はすべて腺癌であった。我々の経験により神経内分泌癌は稀に全長ALKを発現することがある。これらの癌は神経内分泌マーカー

(chromogranin A, synaptophysin)にて腺癌と鑑別可能である。

今回、iAEP免疫染色陰性であった症例においては追加検索をしていないが、(1) 1+症例において総合判定陽性がなかったこと、(2) 他の400例ほどのコホート研究にて、抗ALK iAEP免疫染色法とmultiplex RT-PCR法の結果が完全一致していることから、iAEP免疫染色陰性例にALK融合遺伝子陽性例が含まれている可能性は恐らくないと思われる。

2+では、FISHによる確認可能であった14例中2例のみ総合判定陽性となった。

これらのことから、FFPE標本を用いて、抗ALK iAEP免疫染色法による一次スクリーニング後、FISH法にて確認するというアルゴリズムは、有効に機能すると考えられた。FISH施行の基準は腺癌以外の2+以上の症例及び2+に施行、または2+以上の全例に施行、などの方針が挙げられよう。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

- 1) Tachibana T, Tomita N, Furuya M, Yamanaka S, Takeuchi K, Nakamura N, Fujita H, Ishigatsubo Y. Aberrant CD20 expression in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Internal Medicine*. in press.
- 2) Watanabe N, Noh JY, Narimatsu H, Takeuchi K, Yamaguchi T, Kameyama K, Kobayashi K, Kami M, Kubo A, Kunii Y, Shimizu T, Mukasa K, Otsuka F, Miyara A, Minagawa A,

Ito K, Ito K. Clinicopathological features of 171 cases of primary thyroid lymphoma: a long-term study involving 24,553 patients with Hashimoto's disease. *Br J Haematol*. in press.

- 3) Okuda C, Kim YH, Takeuchi K, Togashi Y, Masago K, Sakamori Y, Mio T, Mishima M. Successful treatment with pemetrexed in a patient with mucinous bronchioloalveolar carcinoma: long-term response duration with mild toxicity. *J Thorac Oncol*. 2011;6:641-642.
- 4) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Ota Y, Sekiguchi Y, Hatano S, Asaka R, Noguchi M, Mano H. Identification of a novel fusion, SQSTM1-ALK, in ALK-positive large B-cell lymphoma. *Haematologica*. on line.
- 5) Nakajima T, Kimura H, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Yasufuku K, Iizasa T. Treatment of Lung Cancer with an ALK Inhibitor After EML4-ALK Fusion Gene Detection Using Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration. *J Thorac Oncol*. 2010;5:2041-2043.
- 6) Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, Takeuchi K, Hamada T, Haruta H, Ishikawa Y, Kimura H, Mitsudomi T, Tanio Y, Mano H. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med*. 2010;363:1734-1739.
- 7) Nishimori H, Takahashi S, Kiura K, Ennishi D, Kobayashi T, Sano K, Shinozaki E, Yokoyama M, Mishima Y, Terui Y, Chin K, Mizunuma N, Ito Y, Nishimura S, Takeuchi K, Ishikawa Y, Oguchi M, Tanimoto M, Hatake K. Cancer of unknown primary site: a review of 28 cases and the efficacy of cisplatin/docetaxel therapy at a single institute in Japan. *Acta Med Okayama*. 2010;64:285-291.
- 8) Jokoji R, Yamasaki T, Minami S, Komuta K, Sakamaki Y, Takeuchi K, Tsujimoto M. Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2010;63:1066-1070.
- 9) Sakairi Y, Nakajima T, Yasufuku K, Ikebe D,