

201209001A

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」



平成24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成25(2013)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24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成25 (2013) 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<br>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<br>自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----                    | 8  |
| 2.   | 「EML4-ALK下流シグナルの解析」に関する研究<br>自治医科大学・医学部・呼吸器内科学 杉山幸比古 -----                           | 11 |
| 3.   | 「阻害剤耐性変異スクリーニング」に関する研究<br>東京大学大学院医学系研究科 崔永林 -----                                    | 14 |
| 4.   | 「非小細胞肺癌の HER family シグナルを介した NK 細胞からの<br>免疫逃避機構の解明」に関する研究<br>川崎医科大学呼吸器外科学 中田昌男 ----- | 16 |
| 5.   | 「がん遺伝子陽性肺癌の臨床病理学的解析」に関する研究<br>東京医科大学呼吸器外科・甲状腺外科 池田徳彦 -----                           | 18 |
| 6.   | 「がん細胞浸潤における TGF- $\beta$ ファミリーシグナルの制御メカニズム」<br>に関する研究<br>東京大学大学院医学系研究科 鯉沼代造 -----    | 20 |
| 7.   | 「がん臨床検体における診断法開発」に関する研究<br>がん研究会がん研究所 竹内賢吾 -----                                     | 23 |
| III. | 研究成果の刊行に関する一覧表 -----   | 25 |
| IV.  | 研究成果の刊行物・別冊 -----  | 33 |

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、様々な臨床試料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  |
| 中田昌男  | 川崎医科大学・教授            |
| 池田徳彦  | 東京医科大学・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  | がん研究会がん研究所・主任研究員     |

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

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

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

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

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。

### 4) 肺がん発症に関わる microRNA (miRNA) の同定

EGFR を標的とする miRNA の単離には 96 well plate に 83 種類の oligo の入った miScan(B-Bridge)に HeLa 細胞を培養して、遺伝子を導入後、24 時間で RNA を回収し、Real time PCR 法を用いて EGFR の mRNA の発現の解析を行って、候補となる miRNA を選択した。

### 5) 肺がん細胞の宿主免疫システムからの逃避メカニズム解析

非小細胞肺癌手術患者に対して、麻酔導入後に末梢血を約 10ml 採血し、マグネット式細胞分離装置で NK 細胞を分離し、効果細胞とした。一方、患者手術検体より採取される腫瘍細胞を無治療、EGFR リガンド、あるいは HER3 リガンド刺激下に培養し標的細胞とする。NK 細胞と腫瘍細胞とを共培養し、NK 細胞の細胞傷害活性を  $^{51}\text{Cr}$  放出試験およびフローサイトメトリー法を用いた CD107a アッセイで解析した。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学および東京医科大学、川崎医科大学それぞれ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

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。

本解析の結果 34 検体 (32 症例) が EML4-ALK 陽性である事が確認され、その内訳は variant 1 が 19 例、variant 2 が 1 例、variant 3 が 10 例、および新規バリエーションが各 1 例ずつであった。EML4-ALK 陽性例は全て肺腺がんであり、腺がんの約 6% に陽性であった。平均発症年齢は 48.3 才であり、EML4-ALK 陰性例の 65.5 才に比べて有意に若年発症であった ( $P < 0.001$ )。EML4-ALK は女性に好発し ( $P < 0.001$ )、非喫煙者あるいは軽度喫煙者に多いことも示された ( $P < 0.001$ )。また陽性例 14

例が海外の ALK 阻害剤臨床試験に参加したところ奏功率は 100%であった。免疫組織染色法と RT-PCR 法の両方で解析可能であった検体は 15 例であり、そのうち 2 例では免疫組織染色では陰性であった。少なくともその 1 例はゲノムの融合点が確認できたため、真の EML4-ALK 陽性症例であったと考えられる。

## 2) 下流シグナルの解析

EML4-ALK によってチロシンリン酸化される細胞内基質を同定する目的で、正常 ALK、EML4-ALK variant 1、EML4-ALK variant 3 および EML4-ALK variant 1 の酵素活性欠失変異体 (EML4-ALK<sup>KM</sup>) を作成し、これを安定に発現するマウス 3T3 細胞を樹立した。これら細胞を可溶化した後、鉄イオンを用いたアフィニティカラムで細胞内タンパクを純化し、さらにリン酸化チロシンを特異的に認識するマウスモノクローナル抗体によるアフィニティカラムを用いて細胞内チロシンリン酸化タンパクを純化した。これらを質量分析装置で解析することにより、各細胞においてチロシンリン酸化されるタンパク群を高感度に同定した。

その結果、EML4-ALK variant 1, variant 3 共に EML1、EML4 の両者を強くリン酸化することが示された。したがって細胞内で EML4-ALK は EML4 および EML1 を含む複体内に存在しており、これらを強くリン酸化していると予想される。さらに細胞内シグナル伝達分子に対しても正常 ALK、EML4-ALK 共にリン酸化する場合と、EML4-ALK 選択的にリン酸化する場合が存在する事が明らかになった。これら分子が、EML4-ALK のがん化シグナルのメディエーターになっていると考えられる。なお NPM1-ALK が強くリン酸化する事が知られる STAT3/5 は EML4-ALK はリン酸化しないことも示された。

## 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 例から既に、C1156Y と L1196M という 2 種類の二次変異を発見し、両変異共にクリゾチニブ耐性原因である事を発見した。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。

さらに ALCAS 活動で収集した「治療前と再発後検体ペア」についても既に全エクソン配列解析を終了し、複数の「再発期特異的ゲノム変異」を発見している。これら異常についても更なる分子生物学的解析を行う予定である。

## 4) 肺がん細胞の宿主免疫からの逃避システム

細胞株を用いた検討では、EGFR 高発現である A549 細胞株において、EGFR リガンドによる EGFR シグナル活性化で、MICA/B 発現レベルが低下し、NK 細胞傷害活性も低下した。一方、HER3 高発現である PC9 では HER3 リガンド刺激により MICA/B 発現が上昇し、NK 細胞傷害活性も増強した。

## 5) 肺がん発症に関わる microRNA (miRNA) の同定

まず 83 種類の候補となる miRNA を 7 つに絞り、さらに同様の実験を行った所、その候補 miRNA の中で最も EGFR の発現抑制効果の高かったものは miR-542-5p であった。近年 miR-7 が EGFR の mRNA の発現を抑制し、細胞周期を停止させ細胞死を導くことが報告されているが、両者の比較の結果 miR-542-5p は miR-7 と同様な効果が得られた。また、細胞増殖に関しては miR-7 よりも高い増殖抑制効果を示した。また、ヒト肺癌組織に対して EGFR の免疫染色及び miRNA に対する in situ hybridization を施行したところそれぞれの発現は相反関係にあった。以上の結果から miR-542-5p により EGFR の発現抑制による腫瘍増殖が抑制されることが示唆された。

## 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大規模な前向きコホートで検証され、免疫組織染色で陰性例においても真の陽性例を検出できた。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。以上よりパラフィン包埋標本が存在しない症例においてはRT-PCR法が優れた診断法であると言える。

また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、プロテオミクスアプローチによって明らかになった。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

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

間野博行

- 1) Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T, Yamashita Y, Katada T, Choi YL & Mano H. “Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers” *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi: 10.1073/pnas.1216141110, 2013
- 2) Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Nakamura T, Matsumoto K, Soda M, Mano H, Uenaka T & Yano S. “Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor resistance in

EML4-ALK lung cancer cells” *Clin Cancer Res*, **18**: 3592-3602, 2012

- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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*, **18**: 378-381, 2012
- 6) 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*, **118**: 4427-4436, 2012
- 7) Soda M, Isobe K, Inoue A, Maemondo M, Oizumi S, Fujita Y, Gemma A, Yamashita Y, Ueno T, Takeuchi K, Choi YL, Miyazawa H, Tanaka T, Hagiwara K & Mano H. “A prospective PCR-based screening for the *EML4-ALK* oncogene in non-small cell lung cancer” *Clin Cancer Res*, **18**: 5682-5689, 2012
- 8) Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, Juan WC, Ko TK, Teo AS, Ariyaratne PN, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee WH, Huang JW, Allen JC, Jr., Woo XY, Nagarajan N, Kumar V, Thalamuthu A, Poh WT, Ang AL, Mya HT, How GF, Yang LY, Koh LP, Chowbay B, Chang CT, Nadarajan VS, Chng WJ, Than H, Lim LC, Goh YT, Zhang S, Poh D, Tan P, Seet JE, Ang MK, Chau NM, Ng QS, Tan DS, Soda M, Isobe K, Nothen MM, Wong TY, Shahab A, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung WK, Tan EH, Yatabe Y, Mano H, Soo RA, Chin TM, Lim WT,

Ruan Y & Ong ST. "A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer" *Nat Med*, **18**: 521-528, 2012

- 9) Mano H. "ALKoma: a cancer subtype with a shared target" *Cancer Discov*, **2**: 495-502, 2012
- 10) 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
- 11) 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*, **33**: 956-961, 2012
- 12) 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.

杉山幸比古

- 1) Bando M, Miyazawa T, Shinohara H, Owada T, Terakado M & Sugiyama Y. "An epidemiological study of the effects of statin use on airflow limitation in patients with chronic obstructive pulmonary disease" *Respirology* **17**: 493-498, 2012.
- 2) Mato N, Bando M, Kusano A, Hirano T, Nakayama M, Uto T, Nakaya T, Yamasawa H & Sugiyama Y. "Clinical Significance of Interleukin 33 (IL-33) in Patients with Eosinophilic Pneumonia" *Allergol Int* 2012.
- 3) Mizushina Y, Bando M, Hosono T, Mato N, Nakaya T, Yamasawa H, Hironaka M, Tanaka A & Sugiyama Y. "A rare case of asymptomatic diffuse pulmonary ossification detected during a routine health examination" *Intern Med* **51**: 2923-2927, 2012.
- 4) Nakano T, Endo S, Endo T, Hasegawa T, Nakayama M, Sugiyama Y & Hironaka M. "Multimodal treatment for multistation

mediastinal lymph node adenocarcinoma: a case report" *Ann Thorac Cardiovasc Surg* **18**: 136-139, 2012.

- 5) Nakasone E, Mato N, Nakayama M, Bando M & Sugiyama Y. "A case of pulmonary tuberculosis with false negative QuantiFERON TB-2G Test" *Kekkaku* **87**: 9-13, 2012.
- 6) Nakayama M, Nawa T, Chonan T, Endo K, Morikawa S, Bando M, Wada Y, Shioya T, Sugiyama Y & Fukai S. "Prevalence of pulmonary arteriovenous malformations as estimated by low-dose thoracic CT screening" *Intern Med* **51**: 1677-1681, 2012.
- 7) Nakayama M, Sugiyama Y, Yamasawa H, Soda M, Mato N, Hosono T & Bando M. "Effect of hochuekkito on alveolar macrophage inflammatory responses in hyperglycemic mice" *Inflammation* **35**: 1294-1301, 2012.
- 8) Watadani T, Sakai F, Johkoh T, Noma S, Akira M, Fujimoto K, Bankier AA, Lee KS, Muller NL, Song JW, Park JS, Lynch DA, Hansell DM, Remy-Jardin M, Franquet T & Sugiyama Y. "Interobserver Variability in the CT Assessment of Honeycombing in the Lungs" *Radiology* 2012.
- 9) Yamasawa H, Nakayama M, Bando M & Sugiyama Y. "Impaired inflammatory responses to multiple toll-like receptor ligands in alveolar macrophages of streptozotocin-induced diabetic mice" *Inflamm Res* **61**: 417-426, 2012.
- 10) Matsubara D, Kishaba Y, Ishikawa S, Sakatani T, Oguni S, Tamura T, Hoshino H, Sugiyama Y, Endo S, Murakami Y, Aburatani H, Fukayama M & Niki T. "Lung cancer with loss of BRG1/BRM, shows epithelial mesenchymal transition phenotype and distinct histologic and genetic features" *Cancer Sci* **104**: 266-273, 2013.

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* **33**: 956-961, 2012.



- 2) Soda M, Isobe K, Inoue A, Maemondo M, Oizumi S, Fujita Y, Gemma A, Yamashita Y, Ueno T, Takeuchi K, Choi YL, Miyazawa H, Tanaka T, Hagiwara K & Mano H. “A prospective PCR-based screening for the *EML4-ALK* oncogene in non-small cell lung cancer” *Clin Cancer Res* **18**: 5682-5689, 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* **18**: 378-381, 2012.
- 4) 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.
- 5) Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T, Yamashita Y, Katada T, Choi YL & Mano H. “Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers” *Proc Natl Acad Sci U S A* doi: 10.1073/pnas.1216141110 2013.

中田昌男

- 1) Shimizu K, Hiram Y, Saisho S, Yukawa T, Maeda A, Yasuda K, Nakata M. “Membrane-bound estrogen receptor- $\alpha$  expression and epidermal growth factor receptor mutation are associated with a poor prognosis in lung adenocarcinoma patients” *World J Surg Oncol*, **10**: 141, 2012.
- 2) Shimizu K, Hiram Y, Okita R, Saisho S, Yukawa T, Maeda A, Yasuda K, Nakata M. “Characteristics of Non-Small Cell Lung Cancer Located in the Right Middle Lobe According to a Retrospective Study of Recurrence and Prognosis” *Open J Thorac Surg*, **2**: 52-57, 2012.
- 3) Saisho S, Yasuda K, Maeda A, Yukawa T, Okita R, Hiram Y, Shimizu K, Nakata M. “Current status of Radiologic Diagnosis for Mediastinal Lymph Node Metastases of Non-Small-Cell

- Lung Cancer: Retrospective Study of pN2 Cases” *Open J Thorac Surg*, **2**: 126-132, 2012.
- 4) Sawada S, Suehisa H, Yamashita M, Nakata M, Okumura N, Okabe K, Nakamura H, Tada H, Toyooka S, Date H. “Current status of postoperative follow-up for lung cancer in Japan: questionnaire survey by the Setouchi Lung Cancer Study Group -A0901” *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, **60**: 104-111, 2012.
- 5) Tanimoto D, Ito K, Tamada T, Higaki A, Kanki A, Sato T, Noda Y, Higashi H, Nakata M. “Serial 3-dimensional volumetric computed tomography evaluation of lung cancer growth rate in patients with chronic obstructive pulmonary disease findings” *J Comput Assist Tomogr*, **36**: 181-186, 2012.
- 6) Saisho S, Yasuda K, Maeda A, Yukawa T, Okita R, Hiram Y, Shimizu K, Nakata M. “Post-recurrence survival of patients with non-small-cell lung cancer after curative resection with or without induction/adjuvant chemotherapy” *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, **16**: 166-172, 2013.
- 7) Maeda A, Nakata M, Yasuda K, Yukawa T, Saisho S, Okita R, Hiram Y, Shimizu K. “Influence of Vascular Endothelial Growth Factor single nucleotide polymorphisms on non-small cell lung cancer tumor angiogenesis” *Oncol Rep*, **29**: 39-44, 2013.
- 8) Shimizu K, Yukawa T, Hiram Y, Okita R, Saisho S, Maeda A, Yasuda K, Nakata M. “Heterogeneity of the EGFR Mutation Status between the Primary Tumor and Metastatic Lymph Node and the Sensitivity to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor in Non-Small Cell Lung Cancer” *Targ Oncol*, 2013, in press.

池田徳彦

- 1) Kajiwara N, Kakihana M, Usuda J, Ohira T, Kawate N, Ikeda N. “Extended indications of robotic surgery for posterior mediastinal tumors” *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals*, **20**: 308-313, 2012
- 2) Kudo Y, Saji H, Shimada Y, Nomura M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. “Do tumors located in the left lower lobe have worse”

*European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*,  
**42**: 414-419, 2012

- 3) Yamaguchi G, Takanashi M, Tanaka M, Fujita K, Ohira T, Kuroda M, Ikeda N. "Isolation of miRNAs that target EGFR mRNA in human lung cancer" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **420**: 411-416, 2012
- 4) Shimada Y, Saji H, Yoshida K, Kakihana M, Honda H, Nomura M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. "Pathological Vascular Invasion and Tumor Differentiation Predict Cancer Recurrence in Stage IA Non-Small-Cell Lung Cancer After Complete Surgical Resection" *J Thorac Oncol*, **7**: 1263-1270, 2012
- 5) Kudo Y, Saji H, Shimada Y, Nomura M, Matsubayashi J, Nagao T, Kakihana M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. "Impact of visceral pleural invasion on the survival of patients with non-small cell lung cancer" *Lung Cancer*, **78**: 153-160, 2012
- 6) Nishimura T, Kato H, Ikeda N, Kihara M, Nomura M, Kato Y, Marko-Varga G. "Cancer Phenotype Diagnosis and Drug Efficacy within Japanese Health Care" *Int J Proteomics*, **2012**: 921901, 2012
- 7) Shimada Y, Saji H, Kakihana M, Honda H, Nomura M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. "Retrospective Analysis of Nodal Spread Patterns According to Tumor Location in Pathological N2 Non-small Cell Lung Cancer" *World J Surg*, **36**: 2865-2871, 2012
- 8) Shimada Y, Saji H, Yoshida K, Kakihana M, Honda H, Nomura M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. "Prognostic factors and the significance of treatment after recurrence in completely resected stage I non-small cell lung cancer" *CHEST*, in press.

#### 鯉沼代造

- 1) Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K & Heldin CH. "Genome-wide mechanisms of Smad binding" *Oncogene*, in press.
- 2) Sundqvist A, Zieba A, Vasilaki E, Herrera Hidalgo C, Söderberg O, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH, Landegren U, Ten Dijke P & van Dam H. "Specific interactions

between Smad proteins and AP-1 components determine TGF- $\beta$ -induced breast cancer cell invasion" *Oncogene*, in press.

#### 竹内賢吾

- 1) Takeuchi K, Sakata S, Asaka R, Tsuyama N, Dobashi A, Noguchi M. A low-grade B-cell lymphoma with prolymphocytic /paraimmunoblastic proliferation and IRF4 rearrangement. *Haematologica*. [Epub ahead of print]

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：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、我が国においても2012年5月から承認・販売されている。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、RT-PCR 法による EML4-ALK 肺がんの診断が精度良く行えることを示した。また EML4-ALK 陽性症例は全て肺腺がんであり、有意に若年発症、女性に好発することが示された。

#### 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。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)。

*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ールを開発した。

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。

本解析の結果34検体（32症例）がEML4-ALK陽性である事が確認され、その内訳はvariant 1が19例、variant 2が1例、variant 3が10例、および新規バリエーションが各1例ずつであった。EML4-ALK陽性例は全て肺腺がんであり、腺がんの約6%に陽性であった。平均発症年齢は48.3才であり、EML4-ALK陰性例の65.5才に比べて有意に若年発症であった（ $P < 0.001$ ）。EML4-ALKは女性に好発し（ $P < 0.001$ ）、非喫煙者あるいは軽度喫煙者に多いことも示された（ $P < 0.001$ ）。また陽性例14例が海外のALK阻害剤臨床試験に参加したところ奏効率は100%であった。免疫組織染色法とRT-PCR法の両方で解析可能であった検体は15例であり、そのうち

2例では免疫組織染色では陰性であった。少なくともその1例はゲノムの融合点が確認できたため、真のEML4-ALK陽性症例であったと考えられる。

#### 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大規模な前向きコホートで検証され、免疫組織染色で陰性例においても真の陽性例を検出できた。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。以上よりパラフィン包埋標本が存在しない症例においてはRT-PCR法が優れた診断法であると言える。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T, Yamashita Y, Katada T, Choi YL & Mano H. “Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers” *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi: 10.1073/pnas.1216141110, 2013
- 2) Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Nakamura T, Matsumoto K, Soda M, Mano H, Uenaka T & Yano S. “Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor resistance in EML4-ALK lung cancer cells” *Clin Cancer Res*, **18**: 3592-3602, 2012
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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*, **18**: 378-381, 2012
- 6) 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*, **118**: 4427-4436, 2012
- 7) Soda M, Isobe K, Inoue A, Maemondo M, Oizumi S, Fujita Y, Gemma A, Yamashita Y, Ueno T, Takeuchi K, Choi YL, Miyazawa H, Tanaka T, Hagiwara K & Mano H. “A prospective PCR-based screening for the *EML4-ALK* oncogene in non-small cell lung cancer” *Clin Cancer Res*, **18**: 5682-5689, 2012
- 8) Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, Juan WC, Ko TK, Teo AS, Ariyaratne PN, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee WH, Huang JW, Allen JC, Jr., Woo XY, Nagarajan N, Kumar V, Thalamuthu A, Poh WT, Ang AL, Mya HT, How GF, Yang LY, Koh LP, Chowbay B, Chang CT, Nadarajan VS, Chng WJ, Than H, Lim LC, Goh YT, Zhang S, Poh D, Tan P, Seet JE, Ang MK, Chau NM, Ng QS, Tan DS, Soda M, Isobe K, Nothen MM, Wong TY, Shahab A, Ruan X, Cacheux-Rataboul V, Sung WK, Tan EH, Yatabe Y, Mano H, Soo RA, Chin TM, Lim WT, Ruan Y & Ong ST. “A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer” *Nat Med*, **18**: 521-528, 2012
- 9) Mano H. “ALKoma: a cancer subtype with a shared target” *Cancer Discov*, **2**: 495-502, 2012
- 10) 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
- 11) 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*, **33**: 956-961, 2012
- 12) 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
- 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、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、EML4-ALK 特異的にリン酸化される基質の同定に成功した。

#### 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。

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、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

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

EML4-ALK によってチロシンリン酸化される細胞内基質を同定する目的で、正常 ALK、EML4-ALK variant 1、EML4-ALK variant 3 および EML4-ALK variant 1 の酵素活性欠失変異体 (EML4-ALK<sup>KM</sup>) を作成し、これを安定に発現するマウス 3T3 細胞を樹立した。これら細胞を可溶化した後、鉄イオンを用いたアフィニティカラムで細胞内タンパクを純化し、さらにリン酸化チロシンを特異的に認識するマウスモノクローナル抗体によるアフィニティカラムを用いて細胞内チロシンリン酸化タンパクを純化した。これらを質量分析装置で解析することによ

り、各細胞においてチロシンリン酸化されるタンパク群を高感度で同定した。

その結果、EML4-ALK variant 1, variant 3 共に EML1、EML4 の両者を強くリン酸化することが示された。したがって細胞内で EML4-ALK は EML4 および EML1 を含む複合体内に存在しており、これらを強くリン酸化していると予想される。さらに細胞内シグナル伝達分子に対しても正常 ALK、EML4-ALK 共にリン酸化する場合と、EML4-ALK 選択的にリン酸化する場合が存在する事が明らかになった。これら分子が、EML4-ALK のがん化シグナルのメディエーターになっていると考えられる。なお NPM1-ALK が強くリン酸化する事が知られる STAT3/5 は EML4-ALK はリン酸化しないことも示された。

#### 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、プロテオミクスアプローチによって明らかになった。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) Bando M, Miyazawa T, Shinohara H, Owada T, Terakado M & Sugiyama Y. “An epidemiological study of the effects of statin use on airflow limitation in patients with

chronic obstructive pulmonary disease” *Respirology* **17**: 493-498, 2012.

- 2) Mato N, Bando M, Kusano A, Hirano T, Nakayama M, Uto T, Nakaya T, Yamasawa H & Sugiyama Y. “Clinical Significance of Interleukin 33 (IL-33) in Patients with Eosinophilic Pneumonia” *Allergol Int* 2012.
- 3) Mizushima Y, Bando M, Hosono T, Mato N, Nakaya T, Yamasawa H, Hironaka M, Tanaka A & Sugiyama Y. “A rare case of asymptomatic diffuse pulmonary ossification detected during a routine health examination” *Intern Med* **51**: 2923-2927, 2012.
- 4) Nakano T, Endo S, Endo T, Hasegawa T, Nakayama M, Sugiyama Y & Hironaka M. “Multimodal treatment for multistation mediastinal lymph node adenocarcinoma: a case report” *Ann Thorac Cardiovasc Surg* **18**: 136-139, 2012.
- 5) Nakasone E, Mato N, Nakayama M, Bando M & Sugiyama Y. “A case of pulmonary tuberculosis with false negative QuantiFERON TB-2G Test” *Kekkaku* **87**: 9-13, 2012.
- 6) Nakayama M, Nawa T, Chonan T, Endo K, Morikawa S, Bando M, Wada Y, Shioya T, Sugiyama Y & Fukai S. “Prevalence of pulmonary arteriovenous malformations as estimated by low-dose thoracic CT screening” *Intern Med* **51**: 1677-1681, 2012.
- 7) Nakayama M, Sugiyama Y, Yamasawa H, Soda M, Mato N, Hosono T & Bando M. “Effect of hochuekkito on alveolar macrophage inflammatory responses in hyperglycemic mice” *Inflammation* **35**: 1294-1301, 2012.
- 8) Watadani T, Sakai F, Johkoh T, Noma S, Akira M, Fujimoto K, Bankier AA, Lee KS, Muller NL, Song JW, Park JS, Lynch DA, Hansell DM, Remy-Jardin M, Franquet T & Sugiyama Y. “Interobserver Variability in the CT Assessment of Honeycombing in the Lungs” *Radiology* 2012.
- 9) Yamasawa H, Nakayama M, Bando M & Sugiyama Y. “Impaired inflammatory responses to multiple toll-like receptor ligands in alveolar macrophages of

streptozotocin-induced diabetic mice” *Inflamm Res* **61**: 417-426, 2012.

- 10) Matsubara D, Kishaba Y, Ishikawa S, Sakatani T, Oguni S, Tamura T, Hoshino H, Sugiyama Y, Endo S, Murakami Y, Aburatani H, Fukayama M & Niki T. “Lung cancer with loss of BRG1/BRM, shows epithelial mesenchymal transition phenotype and distinct histologic and genetic features” *Cancer Sci* **104**: 266-273, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



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 2012 年 3 月に承認され、同年 5 月より販売・使用が開始された。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、我が国でも 2012 年 3 月に承認され、5 月には薬価収載されて販売が始まった。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 例から既に、C1156Y と L1196M という 2 種類の二次変異を発見し、両変異共にクリゾチニブ耐性原因である事を発見した。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。

さらに ALCAS 活動で収集した「治療前と再発後検体ペア」についても既に全エクソン配列解析を終了し、複数の「再発期特異的ゲノム変異」を発見している。これら異常についても

更なる分子生物学的解析を行う予定である。

#### D&E. 考察及び結論

我々が発見したALK阻害剤耐性変異

L1196Mは、タンパクの構造上、BCR-ABLのT315およびEGFRのT790と全く同じ位置に存在しており、gatekeeper部位と呼ばれる。興味深いことにBCR-ABLおよびEGFR共に、gatekeeper部位が薬剤耐性変異の好発部位であることから、キナーゼ種を超えてgatekeeper変異が薬剤耐性獲得に利用される事が明らかになった。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。

またALK阻害剤治療前と耐性獲得後のペア検体について既に全エクソン配列を取得しており、今後はこれら症例で見つかる2次変異の解析に重点をおく予定である。

#### 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* **33**: 956-961, 2012.
- 2) Soda M, Isobe K, Inoue A, Maemondo M, Oizumi S, Fujita Y, Gemma A, Yamashita Y, Ueno T, Takeuchi K, Choi YL, Miyazawa H, Tanaka T, Hagiwara K & Mano H. “A prospective PCR-based screening for the *EML4-ALK* oncogene in non-small cell lung cancer” *Clin Cancer Res* **18**: 5682-5689, 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* **18**: 378-381, 2012.

- 4) 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.
- 5) Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T, Yamashita Y, Katada T, Choi YL & Mano H. “Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers” *Proc Natl Acad Sci U S A* doi: 10.1073/pnas.1216141110 2013.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

「非小細胞肺癌の HER family シグナルを介した NK 細胞からの免疫逃避機構の解明」に関する研究

分担研究者： 中田 昌男 川崎医科大学 教授

研究要旨：HER family シグナルが腫瘍細胞の宿主免疫からの逃避機構に与える影響は未解明な点が多い。2012年に乳癌細胞において、HER2-HER3 シグナルが NK 細胞からの免疫逃避に、NK 細胞活性化受容体 NKG2D のリガンドである MICA/B の発現調整を介して、関与することが報告されている。本研究では、非小細胞肺癌の細胞株ならびに臨床検体を用いて、HER family シグナルが腫瘍細胞上の MICA/B 発現に及ぼす影響、ならびに MICA/B 発現制御を介した NK 細胞からの免疫逃避への影響、を解析する。肺癌における HER family シグナルを介した免疫逃避機構の解明は、HER family シグナル標的療法の未知の耐性機序の発見や癌免疫療法における新たなアプローチの開発に役立つと考える。

A 研究目的

HER レセプター (EGFR、HER2、HER3、HER4) は固形癌に高頻度に発現し、腫瘍細胞の生存および増殖に重要な役割をもつ (Nature reviews 9: 463)。非小細胞肺癌においては、特に EGFR シグナルがその進展に関与しており。EGFR 標的薬剤は肺癌の予後の改善に寄与しているが、従来の化学療法同様、癌細胞は薬剤耐性を獲得する (Lancet Oncol 11: 121)。

ところで、HER レセプターが腫瘍細胞の宿主免疫からの逃避機構に与える影響は未解明な点が多い。EGFR シグナルは MHC クラス I 分子の発現を減弱させ、細胞傷害性 T 細胞による認識を減弱させることがこれまでに報告されているが (Clin Cancer Res 17: 4400)、HER レセプターと NK 細胞による自然免疫からの逃避との関連は、これまでに乳癌細胞株において報告された 1 報のみであり (J Immunol 188: 2136)、非小細胞肺癌における検討は皆無である。

本研究では、非小細胞肺癌の細胞株ならびに臨床検体由来腫瘍細胞において HER レセプター、NK 細胞による腫瘍細胞認識に重要な NKG2D リガンド MICA/B の発現をフローサイトメトリー法で解析する。さらに細胞株ならびに手術標本由来の腫瘍細胞を用いて、HER レセプター刺激下の MICA/B 発現の変化、ならびに NK 細胞による細胞傷害活性に与える影響を解析する。

非小細胞肺癌における HER レセプターを介した免疫逃避機構の解明は、HER シグナル標的療法の未知の耐性機序の発見や癌免疫療法に

おける新たなアプローチ方法の開発に役立つと考える。

B 研究方法

非小細胞肺癌細胞株を用いた検討では、腫瘍細胞株 (A549, PC9) に EGFR リガンド、HER3 リガンド刺激を加えたうえで、腫瘍細胞に発現する MICA/B 発現の変化をフローサイトメトリー法で解析する。

臨床検体由来腫瘍細胞を用いた検討では、非小細胞肺癌切除標本より腫瘍細胞を採取し、EGFR リガンド、HER3 リガンド、それぞれの刺激を加えた上、腫瘍細胞に発現する MICA/B をフローサイトメトリー法で解析する。

NK 細胞傷害活性の解析：非小細胞肺癌手術患者に対して、麻酔導入後に末梢血を約 10ml 採血し、マグネット式細胞分離装置で NK 細胞を分離し、効果細胞とする。一方、患者手術検体より採取される腫瘍細胞を無治療、EGFR リガンド、あるいは HER3 リガンド刺激下に培養し標的細胞とする。NK 細胞と腫瘍細胞とを共培養し、NK 細胞細胞傷害活性を  $^{51}\text{Cr}$  放出試験およびフローサイトメトリー法を用いた CD107a アッセイで解析する。

(倫理面への配慮)

臨床検体 (肺組織、末梢血) の使用については川崎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

細胞株を用いた検討では、EGFR 高発現で

あるA549細胞株において、EGFRリガンドによるEGFRシグナル活性化で、MICA/B発現レベルが低下し、NK細胞傷害活性も低下した。一方、HER3高発現であるPC9ではHER3リガンド刺激によりMICA/B発現が上昇し、NK細胞傷害活性も増強した。

手術検体を用いた検討では、まず、臨床検体から5mm角の腫瘍片を採取し、細かく刻んだうえ、70 $\mu$ Mメッシュに通し、単細胞化した。腫瘍細胞とそれ以外の細胞（血液由来細胞など）の分別には、上皮由来腫瘍細胞に高頻度に発現するEpCAMの発現を指標とし、フローサイトメトリー法でEpCAM陽性腫瘍細胞中のHERレセプター、MICA/B解析を行ない、本方法で評価可能なことを確認した。現在、症例集積ならびに臨床検体由来細胞のNK細胞傷害活性解析への応用について、最適なプロトコルを模索している。

#### D&E. 考察及び結論

我々の解析により、HER familyシグナル活性化は、MHC class IのみならずMICA/Bの発現をも制御し、NK細胞による免疫監視機構からの逃避に関与することが示唆された。さらに臨床検体を用いたHERレセプター、MICA/B発現解析と機能解析を進めることで、HERシグナルを介した免疫逃避機構を解明し、再発・進行非小細胞肺癌に対する分子標的薬の耐性克服や免疫療法の開発への応用を目指す。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shimizu K, Hirami Y, Saisho S, Yukawa T, Maeda A, Yasuda K, Nakata M. “Membrane-bound estrogen receptor- $\alpha$  expression and epidermal growth factor receptor mutation are associated with a poor prognosis in lung adenocarcinoma patients” *World J Surg Oncol*, **10**: 141, 2012.
- 2) Shimizu K, Hirami Y, Okita R, Saisho S, Yukawa T, Maeda A, Yasuda K, Nakata M. “Characteristics of Non-Small Cell Lung Cancer Located in the Right Middle Lobe According to a

Retrospective Study of Recurrence and Prognosis” *Open J Thorac Surg*, **2**: 52-57, 2012.

- 3) Saisho S, Yasuda K, Maeda A, Yukawa T, Okita R, Hirami Y, Shimizu K, Nakata M. “Current status of Radiologic Diagnosis for Mediastinal Lymph Node Metastases of Non-Small-Cell Lung Cancer: Retrospective Study of pN2 Cases” *Open J Thorac Surg*, **2**: 126-132, 2012.
- 4) Sawada S, Suehisa H, Yamashita M, Nakata M, Okumura N, Okabe K, Nakamura H, Tada H, Toyooka S, Date H. “Current status of postoperative follow-up for lung cancer in Japan: questionnaire survey by the Setouchi Lung Cancer Study Group -A0901” *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, **60**: 104-111, 2012.
- 5) Tanimoto D, Ito K, Tamada T, Higaki A, Kanki A, Sato T, Noda Y, Higashi H, Nakata M. “Serial 3-dimensional volumetric computed tomography evaluation of lung cancer growth rate in patients with chronic obstructive pulmonary disease findings” *J Comput Assist Tomogr*, **36**: 181-186, 2012.
- 6) Saisho S, Yasuda K, Maeda A, Yukawa T, Okita R, Hirami Y, Shimizu K, Nakata M. “Post-recurrence survival of patients with non-small-cell lung cancer after curative resection with or without induction/adjuvant chemotherapy” *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, **16**: 166-172, 2013.
- 7) Maeda A, Nakata M, Yasuda K, Yukawa T, Saisho S, Okita R, Hirami Y, Shimizu K. “Influence of Vascular Endothelial Growth Factor single nucleotide polymorphisms on non-small cell lung cancer tumor angiogenesis” *Oncol Rep*, **29**: 39-44, 2013.
- 8) Shimizu K, Yukawa T, Hirami Y, Okita R, Saisho S, Maeda A, Yasuda K, Nakata M. “Heterogeneity of the EGFR Mutation Status between the Primary Tumor and Metastatic Lymph Node and the Sensitivity to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor in Non-Small Cell Lung Cancer” *Targ Oncol*, 2013, in press.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし