

201109001A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

「肺がんの分子診断法および分子標的治療法の開発」

に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成24(2012)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

「肺がんの分子診断法および分子標的治療法の開発」

に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成24(2012)年5月

# 目 次

I.	総括研究報告書	
	「肺がんの分子診断法および分子標的治療法の開発」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 -----	9
2.	「EML4-ALK下流シグナルの解析」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 -----	13
3.	「阻害剤耐性変異スクリーニング」に関する研究 東京大学大学院医学系研究科 崔永林 -----	15
4.	「肺がん細胞の上皮間葉転換と TGF- $\beta$ ファミリーシグナルの制御メカニ ズム」に関する研究 東京大学大学院医学系研究科 鯉沼代造 -----	17
5.	「肺がん検体における大規模FISHスクリーニング」に関する研究 がん研究会がん研究所 竹内賢吾 -----	21
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	23
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	29



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総括研究報告書

「肺がんの分子診断法および分子標的治療法の開発」  
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現在 6 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、2011 年 8 月には既に米国で承認・販売された。このような 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を目指す。本研究計画の成果により EML4-ALK 肺がんの診断法が確立され、様々な臨床試験を用いた診断法が可能になることが実証されると共に、我々が発見した阻害剤耐性メカニズムの知見を利用した新たな ALK 阻害剤開発が促進される。

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
崔永林	東京大学大学院医学系研究科・特任准教授
鯉沼代造	東京大学大学院医学系研究科・講師
竹内賢吾	がん研究会がん研究所・主任研究員

肺がんは速やかに消失した（*PNAS* 105:19893）。すなわち EML4-ALK こそが同遺伝子陽性肺がんの主たる発がん原因であり、だからこそその機能を抑制することが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のである。

現在極めて多くの製薬会社が ALK 阻害剤開発に乗り出しているが、中でも 1 社は既に独自の阻害剤（crizotinib）による第 I/II 相臨床試験を終了し大成功を収めた。申請者らは、日本人陽性患者を見つけるべくボランティア診断ネットワーク活動を行ってきたが、その中で治療当初は著効したものの約半年後に突然再発し crizotinib 不応性となった症例を経験した。本症例の治療前と再発後の検体を次世代シーケンサーで比較する事で、再発時にのみ EML4-ALK 内に新たな二次変異が出現する事を発見したが、その変異こそが阻害剤耐性原因であることを確認したのである（*NEJM* 363:1734）。

こうして EML4-ALK の発見以来、申請者のグループはモデル動物における治療実験の成功、薬剤耐性原因の解明など一貫してこの分野で世界をリードしてきており、一方、申請者らの肺がん診断ネットワーク活動によって、既に約 1000 例の肺がん検体およびその cDNA/ゲノム DNA が申請者らの講座に保存されている。本研究計画はこれまでの臨床研究をさらに発展させて今後の ALK 阻害剤を用いた臨床活動の際に

A 研究目的

今日においても世界中で毎年約 130 万人が肺がんのために命を落としている。申請者らは発がん原因遺伝子を探索する目的で、臨床検体を用いた独自のがん遺伝子スクリーニング法を開発し、これを用いて肺腺がん外科切除検体より新規がん遺伝子 EML4-ALK を発見することに成功した（*Nature* 448: 561）。申請者の *Nature* 誌論文は *Nature Medicine* 誌が選ぶ 2007 年の最も重要な 10 の医学発見に選ばれたように世界的に高い注目を集めた。さらに申請者らが同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たところ同マウスは生後すぐに肺腺がんを多発発症し、しかも同マウスに ALK 酵素活性阻害剤を投与するとマウス

重要となる EML4-ALK 陽性肺がんの診断法、至適治療法、さらには薬剤耐性メカニズムを解明するものである。

## 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 遺伝子も同時に検出可能なように 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 のエキソン 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。

### 2) 下流シグナルの解析

HEK293 細胞に c-fos, c-myc, bcl-xl, NF- $\kappa$ B, STAT 経路のルシフェラーゼレポータープラスミドを導入し、同時に EML4-ALK 発現プラスミドを導入した際のルシフェラーゼ活性を Dual-Luciferase reporter assay (Promega) を用いて測定した。

一方 EML4-ALK の基質分子の同定目的で、米国マサチューセッツ工科大学の Forest White 博士との共同研究を行い、細胞内のチロシンリン酸化タンパクを高感度に検出する共同研究を開始した。具体的には、EML4-ALK 陽性細胞株、正常 ALK 陽性細胞株、EML4-ALK/ALK 陰性細胞株の計 3 種類において、細胞内でチロシン残基がリン酸化されているタンパクをスクリーニングし、EML4-ALK がどのような細胞内タンパク質をチロシンリン酸化させているかを明らかにする。

### 3) ALK 阻害剤耐性原因の解明

ALK 阻害剤の臨床試験に参加する EML4-ALK 陽性患者の初回診断時と再発時の検体を系統的に収集し、これら検体の全エクソン配列を次世代シーケンサーで解析する事により、二次変異を探索する。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、細胞株に導入して

ALK 阻害剤感受性への影響を検討する。

### 4) 肺がん細胞の上皮間葉転換

乳腺上皮細胞 NMuMG、肺がん細胞株 A549 および正常角化上皮細胞株 HaCaT における網羅的発現解析、ゲノム配列解析、さらには ChIP-seq 相席を行い、TGF- $\beta$  シグナルが上皮間葉転換を誘導する際のメカニズムについて生化学的・分子生物学的検討を行った。

### 5) 大規模 FISH スクリーニング

抗 ALK iAEP 免疫染色陽性、FISH 法で ALK split assay 陽性、EML4-ALK、KIF5B-ALK fusion assay がそれぞれ陰性であった一症例、EML4-ALK、KIF5B-ALK 陽性それぞれ一症例ずつの合計 3 つの肺がん FFPE ブロックを用いた。型どおり RNA を FFPE から抽出し合成した cDNA に対し、FFPE 用に特化・設計した 5'-RACE を施行した。得られた配列から想定される全長融合 ALK についてはさらに造腫瘍能の検討をおこなった。

(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

### 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 のエキソン 13 が ALK cDNA のエキソン 20 に融合したものであったが、ALK のエキソン 20 に in-frame で融合しうる EML4 のエキソンには 2、6、18、20、21 も存在する。そこでこれらのエキソンで 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「ALK 肺がん研究会：ALK Lung Cancer Study Group (ALCAS)」における前向き診断活動を行った。実際に収集した検体は 851 例の症例から得られた 916 種類の臨床試料であり、これらからそれぞれ cDNA を調整し、内部コントロール遺伝子である RNaseP

の発現を検討した結果、計808種類の検体（754例）が十分な質のcDNAであることが確認された。これら検体のうち過半数を気管支洗浄液、気管支擦過液などが占め、また喀痰、胸水、心嚢液など様々な種類の試料が解析された。

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ぶ形で最終的に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。

## 2) 下流シグナルの解析

Fos, Myc, Bcl-xL, NF- $\kappa$ B および STAT 経路の活性をアッセイするレポータープラスミドをHEK293細胞にリポフェクション法によって導入し、EML4-ALKを共発現した場合の活性の変化を測定した。その結果STAT経路活性（GAS）はEML4-ALKによって影響を受けなかったが、Fos, Mycは共にEML4-ALKによって明瞭な上昇を見た。同様にNF- $\kappa$ B活性もEML4-ALKによって正に制御されることが確認された。

一方EML4-ALK下流分子の探索をフォスフォプロテオミクス法により行ったところ、興味深いことに正常のALKとEML4-ALKは全く異なる基質をリン酸化することが明らかになった。正常ALKはNPM1-ALKと同様にSTATをリン酸化することが知られているが、EML4-ALKはSTATのリン酸化は極めて低く、以前より知られているSTAT経路以外の基質を利用して細胞増殖を誘導することが明らかになった。

## 3) 阻害剤耐性変異スクリーニング

我々は日本のALK陽性患者を救うべく、ボランティアでEML4-ALKを診断する全国規模のネットワーク活動「ALK肺がん研究会（ALCAS）」を行ってきた。同活動を通して既に1000例近い症例の初回診断時検体を収集しており、また数例においては二次性薬剤耐性を獲得した症例も経験した。これら再発例についても、検体を収集し、ゲノムDNAおよびcDNAを調整済みである。

その様な再発例1例について、未治療時と再発時の各試料からRNAを抽出し、RT-PCR法によりALKcDNA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EML4-ALK内にG4374AとC4493Aの2種類の変異を発見した。これら変異はキャピラリーシーケ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ので、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。またこれら変異を有するEML4-ALKはcrizotinibだけでなく、他のALK阻害剤に対しても耐性になり、ユニバーサルなALK阻害剤耐性メカニズムであると考えられた。

## 4) 肺がん細胞の上皮間葉転換

肺腺がん細胞株A549のTGF- $\beta$ による上皮間葉転換（EMT）は、マクロファージ細胞株との共培養、培養上清のいずれでも促進された。そこで主たる分泌因子の一つTNF- $\alpha$ に着目し、その中和抗体を用いたところ、培養上清のEMT促進効果が抑制された。そこでA549細胞でのTGF- $\beta$ とTNF- $\alpha$ の刺激による影響を検討したところ、TNF- $\alpha$ はTGF- $\beta$ によるEMTを増強することが明らかとなり、これはこれまでの報告に一致するものであった。さらにその下流について検討を行いNF- $\kappa$ Bの選択的阻害剤であるDHMEQがTGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ によるA549のEMTを部分的に抑制することが明らかになった（Kawata et al, J Biochem, 2012）。

## 5) 大規模FISHスクリーニング

ALKの融合点は常に exon 20の先端であることが経験的にわかっている。そこで、RACEに用いるプライマー群を ALK exon 20の先端に集中させることにより、FFPE ブロックから合成される短い cDNA にも対応できるようにした。

抗 ALK iAEP 免疫染色陽性、FISH法で ALK split assay 陽性、EML4-ALK、KIF5B-ALK fusion assay がそれぞれ陰性であった一症例に対し本法を施行したところ、KLC1 exon 9が ALK exon 20に融合した配列が得られた。

造腫瘍能の証明のために、想定される KLC1-ALK 全長 cDNA を人工的に合成し、マウス 3T3 細胞にトランスフェクトした。培養系では、明らかな形質転換フォーカスを形成し、マウスに皮下注射したものは肉眼的に確認できる腫瘍を形成したことにより、KLC1-ALK の造腫瘍能が証明された。

#### D&E. 考察及び結論

本研究計画により、EML4-ALKの診断法、薬剤対せ獲得機構、下流分子の探索など様々な面において大きな成果が得られた。まずは、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マルチプレックス 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。また今回の解析により 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。

さらに本解析によって世界で初めて ALK 阻害剤の耐性化メカニズムが明らかにされた。広く臨床で用いられているキナーゼ阻害剤のうち、imatinib 治療に耐性となるメカニズムとして BCR-ABL の T315I 変異が知られ、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 (gate keeper 部位)。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。我々の発見を基に、gate keeper 変異を有する EML4-ALK に対しても有効な ALK 阻害剤が複数開発されており、そのうちの2社は既に国内外において第I相臨床試験を開始した。こうして、我々の研究成果により、耐性を生じにくい新たな治療薬の開発が促進したことになる。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

間野博行

- 1) Ueno T, Yamashita Y, Soda M, Fukumura K, Ando M, Yamato A, Kawazu M, Choi YL & Mano H. "High-throughput resequencing of target-captured cDNA in cancer cells" *Cancer Sci*, **103**: 131-135, 2012.
- 2) Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Nakajima T, Mano H & Takeuchi K. "KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only" *PLoS ONE*, **7**:e31323, 2012.
- 3) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Choi YL, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H & Ishikawa Y. "RET, ROS1, and ALK fusions in lung cancer" *Nat Med*, in press, 2012.
- 4) Sugawara E, Togashi Y, Kuroda N, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Yuasa T, Yonese J, Kitagawa M, Mano H, Ishikawa Y & Takeuchi K. "Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by the intercalated antibody-enhanced polymer method" *Cancer*, in press, 2012.
- 5) Ng KP, Hillmer AM, Chuah CTH, Juan WC, Ko T-K, Teo ASM, Ariyaratne PN, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee WH, Huang JWJ, Allen Jr. JC, Woo XY, Nagarajan N, Kumar V, Thalamuthu A, Poh WT, Ang AL, Mya HT, How GF, Yang LY, Koh LP, Chowbay B, Chang C-T, Nadarajan VS, Chung WJ, Than H, Lim LC, Goh YT, Zhang S, Poh D, Tan P, Seet J-E, Ang M-K,

- Chau N-M, Ng Q-S, Tan DSW, Soda M, Isobe K, Nothen MM, Wong TY, Shahab A, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung W-K, Tan EH, Yatabe Y, Mano H, Soo RA, Chin TM, Lim W-T, Ruan Y & Ong ST. "A common BCL2L1 deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer" *Nat Med*, in press, 2012.
- 6) Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M & Nakagawara A. "ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity" *Lung Cancer*, **75**: 66-72, 2012.
- 7) Choi YL, Soda M, Ueno T, Hamada T, Haruta H, Yamato A, Fukumura K, Ando M, Kawazu M, Yamashita Y & Mano H. "Oncogenic *MAP2K1* mutations in human epithelial tumors" *Carcinogenesis*, in press, 2012.
- 8) Butler MO, Imataki O, Yamashita Y, Tanaka M, Ansen S, Berezovskaya A, Metzler G, Milstein MI, Mooney MM, Murray AP, Mano H, Nadler LM & Hirano N. "Ex vivo expansion of human CD8 T cells using autologous CD4 T cell help" *PLoS One*, **7**: e30229, 2012.
- 9) Tominaga-Sato S, Tsushima H, Ando K, Itonaga H, Imaizumi Y, Imanishi D, Iwanaga M, Taguchi J, Fukushima T, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Kuriyama K, Mano H, Tomonaga M & Miyazaki Y. "Expression of myeloperoxidase and gene mutations in AML patients with normal karyotype: double CEBPA mutations are associated with high percentage of MPO positivity in leukemic blasts" *Int J Hematol*, **94**: 81-89, 2011.
- 10) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Okumura S, Nakagawa K, Mano H & Ishikawa Y. "Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK fusion identification" *Clin Cancer Res*, **17**: 3341-3348, 2011.
- 11) 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*, **96**: 464-467, 2011.
- 12) Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K. "MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation" *Mol Cell*, **44**: 424-436, 2011.
- 13) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez VE, 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*, **96**: 712-719, 2011.
- 14) Matsuyama H, Suzuki HI, Nishimori H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K. "miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma" *Blood*, **118**: 6881-6892, 2011.
- 15) Iida A, Shinoue T, Baba Y, Mano H & Watanabe S. "Dicer plays essential roles for retinal development by regulation of survival and differentiation" *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**: 3008-3017, 2011.
- 杉山幸比古
- 1) Mizushima 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) Taniguchi H, Kondoh Y, Ebina M, Azuma A, Ogura T, Taguchi Y, Suga M, Takahashi H, Nakata K, Sato A, Sugiyama Y, Kodoh S, Nukiwa T, Pirfenidone Clinical Study Group in Japan. "The clinical significance of 5% change in vital capacity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: extended analysis of the pirfenidone trial" *Respir Res* **12**:93, 2011.



- 3) Bando M, Miyazawa T, Sugiyama Y, Shinohara H, Owada T, Terakado M. "An epidemiological study of the effects of statin use on airflow limitation in patients with chronic obstructive pulmonary disease" *Respirology*, in press.
- 4) Uto T, Bando M, Yamauchi H, Nakayama M., Ohata, M, Mato N, Nakaya T, Yamasawa H, Kawai T, Sugiyama Y. "Primary cardiac angiosarcoma of the right auricle with difficult-to-treat bilateral pleural effusion" *Intern Med* **50**:2371-2374, 2011.

崔永林

- 1) Choi YL, Soda M, Ueno T, Hamada T, Haruta H, Yamato A, Fukumura K, Ando M, Kawazu M, Yamashita Y & Mano H. "Oncogenic *MAP2K1* mutations in human epithelial tumors" *Carcinogenesis*, in press.
- 2) Ueno T, Yamashita Y, Soda M, Fukumura K, Ando M, Yamato A, Kawazu M, Choi YL & Mano H. "High-throughput resequencing of target-captured cDNA in cancer cells" *Cancer Sci* **103**: 131-135, 2012.
- 3) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Choi YL, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H & Ishikawa Y. "RET, ROS1, and ALK fusions in lung cancer" *Nat Med*, in press.
- 4) Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K. "MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation" *Mol Cell* **44**: 424-436, 2011.
- 5) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez VE, 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*, **96**: 712-719, 2011.

鯉沼代造

- 1) Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, Semba K, Inoue A, Inoue S, Fujii H, Yamaguchi A,

Miyazawa K, Miyazono K & Saitoh M. "TGF-beta drives epithelial-mesenchymal transition through deltaEF1-mediated downregulation of ESRP" *Oncogene*, in press.

- 2) Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, Watabe T & Miyazono K. "TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by proinflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells" *J Biochem*, **151**: 205-206, 2012.
- 3) Miyazono K, Ehata S & Koinuma D. "Tumor-promoting functions of transforming growth factor-beta in progression of cancer" *Ups J Med Sci*, in press.
- 4) Koinuma D, Shinozaki M, Nagano Y, Ikushima H, Horiguchi K, Goto K, Chano T, Saitoh M, Imamura T, Miyazono K & Miyazawa K. "RB1CC1 Protein Positively Regulates Transforming Growth Factor-beta Signaling through the Modulation of Arkadia E3 Ubiquitin Ligase Activity" *J Biol Chem* **286**: 32502-32512, 2011.
- 5) Mizutani A, Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Morikawa M, Suzuki HI, Imamura T, Miyazono K & Aburatani H. "Cell type-specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 proteins and hepatocyte nuclear factor 4alpha in HepG2 cells" *J Biol Chem* **286**: 29848-29860, 2011.
- 6) Morikawa M, Koinuma D, Tsutsumi S, Vasilaki E, Kanki Y, Heldin CH, Aburatani H & Miyazono K. "ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif" *Nucleic Acids Res* **39**: 8712-8727, 2011.

竹内賢吾

1. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Lim Choi Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. Epub ahead of print, 2012.
2. Yamamoto M, Takeuchi K, Shimoji M, Maniwa T, Isaka M, Nakagawa K, Ohde Y, Kondo H, Nakajima T. Small non-mucinous

bronchioloalveolar carcinoma with anaplastic lymphoma kinase immunoreactivity: A novel ALK fusion gene? *Cancer Sci.* 2012;103:390-392.

3. Sugawara E, Togashi Y, Kuroda N, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Yuasa T, Yonese J, Kitagawa M, Mano H, Ishikawa Y, Takeuchi K. Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by the intercalated antibody-enhanced polymer method. *Cancer*. 2012.
4. Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M, Nakagawara A. ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity. *Lung Cancer*. 2012;75:66-72.
5. Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Nakajima T, Mano H, Takeuchi K. KLC1-ALK: A novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. *PLoS One*. 2012;7:e31323.
6. Kijima T, Takeuchi K, Tetsumoto S, Shimada K, Takahashi R, Hirata H, Nagatomo I, Hoshino S, Takeda Y, Kida H, Goya S, Tachibana I, Kawase I. Favorable response to crizotinib in three patients with echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase fusion-type oncogene-positive non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2011;102:1602-1604.
7. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK fusion identification. *Clin Cancer Res.* 2011;17:3341-3348.

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 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2007年に新たな融合型チロシンキナーゼ EML4-ALK を肺がんにおいて発見した。同遺伝子陽性肺がんに対する分子標的治療薬として ALK 阻害剤が様々な製薬会社によって開発され、臨床試験が行われている。なかでも1社の crizotinib は既に米国で承認・販売されており、近い将来には我が国においても承認されると期待される。今後 ALK 阻害剤が急速に臨床へ普及すると予想され、EML4-ALK 陽性肺がんを正確かつ簡便に診断する臨床技術の確立が急務と言える。本研究で我々は、EML4 上と KIF5B 上に複数の forward primer をデザインしたマルチプレックス RT-PCR 法を開発し、EML4-ALK と KIF5B-ALK の様々なバリエーションを全て検出可能な診断技術を作成した。本手法を用いて「ALK 肺がん研究会」活動において収集する日本人肺がん検体の前向きスクリーニングを行い、同診断法の有効性を検証する。

#### 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、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。我々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。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)。

*EML4-ALK* は肺がんの全く新しい治療標的であり、現在既に6社を超える製薬会社の ALK 阻害剤が世界で臨床試験に入っている。なかでも最初に第I相臨床試験を開始した ALK 阻害剤 crizotinib については、すでにその第I/II相試験の成果公表されたが、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であった (*NEJM* 363:1693)。またこれを受けて2011年8月には米国において crizotinib が治療薬剤としての承認を受け、既に販売・使用されている。

我が国における crizotinib の承認も近いと考えられ、今後 ALK 阻害剤が急速に臨床応用されると予想される。そのような中であって、ALK 阻害剤の恩恵を受ける ALK 転座を有する肺がんを正確に診断する技術の開発は急務と言える。我々は肺がんにおける第2の融合型 ALK

(KIF5B-ALK) を2009年に報告していることから (*Clin Cancer Res* 15:3143)、本研究計画では *EML4-ALK* と *KIF5B-ALK* の両者について、全てのバリエーションを検出可能なマルチプレックス RT-PCR 法を開発し、前向きに収集した様々な検体による PCR 診断を行った。

#### 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* 遺伝子も同時に検出可能なように *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。そこでこれらのエキソンで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。

実際に収集した検体は851例の症例から得られた916種類の臨床試料であり、これらからそれぞれcDNAを調整し、内部コントロール遺伝子であるRNasePの発現を検討した結果、計808種類の検体（754例）が十分な質のcDNAであることが確認された。これら検体のうち過半数を気管支洗浄液、気管支擦過液などが占め、また喀痰、胸水、心嚢液など様々な種類の試料が解析された。

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ぶ形で最終的に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。また今回の解析により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) Ueno T, Yamashita Y, Soda M, Fukumura K, Ando M, Yamato A, Kawazu M, Choi YL & Mano H. “High-throughput resequencing of target-captured cDNA in cancer cells” *Cancer Sci*, **103**: 131-135, 2012.
- 2) Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Nakajima T, Mano H & Takeuchi K. “KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only” *PLoS ONE*, **7**:e31323, 2012.
- 3) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Choi YL, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H & Ishikawa Y. “RET, ROS1, and ALK fusions in lung cancer” *Nat Med*, in press, 2012.
- 4) Sugawara E, Togashi Y, Kuroda N, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Yuasa T, Yonese J, Kitagawa M, Mano H, Ishikawa Y & Takeuchi K. “Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by the intercalated antibody-enhanced polymer method” *Cancer*, in press, 2012.
- 5) Ng KP, Hillmer AM, Chuah CTH, Juan WC, Ko T-K, Teo ASM, Ariyaratne PN, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee WH, Huang JWJ, Allen Jr. JC, Woo XY, Nagarajan N, Kumar V, Thalamuthu A, Poh WT, Ang AL, Mya HT, How GF, Yang LY, Koh LP, Chowbay B, Chang C-T,

- Nadarajan VS, Chung WJ, Than H, Lim LC, Goh YT, Zhang S, Poh D, Tan P, Seet J-E, Ang M-K, Chau N-M, Ng Q-S, Tan DSW, Soda M, Isobe K, Nothen MM, Wong TY, Shahab A, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung W-K, Tan EH, Yatabe Y, Mano H, Soo RA, Chin TM, Lim W-T, Ruan Y & Ong ST. "A common BCL2L1 deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer" *Nat Med*, in press, 2012.
- 6) Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M & Nakagawara A. "ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity" *Lung Cancer*, **75**: 66-72, 2012.
- 7) Choi YL, Soda M, Ueno T, Hamada T, Haruta H, Yamato A, Fukumura K, Ando M, Kawazu M, Yamashita Y & Mano H. "Oncogenic *MAP2K1* mutations in human epithelial tumors" *Carcinogenesis*, in press, 2012.
- 8) Butler MO, Imataki O, Yamashita Y, Tanaka M, Ansen S, Berezovskaya A, Metzler G, Milstein MI, Mooney MM, Murray AP, Mano H, Nadler LM & Hirano N. "Ex vivo expansion of human CD8 T cells using autologous CD4 T cell help" *PLoS One*, **7**: e30229, 2012.
- 9) Tominaga-Sato S, Tsushima H, Ando K, Itonaga H, Imaizumi Y, Imanishi D, Iwanaga M, Taguchi J, Fukushima T, Yoshida S, Hata T, Moriuchi Y, Kuriyama K, Mano H, Tomonaga M & Miyazaki Y. "Expression of myeloperoxidase and gene mutations in AML patients with normal karyotype: double CEBPA mutations are associated with high percentage of MPO positivity in leukemic blasts" *Int J Hematol*, **94**: 81-89, 2011.
- 10) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Okumura S, Nakagawa K, Mano H & Ishikawa Y. "Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK fusion identification" *Clin Cancer Res*, **17**: 3341-3348, 2011.
- 11) 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*, **96**: 464-467, 2011.
- 12) Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K. "MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation" *Mol Cell*, **44**: 424-436, 2011.
- 13) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez VE, 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*, **96**: 712-719, 2011.
- 14) Matsuyama H, Suzuki HI, Nishimori H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K. "miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma" *Blood*, **118**: 6881-6892, 2011.
- 15) 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*, **52**: 3008-3017, 2011.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



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 がどのような下流分子を活性化して発がんを誘導するかを検討する目的で、様々な細胞内シグナル伝達系のレポータープラスミドを用いて EML4-ALK の作用を検討すると共に、EML4-ALK 発現によって特異的にチロシンリン酸化される細胞内分子をプロテオミクスアプローチによって検討した。

#### 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」の非小細胞肺がんに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。

さらに肺胞上皮特異的に発現する surfactant protein-C (SPC) 遺伝子プロモーターによって EML4-ALK の発現が制御されるコンストラクトを作成し、これを用いてトランスジェニックマウスを作成した。同マウスは生後すぐに両肺に数百個もの肺腺がんを同時多発発症し、EML4-ALK の発がんにおける本質的な役割が確認された (*PNAS* 105:19893)。同マウスに ALK 阻害剤を投与すると速やかにがん細胞が消失することから、ALK 阻害剤は全く新しい肺がんの分子標的治療薬となることが確認さ

れた。

本研究計画において我々は、EML4-ALK がどのような下流分子を活性化して発がんを誘導するかを検討する目的で、様々な細胞内シグナル伝達系のレポータープラスミドを用いて EML4-ALK の作用を検討すると共に、EML4-ALK 発現によって特異的にチロシンリン酸化される細胞内分子をプロテオミクスアプローチによって検討した。

#### B 研究方法

HEK293 細胞に c-fos, c-myc, bcl-xl, NF-kB, STAT 経路のルシフェラーゼレポータープラスミドを導入し、同時に EML4-ALK 発現プラスミドを導入した際のルシフェラーゼ活性を Dual-Luciferase reporter assay (Promega) を用いて測定した。

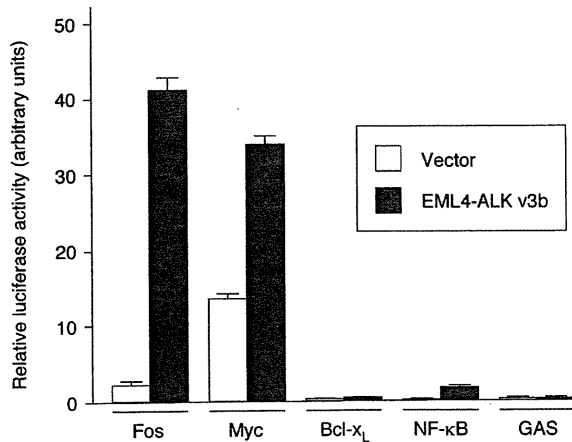
一方 EML4-ALK の基質分子の同定目的で、米国マサチューセッツ工科大学の Forest White 博士との共同研究を行い、細胞内のチロシンリン酸化タンパクを高感度に検出する共同研究を開始した。具体的には、EML4-ALK 陽性細胞株、正常 ALK 陽性細胞株、EML4-ALK/ALK 陰性細胞株の計 3 種類において、細胞内でチロシン残基がリン酸化されているタンパクをスクリーニングし、EML4-ALK がどのような細胞内タンパク質をチロシンリン酸化させているかを明らかにする。

(倫理面への配慮)

該当しない

#### C 研究結果

Fos, Myc, Bcl-xL, NF-kB および STAT 経路の活性をアッセイするレポータープラスミ



ドをHEK293細胞にリポフェクション法によって導入し、EML4-ALKを共発現した場合の活性の変化を測定した。上図に示すようにSTAT経路活性(GAS)はEML4-ALKによって影響を受けなかったが、Fos, Mycは共にEML4-ALKによって明瞭な上昇を見た。同様にNF-κB活性もEML4-ALKによって正に制御されることが確認された。

一方EML4-ALK下流分子の探索をフォスフォプロテオミクス法により行ったところ、興味深いことに正常のALKとEML4-ALKは全く異なった基質をリン酸化することが明らかになった。正常ALKはNPM1-ALKと同様にSTATをリン酸化することが知られているが、EML4-ALKはSTATのリン酸化は極めて低く、以前より知られているSTAT経路以外の基質を利用して細胞増殖を誘導することが明らかになった。

#### D&E. 考察及び結論

ALK融合遺伝子としては、悪性リンパ腫で発見されたNPM1-ALKが有名であるが、同キナーゼはSTAT3/STAT5をリン酸化することで細胞増殖を誘導することが知られている。しかし意外にもEML4-ALKは、主たる経路としてSTATを利用していないことが、レポーターアッセイによっても、プロテオミクスアプローチによっても明らかになった。おそらく融合パートナーの本来の特性に従ってNPM1-ALK/EML4-ALKの細胞内局在は規定されており、その結果異なった融合パートナーの場合は大きく違う経路を利用するのではないかと予想される。

我々の今回のプロテオミクス解析で検出さ

れた新たな基質群は、臨床の場における薬剤耐性機構に対する重要な知見となり、実際のALK阻害剤耐性症例でこれら下流分子の配列異常が存在するか否かを検証する必要がある。

#### 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) Taniguchi H, Kondoh Y, Ebina M, Azuma A, Ogura T, Taguchi Y, Suga M, Takahashi H, Nakata K, Sato A, Sugiyama Y, Kodoh S, Nukiwa T, Pirfenidone Clinical Study Group in Japan. "The clinical significance of 5% change in vital capacity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: extended analysis of the pirfenidone trial" *Respir Res* **12**:93, 2011.
- 3) Bando M, Miyazawa T, Sugiyama Y, Shinohara H, Owada T, Terakado M. "An epidemiological study of the effects of statin use on airflow limitation in patients with chronic obstructive pulmonary disease" *Respirology*, in press.
- 4) Uto T, Bando M, Yamauchi H, Nakayama M., Ohata, M, Mato N, Nakaya T, Yamasawa H, Kawai T, Sugiyama Y. "Primary cardiac angiosarcoma of the right auricle with difficult-to-treat bilateral pleural effusion" *Intern Med* **50**:2371-2374, 2011.

#### 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

「阻害剤耐性変異スクリーニング」に関する研究

分担研究者： 崔 永林 東京大学大学院医学系研究科・特任准教授

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。ALK チロシンキナーゼは EML4 と融合することで恒常的に二量体化・活性化され、強いがん化能を獲得する。既に多くの ALK 阻害剤が開発され臨床試験に入っているが、その一つ crizotinib は 2011 年に米国で承認され、我が国でも近い将来に承認されると期待される。ALK 阻害剤治療の普及に伴い薬剤耐性例が出現する可能性が予想されるが、本研究で我々は次世代シーケンサーを用いた大規模塩基配列解析により、薬剤耐性の直接原因となる遺伝子変異の探索を行う。また既に世界に先駆けて、薬剤耐性の原因となる EML4-ALK 内二次変異を発見することにも成功した。

A 研究目的

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。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。

最初に EML4-ALK 陽性肺がんに対する臨床試験が開始された ALK 阻害剤である crizotinib については、その第 I/II 相試験の成果公表されたが、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であった (*NEJM* 363:1693)。またこれを受けて 2011 年 8 月には米国において crizotinib が治療薬剤としての承認を受け、既に販売・使用されている。

我が国における crizotinib の承認も近いと考えられ、今後 ALK 阻害剤が急速に臨床応用されると予想される。臨床上広く使われているチロシンキナーゼ阻害剤として 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) が知られているが、いずれの場合も一部の症例で薬剤耐性となる。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次世代シーケンサーを用いて EML4-ALK 陽性肺がんの阻害剤耐性メカニズムを解明することを目指す。

B 研究方法

現在日本では 3 種類の ALK 阻害剤の臨床

試験が行われているが、これら試験に参加する EML4-ALK 陽性患者の初回診断時と再発時の検体を系時的に収集し、これら検体の全エクソン配列を次世代シーケンサーで解析する事により、二次変異を探索する。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、細胞株に導入して ALK 阻害剤感受性への影響を検討する。

(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

我々は日本の ALK 陽性患者を救うべく、ボランティアで EML4-ALK を診断する全国規模のネットワーク活動「ALK 肺がん研究会 (ALCAS)」を行ってきた。同活動を通して既に 1000 例近い症例の初回診断時検体を収集しており、また数例においては二次性薬剤耐性を獲得した症例も経験した。これら再発例についても、検体を収集し、ゲノム DNA および cDNA を調整済みである。

その様な再発例 1 例について、未治療時と再発時の各試料から 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 EML4-ALK 内に G4374A と C4493A の 2 種類の変異を発見した。これら

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。またこれら変異を有する EML4-ALK は crizotinib だけでなく、他の ALK 阻害剤に対しても耐性になり、ユニバーサルな ALK 阻害剤耐性メカニズムであると考えられた。

#### D&E. 考察及び結論

広く臨床で用いられているキナーゼ阻害剤のうち、imatinib 治療に耐性となるメカニズムとして BCR-ABL の T315I 変異が知られ、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 L1196M は、タンパクの構造上、上記 ABL(T315I) や EGFR(T790M) と全く同じ場所に位置していた (gate keeper 部位)。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。我々の発見を基に、gate keeper 変異を有する EML4-ALK に対しても有効な ALK 阻害剤が複数開発されており、そのうちの 2 社は既に国内外において第 I 相臨床試験を開始した。こうして、我々の研究成果により、耐性を生じにくい新たな治療薬の開発が促進されたことになる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Choi YL, Soda M, Ueno T, Hamada T, Haruta H, Yamato A, Fukumura K, Ando M, Kawazu M, Yamashita Y & Mano H. “Oncogenic MAP2K1 mutations in human epithelial tumors” *Carcinogenesis*, in press.
- 2) Ueno T, Yamashita Y, Soda M, Fukumura K, Ando M, Yamato A, Kawazu M, Choi YL & Mano H. “High-throughput resequencing of target-captured cDNA in cancer cells” *Cancer Sci* **103**: 131-135, 2012.
- 3) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Choi YL, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H & Ishikawa Y. “RET, ROS1, and ALK fusions in lung cancer” *Nat Med*, in press.
- 4) Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K. “MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation” *Mol Cell* **44**: 424-436, 2011.
- 5) Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez VE, 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*, **96**: 712-719, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

「肺がん細胞の上皮間葉転換と TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの制御メカニズム」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：我々は肺がん細胞の上皮間葉転換の抑制によるがん細胞の運動・浸潤能の制御を目的として、その重要な誘導シグナルである Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )による上皮間葉転換の分子メカニズムについて検討を行った。その結果上皮間葉転換において TGF- $\beta$  シグナルが選択的スプライシングの変化を引き起こすことを見出し、その ESRP を介したメカニズムを明らかにした。また肺がん細胞の TGF- $\beta$  による上皮間葉転換を促進する、TNF- $\alpha$  の協調的役割を見出した。さらに次世代シーケンサーを用いた TGF- $\beta$  ファミリー下流の転写因子の網羅的な結合部位同定を行い、その分布ががん細胞など細胞種によって大きく異なることを見出し、その制御因子の同定を行ったほか、癌抑制因子として知られる分子 RB1CC1 の TGF- $\beta$  シグナル調節機構を明らかにした。

A 研究目的

Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  ファミリーに属するサイトカインは、細胞分化、上皮細胞の増殖抑制、細胞外マトリックス産生など多彩な作用を有する。TGF- $\beta$  はまた、肺がん細胞をはじめとして上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) を誘導することで、細胞の運動・浸潤能を促進することも知られる。従って TGF- $\beta$  シグナルはがん細胞に対して、増殖抑制と EMT の促進という、がんの進展に対して相反する作用を有している。グリオーマをはじめとして、一部の腫瘍において TGF- $\beta$  シグナルを抑制する臨床試験が行われ、その効果が有望視される中で、このようなシグナル作用の二面性は、がんの治療法開発戦略上、解決しなければいけない課題である。

そこで申請者らは TGF- $\beta$  シグナルの下流で EMT 促進作用のみを選択的に制御する方法を見出すことを目的として、肺がん細胞をはじめとして、そのシグナル伝達のメカニズムと制御機構につき詳細に解析した。

B 研究方法

まず TGF- $\beta$  により強く EMT を起こす乳腺上皮細胞 NMuMG を用いて、TGF- $\beta$  刺激による転写産物の発現変化につき、そのバリエーションの相対的発現変化を含めてエクソンアレイを用いて網羅的に検討を行った。その発現変動の全体像から制御因子の予測を行い、合わせてその発現制御機構と機能につき検討を行った。

さらに肺がん細胞株 A549 の TGF- $\beta$  によ

る EMT 誘導作用について、マクロファージ細胞株との共培養を行い、その作用とメカニズムについて解析を行った。

続いて肝がん細胞株 HepG2 をモデルとして、クロマチン免疫沈降法を用いて TGF- $\beta$  シグナル下流の転写因子 Smad2/Smad3 の結合ゲノム部位を ChIP-chip 法を用いて網羅的にを行い、正常角化上皮細胞株 HaCaT における Smad2/Smad3 結合部位との比較を行い、その違いとメカニズムにつき、結合部位のゲノム配列情報やマイクロアレイによる遺伝子発現情報を用いて解析を行った。合わせて TGF- $\beta$  ファミリーの一つである Bone morphogenetic protein (BMP) についても、その下流の転写因子 Smad1/5 の結合部位につき次世代シーケンサーを用いた ChIP-sequencing 法により同定を行い、結合部位の特徴につき解析を行った。

最後ががん抑制候補遺伝子として知られる RB1CC1 の TGF- $\beta$  シグナルへの作用とそのメカニズムについて生化学的・分子生物学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では臨床検体は用いない。

C 研究結果

エクソンアレイによる解析の結果、TGF- $\beta$  刺激による EMT に伴い、FGF 受容体をはじめとして 6 千を超える遺伝子に選択的スプライシングが起きる可能性が示唆された。これらの遺伝子の一部について、選択的スプライシングを誘導するとして近年報告された RNA 結合蛋白 ESRP1/2 の発現につき評価したところ、TGF- $\beta$



はその発現を抑制した。そこで ESRP1/2 の発現制御機構を解析して、Smad2/3 の下流で EMT を誘導する転写因子 ZEB1/2 の発現を介していることを明らかにした。興味深いことに乳がん細胞株パネルでの検討により、ESRP の発現は特定の組織型で抑制され、E-cadherin の発現と相関する傾向が認められた。一方で ZEB1/2 の発現は反対に TGF- $\beta$  に依存せず上昇する傾向が認められた。そして ESRP の強発現により、TGF- $\beta$  による EMT において、E-cadherin の発現抑制が解除されることが明らかとなった (Horiguchi et al, *Oncogene*, in press)。

肺腺がん細胞株 A549 の TGF- $\beta$  による EMT は、マクロファージ細胞株との共培養、培養上清のいずれでも促進された。そこで主たる分泌因子の一つ TNF- $\alpha$  に着目し、その中和抗体を用いたところ、培養上清の EMT 促進効果が抑制された。そこで A549 細胞での TGF- $\beta$  と TNF- $\alpha$  の刺激による影響を検討したところ、TNF- $\alpha$  は TGF- $\beta$  による EMT を増強することが明らかとなり、これはこれまでの報告に一致するものであった。さらにその下流について検討を行い NF $\kappa$ B の選択的阻害剤である DHMEQ が TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  による A549 の EMT を部分的に抑制することが明らかになった (Kawata et al, *J Biochem*, 2012)。

肝がん細胞株 HepG2 において ChIP-chip 法により同定した Smad2/3 結合部位について、分担研究者らが以前に同定した正常角化上皮細胞での結合部位と比較したところ、8 割もの結合部位がそれぞれの細胞に特異的であることが明らかとなった。そこで HepG2 特異的な Smad2/3 結合に関わる分子を同定するため、結合部位に濃縮するモチーフ解析を行った結果、肝臓特異的転写因子 HNF4A の結合配列を見出した。この HNF4A の ChIP-sequencing データを取得して比較した結果、Smad2/3 結合部位の 3 割が HNF4A 結合部位と一致した。発現マイクロアレイの結果と合わせ、この HNF4A が Smad2/3 のリクルートを含むメカニズムによって細胞種特異的な Smad2/3 結合部位と標的遺伝子発現に関わっていることを明らかにした (Mizutani et al, *J Biol Chem*, 2011)。TGF- $\beta$  ファミリーの一つ BMP のがんの病態への関与も多く報告されることから、BMP シグナル下流の Smad1/5 結合部位につき、モデル細胞で検討

を行った結果、同様に細胞種特異的な結合部位が多く存在することが明らかになった (Morikawa et al, *Nucleic Acids Res*, 2011)。

研究分担者が TGF- $\beta$  シグナルを増強するユビキチンリガーゼとして初めて報告した Arkadia 蛋白は、TGF- $\beta$  シグナルを制御する主たる分子の一つとして siRNA スクリーニングによって同定された分子でもある。この Arkadia 結合蛋白として同定した RB1CC1 は乳がんにおけるがん抑制遺伝子候補として知られることから、その TGF- $\beta$  シグナルへの影響につき検討を行った結果、RB1CC1 は Arkadia による TGF- $\beta$  抑制因子であるがん遺伝子 c-Ski のユビキチン化による分解を促進することが明らかとなった (Koinuma et al, *J Biol Chem*, 2011)。

#### D&E. 考察及び結論

本研究により TGF- $\beta$  によるがん細胞の EMT における、ESRP1/2 発現抑制の意義と、その発現とがん組織型との関連が明らかになった。またがん細胞パネルで見いだされた、ZEB1/2 の強発現は EMT を促進してがん細胞の運動・浸潤能に関わる重要な機序であると考えられた。NF $\kappa$ B の選択的阻害剤が TGF- $\beta$  と TNF- $\alpha$  による EMT を部分的に抑制したことは標的としての可能性を示唆するものとして興味深い。

細胞特異的な Smad ファミリー結合部位の違いはその後の他の報告でも裏付けられ、本来がん抑制的に作用する TGF- $\beta$  シグナルが如何に個々のがん種で異常な制御を受け利用されてしまうのか、今後同様のアプローチを含めた解析を行うことで EMT 選択的な制御を含めた治療戦略構築に結びつく可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, Semba K, Inoue A, Inoue S, Fujii H, Yamaguchi A, Miyazawa K, Miyazono K & Saitoh M. "TGF-beta drives epithelial-mesenchymal transition through deltaEF1-mediated downregulation of ESRP" *Oncogene*, in press.

- 2) Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, Watabe T & Miyazono K. “TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by proinflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells” *J Biochem*, **151**: 205-206, 2012.
- 3) Miyazono K, Ehata S & Koinuma D. “Tumor-promoting functions of transforming growth factor-beta in progression of cancer” *Ups J Med Sci*, in press.
- 4) Koinuma D, Shinozaki M, Nagano Y, Ikushima H, Horiguchi K, Goto K, Chano T, Saitoh M, Imamura T, Miyazono K & Miyazawa K. “RB1CC1 Protein Positively Regulates Transforming Growth Factor-beta Signaling through the Modulation of Arkadia E3 Ubiquitin Ligase Activity” *J Biol Chem* **286**: 32502-32512, 2011.
- 5) Mizutani A, Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Morikawa M, Suzuki HI, Imamura T, Miyazono K & Aburatani H. “Cell type-specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 proteins and hepatocyte nuclear factor 4alpha in HepG2 cells” *J Biol Chem* **286**: 29848-29860, 2011.
- 6) Morikawa M, Koinuma D, Tsutsumi S, Vasilaki E, Kanki Y, Heldin CH, Aburatani H & Miyazono K. “ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif” *Nucleic Acids Res* **39**: 8712-8727, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし