

201407001A

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26年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成27(2015)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 下流分子およびクリゾチニブ耐性機構の探索」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 ……………	6
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 ……………	8
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 ……………	10
4.	「肺癌のEGFR チロシンキナーゼインヒビターの臨床的効果と分子生物学的特性」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 ……………	13
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 ……………	15
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 ……………	17
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 ……………	19
IV.	研究成果の刊行物・別冊 ……………	25

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社のクリゾチニブは既に米国で承認・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（アレクチニブ）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・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 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（クリゾチニブ）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クリゾチニブ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、

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

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。また確認のため、これらタンパクのチロシン残基をリジン残基に置換したYF変異体を作成し、リン酸化レベルの変化を見た。

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、新たにクリゾチニブ耐性となった5症例、耐性期と感受性期が保存された3症例につ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) 肺がんにおけるEGFRシグナルの解析

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、悪性胸水より腫瘍細胞を採取し、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤暴露、HERレセプターのリガンド刺激を加えた上、腫瘍細胞上のNKG2Dリガンド発現量をフローサイトメトリー法で解析する

4) TGF- β シグナルの解析

また肺腺がん細胞H441を用いてTGF- β 刺激時のSmad3とSmad4の結合部位をChIP-sequencingにより網羅的に同定した。その際にTTF-1の発現をsiRNAにより抑制することで、そのSmad結合に与える影響を、TTF-1のChIP-sequencingデータ及びRNA-sequencingと比較しつつ検討した。ChIP-sequencingやRNA-sequencingは確立している方法を用いてデ

ータ取得を行った。

(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、新規分子を同定した。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、EML4-ALKの標的となるアミノ酸残基が確認された。さらにこの分子に対するYF変異体を導入することで細胞の増殖が抑制されることがわかった。こうして本タンパクが、EML4-ALKの増殖シグナルにリンクし、セカンドメッセンジャーとして働くことが示された。

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。その結果、耐性期にのみ出現するアミノ酸置換として24種類が同定された。現在この遺伝子の点突然変異が、ALK阻害剤耐性に

3) 肺がんにおけるEGFRシグナルの解析

EGFR阻害剤(ゲフィチニブ)によって治療した症例のうち、効果不良群は4例、中間効果群が25例、長期効果群が15例であった。EGFR遺伝子変異では、Exon18遺伝子変異:1例、Exon19:23例、Exon20遺伝子変異:2例、Exon21遺伝子変異:16例を認めた。2例にExon20とExon21遺伝子変異を同時に認めた。治療効果を認めなかった効果不良群の4例中2例にExon20の遺伝子変異を認め、Exon19とExon21にそれぞれ遺伝子変異を認めた。Exon19に遺伝子変異を認めた症例では、METが強く発現していた。Exon21の発現していた症例では、METの発現は認められなかったが、HGFの発現を認めた。Exon20と21に遺伝子変

異を認めた2例は、長期効果群であった。

4) 肺がんにおける TGF- β シグナルの解析

肺腺がん細胞 H441 は TTF-1 を発現しており、TGF- β による EMT が TTF-1 によって抑制されていることが分かっている。TTF-1 の強発現が核内において Smad3 と Smad4 の複合体形成を阻害したことから、Smad のゲノム結合への影響を探索した。H441 細胞での Smad3、Smad4、TTF-1 の ChIP-sequencing データの解析においては、それぞれの結合強度の定量的評価をおこなった。その結果、Smad3 と Smad4 の結合強度が TTF-1 によって強く制御されていることを見いだした。興味深いことにこのような制御は全ての Smad3 結合部位に起きるわけではなく、TTF-1 と共局在する部位においては認められなかった。Chromatin conformation capture 実験等を踏まえ、TTF-1 は TGF- β 刺激の無い状態で Smad3 と共にゲノム上で LMO3 をはじめ特別な標的遺伝子群の発現を制御していること、そして TTF-1 発現抑制により TGF- β の標的遺伝子群が Smad3 の結合増強を伴って発現変動することを見いだした。

D&E. 考察及び結論

EML4-ALK の下流分子として昨年度とあわせて 2 分子が明らかになり、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) Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T, Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Ichikawa M, Mano H and Kurokawa M. “Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML” *Nat Commun.* 2014; **5**: 4770.
- 2) 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 and Mano H. “Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation” *Leukemia.* 2014; **28**: 426-8.

- 3) Nakamura Y, Taniguchi H, Mizoguchi K, Ikeda T, Motoshima K, Yamaguchi H, Nagashima S, Nakatomi K, Soda M, Mano H and Kohno S. “Secondary EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma in a patient previously treated for acute lymphoblastic leukemia in childhood: a case report” *Jpn J Clin Oncol.* 2014; **44**: 593-6.
- 仁木利郎

- 1) 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.
- 2) Ibrahim R, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Goto A, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Takai D, Nakajima J, Fukayama M, Niki T, Murakami Y. Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial mesenchymal transition. *Hum Pathol* 45:1397-1405, 2014.
- 3) Saito S, Morishima K, Ui T, Matsubara D, Tamura T, Oguni S, Hosoya Y, Sata N, Lefor AT, Yasuda Y, Niki T. Stromal fibroblasts are predictors of disease-related mortality in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 32:348-54, 2014.
- 4) Matsubara D, Kishaba Y, Yoshimoto T, Sakuma Y, Sakatani T, Tamura T, Endo S, Sugiyama Y, Murakami Y, Niki T. Immunohistochemical analysis of the expression of E-cadherin and ZEB1 in non-small cell lung cancer. *Pathol Int* 64:560-568, 2014.

中田昌男

- 1) 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.
- 2) 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.
 - 3) 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* **8**: 237-42, 2013.
 - 4) 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* **27**: 515-22, 2013.
 - 5) Shimizu K, Okita R, Nakata M. Clinical significance of the tumor microenvironment in non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med* **2**: doi:10.3978/j.issn.2305-5839, 2013.
 - 6) Yasuda K, Nakata M, Nojima Y, Maeda A, Yukawa T, Saisho S, Okita R, Shimizu K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and Delta-like ligand 4 in small pulmonary adenocarcinoma. *Kawasaki Med J* **40**: 23-31, 2014.
 - 7) Yamagishi T, Shimizu K, Ochi N, Yamane H, Irei I, Sadahira Y, Takigawa N, Oka M, Nakata M. Histological comparison between preoperative and surgical specimens of non-small cell lung cancer for distinguishing between "squamous" and "non-squamous" cell carcinoma. *Diagn Pathol* **9**: doi: 10.1186/1746-1596-9-103, 2014.
 - 8) Shimizu K, Maeda A, Yukawa T, Nojima Y, Saisho S, Okita R, Nakata M. Difference in prognostic values of maximal standardized uptake value on fluorodeoxyglucose- positron emission tomography and cyclooxygenase-2 expression between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol* **12**: doi: 10.1186/1477-7819-12-343, 2014.
 - 9) Yukawa T, Shimizu K, Maeda A, Yasuda K, Saisho S, Okita R, Nakata M. Cyclooxygenase-2 genetic variants influence intratumoral infiltration of Foxp3-positive regulatory T cells in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* **33**: 74-80, 2015.
- 池田徳彦
- 1) Kudo Y, Miura H, Nakajima E, Takahash H, Aoki A, Ikeda N. “Chylothorax in POEMS syndrome” *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* **232**(1): 43-46, 2014
 - 2) Kimura H, Ohira T, Uchida O, Matsubayashi J, Shimizu S, Nagao T, Ikeda N, Nishio K*. “Analytical performance of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small -cell lung cancer” *Lung Cancer* **83**(3): 329-333, 2014
 - 3) Kajiwara N, Akata S, Hagiwara M, Yoshida K, Kato Y, Kakihana M, Ohira T, Kawate N*, Ikeda N. “High-Speed 3-Dimensional Imaging in Robot-Assisted Thoracic Surgical Procedures” *Ann Thorac Surg* **97**(6): 2182-2184, 2014
 - 4) Saji H*, Kato Y, Shimada Y, Kudo Y, Hagiwara M, Matsubayashi J, Nagao T, Ikeda N. “Three-dimensional multidetector computed tomography may aid preoperative planning of the transmanubrial osteomuscular-sparing approach to completely resect superior sulcus tumor” *Gen Thorac Cardiovasc Surg* in press: , 2014
 - 5) Kajiwara N, Barron JP, Kato Y, Kakihana M, Ohira T, Kawate N*, Ikeda N. “Cost-Benefit Performance of Robotic Surgery Compared with Video-Assisted Thoracoscopic Surgery under the Japanese National Health Insurance System” *Ann Thorac Cardiovasc Surg* in press: , 2014
 - 6) Fukuta K, Shimada Y, Hagiwara M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. “High-quality 3-dimensional imaging for patients with anomalous pulmonary veins” *Asian Cardiovasc Thorac Ann* in press: , 2014
 - 7) Hagiwara M, Shimada Y, Kato Y, Nawa K, Makino Y, Furumoto H, Akata S, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Saji H, Ikeda N. “High-quality 3-dimensional image simulation for pulmonary lobectomy and segmentectomy:

- results of preoperative assessment of pulmonary vessels and short-term surgical outcomes in consecutive patients undergoing video-assisted thoracic surgery†” *Eur J Cardiothorac Surg* 46(6): e120-6, 2014
- 8) Saji H*, Matsubayashi J, Akata S, Shimada Y, Kato Y, Kudo Y, Nagao T, Park J, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. “Correlation between whole tumor size and solid component size on high-resolution computed tomography in the prediction of the degree of pathologic malignancy and the prognostic outcome in primary lung adenocarcinoma” *Acta Radiol* in press: , 2014
- 9) Oikawa T, Ohira T, Otani K, Hagiwara M, Konaka C*, Ikeda N. “Clinical usefulness of gefitinib for non-small-cell lung cancer with a double epidermal growth factor receptor mutation” *Molecular and Clinical Oncology* in press: , 2014
- 10) vucic EA*, Usuda J*, Ishizumi T*, Ichinose S, Ohtani K, Inoue T*, Imai K, Furumoto H, Kudo Y, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. “Combination effect of photodynamic therapy using NPe6 with pemetrexed for human malignant pleural mesothelioma cells” *Int J Oncol* in press: , 2014
- 11) Nakamura H*, Suda T, Ikeda N, Okada M, Date H, Oda M, Iwasaki A. “Initial results of robot-assisted thoracoscopic surgery in Japan” *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 62(12): 720-725, 2014

鯉沼代造

- 1) Arase M, Horiguchi K, Ehata S, Morikawa M, Tsutsumi S, Aburatani H, Miyazono K, & Koinuma D. “Transforming growth factor-beta-induced lncRNA-Smad7 inhibits apoptosis of mouse breast cancer JygMC(A) cells” *Cancer Sci*, **105**: 974-982, 2014
- 2) Isogaya K, Koinuma D, Tsutsumi S, Saito RA, Miyazawa K, Aburatani H, & Miyazono K. ”A Smad3 and TTF-1/NKX2-1 complex regulates Smad4-independent gene expression” *Cell Res*, **24**: 994-1008, 2014

竹内賢吾

1. Hashimoto T, Fujimoto M, Nishikori M, Takeuchi K, Kimura M, Nakajima N,

Miyagawa-Hayashino A, Takaori-Kondo A, Haga H. Plasmacytic ALK-positive large B-cell lymphoma: a potential mimic of extramedullary plasmacytoma. *Pathol Int*. 2014;64:292-294.

2. Sakata S, Tsuyama N, Takeuchi K. Pathology of indolent B-cell neoplasms other than follicular lymphoma. *J Clin Exp Hematop*. 2014;54:11-22.
3. Nakada T, Okumura S, Kuroda H, Uehara H, Mun M, Takeuchi K, Nakagawa K. Imaging Characteristics in ALK Fusion-Positive Lung Adenocarcinomas by Using HRCT. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 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

「EML4-ALK 下流分子およびクリゾチニブ耐性機構の探索」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社のクリゾチニブは既に米国で承認・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、耐性期のみのサンプル5症例、感受性期とのペア検体がある3症例について検討を行った。また EML4-ALK 下流分子の同定のため、EML4-ALK によってチロシンリン酸化されるタンパクを複数同定した。

A 研究目的

肺がんは我が国及び欧米先進国におけるがん死数の第一位を占める予後不良の疾患であり、旧来の抗がん剤による化学療法で延命効果が証明された治療剤は少ない。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 阻害剤クリゾチニブについては、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ふ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クリゾチニブ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臨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。また確認のため、これらタンパクのチロシン残基をリジン残基に置換した YF 変異体を作成し、リン酸化レベルの変化を見た。

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、新たにクリゾチニブ耐性となった5症例、耐性期と感受性期が保存された3症例につ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、新規分子を同定した。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、EML4-ALKの標的となるアミノ酸残基が確認された。さらにこの分子に対するYF変異体を導入することで細胞の増殖が抑制されることがわかった。こうして本タンパクが、EML4-ALKの増殖シグナルにリンクし、セカンドメッセンジャーとして働くことが示された。

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。その結果、耐性期にのみ出現するアミノ酸置換として24種類が同定された。現在この遺伝子の点突然変異が、ALK阻害剤耐性におよぼす影響について機能解析を行っている。

D&E. 考察及び結論

EML4-ALKの下流分子として昨年度とあわせて2分子が明らかになり、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) Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T, Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Ichikawa M, Mano H and Kurokawa M. “Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML” *Nat Commun.* 2014; **5**: 4770.

- 2) 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 and Mano H. “Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation” *Leukemia.* 2014; **28**: 426-8.
- 3) Nakamura Y, Taniguchi H, Mizoguchi K, Ikeda T, Motoshima K, Yamaguchi H, Nagashima S, Nakatomi K, Soda M, Mano H and Kohno S. “Secondary EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma in a patient previously treated for acute lymphoblastic leukemia in childhood: a case report” *Jpn J Clin Oncol.* 2014; **44**: 593-6.

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。本年度は、肺癌細胞株を系統的に NOD/SCID マウスの皮下に接種し、ヒトの肺癌組織に類似した線維性間質、血管形成が誘導されること、上皮型と間葉型では、形成される腫瘍組織の線維性間質ならびに血管の構築パターン、チロシンキナーゼ、シグナル伝達分子、上皮間葉転換関連の転写因子などの発現・分布において相違があることを示した。また非小細胞肺癌症例の切除検体の解析により、大細胞癌、多形癌などの未分化な癌において、上皮間葉転換に関連した転写因子 Zeb1 の発現、ならびにクロマチンリモデリング因子 BRG1, BRM の発現喪失が高頻度にみられることを明らかにした。

A 研究目的

肺腺癌の分類は、現在組織像に基づいて行われているが、今後は、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、組織形態に加え、遺伝子異常、分化マーカー発現などの情報を結びつけた分類が、目指すべき方向性と考えられる。

これまでわれわれは、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き、肺腺癌を上皮型と間葉型に分類できることを報告してきた。上皮型の腺癌は、EGFR, MET の発現、リン酸化レベルが高く、CK7などの分化形質を高発現し、Laminin-5 など創傷治癒関連因子の発現が高い。これに対し間葉型では、EMT (epithelial-mesenchymal transition; 上皮間葉転換)形質を示し、EGFR, MET の発現は低い。EGFR, HER2, MET などの変異は上皮型に多く、間葉型には少ない。このように上皮型と間葉型では発癌進展の経路や分子標的が異なる可能性が考えられる。

本年度は、昨年度から引き続き肺癌細胞を系統的に NOD/SCID マウスに接種・解析する実験を行った。(1)腫瘍の組織形態、線維性間質 (cancer associated fibroblast; CAF)、血管形成などの腫瘍間質、(2)シグナル伝達分子、上皮間葉転換関連の転写因子、幹細胞マーカーの発現を解析し、上皮型と間葉型の間で比較した。また非小細胞肺癌症例の切除検体を用いた免疫組織学的な解析をあわせて行った。

B 研究方法

セルバンクから購入した肺癌細胞 40 種類を用いた。培養細胞を NOD/SCID マウスの皮下に接種

し、ホルマリン固定、パラフィン包埋標本を作製し、薄切後、ABC 法により、(1) 肺の上皮形質マーカー (Cytokeratin 7, MUC1), (2) チロシンキナーゼ受容体 (EGFR, p-EGFR, MET, p-MET), (3) 上皮間葉転換(EMT)関連因子 (E-cadherin, vimentin, ZEB1, laminin-5 γ 2), (4) 幹細胞マーカー (CD133, ALDH1, nestin), (5) クロマチンリモデリング因子 (BRG1, BRM, ARID1A), (6) 腫瘍間質のマーカーとして α -smooth muscle actin (CAF), CD31 (血管内皮), (7)シグナル伝達系として STAT3, p-STAT3, ERK, p-ERK), などを検討した。

非小細胞肺癌症例は、自治医科大学附属病院にて外科的に切除された 157 例(腺癌 93 例、扁平上皮癌 36 例、大細胞癌 18 例、多形癌 10 例)を対象とした。ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用い ABC 法により染色した。使用した抗体は、ZEB1 (Sigma), BRG1 (SantaCruz), BRM (Abcam), ARID1A (Sigma), ARID1B (Abnova), BAF47 (BD)である。

C 研究結果

NOD/SCID マウスの皮下接種実験では、上皮型と間葉型の間で組織構築の違いがあり、上皮型では乳頭状、管状、胞巣状、索状の組織像を示すのに対し、間葉型では髄様の組織像がみられた。 α -SMA (smooth muscle actin)に陽性を示す CAF (cancer associated fibroblast)は上皮型で多くみられ、線維性間質の形成と関連した。上皮型では広い線維性間質を伴った血管形成を示すのに対し、間葉型では膠原線維に乏しい細い血管軸からなる血管が形成された。そのほか、バイオマーカーの発現についての結果を要約すると、(1) p-EGFR, MET,

p-MET は培養細胞と同様、上皮型で発現が高い、(2)EMT 関連では、E-cadherin, Laminin-5 γ 2 は上皮型で高く、逆に vimentin, Zeb1 は間葉型で発現が高い、(3)幹細胞マーカーCD133, ALDH1, nestin の発現は、上皮型、間葉型で明らかな違いはみられない、(4)STAT3, p-STAT3, ERK, p-ERK の発現も、上皮型と間葉型で発現自体の大きな違いはないが、陽性細胞の分布に特徴を示す例が認められた。

次いで、非小細胞肺癌症例における発現解析を行った。上皮間葉転換に関連した転写因子 Zeb1 の発現は、腺癌、扁平上皮癌ではほとんどの症例で陰性だが、大細胞癌、多形癌などの未分化な癌においてはしばしば陽性となった(それぞれ 10%、50%)。クロマチンリモデリング因子 BRG1, BRM の発現喪失も同様に、大細胞癌と多形癌において高頻度に見られた。

D&E. 考察及び結論

本年度の研究により、上皮型と間葉型の肺癌細胞では、線維性間質、血管形成のような間質の構築、形成に違いのあることが明らかとなった。線維性間質は、CAF の誘導、形成と相関している。CAF, angiogenesis はともに癌の微小環境を形成する重要な因子であり、分子標的療法や化学療法を考えるうえでも、近年注目されてきている分野である。Xenograft では間質はマウス由来であることを考えると、ヒトとマウスという種の違いがあっても、癌細胞が上皮型と間葉型でそれぞれ特徴的な間質を形成する点は興味深い。現時点では、培養細胞、xenograft の遺伝子発現プロファイルの予備的な解析から、上皮型、間葉型で差次的な発現を示す遺伝子群が同定されており、そのなかには細胞間相互作用、転写、シグナル伝達に関連した遺伝子もいくつか含まれている。今後はこれら遺伝子をノックダウンあるいは強制発現することにより、ヒト-マウス間での癌間質相互作用を *in vivo* で規定している因子を同定したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) 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.
- 2) Ibrahim R, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Goto A, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Takai D, Nakajima J, Fukayama M, Niki T, Murakami Y. Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial mesenchymal transition. *Hum Pathol* 45:1397-1405, 2014.
- 3) Saito S, Morishima K, Ui T, Matsubara D, Tamura T, Oguni S, Hosoya Y, Sata N, Lefor AT, Yasuda Y, Niki T. Stromal fibroblasts are predictors of disease-related mortality in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 32:348-54, 2014.
- 4) Matsubara D, Kishaba Y, Yoshimoto T, Sakuma Y, Sakatani T, Tamura T, Endo S, Sugiyama Y, Murakami Y, Niki T. Immunohistochemical analysis of the expression of E-cadherin and ZEB1 in non-small cell lung cancer. *Pathol Int* 64:560-568, 2014.

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 シグナル研究は各種細胞内シグナル阻害剤の開発へと発展してきたが、腫瘍細胞の宿主免疫逃避機構に与える影響について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MICA/Bの発現調整を介して関与することが報告された。本研究では、非小細胞肺癌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のNKG2Dリガンド(MICA/B, ULBPs)発現に及ぼす影響ならびにNKG2Dリガンド発現制御を介したNK細胞からの免疫逃避への影響を解析する。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法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, ULBPs) の発現をフローサイトメトリー法で解析する。さらに非小細胞肺癌細胞株ならびに非小細胞肺癌患者より分離した腫瘍細胞を用いて、HER レセプター阻害、あるいは刺激下の 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 (5 種) に EGFR チロシンキナーゼ阻害剤暴露、HER レセプターのリガンド刺激を加えたうえで、腫瘍細胞上の NKG2D リガンド発現量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、悪性胸水より腫瘍細胞を採取し、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤暴露、HER レセプターのリガンド刺激を加えた上、腫瘍細胞上の NKG2D リガンド発現量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：非小細胞肺癌細胞株あるいは非小細胞肺癌手術患者より分離した腫瘍細胞を標的細胞、ヒト末梢血由来 NK 細胞を効果細胞とする。標的細胞に EGFR チロシンキナーゼ阻害剤あるいは HER レセプターのリガンドを加えた後、効果細胞と共培養し、NK 細胞傷害活性に与える影響を LDH 放出試験と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チロシンキナーゼ阻害剤はNKG2Dリガンド発現を抑制し、NK細胞傷害活性を減弱させた。一方、HER3陽性細胞株においてはHER3刺激によりNKG2Dリガンドの発現が増し、NK細胞傷害活性も増強した。手術検体由来腫瘍細胞を用いたNK細胞傷害活性の検討では、組織片から採取した腫瘍細胞が機能解析に適さないため、現在までに悪性胸水から腫瘍細胞を採取し、機能解析を行なう系を構築し、症例集積を再開した。

D&E. 考察及び結論

我々の解析により、HER familyシグナル阻害は、NKG2Dリガンドの発現を制御し、NK細胞による免疫監視機構からの逃避に関与すること、一方、HER familyシグナル刺激はNKG2Dリガンド発現を増強させ、NK細胞傷害活性をも増強させることが示唆された。今後、詳細なメカニズムの解析と、悪性胸水由来腫瘍細胞を用いた臨床検体における本現象の証明を行うことで、非小細胞肺癌の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HERシグナル標的療法の耐性克服や新規免疫療法の開発を目指す。

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, Hiramami 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.
- 2) Maeda A, Nakata M, Yasuda K, Yukawa T, Saisho S, Okita R, Hiramami 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.
- 3) Shimizu K, Yukawa T, Hiramami 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* **8**: 237-42, 2013.
- 4) Saisho S, Yasuda K, Maeda A, Yukawa T, Okita R, Hiramami 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* **27**: 515-22, 2013.
- 5) Shimizu K, Okita R, Nakata M. Clinical significance of the tumor microenvironment in non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med* **2**: doi:10.3978/j.issn.2305-5839, 2013.
- 6) Yasuda K, Nakata M, Nojima Y, Maeda A, Yukawa T, Saisho S, Okita R, Shimizu K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and Delta-like ligand 4 in small pulmonary adenocarcinoma. *Kawasaki Med J* **40**: 23-31, 2014.
- 7) Yamagishi T, Shimizu K, Ochi N, Yamane H, Irei I, Sadahira Y, Takigawa N, Oka M, Nakata M. Histological comparison between preoperative and surgical specimens of non-small cell lung cancer for distinguishing between "squamous" and "non-squamous" cell carcinoma. *Diagn Pathol* **9**: doi: 10.1186/1746-1596-9-103, 2014.
- 8) Shimizu K, Maeda A, Yukawa T, Nojima Y, Saisho S, Okita R, Nakata M. Difference in prognostic values of maximal standardized uptake value on fluorodeoxyglucose- positron emission tomography and cyclooxygenase-2 expression between lung adenocarcinoma

and squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol* **12**: doi: 10.1186/1477-7819-12-343, 2014.

- 9) Yukawa T, Shimizu K, Maeda A, Yasuda K, Saisho S, Okita R, Nakata M. Cyclooxygenase-2 genetic variants influence intratumoral infiltration of Foxp3-positive regulatory T cells in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* **33**: 74-80, 2015.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

「肺癌の EGFR チロシンキナーゼインヒビターの臨床的効果と
分子生物学的特性」に関する研究

分担研究者：池田徳彦 東京医科大学呼吸器・甲状腺外科学分野 主任教授

研究要旨：

肺癌に対する分子標的治療薬は、EGFR 遺伝子変異を認める腫瘍に対して効果的であることが知られている。しからながら、遺伝子変異を認めても効果が不良な患者を経験する。今回の研究では、臨床的な効果と腫瘍の分子生物学的な特性を検討した。耐性遺伝子の発現や高感度の検索法により同定困難な微量の Exon 20 の変異発現を検出することは臨床上有益であることが示唆された。

A 研究目的

EGFR チロシンキナーゼインヒビター (EGFR-TKI) の感受性は各種 EGFR 遺伝子変異や耐性に関係しているといわれているが、このうち MET や HGF の発現による影響を検討した。

B 研究方法

当院で手術を行い、術後に再発を認めたため薬物療法を施行した症例で、1次から3次治療までに EGFR-TKI による治療を行った 44 症例を対象に検討した。組織型は 43 例が腺癌で 1 例が大細胞癌であった。44 症例を臨床的な治療効果で以下の 3 群に分けた。i) 2 か月以上効果を示さなかった効果不良群、ii) 3-11 か月の効果を示した中間効果群、iii) 12 か月以上効果を示した長期効果群に分類し、EGFR 遺伝子変異のパターンと MET や HGF の発現との関係を検討した。研究材料には切除組織を用い、サイクリーブ法を用いて EGFR 遺伝子変異を検討し、MET および HGF の発現は、免疫染色を用いて検討した。

C 研究結果

効果不良群は4例、中間効果群が25例、長期効果群が15例であった。EGFR遺伝子変異では、Exon18遺伝子変異：1例、Exon19：23例、Exon20遺伝子変異：2例、Exon21遺伝子変異：16例を認めた。2例にExon20とExon21遺伝子変異を同時に認めた。治療効果を認めなかった効果不良群の4例中2例にExon20の遺伝子変異を認め、Exon19とExon21にそれぞれ遺伝子変異を認めた。Exon19に遺伝子変異を認めた症例

では、METが強く発現していた。Exon21の発現していた症例では、METの発現は認められなかったが、HGFの発現を認めた。Exon20と21に遺伝子変異を認めた2例は、長期効果群であった。

D&E. 考察及び結論

EGFRチロシンキナーゼインヒビターでは、Exon18,19,21にEGFR遺伝子変異を認めることが効果予測因子となっていることが知られている。しかし、耐性が発現して治療効果が失われることが臨床上的の問題であり、耐性の原因としては、Exon20に遺伝子変異を認めることやMETやHGFの発現が関係していることが示されてきている。今回、効果が不良であった4例では、Exon20に遺伝子変異を2例に認め、他の2例にMETあるいはHGFの発現を認めたことが効果不良に影響したものと考えられた。耐性遺伝子と言われるExon20とExon21に同時に遺伝子変異を認めた2例は、長期効果を示した。今回の遺伝子変異の検索はサイクリーブ法で行われており、高感度な方法のため微量のExon20に認めた変異を検出したものと推測された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kudo Y, Miura H, Nakajima E, Takahash H, Aoki A, Ikeda N. "Chylothorax in POEMS syndrome" *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 232(1): 43-46, 2014

- 2) Kimura H, Ohira T, Uchida O, Matsubayashi J, Shimizu S, Nagao T, Ikeda N, Nishio K*. “Analytical performance of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small -cell lung cancer” *Lung Cancer* 83(3): 329-333, 2014
- 3) Kajiwara N, Akata S, Hagiwara M, Yoshida K, Kato Y, Kakihana M, Ohira T, Kawate N*, Ikeda N. “High-Speed 3-Dimensional Imaging in Robot-Assisted Thoracic Surgical Procedures” *Ann Thorac Surg* 97(6): 2182-2184, 2014
- 4) Saji H*, Kato Y, Shimada Y, Kudo Y, Hagiwara M, Matsubayashi J, Nagao T, Ikeda N. “Three-dimensional multidetector computed tomography may aid preoperative planning of the transmanubrial osteomuscular-sparing approach to completely resect superior sulcus tumor” *Gen Thorac Cardiovasc Surg* in press: , 2014
- 5) Kajiwara N, Barron JP, Kato Y, Kakihana M, Ohira T, Kawate N*, Ikeda N. “Cost-Benefit Performance of Robotic Surgery Compared with Video-Assisted Thoracoscopic Surgery under the Japanese National Health Insurance System” *Ann Thorac Cardiovasc Surg* in press: , 2014
- 6) Fukuta K, Shimada Y, Hagiwara M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. “High-quality 3-dimensional imaging for patients with anomalous pulmonary veins” *Asian Cardiovasc Thorac Ann* in press: , 2014
- 7) Hagiwara M, Shimada Y, Kato Y, Nawa K, Makino Y, Furumoto H, Akata S, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Saji H, Ikeda N. “High-quality 3-dimensional image simulation for pulmonary lobectomy and segmentectomy: results of preoperative assessment of pulmonary vessels and short-term surgical outcomes in consecutive patients undergoing video-assisted thoracic surgery†” *Eur J Cardiothorac Surg* 46(6): e120-6, 2014
- 8) Saji H*, Matsubayashi J, Akata S, Shimada Y, Kato Y, Kudo Y, Nagao T, Park J, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. “Correlation between whole tumor size and solid component size on high-resolution computed tomography in the prediction of the degree of pathologic malignancy and the prognostic outcome in primary lung adenocarcinoma” *Acta Radiol* in press: , 2014
- 9) Oikawa T, Ohira T, Otani K, Hagiwara M, Konaka C*, Ikeda N. “Clinical usefulness of gefitinib for non-small-cell lung cancer with a double epidermal growth factor receptor mutation” *Molecular and Clinical Oncology* in press: , 2014
- 10) Yucic EA*, Usuda J*, Ishizumi T*, Ichinose S, Ohtani K, Inoue T*, Imai K, Furumoto H, Kudo Y, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. “Combination effect of photodynamic therapy using NPe6 with pemetrexed for human malignant pleural mesothelioma cells” *Int J Oncol* in press: , 2014
- 11) Nakamura H*, Suda T, Ikeda N, Okada M, Date H, Oda M, Iwasaki A. “Initial results of robot-assisted thoracoscopic surgery in Japan” *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 62(12): 720-725, 2014
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

分担研究者： 鯉沼 代造 東京大学大学院医学系研究科 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、TGF- β による EMT に伴い発現上昇する新規 noncoding RNA を同定し、その抗アポトーシス作用を見いだした。また組織特異的転写因子 TTF-1 (NKX2-1)による TGF- β -Smad シグナルの質的調節機構を ChIP-seq や RNA-seq により明らかにした。今後はがん細胞の上皮間葉転換をはじめとする悪性形質の制御の鍵となる分子の同定と作用機構解析を引き続き行う。

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 26 年度はこれまでに本研究課題で得られた知見を踏まえ、EMT に伴い TGF- β によって発現誘導される新規の noncoding RNA のがん細胞における役割を解析した。また網羅的 Smad3 結合部位及び遺伝子発現解析により、肺腺がん予後関連因子である、転写因子 TTF-1 (NKX2-1)の抗 EMT 作用のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

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まず乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞を用いた。この細胞で取得した RNA-seq のデータを元に EMT に伴い発現誘導される noncoding RNA を探索した。この遺伝子をクローニングして配列決定すると共に、その機能について EMT だけでなく乳がん細胞 JygMC(A)の TGF- β による抗アポトーシス作用に着目して gain of function、loss of function による解析を行った。

また肺腺がん細胞 H441 を用いて TGF- β 刺激時の Smad3 と Smad4 の結合部位を ChIP-sequencing により網羅的に同定した。その際に TTF-1 の発現を siRNA により抑制すること

で、その Smad 結合に与える影響を、TTF-1 の ChIP-sequencing データ及び RNA-sequencing と比較しつつ検討した。ChIP-sequencing や RNA-sequencing は確立している方法を用いてデータ取得を行った。

(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

NMuMG 細胞は TGF- β により EMT を起こすモデル上皮細胞である。この細胞で取得した RNA-sequencing のデータを元に、TGF- β により強く発現誘導される転写産物を既知の標的遺伝子 Smad7 のすぐ上流に同定した。この転写産物を RACE 法によりクローニングした結果、少なくとも 100 a.a. を超える ORF を有しないこと、また ES 細胞での報告から、long noncoding RNA (lncRNA) とされていることから、この遺伝子を lncRNA-Smad7 と名付けた。NMuMG 細胞でこの lncRNA に対する siRNA を用いても、明らかな EMT への影響を示さなかった。一方で TGF- β が抗アポトーシス作用を有するマウス乳がん細胞 JygMC(A) においては、この lncRNA の発現抑制によりアポトーシスが促進されること、またこの lncRNA を過剰発現させることにより TGF- β シグナル遮断によるアポトーシス誘導が部分的に抑えられることを見いだした。以上を論文報告した(Arase et al, Cancer Sci 2014)。

肺腺がん細胞 H441 は TTF-1 を発現しており、TGF- β による EMT が TTF-1 によって抑制されていることが分かっている。TTF-1 の強発現が核内において Smad3 と Smad4 の複合体形成を阻害したことから、Smad のゲノム結合への影響を探索した。H441 細胞での Smad3、Smad4、TTF-1 の ChIP-sequencing データの解析においては、それぞれの結合強度の定量的評価をおこなった。その結果、Smad3 と Smad4 の結合強度が TTF-1 によって強く制御されていることを見いだした。興味深いことにこのような制御は全ての Smad3 結合部位に起きるわけではなく、TTF-1 と共局在する部位においては認められなかった。Chromatin conformation capture 実験等を踏まえ、TTF-1 は TGF- β 刺激の無い状態で Smad3 と共にゲノム上で LMO3 をはじめ特別な標的遺伝子群の発現を制御していること、そして TTF-1 発現抑制により TGF- β の標的遺伝子群が Smad3 の結

合増強を伴って発現変動することを見いだした。以上を論文報告した(Isogaya et al, Cell Res, 2014)。

D&E 考察及び結論

本検討により肺腺がん予後規定因子である TTF-1 による TGF- β -Smad シグナル制御の破綻が、ゲノム上のそれぞれの転写因子結合分布の変化によって、Smad 標的遺伝子のサブセット特異的に行われ、それが TGF- β 作用の負の側面である EMT を引き起こすことが示唆された。TTF-1 は専らがん抑制因子として考えられてきたが、組織特異的ながん促進因子としての役割も有することが示唆されている。興味深いことに後者で重要とされる標的遺伝子 LMO3 は TGF- β 刺激非存在時の TTF-1 と Smad3 の標的遺伝子として今回同定されている。このことは TTF-1、TGF- β 両者のがん細胞に対する作用の二面性を理解する上できわめて重要な知見であると考えられた。

一方で lncRNA-Smad7 については、ヒトオルソログの探索の結果、該当するものは存在しないことが考えられた。今後は網羅的解析により得られた、他の標的遺伝子群の解析により、如何に TGF- β シグナルが肺がん細胞に利用されているか、その鍵となる機構をさらに明らかにすることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arase M, Horiguchi K, Ehata S, Morikawa M, Tsutsumi S, Aburatani H, Miyazono K, & Koinuma D. "Transforming growth factor-beta-induced lncRNA-Smad7 inhibits apoptosis of mouse breast cancer JygMC(A) cells" *Cancer Sci*, **105**: 974-982, 2014
- 2) Isogaya K, Koinuma D, Tsutsumi S, Saito RA, Miyazawa K, Aburatani H, & Miyazono K. "A Smad3 and TTF-1/NKX2-1 complex regulates Smad4-independent gene expression" *Cell Res*, **24**: 994-1008, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究者： 竹内賢吾 がん研究会がん研究所プロジェクトリーダー

研究要：ALK 陽性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（ALK+LBCL）における組織病理学的・分子病理学的診断精度の向上と分子標的治療への糸口の提供を目指すこととした。形質細胞腫との鑑別が問題となった症例，ALK+epiIMS との鑑別が問題となった症例，対照として ALK+epiIMS2 例が用いられた。形質細胞様の像を呈した症例に関しては，形質細胞腫としては病変分布，マーカー発現（CD4+），発症年齢（31 歳）などが非典型的であったことが ALK 検索の糸口となった。形質細胞腫と思われる症例に対して ALK の検索はなされないため，非定型例ないし研究的に連続診断例の形質細胞腫に対して ALK 発現の有無の再検討を行う必要性が示唆された。ALK+epiIMS との鑑別が問題となった例に関しては，形態学的に細胞像や背景の炎症性細胞浸潤所見，また発症部位（腹部）が共通し診断に難渋した。鑑別マーカーとして有用である可能性が示唆されたものは D2-40 と desmin であった。ともに対照例に陽性となり，ALK+LBCL では陰性となった。今後症例を蓄積し免疫染色等による鑑別が有効であるか検証する必要があると考えられた。

A. 研究目的

主任研究者らは 62 才男性肺腺がん患者外科切除検体より cDNA 発現レトロウィルスライブラリーを構築し，マウス 3T3 細胞を用いて形質転換フォーカスのスクリーニングを行った結果，新規がん遺伝子 *EML4-ALK* を発見することに成功した（Nature 448: 561-566）。これを受け，病理診断医である分担研究者らは，ALK 陽性肺癌の簡便な診断法として multiplex RT-PCR 法（Takeuchi K, et al., Clin Cancer Res. 2008;14:6618-6624），高感度免疫染色法 intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP)法（Takeuchi K, et al., Clin Cancer Res. 2009;15:3143-3149），FISH 法を開発した。

これらの診断法を用いて分担研究者は様々な腫瘍において，様々な ALK 融合遺伝子を同定してきた。すなわち，炎症性筋線維芽細胞腫における *PPFIBP1-ALK*（Takeuchi K, et al., Clin Cancer Res. 2011;17:3341-3348），腎癌における *TPM3-ALK*，*EML4-ALK*（Sugawara E, et al., Cancer. 2012;118:4427-44367），肺癌における *KIF5B-ALK*（Takeuchi K, et al., Clin Cancer Res. 2009;15:3143-3149），*KLC1-ALK*（Togashi Y, et al., PLoS One. 2012;7:e31323），*ROS1* 融合遺伝子 4 種および *RET* 融合遺伝子 2 種（Takeuchi K, et al., Nat Med. 2012;18:378-381），*HIP1-ALK*（Hong M, et al., J Thorac Oncol. 2014;9:419-422）を新規同定した。ALK 陽性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（ALK+LBCL）においては，*SQSTM1-ALK*（Takeuchi K, et al., Haematologica. 2011;96:464-467），*RANBP2-ALK*（Lee SE, et al., Hematol Oncol. 2014;32:221-224）を新規同定している。

ALK+LBCL は，1997 年 Delsol らにより ALK タンパク発現を見る大細胞型 B 細胞性リンパ腫として報告された。ALK 陽性 anaplastic large cell lymphoma におけるもっとも頻度が高い t(2;5)(p23;q35)*NPM-ALK* を欠き，当初は全長 ALK を発現していると推測された。しかしながら，2003 年 Gascoyne らが，これらの症例を含めた症例群を解析し，ALK+LBCL においても *ALK* 融合遺伝子が存在すること，およびその大半が *CTCL-ALK* であることを示した。ALK+LBCL は，現在までに 100 例ほどが報告されている。頻度が少ないことは事実であるが，病理診断が困難であり ALK+LBCL の診断に至らなかった例も多くあると推測される。その理由として，(1)形態学的にリンパ腫であることを想起しにくくリンパ腫を想定した検索がなされない，(2)上皮性マーカーを発現することがあり，その形態像とあわせて未分化癌，ALK 陽性癌（肺癌など），または ALK 陽性 epithelioid inflammatory myofibroblastic sarcoma(ALK+epiIMS)などと診断され，それ以上の検索がなされない，(3)B 細胞性リンパ腫であるにも関わらず，B 細胞性マーカー（CD20, CD79a, PAX5）の発現率が 10%内外の症例にとどまりリンパ腫の亜型分類まで至らない，(4)定義上，診断要件に必須である ALK はルーチンとして検索されない，などがあげられる。

本分担研究の今年度の目的は，(1)ALK+LBCL における病理診断上の問題点，特に形態学の多様性について明示すること，(2)ALK+LBCL において既知である *CLTC-ALK*，*NPM-ALK*，*SEC31A-ALK*，*SQSTM1-ALK*，および *RANBP2-ALK* 以外の ALK 融合遺伝子を同定することを通じて，その組織病理学的・分子病理学的診断精度の向上と分子標的治療

への糸口の提供を目指すことである。

B. 研究方法

形質細胞腫との鑑別が問題となった症例、ALK+epiIMSとの鑑別が問題となった症例、対照としてALK+epiIMS2例が用いられた。FISH、および抗ALK iAEP法免疫染色 (iAEP IHC) が行われた。ALK+epiIMSとの鑑別が問題となった症例には、免疫グロブリン重鎖遺伝子 (IGH)、kappa遺伝子 (IGK) に対するBIOMED-2準拠のPCR解析が施行された。ALK融合遺伝子の同定にはRACE法を用いた。

C. 研究結果

形質細胞腫との鑑別が問題となった症例は、31歳女性、1ヶ月来の腹痛で受診。径5cm大の腹部腫瘤が確認されたが、リンパ節腫脹は見られなかった。形態像からは形質細胞腫が想定されたが、免疫マーカーは、CD4、CD56、CD138、EMA、IgK、MUM1が陽性であった。ALKの免疫染色を施行したところ陽性であり、FISHにてALK遺伝子の再構成が確認された。

ALK+epiIMSとの鑑別が問題となった症例は46歳女性、1ヶ月来の下血、疲労、嘔吐、体重減少、下肢の浮腫で受診。径7cm大の肺腫瘤、3cm大の腹壁腫瘤、12cm大の回腸腫瘤が同定された。腸切除検体における細胞像は、中心に核小体を有する大型空胞状の核を有し、背景に高度の好中球浸潤を伴っていた。免疫マーカーはIgA、MYC、ALK、cytokeratin、CD30が陽性であった。FISH解析によりALK遺伝子の再構成が証明された。ALK+epiIMSとの鑑別が問題となり、IGH PCRを施行したが所見が得られず、IGK PCRによって monoclonal 再構成ピークを得た。D2-40 (podoplanin)と desmin は対照例に陽性となり、ALK+LBCLでは陰性となった。なお、本症例からはALK+LBCLでは知られていないALK融合遺伝子が同定された。

D. 考察&結論

ALK+LBCLの典型的組織像・マーカー所見は、空胞状類円形核の中心に大きな核小体を有する形質芽細胞様とされ、B細胞性マーカーを欠き、形質細胞性マーカー (CD138、免疫グロブリンなど) を発現するものとされる。この型に該当する腫瘍であっても、ALK+LBCLの認知度が低いためALKの検索がなされないことも多いのであるが、この型から外れる腫瘍に対し、ALKを検索する可能性はさらに低い。

形質細胞様の像を呈した症例に関しては、形質細胞腫としては病変分布、マーカー発現 (CD4+)、発症年齢 (31歳) などが非典型的であったことがALK検索の糸口となった。形質細胞腫と思われる症例に対してALKの検索はなされないため、非定型例ないし研究的に連続診断例の形質細胞腫に対してALK発現の有無の再検討を行う必要性が示唆される。

ALK+epiIMSとの鑑別が問題となった例に関しては、形態学的に細胞像や背景の炎症性細胞浸潤所見、

また発症部位 (腹部) が共通し診断に難渋した。マーカー所見でIgAが陽性となった。免疫グロブリンは特異性の高いB細胞性・形質細胞性マーカーであるが、免疫グロブリンは固定中に非特異的に非発現細胞に吸着する現象が知られており、非特異的に陽性所見が得られることがある。今回、対照例とした2例のepiIMSにおいても陽性となってしまう、実地診断の鑑別マーカーとしては使いにくいことが示唆された。鑑別マーカーとして有用である可能性が示唆されたものはD2-40と desminであった。ともに対照例に陽性となり、ALK+LBCLでは陰性となった。最終的に本例をALK+LBCLとした所見はIGK遺伝子の monoclonal な再構成所見が確認されたことによる。しかしながら、この解析は日常病理診断でルーチンに行われるものではないため、今後症例を蓄積し免疫染色等による鑑別が有効であるか検証する必要があると考えられた。

E. 健康危険情報

該当せず。

F. 研究発表

1. Hashimoto T, Fujimoto M, Nishikori M, Takeuchi K, Kimura M, Nakajima N, Miyagawa-Hayashino A, Takaori-Kondo A, Haga H. Plasmacytic ALK-positive large B-cell lymphoma: a potential mimic of extramedullary plasmacytoma. *Pathol Int*. 2014;64:292-294.
2. Sakata S, Tsuyama N, Takeuchi K. Pathology of indolent B-cell neoplasms other than follicular lymphoma. *J Clin Exp Hematop*. 2014;54:11-22.
3. Nakada T, Okumura S, Kuroda H, Uehara H, Mun M, Takeuchi K, Nakagawa K. Imaging Characteristics in ALK Fusion-Positive Lung Adenocarcinomas by Using HRCT. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず。