

201307013A

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25年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成26(2014)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 東京大学・大学院医学系研究科・細胞情報学分野 間野博行 …… | 1 |
| II. | 分担研究報告 | |
| 1. | 「EML4-ALK 下流分子および crizotinib 耐性機構の探索」に関する研究 東京大学・大学院医学系研究科・細胞情報学分野 間野博行 …… | 7 |
| 2. | 「肺腺癌の分化形質と生物学的特性」に関する研究 自治医科大学・医学部・病理学講座 仁木利郎 …… | 10 |
| 3. | 「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 川崎医科大学・医学部・呼吸器外科学 中田昌男 …… | 13 |
| 4. | 「肺腺癌におけるがん幹細胞マーカーの発現と臨床病理学的解析」に関する研究 東京医科大学・呼吸器外科・甲状腺外科 池田徳彦 …… | 15 |
| 5. | 「肺がん細胞における TGF- β 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 …… | 18 |
| 6. | 「臨床検体における診断法開発」に関する研究 がん研究会がん研究所 竹内賢吾 …… | 20 |
| 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 …… | 31 |

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 東京大学大学院医学系研究科 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、その診断法の確立と耐性機構の解明は重要なテーマである。我々は免疫染色法とマルチプレックス RT-PCR 法を開発し、それを用いて ALK 阻害剤の臨床試験を行った。その結果 ALK 阻害剤 (alectinib) 単剤治療による奏効率は93.5%におよび、我々の診断法の有効性が証明された。次に我々は阻害剤耐性となった症例の検体の全エクソン配列を解析し、耐性期特異的に出現したアミノ酸置換を検出した。そのうち1変異は2症例で共通に出現し、また1変異は1症例で検出された。現在その機能解析を進めている。また EML4-ALK の下流分子を探索し、複数の分子を同定した。そのうち1つは shRNA によるノックダウンで細胞死が誘導され、生存に必須であることがわかった。このように研究は順調に進捗している。

分担研究者

| | |
|------|---------------------|
| 間野博行 | 東京大学・大学院医学系研究科・教授 |
| 仁木利郎 | 自治医科大学・医学部・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・特任准教授 |
| 竹内賢吾 | がん研究会がん研究所・主任研究員 |

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肺がんは速やかに消失した (*PNAS* 105:19893)。すなわち EML4-ALK 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

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

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) 下流分子の探索

EML4-ALKの下流に働く分子を解明するために、高感度 phosphoproteomics 解析を行った。3T3線維芽細胞に野生型ALK、EML4-ALK、EML4-ALK(kinase-dead)を安定導入し、それぞれの細胞においてリン酸化されるタンパクを検証したところ、EML4-ALKによって特異的にチロシンリン酸化されるタンパクを同定した。その一つについてshRNAによるノックダウン実験を行った。

2) 臨床検体のゲノム解析

これまで収集したEML4-ALK陽性検体のなかで、ALK阻害剤であるcrizotinibに感受性期と、同じ症例の耐性期の検体ペアを合計で6ペア採取した。これらを用いて全エクソンの配列を次世代シーケンサーで解析し、耐性期にのみ出現するアミノ酸置換を同定した。

3) ALK診断法の開発

前年に引き続き、今年は免疫組織染色法の確立を目指した。iAEP法の染色結果をスコア化して0から3の4段階に分け、他の診断法との一致率を検証した。

4) 肺がんの病理解析

肺がん検体のパラフィン包埋検体を各種抗体を用いて染色するとともに、免疫不全マウスの皮下に接種しその腫瘍の病理型を解析した。

5) がん抑制遺伝子 heme oxygenase-1 (HO-1) の解析

TGF- β のHO-1転写活性の影響をNMuMG細胞を用いて検討した。また介在分子の候補に対しては、siRNAによるノックダウンによって影響を確認した。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては東京大学医学部および自治医科大学、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) 下流分子の探索

EML4-ALKによって特異的にリン酸化される分子の中で、チロシンリン酸化される事が知られているアダプター分子があった。この分子のリン酸化部位を決定するために、チロシンをフェニルアラニンに置換したYF変異体をそれぞれのチロシンについて作成し、EML4-ALKによるリン酸化を調べた。その結果、3種類のチロシン残基が標的である事が明らかになった。さらにこのアダプター分子に対するshRNAを導入し、発現を下げた際の細胞増殖について検討したところ、shRNAの導入によって細胞死が誘導されることが判った。したがって本アダプター分子はEML4-ALK陽性細胞の増殖に必須なものである事が明らかになった。

2) 臨床検体のゲノム解析

感受性期および耐性期のペア検体についてそのゲノムDNAを抽出し、SureSelectシステム(Agilent社)を用いてエクソン領域を純化した。それを次世代シーケンサーによって解析したところ、各検体で6-7億リードの配列情報が得られ、塩基量としては60-70Gbpが検体毎に得られた。また全エクソンの88%程がカバーされていることが判った。塩基変異は ~ 50 mutations/Mbpであり感受性期と耐性期で変異の総数に違いは無かった。アミノ酸を変える変異の数は感受性期 ~ 6 個、耐性期 ~ 20 個と有意に耐性期に多く認められた。耐性期特異的に認められる変異の中には2症例共通して認められるものもあり、現在解析を進めている。

3) ALK肺がん診断法の開発

免疫組織染色のスコア3の検体はFISH法、マルチプレックス法ともに一致率100%であり、信頼性良くALK肺がんを診断可能であった。これらの方法を利用してALK阻害剤alectinibの第I/II相臨床試験における患者の診断を行った。我々の診断で陽性を判定された症例の奏効率は93.5%と驚くべきものであり、診断法の臨床的有用性が確認された。

4) 肺がんの病理解析

組織亜分類ごとに相関性を示すがん幹細胞

マーカーが異なることが示され、腺癌発生メカニズムにおいて、特定のがん幹細胞の影響で組織形態的特徴の違いが生ずる可能性が示唆された。また AL1A1 の発現は肺腺癌の悪性度、予後に強い影響を及ぼすことを明らかにした。

一方、肺癌細胞株 40 種類を系統的に NOD/SCID マウスの皮下に接種し、上皮型と間葉型では、形成される腫瘍組織の分化度、組織構築、バイオマーカー発現、線維性間質の誘導などに相違があることを示した。

5) 肺がん細胞の宿主免疫系からの逃避機構

細胞株を用いた検討では、EGFR および NRG シグナル活性化で 5 細胞株中、2 細胞株で NKG2D リガンド発現が増加した。また Gefitinib 暴露では 2 細胞株で同リガンド発現が減弱する一方、Gemcitabine 暴露では増加した。NK 細胞傷害活性は Gefitinib で減弱、Gemcitabine で増強し、EGFR 阻害剤と殺細胞型抗腫瘍薬で NK 細胞傷害活性に異なる影響を及ぼすことが明らかとなった。

6) HO-1 の解析

TGF- β は HO-1 遺伝子の転写を抑制した。Nrf2 が HO-1 の転写に重要な役割を果たすことが知られているが、TGF- β は Nrf2 の安定性や核内移行に影響を与えなかったことから、次に Nrf2 の co-factor の制御に着目した結果、TGF- β が MafK と Bach1 の発現を上昇させることを見出した。

D&E. 考察及び結論

新たな ALK 阻害剤 alectinib の臨床試験に我々の診断法が用いられ、奏効率 93.5%と目覚ましい治療効果が確認されたことから、臨床の場において診断法の有用性が示された。さらに EML4-ALK の下流分子の一つが明らかになり、しかも増殖に必須であることが示された。この分子の耐性期検体における発現量および変異の有無について検討する予定である。また感受性期と耐性期とのゲノムワイドな比較の結果、同一の変異が複数例で見つかった。現在本変異を含む耐性期特異的変異群の機能解析を行っており、その役割を明らかにする予定である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

間野博行

- 1) Ando M, Kawazu M, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Yamashita Y, Choi YL, Yamasoba T & Mano H. “Cancer-associated missense mutations of caspase-8 activate nuclear factor-kappaB signaling” *Cancer Sci*, **104**: 1002-1008, 2013.
- 2) Ando K, Tsushima H, Matsuo E, Horio K, Tominaga-Sato S, Imanishi D, Imaizumi Y, Iwanaga M, Itonaga H, Yoshida S, Hata T, Moriuchi R, Kiyoi H, Nimer S, Mano H, Naoe T, Tomonaga M & Miyazaki Y. “Mutations in the nucleolar phosphoprotein, nucleophosmin, promote the expression of the oncogenic transcription factor MEF/ELF4 in leukemia cells and potentiates transformation” *J Biol Chem*, **288**: 9457-9467, 2013.
- 3) Fukumura K, Yamashita Y, Kawazu M, Sai E, Fujiwara SI, Nakamura N, Takeuchi K, Ando M, Miyazono K, Ueno T, Ozawa K & Mano H. “STK10 missense mutations associated with anti-apoptotic function” *Oncol Rep*, **30**: 1542-1548, 2013.
- 4) Himpe E, Abdul Rahim SA, Verdood P, Mano H & Kooijman R. “Tec kinase stimulates cell survival in transfected Hek293T cells and is regulated by the anti-apoptotic growth factor IGF-I in human neutrophils” *Cell Signal*, **25**: 666-673, 2013.
- 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*, **110**: 3029-3034, 2013.
- 6) Miyana A, Shimizu K, Noro R, Seike M, Kitamura K, Kosaihiro S, Minegishi Y, Shukuya T, Yoshimura A, Kawamoto M, Tsuchiya S, Hagiwara K, Soda M, Takeuchi K, Yamamoto N, Mano H, Ishikawa Y & Gemma A. “Activity of EGFR-tyrosine kinase and ALK inhibitors for EML4-ALK-rearranged non-small-cell lung

- cancer harbored coexisting EGFR mutation” *BMC Cancer*, **13**: 262, 2013.
- 7) Ninomiya H, Kato M, Sanada M, Takeuchi K, Inamura K, Motoi N, Nagano H, Nomura K, Sakao Y, Okumura S, Mano H, Ogawa S & Ishikawa Y. “Allelotypes of lung adenocarcinomas featuring ALK fusion demonstrate fewer onco- and suppressor gene changes” *BMC Cancer*, **13**: 8, 2013.
 - 8) Suzuki HI, Matsuyama H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K. “Computational dissection of distinct microRNA activity signatures associated with peripheral T cell lymphoma subtypes” *Leukemia*, **27**: 2107-2111, 2013.
 - 9) Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H, Soda M, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Murata M, Kiyoi H, Naoe T & Mano H. “Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation” *Leukemia*, **28**: 426-428, 2014.
- 仁木利郎
- 1) 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.
 - 2) Sakuma Y, Matsukuma S, Nakamura Y, Yoshihara M, Koizume S, Sekiguchi H, Saito H, Nakayama H, Kameda Y, Yokose T, Oguni S, Niki T, Miyagi Y. “Enhanced autophagy is required for survival in EGFR-independent EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells” *Lab Invest*, **93**:1137-1146, 2013.
 - 3) Ui T, Morishima K, Saito S, Sakuma Y, Fujii H, Hosoya Y, Ishikawa S, Aburatani H, Fukayama M, Niki T, Yasuda Y. “The Hsp 90 inhibitor, 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) synergizes with cisplatin and induces apoptosis in cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell lines via the Akt/XIAP pathway”. *Oncol Rep*, **31**: 619-624, 2014.
- 中田昌男
- 1) Saisho S, Yasuda K, Maeda A, Yukawa T, Okita R, Hirami Y, Shimizu K, Nakata M. Role of 2-[18F]fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography in preoperative management of solid-type small-sized lung cancer. *Ann Nucl Med*. 2013; **27**(6):515-22.
 - 2) 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. *Target Oncol*. 2013;**8**(4):237-42.
 - 3) 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*. 2013;**16**(2):166-72.
 - 4) 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*. 2013, **29**(1):39-44.
 - 5) Maeda A, Nakata M, Yasuda K, Yukawa T, Saisho S, Okita R, Hirami Y, Shimizu K. Unknown primary large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) in the mediastinum. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2013; **61**: 542-5.
 - 6) Yukawa T, Shimizu K, Hirami Y, Maeda A, Yasuda K, Nakata M. Lung cancer with sarcoid reaction in the lymph nodes following chemoradiotherapy. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, 2013; **21**: 732-4.
 - 7) Shimizu K, Okita R, Nakata M. Clinical significance of the tumor microenvironment in non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med*. 2013; **1**: 20.
 - 8) 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*, 2012; 36: 181-6.

池田徳彦

- 1) Ikeda N, Yoshimura A, Hagiwara M, Akata S, Saji H. "Three Dimensional Computed Tomography Lung Modeling is Useful in Simulation and Navigation of Lung Cancer Surgery" *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, **63(1)**: 56-62, 2013
- 2) 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*, **143(6)**:1626-1634, 2013
- 3) Shimada Y, Saji H, Nomura M, Matsubayashi J, Yoshida K, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. "Cancer stem cell-related marker expression in lung adenocarcinoma and relevance of histologic subtypes based on IASLC/ATS/ERS classification" *Onco Targets and Therapy*, **46**:1597-1604,2013
- 4) Saji H, Inoue T, Kato Y, Shimada Y, Hagiwara M, Kudo Y, Akata S, Ikeda N. "Virtual segmentectomy based on high-quality three-dimensional lung modelling from computed tomography images" *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, **17(2)**:227-232,2013
- 5) Kudo Y, Saji H, Shimada Y, Matsubayashi J, Nagao T, Kakihana M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. "Proposal on incorporating blood vessel invasion into the T classification parts as a practical staging system for stage I non-small cell lung cancer" *Lung Cancer*, **81(2)**:187-193,2013
- 6) Saji H, Tsuboi M, Shimada Y, Kato Y, Yoshida K, Nomura M, Matsubayashi J, Nagao T, Kakihana M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. "A proposal for Combination of Total Number and Anatomical Location of Involved Lymph Nodes for Nodal Classification in Non-small Cell Lung Cancer"

CHEST, **143(6)**:1618-1625,2013

- 7) 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*, **143(6)**:1626-1634,2013
- 8) Saji H, Tsuboi M, Shimada Y, Kato Y, Hamanaka W, Kudo Y, Yoshida K, Matsubayashi J, Usuda J, Ohira T, Ikeda N. "Gene expression profiling and molecular pathway analysis for the identification of early-stage lung adenocarcinoma patients at risk for early recurrence" *Oncol Rep*, **29(5)**: 1902-1906,2013
- 9) Kurata A, Saji H, Ikeda N, Kuroda M. "Intracaval and intracardiac extension of invasive thymoma complicated by superior and inferior vena cava syndrome" *Pathology International*, **63(1)**:56-62,2013
- 10) Ikeda N, Saji H, Hagiwara M, Ohira T, Usuda J, Kajiwara N. "Recent advances in video-assisted thoracoscopic surgery for lung cancer" *Asian J Endosc Surg*, **6(1)**: 9-13, 2013

鯉沼代造

- 1) Okita Y, Kamoshida A, Suzuki H, Itoh K, Motohashi H, Igarashi K, Yamamoto M, Ogami T, Koinuma D, & Kato M. "Transforming growth factor- β induces transcription factors MafK and Bach1 to suppress expression of the Heme Oxygenase-1 gene" *J Biol Chem*, **288**:20658-20667, 2013

竹内賢吾

- 1) Hong M, Kim RN, Song JY, Choi SJ, Oh E, Lira ME, Mao M, Takeuchi K, Han J, Kim J, Choi YL. HIP1-ALK, a Novel Fusion Protein Identified in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*;9:419-422.2014.
- 2) Lee SE, Kang SY, Takeuchi K, Ko YH. Identification of RANBP2-ALK fusion in ALK positive diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol*.2014. in press
- 3) Li J, Yin WH, Takeuchi K, Guan H, Huang YH, Chan JK. Inflammatory myofibroblastic tumor

- with RANBP2 and ALK gene rearrangement: a report of two cases and literature review. *Diagn Pathol*;8:147.2013.
- 4) Takamochi K, Takeuchi K, Hayashi T, Oh S, Suzuki K. A rational diagnostic algorithm for the identification of ALK rearrangement in lung cancer: a comprehensive study of surgically treated Japanese patients. *PLoS One*;8:e69794.2013.
 - 5) Takeuchi K. Interpretation of anti-ALK immunohistochemistry results. *J Thorac Oncol*;8:e67-68.2013.
 - 6) Miyanaga A, Shimizu K, Noro R, Seike M, Kitamura K, Kosaihiira S, Minegishi Y, Shukuya T, Yoshimura A, Kawamoto M, Tsuchiya S, Hagiwara K, Soda M, Takeuchi K, Yamamoto N, Mano H, Ishikawa Y, Gemma A. Activity of EGFR-tyrosine kinase and ALK inhibitors for EML4-ALK-rearranged non-small-cell lung cancer harbored coexisting EGFR mutation. *BMC Cancer*;13:262.2013.
 - 7) Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, Hida T, Yamamoto N, Yoshioka H, Harada M, Ohe Y, Nogami N, Takeuchi K, Shimada T, Tanaka T, Tamura T. CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol*;14:590-598.2013.
 - 8) Matsuda I, Takeuchi K, Mizuguchi S, Kaji M, Ueda K, Teramura K, Hirota S. A case of synchronous bilateral lung cancers: EML4-ALK positive adenocarcinoma in the right lung and adenocarcinoma in situ (the former bronchioloalveolar carcinoma) in the left lung. *BMC Pulm Med*;13:25.2013.

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 下流分子および crizotinib 耐性機構の探索」に関する研究

分担研究者： 間野 博行 東京大学大学院医学系研究科 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、その耐性機構の解明と克服は重要なテーマである。今回我々は阻害剤耐性となった症例の検体の全エクソン配列を解析し、耐性期特異的に出現したアミノ酸置換を検出した。そのうち1変異は2症例で共通に出現し、また1変異は1症例で検出された。現在その機能解析を進めている。また EML4-ALK の下流分子を探索し、複数の分子を同定した。そのうち1つは shRNA によるノックダウンで細胞死が誘導され、生存に必須であることがわかった。このように下流分子の同定と、薬剤耐性の解明の両面から研究は順調に進行している。

A 研究目的

肺がんは我が国及び欧米先進国におけるがん死数の第一位を占める予後不良の疾患であり、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、我が国においても2012年に承認・保険収載されたところである。

今後 ALK 阻害剤が急速に臨床応用される

と予想され、そのような中であって临床上最大の課題は薬剤耐性機構の解明とその克服である。本研究計画では EML4-ALK の下流分子の探索と、実際の臨床検体のゲノム解析を通してその解明を目指した。

B 研究方法

1) 下流分子の探索

EML4-ALK の下流に働く分子を解明するために、高感度 phosphoproteomics 解析を行った。3T3線維芽細胞に野生型 ALK、EML4-ALK、EML4-ALK(kinase-dead)を安定導入し、それぞれの細胞においてリン酸化されるタンパクを検証したところ、EML4-ALK によって特異的にチロシンリン酸化されるタンパクを同定した。その一つについて shRNA によるノックダウン実験を行った。

2) 臨床検体のゲノム解析

これまで収集した EML4-ALK 陽性検体のなかで、ALK 阻害剤である crizotinib に感受性期と、同じ症例の耐性期の検体ペアを合計で6ペア採取した。これらを用いて全エクソンの配列を次世代シーケンサーで解析し、耐性期にのみ出現するアミノ酸置換を同定した。

(倫理面への配慮)

本研究計画は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した東京大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の認可を

受けている。またサンプル採取に際しては研究計画説明書を患者さんに渡して担当医が説明すると共に、試料提供の同意書に署名をいただいている。

C 研究結果

1) 下流分子の探索

EML4-ALKによって特異的にリン酸化される分子の中で、チロシンリン酸化される事が知られているアダプター分子があった。この分子のリン酸化部位を決定するために、チロシンをフェニルアラニンに置換したYF変異体をそれぞれのチロシンについて作成し、EML4-ALKによるリン酸化を調べた。その結果、3種類のチロシン残基が標的である事が明らかになった。さらにこのアダプター分子に対するshRNAを導入し、発現を下げた際の細胞増殖について検討したところ、shRNAの導入によって細胞死が誘導されることが判った。したがって本アダプター分子はEML4-ALK陽性細胞の増殖に必須なものである事が明らかになった。

2) 臨床検体のゲノム解析

感受性期および耐性期のペア検体についてそのゲノムDNAを抽出し、SureSelectシステム（Agilent社）を用いてエクソン領域を純化した。それを次世代シーケンサーによって解析したところ、各検体で6-7億リードの配列情報が得られ、塩基量としては60-70Gbpが検体毎に得られた。また全エクソンの88%程がカバーされていることが判った。塩基変異は~50 mutations/Mbpであり感受性期と耐性期で変異の総数に違いは無かった。アミノ酸を変える変異の数は感受性期~6個、耐性期~20個と有意に耐性期に多く認められた。耐性期特異的に認められる変異の中には2症例共通して認められるものもあり、現在解析を進めている。

D&E. 考察及び結論

EML4-ALKの下流分子の一つが明らかになり、しかも増殖に必須であることが示された。この分子の耐性期検体における発現量および変異の有無について検討する予定である。また感受性期と耐性期とのゲノムワイドな比較の結果、同一の変異が複数例で見つかるのは驚きであった。現在本変異を含む耐性期特異的変異群の機能解析を行っており、その役割を明らかにする

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) Ando M, Kawazu M, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Yamashita Y, Choi YL, Yamasoba T & Mano H. “Cancer-associated missense mutations of caspase-8 activate nuclear factor-kappaB signaling” *Cancer Sci*, **104**: 1002-1008, 2013.
- 2) Ando K, Tsushima H, Matsuo E, Horio K, Tominaga-Sato S, Imanishi D, Imaizumi Y, Iwanaga M, Itonaga H, Yoshida S, Hata T, Moriuchi R, Kiyoi H, Nimer S, Mano H, Naoe T, Tomonaga M & Miyazaki Y. “Mutations in the nucleolar phosphoprotein, nucleophosmin, promote the expression of the oncogenic transcription factor MEF/ELF4 in leukemia cells and potentiates transformation” *J Biol Chem*, **288**: 9457-9467, 2013.
- 3) Fukumura K, Yamashita Y, Kawazu M, Sai E, Fujiwara SI, Nakamura N, Takeuchi K, Ando M, Miyazono K, Ueno T, Ozawa K & Mano H. “STK10 missense mutations associated with anti-apoptotic function” *Oncol Rep*, **30**: 1542-1548, 2013.
- 4) Himpe E, Abdul Rahim SA, Verdood P, Mano H & Kooijman R. “Tec kinase stimulates cell survival in transfected Hek293T cells and is regulated by the anti-apoptotic growth factor IGF-I in human neutrophils” *Cell Signal*, **25**: 666-673, 2013.
- 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*, **110**: 3029-3034, 2013.
- 6) Miyanaga A, Shimizu K, Noro R, Seike M, Kitamura K, Kosaihiira S, Minegishi Y, Shukuya T, Yoshimura A, Kawamoto M, Tsuchiya S, Hagiwara K, Soda M, Takeuchi K, Yamamoto N,

- Mano H, Ishikawa Y & Gemma A. “Activity of EGFR-tyrosine kinase and ALK inhibitors for EML4-ALK-rearranged non-small-cell lung cancer harbored coexisting EGFR mutation” *BMC Cancer*, **13**: 262, 2013.
- 7) Ninomiya H, Kato M, Sanada M, Takeuchi K, Inamura K, Motoi N, Nagano H, Nomura K, Sakao Y, Okumura S, Mano H, Ogawa S & Ishikawa Y. “Allelotypes of lung adenocarcinomas featuring ALK fusion demonstrate fewer onco- and suppressor gene changes” *BMC Cancer*, **13**: 8, 2013.
- 8) Suzuki HI, Matsuyama H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K & Miyazono K. “Computational dissection of distinct microRNA activity signatures associated with peripheral T cell lymphoma subtypes” *Leukemia*, **27**: 2107-2111, 2013.
- 9) Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H, Soda M, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Murata M, Kiyoi H, Naoe T & Mano H. “Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation” *Leukemia*, **28**: 426-428, 2014.

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
「肺腺癌の分化形質と生物学的特性」に関する研究

分担研究者： 仁木 利郎 自治医科大学 教授

研究要旨：これまでわれわれは、多彩な形質を示す肺腺癌を分化形質やチロシンキナーゼの発現パターンなどに基づき、上皮型と間葉型に大別可能であることを報告してきた。本年度の研究では、肺癌細胞株 40 種類を系統的に NOD/SCID マウスの皮下に接種し、上皮型と間葉型では、形成される腫瘍組織の分化度、組織構築、バイオマーカー発現、線維性間質の誘導などに相違があることを示した。またマトリゲルを用いた 3 次元培養において、上皮型の癌細胞では、線維芽細胞との共培養によって細胞集塊の形態に変化が誘導され、浸潤性が誘導されることを明らかにした。

A 研究目的

肺腺癌は組織像が多彩であり、どのような組織型に分類するのが合理的なのか、以前より問題となってきた。特にここ数年、分子標的薬剤や化学療法により一定の効果が得られるようになってからは、癌の生物学的特性（転移能、薬剤感受性）を反映した合理的で客観性のある分類が求められている。従来の肺腺癌の分類は、組織形態のみに依拠してきたが、すでに白血病や悪性リンパ腫の分類で行われているように、組織形態や細胞形態に加え、遺伝子異常、分化メーカー（バイオマーカー）発現などの情報を有機的に結びつけた多面的な分析による分類が、今後目指すべき方向性と考えられる。

これまでの研究においてわれわれは、分化形質やチロシンキナーゼの発現パターンなどに基づいて、肺腺癌を上皮型と間葉型に大別することが可能であることを報告してきた (Matsubara, Niki et al. Am J Pathol 2010)。上皮型の腺癌は、EGFR, MET の発現、リン酸化レベルが高く、MUC1, CK (cytokeratin 7) などの分化形質を高発現し、Laminin-5, cyclooxygenase-2 など創傷治癒・組織リモデリング関連因子の発現が高い。これに対し間葉型では、vimentin の高発現、E-cadherin の低下など EMT (epithelial-mesenchymal transition; 上皮間葉転換) 形質を示し、チロシンキナーゼでは EGFR, MET の発現が低く、FGFR1, Axl などが高い発現を示す。EGFR, HER2, MET などの変異は上皮型に多く、これに対し KRAS 変異は上皮型と間葉型にほぼ同数みられる。

EGFR 阻害剤や MET 阻害剤に対して感受性を示す細胞のほとんどは E-cadherin を比較的高発現している細胞であった (Matsubara et al. Am J Pathol 2010;177:2191-2204; Matsubara et al. J Thorac Oncol 2010;5:1317-1324)。逆に、代表的な化学療法剤である cisplatin に感受性を示す細胞は間葉型の細胞に比較的多い傾向がみられている。このようなことから、上皮型と間葉型では、その発癌進展の経路や分子標的とすべき遺伝子異常のプロファイルが異なる可能性が考えられる。事実、最近になり、肺腺癌、膵臓癌でこのような我々の考えを支持する結果が報告されはじめている (Byers et al. Cancer Res 2013; Collisson et al. Nat Med 2013)。

本研究では、肺腺癌の分化形質を基軸として、病理形態、遺伝子異常、薬剤感受性といったさまざまな肺腺癌の形質を多面的・有機的に解析し、肺腺癌の診断、治療への応用を目指している。本年度は、これまで in vitro で解析してきた肺癌細胞 40 種類を系統的に NOD/SCID マウスに接種し、上皮型と間葉型のそれぞれについて、in vivo で形成される腫瘍の組織形態、バイオマーカーの発現との関連性について検討を行った。また同じ 40 種類の細胞株をゲル内 3 次元培養し、細胞集塊の形態、線維芽細胞との共培養の影響を調べた。

B 研究方法

ATCC (American Type Culture Collection)、JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources)、RIKEN Bioresource

Cell Bank から購入した肺癌細胞 40 種類を用いた。通常の条件で培養後、トリプシン処理して調整した細胞懸濁液を NOD/SCID マウスの皮下に接種し、6 週後、ホルマリン固定、パラフィン包埋し、組織標本を作製した。薄切後、ABC 法により E-cadherin, vimentin, α -smooth muscle actin, laminin-5 γ 2 鎖などの免疫染色を行った。

3次元培養は Bissell らの方法 (Nat Methods 2007) に準じて行った。マトリゲル上に癌細胞を播種し、癌細胞のみの単培養あるいは肺線維芽細胞 (HFLIII, JCRB より購入) との共培養を行い、播種後 4 日目に細胞集塊の形態を観察した。

C 研究結果

NOD/SCID マウスの皮下接種実験では、40 種類の細胞株のうち 36 種の細胞株において腫瘍の形成が認められた。組織型は主に充実性に増殖する低分化な癌が多くみられたが、実際のヒトの肺腺癌症例でよくみられるような管状ないし乳頭状構造を示すものが 4 種類みられ、いずれも上皮型に属する細胞株に由来するものであった。腫瘍の長径 5mm 以上のもの 28 種 (上皮型 19 種、間葉型 9 種) について、さらに免疫染色による検討を進めた。 α -SMA (smooth muscle actin) に陽性を示す CAF (cancer associated fibroblast) は、腫瘍により多寡はあったがいずれの腫瘍にも認められた。臨床的な肺腺癌でしばしばみられるような線維性間質を形成するものが 10 種あり、いずれも上皮型の癌であった。これまでの肺腺癌の組織解析により、癌の浸潤先進部では、しばしば Laminin-5 γ 2 鎖, cox-2 などの創傷治癒関連分子の発現が報告されている (Moriya et al. Cancer 2001; Niki et al. Am J Pathol 2002)。このような Laminin-5 γ 2 鎖の発現パターンは、上皮型の細胞に由来する腫瘍においても認められた。これに対し、間葉型の細胞に由来する腫瘍は、ほぼ全例、多角形ないし類円形の腫瘍細胞が充実性に増殖する低分化腺癌ないし大細胞癌に類似した組織像を示していたが、紡錘形の細胞形態を示すものはみられなかった。間葉型の腫瘍ではおおむね線維性間質に乏しく、 α -SMA 陽性の CAF も上皮型細胞に由来する腫瘍に比し少ない傾向が認められた。

このように上皮型と間葉型では、

NOD/SCID マウスに接種し形成される腫瘍の組織構築が線維性間質の多寡を含め異なっている。その理由として、上皮型と間葉型では、細胞接着のみならず、線維芽細胞との癌間質相互作用に違いのあることが想定された。そこでマトリゲル上で 3次元培養を行い、線維芽細胞による細胞集塊の形態形成への影響を検討した。癌細胞の単培養では、丸いスフェロイドを形成するもの (3 1 株)、ぶどう状の塊を形成するもの (4 株)、星芒状の塊を形成するもの (5 株) に分類可能であった。上皮型の細胞は、1 例を除きすべて丸いスフェロイドを形成しており、癌細胞のみの単培養では浸潤傾向には乏しかった。線維芽細胞との共培養により、およそ半数の 2 3 株で単培養と異なる形態変化が認められた。特に上皮型の細胞では、単培養での丸いスフェロイド形成に比し、共培養において網目状のネットワーク構造を形成するもの、あるいは線維芽細胞の集団のなかに浸潤するような増殖形態を示すなど、劇的な形態変化を示すものが多く認められた。

D&E. 考察及び結論

上皮間葉転換 (EMT, epithelial mesenchymal transition) は、上皮細胞が、恒常的あるいは一時的に間葉細胞の特性を獲得する現象を指し、最近では癌の浸潤・転移への関与、また最近では薬剤抵抗性との関連で注目されている。われわれも“上皮型”と“間葉型”あるいは“EMT 形質”という用語を用いているが、現実の癌の診断・治療を考えた時、ドライバー変異や組織形態あるいはバイオマーカーなどを含めたより多面的な解析が望まれる。

本年度の研究では、これまで主に *in vitro* で行ってきた肺癌細胞株を系統的にマウスに接種し、形成される腫瘍の組織構築、分化度、バイオマーカー発現などとの関連性を検討した。その結果、上皮型の癌細胞に由来する腫瘍では、実際のヒトの肺腺癌症例でよくみられるような組織構築、線維間質誘導、あるいは代表的な創傷治癒・リモデリング関連分子である Laminin-5 γ 2 鎖の浸潤先進部での発現誘導などが確認された。これに対し、間葉型の癌細胞に由来する腫瘍では、充実性の低分化腺癌ないし大細胞癌に類似した組織構築を示すことが明

らかとなった。上皮型と間葉型で線維性間質の多寡に違いがあることは、線維性間質の誘導、線維芽細胞への依存性などが両者の間で異なることを示唆しており興味深い。今後さらにその分子機構についても検討してゆきたいと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Sakuma Y, Matsukuma S, Nakamura Y, Yoshihara M, Koizume S, Sekiguchi H, Saito H, Nakayama H, Kameda Y, Yokose T, Oguni S, Niki T, Miyagi Y. “Enhanced autophagy is required for survival in EGFR-independent EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells” *Lab Invest*, **93**:1137-1146, 2013.
- 3) Ui T, Morishima K, Saito S, Sakuma Y, Fujii H, Hosoya Y, Ishikawa S, Aburatani H, Fukayama M, Niki T, Yasuda Y. “The Hsp 90 inhibitor, 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) synergizes with cisplatin and induces apoptosis in cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell lines via the Akt/XIAP pathway”. *Oncol Rep*, 31: 619-624, 2014.

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

「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については、乳癌細胞において HER2-HER3 シグナルが NK 細胞活性化受容体 NKG2D のリガンド発現調整を介して NK 細胞からの免疫逃避に関与することが報告された。非小細胞肺癌においては EGFR が重要な治療標的だが、EGFR シグナルと NK 細胞からの免疫逃避については未解明の分野である。本研究では、非小細胞肺癌の細胞株ならびに臨床検体を用いて、EGFR を含む HER family シグナルが腫瘍細胞上の NKG2D リガンド発現に及ぼす影響とその機構、ならびに NK 細胞からの免疫逃避への影響を解析する。非小細胞肺癌における 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発見に役立つと考える。

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を用いて HER レセプター刺激下の NK 細胞による腫瘍細胞認識に重要な NKG2D リガンド発現をフローサイトメトリー法で解析する。さらに HER レセプター刺激や EGFR 阻害剤を含む各種抗腫瘍薬による NKG2D リガンド発現の変化、ならびに NK 細胞による細胞傷害活性に与える影響も解析する。

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と克服、さらに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、5 種の非小細胞肺癌細胞株に 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 NKG2D リガンド発現の変化をフローサイトメトリー法で解析する。また、腫瘍細胞に同刺激を加えたのち、NK 細胞と共培養し、NK 細胞傷害活性を LDH 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。

さらに肺癌診療で用いられる EGFR 阻害剤 Gefitinib の肺癌細胞における NKG2D リガンド発現の変化と NK 細胞傷害活性への影響を検討し、殺細胞型抗腫瘍薬 Gemcitabine と、その影響を比較した。

臨床検体を用いた検討では、非小細胞肺癌新鮮切除標本より腫瘍細胞を採取し、その機能解析を試みた。また、当科手術症例のうち、抗腫瘍薬による治療前・後に組織を採取できたものについて、治療前後の NKG2D リガンド発現の変化を免疫組織学的反応により検討した。

(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およびNRGシグナル活性化で5細胞株中、2細胞株でNKG2Dリガンド発現が増加した。またGefitinib暴露では2細胞株で同リガンド発現が減弱する一方、Gemcitabine暴露では増加した。NK細胞傷害活性はGefitinibで減弱、Gemcitabineで増強し、EGFR阻害剤と殺細胞型抗腫瘍薬でNK細胞傷害活性に異なる影響を及ぼすことが明らかとなった。手術検体を用いた検討では、単細胞化した腫瘍細胞においてNKG2Dリガンド発現は確認できたが、NK細胞傷害活性を評価するための機能解析については十分な数の生細胞を採取することができず、未だ評価に至っていない。よって術前治療症例を中心に、抗腫瘍薬治療前後の肺癌組織標本を用いて、治療によるNKG2Dリガンド発現の変化について免疫組織学的反応による解析を進めている。

D&E. 考察及び結論

我々の解析により、HER familyシグナルがMHC class IのみならずNKG2Dリガンドの発現をも制御し、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) Saisho S, Yasuda K, Maeda A, Yukawa T, Okita R, Hiram Y, Shimizu K, Nakata M. Role of 2-[18F]fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography in preoperative management of solid-type small-sized lung cancer. *Ann Nucl Med*. 2013; 27(6):515-22.
- 2) 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. *Target Oncol*. 2013;8(4):237-42.

3) 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*. 2013;16(2):166-72.

4) 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*. 2013, 29(1):39-44.

5) Maeda A, Nakata M, Yasuda K, Yukawa T, Saisho S, Okita R, Hiram Y, Shimizu K. Unknown primary large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) in the mediastinum. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2013; 61: 542-5.

6) Yukawa T, Shimizu K, Hiram Y, Maeda A, Yasuda K, Nakata M. Lung cancer with sarcoid reaction in the lymph nodes following chemoradiotherapy. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, 2013; 21: 732-4.

7) Shimizu K, Okita R, Nakata M. Clinical significance of the tumor microenvironment in non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med*. 2013; 1: 20.

8) 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*, 2012; 36: 181-6.

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

「肺腺癌におけるがん幹細胞マーカーの発現と臨床病理学的解析」に関する研究

分担研究者：池田徳彦 東京医科大学外科Ⅰ講座 主任教授

研究要旨：我々は肺癌の包括的プロテオーム解析において、高悪性度群でがん幹細胞マーカーであるアセトアルデヒド脱水素酵素(AL1A1)、アルド・ケト還元酵素(AK1A1、AK1C3)が有意に高発現していることを報告した。本研究では肺癌の大半を占める肺腺癌を対象として、これらのがん幹細胞マーカーの発現と臨床病理学的因子との関連、さらに組織形態学に基づき新たに確立された総合的肺腺癌分類である IASLC/ATS/ERS 分類との関連について検討した。組織亜分類(predominant subtype)ごとに相関性を示すがん幹細胞マーカーが異なることが示され、腺癌発生メカニズムにおいて、特定のがん幹細胞の影響で組織形態的特徴の違いが生ずる可能性が示唆された。また AL1A1 の発現は肺腺癌の悪性度、予後に強い影響を及ぼすことを明らかにした。AL1A1 は血液/固形腫瘍に関わらず横断的ながん幹細胞マーカーとなる可能性を有しており、これにより単離された細胞を標的とする新規薬剤の確立と、がん幹細胞研究の進展が期待される。

A 研究目的

がんは多様な細胞からなる不均一な細胞集団である。近年、腫瘍において、がん幹細胞と呼ばれる一部の細胞集団が存在することが多くの研究で示されており、腫瘍形成、転移、治療抵抗性に関与すると考えられている。

肺癌は難治性であり、現行の治療法では予後の劇的な改善は望めない。がんを根治するためには従来のがん治療法に加えて、がん幹細胞を標的とする治療の開発が求められおり、この確立のためにはがん幹細胞を濃縮するための細胞表面マーカーが必要不可欠である。我々は肺癌患者標本を用いたプロテオーム解析で、高悪性度群においてがん幹細胞マーカーとして報告されているアセトアルデヒド脱水素酵素(AL1A1)、アルド・ケト還元酵素(AK1A1、AK1C3)が有意に高発現していることを報告した。そこで、本研究では肺癌の大半を占める肺腺癌を対象として、これらのがん幹細胞マーカーの発現と生命予後を含めた臨床病理学的因子との関連について検討した。一方、近年、組織形態的所見(predominant subtype)に基づき、国際的な総合的肺腺癌分類(IASLC/ATS/ERS 分類)が改訂された。本研究ではがん幹細胞マーカーの発現とこの predominant subtype との関係についても検討した。肺腺癌の発症機序の解明とがん幹細胞を標的とした新たな治療法の確立・創薬のための基盤研究としたい。

B 研究方法

1999年～2002年の肺腺癌完全切除例103例を対象として、AL1A1、AK1A1、AK1C3の免疫組織染色を行った。蛋白発現解析には抗ALDH1A1抗体(Abcam Japan, Tokyo, Japan)、抗AK1C1抗体(GeneTex, Irvine, CA, USA)、抗AK1C3抗体(Sigma Japan, Tokyo, Japan)を用いた。切除標本の最大断面で5%以上の腫瘍細胞が染色されるものを陽性とした。

また切除標本切片を再検し、IASLC/ATS/ERS分類に基づき predominant subtype に分類した。上記のがん幹細胞マーカー蛋白発現、IASLC/ATS/ERS 分類と臨床病理学的因子との関連について解析した。

検体収集に関しては東京医科大学倫理審査委員会の承認下に、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C 研究結果

103症例においてAL1A1陽性は66%、AK1C1陽性は63%、AK1C3陽性は86%であった。IASLC/ATS/ERS分類ではAdenocarcinoma in situ (AIS)が3%、Microinvasive adenocarcinoma (MIA)が6%、Lepidic patternが8%、Papillary patternが38%、Acinar patternが10%、Micropapillary patternが5%、Solid patternが26%、Mucinous patternが4%であり、多重比較検定においてAL1A1発現はSolid patternに比してPapillary patternで有意に高値であり、

AK1C1 発現は papillary pattern に対して Solid pattern、AIS/MIA で有意に高値であった。がん幹細胞マーカー蛋白発現を含めた臨床病理学的因子と術後生存期間に関する予後解析では、AL1A1 発現は腫瘍径、リンパ節転移の有無と並び予後に強い影響を及ぼすことが示された。また AL1A1 発現は組織学的分化度と強い相関があることが示された。

D&E. 考察及び結論

IASLC/ATS/ERS分類が予後や生物学的悪性度と強い関連があり、またEGFRやKRAS変異などの遺伝子発現との関連があることは現在までに報告されているが、がん幹細胞マーカー蛋白発現との関連性についての報告はなかった。本研究では、先行研究の肺癌のプロテオーム解析において高悪性度群で高い発現が示されたがん幹細胞マーカーAL1A1、AK1C1、AK1C3とpredominant subtypeとの関連について検討したが、subtypeごとに相関性を示すがん幹細胞マーカーが異なることが明らかとなり、肺腺癌の発生メカニズムにおいて、特定のがん幹細胞の影響で組織形態的特徴の違いが生ずる可能性が示唆された。またAL1A1は、現在までに乳癌、急性骨髄性白血病、脳腫瘍、多発性骨髄腫などでがん幹細胞マーカーの候補として認識されており、本研究においてもAL1A1が肺腺癌の悪性度、予後に強い影響を及ぼすことが明らかとなった。AL1A1は血液/固形腫瘍に関わらず横断的ながん幹細胞マーカーの候補となる可能性があり、これにより単離された細胞を標的とする新規薬剤の開発ならびにがん幹細胞研究の進展が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Ikeda N, Yoshimura A, Hagiwara M, Akata S, Saji H. "Three Dimensional Computed Tomography Lung Modeling is Useful in Simulation and Navigation of Lung Cancer Surgery" *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, **63**(1): 56-62, 2013
- 2) 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*, **143**(6):1626-1634, 2013
- 3) Shimada Y, Saji H, Nomura M, Matsubayashi J, Yoshida K, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. "Cancer stem cell-related marker expression in lung adenocarcinoma and relevance of histologic subtypes based on IASLC/ATS/ERS classification" *Onco Targets and Therapy*, **46**:1597-1604, 2013
- 4) Saji H, Inoue T, Kato Y, Shimada Y, Hagiwara M, Kudo Y, Akata S, Ikeda N. "Virtual segmentectomy based on high-quality three-dimensional lung modelling from computed tomography images" *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, **17**(2):227-232, 2013
- 5) Kudo Y, Saji H, Shimada Y, Matsubayashi J, Nagao T, Kakihana M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. "Proposal on incorporating blood vessel invasion into the T classification parts as a practical staging system for stage I non-small cell lung cancer" *Lung Cancer*, **81**(2):187-193, 2013
- 6) Saji H, Tsuboi M, Shimada Y, Kato Y, Yoshida K, Nomura M, Matsubayashi J, Nagao T, Kakihana M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. "A proposal for Combination of Total Number and Anatomical Location of Involved Lymph Nodes for Nodal Classification in Non-small Cell Lung Cancer" *CHEST*, **143**(6):1618-1625, 2013
- 7) 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*, **143**(6):1626-1634, 2013
- 8) Saji H, Tsuboi M, Shimada Y, Kato Y, Hamanaka W, Kudo Y, Yoshida K, Matsubayashi J, Usuda J, Ohira T, Ikeda N. "Gene expression profiling and molecular pathway analysis for the identification of early-stage lung adenocarcinoma patients at risk for early recurrence" *Oncol Rep*, **29**(5): 1902-1906, 2013
- 9) Kurata A, Saji H, Ikeda N, Kuroda M. "Intracaval and intracardiac extension

of invasive thymoma complicated by superior and inferior vena cava syndrome” *Pathology International*, **63(1)**:56-62,2013

- 10) Ikeda N, Saji H, Hagiwara M, Ohira T, Usuda J, Kajiwara N.
“Recent advances in video-assisted thoracoscopic surgery for lung cancer”
Asian J Endosc Surg, **6(1)**: 9-13, 2013

- 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

「肺がん細胞における TGF- β 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 特任准教授

研究要旨：我々は肺がん細胞をはじめとして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- β (TGF- β)の制御メカニズムについて検討を行ってきた。これまでに次世代シーケンサーを用いた TGF- β ファミリー下流の転写因子 Smad 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ている。本検討では、酸化ストレスと肺がん発がんの抑制作用を有する heme oxygenase-1 遺伝子の TGF- β による転写抑制のメカニズムを明らかにした。また RNA-sequencing を用いて TGF- β 刺激による肺腺がん細胞の遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。今後がん細胞の上皮間葉転換の制御の鍵となる分子の同定と作用機構解析を行う。

A 研究目的

Transforming growth factor (TGF)- β 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- β 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- β 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- β 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、解決しなければならない課題である。

分担研究者らは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てきた。本研究によりこれまでに TGF- β によるがん細胞の EMT における、上皮特異的選択的 RNA スプライシング因子 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 (Horiguchi et al, *Oncogene*, 2011)。またがん細胞パネルで見いだされた、ZEB1/2 の強発現が 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ことを明らかにした。さらに NF κ B の選択的阻害剤が TGF- β と TNF- α による肺がん細胞の EMT を部分的に抑制し、分子標的としてのこれらシグナル伝達経路の可能性が示唆された (Kawata et al, *J Biochem*, 2012)。また分担研究者

らの見出した細胞特異的な Smad ファミリー結合部位の違い (Mizutani et al, *J Biol Chem*, 2011) 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- β 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ている。実際に TGF- β 下流のシグナル伝達分子・転写因子である Smad2/3 のゲノム結合部位に極めて高頻度に存在する AP-1 結合モチーフに着目し、このモチーフに結合する転写因子群ががん細胞の浸潤能に与える影響を見出した (Sundqvist et al, *Oncogene*, 2013)。

平成 25 年度はこれまでの本研究課題で得られた知見を踏まえ、酸化ストレス及び肺がん発がんの抑制作用を有する heme oxygenase-1 (HO-1) の TGF- β による発現抑制機構を明らかにすることを目的とした。また先に肺腺がんの ChIP-sequencing により同定した Smad 結合部位の解析のため、RNA-sequencing を行うことで miRNA など ncRNA を含めた網羅的遺伝子発現解析を行って肺がんにおける制御異常を見出すことを目的とした。

B 研究方法

TGF- β により EMT を起こすモデル細胞として本検討では乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞を用いた。この細胞における HO-1 遺伝子発現誘導への TGF- β の効果について RT-PCR で検討した。またシグナルの下流因子の HO-1 転写活性への