

201408007A

別紙1

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

(委託業務題目) クリニカルシーケンスによる肺腺がんの治療標的・  
抵抗性克服分子の同定に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 河野 隆志

平成27 (2015) 年 3月

委託業務成果報告書への標記について

委託業務に係る成果報告書の表紙裏に、次の標記を行うものとする。

本報告書は、厚生労働省の革新的がん医療実用化研究事業による委託業務として、河野隆志が実施した平成26年度「クリニカルシーケンスによる肺腺がんの治療標的・抵抗性克服分子の同定に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

委託業務成果報告書目次レイアウト

目 次	
I. 委託業務成果報告（総括）	
クリニカルシーケンスによる肺腺がんの治療標的・ 抵抗性克服分子の同定に関する研究	1
業務主任者 河野 隆志	
(資料1) 遺伝子解析倫理プロトコル	
(資料2) 説明同意文書	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. クリニカルシーケンスによる肺腺がんの治療標的・抵抗性克服分子 の同定に関する研究	33
担当責任者 河野 隆志	
2. 患者がん試料のin vivo, in vitro培養に関する研究	37
担当責任者 今井 俊夫	
III. 学会等発表実績	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷	41

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

クリニカルシーケンスによる肺腺がんの治療標的・  
抵抗性克服分子の同定に関する研究

業務主任者 河野 隆志 国立がん研究センター研究所分野長

研究要旨

本研究では、クリニカルシーケンス解析を基盤とし、機能的ゲノム解析を行い、現存抗がん剤治療では効果の見込めない進行肺がんの治療標的・抵抗性克服分子の同定を目指した研究を行う。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

①肺がんゲノム解析

国立がん研究センター研究所  
分野長 河野隆志(①担当責任者)  
国立がん研究センター中央病院  
外来医長 軒原浩  
国立がん研究センター早期・探索臨床  
研究センター  
科長 山本昇  
国立がん研究センター中央病院  
医長 古田耕  
国立がん研究センター中央病院  
医長 笹田真滋  
国立がん研究センター中央病院  
医長 蔦幸治  
国立がん研究センター東病院院  
科長 後藤功一  
国立がん研究センター臨床開発センタ  
ー  
ユニット長 石井源一郎  
国立がん研究センター早期・探索臨床  
研究センター  
医員 松本慎吾  
国立がん研究センター研究所  
部門長 加藤護

②患者がん試料のin vivo,in vitro  
培養

国立がん研究センター研究所  
施設長 今井俊夫(②担当責任者)  
国立がん研究センター研究所  
ユニット長 高橋真美  
国立がん研究センター研究所  
主任研究員 温川恭至

A. 研究目的

本研究では、クリニカルシーケンス解析を基盤とし、申請者らが築き上げた研究体制・微小試料に対するゲノム解析技術、さらに患者試料の先駆的培養技術を最大限に活用することで、現存抗がん剤治療では効果の見込めない進行肺がんの治療標的・抵抗性克服分子を同定する。具体的には、RET阻害剤治療への耐性獲得例、EGFR阻害剤既治療例から選出されたlong responder・自然耐性例、EGFR阻害剤治療への耐性獲得例、Pan-negative例の遺伝子変異profileを明らかにし、治療抵抗性獲得に伴い発出する遺伝子異常(ドライバー変異と考えられる)・Pan-negative例に生じる遺伝子異常(未知ドライバー変異が隠れている)を総合的に把握することで、進行肺がんの遺伝的特性を理解し、治療標的・抵抗性克服遺伝子を同定する。患者がん試料をin vivo, in vitro培養し、同定した分子の治療標的・抵抗性への関与の検証を行う。

B. 研究方法

3年間で、抗がん剤治療対象肺がんの治療関連遺伝子変異プロファイルを作成するとともに、治療耐性関連・克服分子、新規治療標的分子候補を同定し、薬剤投与実験で検証する。本研究で、進行肺がんの特性、分子標的治療不応・耐性獲得の分子基盤を理解し、肺がん難治性を克服するためのシーズを得る。本研究は、RET遺伝子融合を同定したゲノム解析研究者(河野ら)とLC-SCRUM等の遺伝子による個別化に基づく医師

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

主導治験を遂行する臨床研究者（後藤ら）、高率でのがん試料の先駆的培養技術を持つ専門家（温川ら）そしてゲノム情報生物統計家（加藤）の共同で進める。

平成26年度は、入手済のPan-negative例(n=100)のゲノム解析を行うとともに、抗RET耐性例、抗EGFR治療 long responder・自然耐性例(n=40)のゲノム解析を開始する。肺がん試料の培養を開始し、薬剤効果検証の体制整備を行う。

（倫理面への配慮）

研究対象者から同意を得た上で、検体は匿名化し、患者に不利益がないよう、プライバシーを厳守して行う。すべての研究は、「個人情報保護法」ならびに「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」「疫学指針」を遵守し、あらかじめ倫理委員会での承認手続きを行った上で進める。動物実験は、各研究機関の定める動物実験に関する規約に従って行い、動物の生命や苦痛に対して十分な倫理的な配慮を払って行う。遺伝子組換え実験についてはその計画書の機関承認を得て、遺伝子組換え実験安全管理規程に従って行う。

C. 研究結果

以下に示すように、計画通り、研究は進捗している。

①肺がんゲノム解析

入手済のPan-negative例のゲノム解析を行った。その結果、浸潤性粘液腺がん、NRG1, ERBB4, BRAFの遺伝子融合が存在することを明らかにした。NRG1融合については、浸潤非性粘液腺がん特異的に、また、女性喫煙者に多くみられ、HER2/HER3タンパク質を介したシグナル伝達を介して、がん化に寄与していることが見出された。HERタンパク質阻害薬であるラパチニブ、アファチニブが治療に有効である等

RET阻害薬耐性に関し、RET阻害薬バンデタニブ等に対し、治療抵抗性試料を収集するためのプロトコルを作成し、倫理審査委員会の承認を得た(資料1)。1例目のバンデタニブ獲得耐性症例試料のゲノム解析に着手した。

EGFR阻害薬治療例について、EGFR阻害薬で治療された全589例からがん組織が利用できる術後再発症例124例を選出した(資料2)。手術標本から抽出したDNAを用いて、50がん関連遺伝子の変異（アレル頻度4%以上）の解析に着手した。その結果、既存の候補遺伝子変化であるEGFR遺伝子の2次変異は1%未満であり、奏効期間を大きく規定するものでないことが分かった。そこで、ゲノム網羅的な解析、具体的には全エクソームシーケンス解析、DNAメチル化チップ解析、RNA及びmiRNA発現解析を行うため、DNA, RNAを抽出した。ホルマリン固定組織由来のRNAを用いた発現解析のため、分子カウンティング系のセットアップを行った。EGFR阻害薬のlong responderに関しては、さらに利用可能な検体のある症例が1000日以上奏効例では9例と少なかったことからlong responderの定義を2年以上と変更し、20例を選出した。

②患者がん試料のin vivo, in vitro培養

肺がん試料、手術症例、胸水試料の培養を開始した。現在、2例の肺がん組織のin vitro, in vivo(ゼノグラフト)培養に成功している。今後、融合陽性がんの培養を中心に、進めていく。

D. 考察

上記の体制で入手できる現時点で分子標的薬治療のないPan-negative例、RET阻害薬治療への耐性獲得例、そして全600 EGFR阻害剤治療例から選出されたlong responder・自然耐性例、EGFR阻害剤治療への耐性獲得例という貴重な症例をゲノム解析の対象とし、統合的な解析で治療標的・抵抗性克服分子を探索することが最大の特色、かつ独創的な点である。

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

米国では抗EGFR治療については耐性変化がいくつか同定されたものの、試料の制限から特にlong responseをもたらずメカニズムは全く不明である。そこで、これまで培った技術により、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）微小がん試料について、質の高いゲノム解析データを採取する。肺がん株の樹立効率が極めて低く、世界的に遺伝子融合やEGFR変異陽性例の研究用資材が乏しいことから、患者試料の培養に努める。これらが計画通り、進捗しており、成果が期待できると考える。

肺がんは我が国のがん死因の一位を占め、厚生労働行政上の重要克服課題である。本研究は「今後のがん研究あり方について」に記される、ゲノム情報を臨床及び臨床試験に活用するクリニカルシーエンスを行う体制から得られた知見・情報を、基礎研究へフィードバックするリバーストランレーショナル・リサーチにまさに合致し、保健医療上の要請に直接応えるものである。

#### E. 結論

クリニカルシーエンスに基づいて、進行肺がんの特性、分子標的治療不応・耐性獲得の分子基盤を理解し、肺がん難治性を克服するためのシーズを得る本研究は順調に進捗している。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, Shiraishi K, Sakamoto H, Enari M, Furuta K, Shimada Y, Ogiwara H, Watanabe SI, Nokihara H, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Ishigame T, Schetter AJ, Okayama H, Harris CC, Kim YH, Mishima M, Yokota J, Yoshida T, Kohno T\* (2014) Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma. *Clin Cance Res.* 20(12) :3087- 3093.

##### 2. 学会発表

○中奥敬史、蔦幸治、渡邊俊一、軒原浩、金永学、三嶋理晃、横田淳、河野隆志：Lung invasive mucinous adenocarcinoma (IMA)における治療標的となる新規遺伝子融合、第55回日本肺癌学会学術総会、京都、11月、2014年

○中奥敬史、市川仁、白石航也、坂本裕美、江成政人、荻原秀明、軒原浩、岡山洋和、金永学、三嶋理晃、横田淳、吉田輝彦、河野隆志：Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma、横浜、第73回日本肺癌学会学術総会：9月、2014年

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1. 特許取得

河野隆志・蔦幸治

国内・国際出願の各国移行：KIF5B遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子、並びに該融合遺伝子を標的としたがん治療の有効性を判定する方法（特願2011-171256 およびPCT/JP2012/069799）に関する各国移行

国際出願（未公開）：Novel fusion genes identified in lung cancer (61/867,921)

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(資料1) 研究実施計画書

RET 融合遺伝子等の遺伝子異常陽性肺がんにおける  
治療に対する耐性を規定する遺伝子の研究

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(以下、「指針」と略称)に定められた、研究計画書に記載すべき項目について以下に記し、この指針を遵守して本研究を実施する。

臨床研究代表者

河野 隆志

国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター TR 分野

国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野

〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

電話：03-3542-2511 (代表)

FAX：03-3545-3567

後藤 功一

国立がん研究センター東病院 呼吸器内科

〒277-8577

千葉県柏市柏の葉 6-5-1

電話：04-7133-1215 (事務局直通, FAX 兼用)

研究事務局

河野 隆志、中奥敬史

国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター TR 分野

国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野

山上須賀、加藤健

国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター

先端医療開発支援室

〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

電話：03-3542-2511 (代表)

FAX：03-3545-3567

後藤 功一、葉 清隆

国立がん研究センター東病院 呼吸器内科

〒277-8577

千葉県柏市柏の葉 6-5-1

電話：04-7133-1215 (事務局直通, FAX 兼用)

研究計画書の作成日：2014年 7月 2日 第1版

2014年 9月12日 第1.1版



## 目次

1. 背景と意義	3
2. 目的	6
3. 研究の内容	6
3- 1. 研究内容の概略図	6
3- 2. 研究期間	7
3- 3. 試料提供者の適格性基準	8
3- 4. インフォームド・コンセント	8
3- 5. 提供試料	9
3- 6. 登録予定症例数	9
3- 7. オミクス解析法	9
3- 8. 登録と個人情報の保護の方法、遺伝情報の安全管理の方法	10
3- 9. 試料の保管	11
3- 10. 臨床情報の収集、種類	11
4. 研究実施場所	11
5. 研究責任者および研究分担医師	12
5- 1. 研究責任者	12
5- 2. 研究分担者	13
6. 被験者の利益と不利益	14
6- 1. 被験者の利益	14
6- 2. 被験者の不利益	14
7. 資料提供者の費用負担	14
8. 既存試料の使用	14
9. 被験者への遺伝情報の開示	14
10. 試料・情報の廃棄の方法	15
11. 残余検体の他の研究への利用	15
12. 外部機関への解析委託	15
13. ヒト細胞・遺伝子・組織バンクへの試料の提供	15
14. 遺伝カウンセリング	15
15. 研究に要する費用	15
16. 利益相反について	16
17. 研究成果の発表	16
18. 研究から生じる知的財産権の帰属	16
19. 引用文献	16

## 1. 背景と意義

チロシンキナーゼ阻害剤 (Tyrosin kinase inhibitor: TKI) による分子標的治療の有効性により、悪性腫瘍の治療は劇的に変化し、腫瘍の遺伝学的な特性の解明することの重要性が証明された。非小細胞肺癌において EGFR 変異や ALK 融合を標的とする Gefitinib、Erlotinib や Crizotinib は高い奏効性を示し、標的治療の成功例となった[1-3]。一方で、奏効を認めていた症例も治療経過中にほぼ全例で耐性を獲得し、再増悪することが問題となっている。実際に、EGFR 変異もしくは ALK 融合陽性患者に対する EGFR-TKI もしくは ALK-TKI の治療において、無増悪生存期間中央値は 1 年に満たない[4-8]。また、一部の症例では、活性型遺伝子異常を有するにもかかわらず、TKI に対して内因的に耐性を示す症例があることも知られている[9]。

そうした中、新規融合遺伝子 KIF5B-RET が肺腺がんの約 2% に存在することが見出され、RET のキナーゼを標的とした TKI に感受性を示すことが報告された[10-12]。この結果を受け、本邦において RET 融合陽性肺癌患者を対象に Vandetanib (ZD6474) の治療効果を評価する第 II 相臨床試験が開始されている[13]。また、米国においては Cabozantinib (XL184)、Lenvatinib (E7080)、Ponatinib (AP25434) の治療効果を調べる第 II 相臨床試験が開始されている[13,14]。加えて、最近実地臨床においても Vandetanib の治療効果が認められた RET 融合遺伝子陽性肺癌の症例も報告されている[15]。また、ROS1 融合、BRAF 遺伝子変異など、他のがん遺伝子異常に対する臨床試験も開始されている。

RET 融合陽性例等に対する分子標的治療の効果が期待されているが、EGFR 変異や ALK 融合陽性例に対する TKI 治療で得られた経験から、RET 融合陽性例等においても同様に治療耐性の出現が予想されている。耐性は、以下に述べるように多様性に富んでおり、治療効果をより高めるため、耐性の分子機構の解明とその克服に向けた治療法の開発が求められている。

### 【耐性の種類】

分子標的治療に対する耐性は自然耐性と獲得耐性に分類される。自然耐性は内因的に初めから治療への感受性が認められないことを指し、獲得耐性は治療経過中に耐性機序を獲得し、再増悪することを指す。

### 【自然耐性】

EGFR-TKI に対する自然耐性の機序は多くは知られていない。多様な EGFR 変異の様式が、多様な TKI への反応性をもたらす要因であることが示唆されている。TKI へ奏効を示す Exon 19 欠損や L858R 変異に比較し、Exon 20 挿入・重複 (EGFR 変異の 4% 未満) は EGFR-TKI に対する耐性を示すことが報告されている[16,17]。また、EGFR キナーゼドメイン内の T790M 変異[18] や MET 増幅[19,20] などの 2 次的な遺伝子異常が、予め生じていることも自然耐性に関連していることが知られている。

ALK 融合陽性例の一部には、Crizotinib 治療開始直後にもかかわらず耐性を示し、病状の進行を経験する症例がある。ALK の融合様式には、EML4 の切断点も多様なバリエーションが存在しており、5'側の融合パートナーも多岐に渡る。Heuckmann らによると、in vitro で Crizotinib の感受性の違いは EML4-ALK の融合バリエーションや 5'融合パートナーにより異なっていることが報告されている[21] (\*なお、Crizotinib の Phase I 試験におけるサブグループ解析では EML4 のバリエーションと感受性の間には相関は認められなかった[7])。

### 【獲得耐性】

獲得耐性の機序は 2 つに分類される (表 1)。1 つは、元々の driver oncogene 内に、2 次変異や増幅などの更なる遺伝子異常が生じ、それにより持続的な下流シグナルの活性化が起こるこ

とである[22]。もうひとつは、driver oncogene とは独立した遺伝子変化が細胞内に生じ、下流シグナルのバイパスの活性化、組織変化や薬剤代謝変化により、耐性が生じることである[23]。

表1 :主な獲得耐性の機序

機序	頻度 (%)	参考文献
EGFR TKI 耐性		
Genetic alterations in <i>EGFR</i>		
T790M 変異	50	24
D761Y, T854A, and L747S 変異	< 5	25, 26, 27
<i>EGFR</i> 増幅	8	18
バイパス経路活性化		
<i>MET</i> 増幅	5-22	20, 24
<i>HER2</i> 増幅	12	28
<i>PIK3CA</i> 変異	5	24
<i>BRAF</i> 変異	1	29
<i>CRKL</i> 増幅	9	30
HGF 過剰発現	1 of 2 cases	31
形態変化		
小細胞肺癌への形質変化	3-14	24
ALK TKI 耐性		
ALK 遺伝子異常		
<i>ALK</i> 2 次変異 (eg, L1196M)	22-36	32-35
<i>ALK</i> 増幅	7-18	34, 35
バイパス経路活性化		
<i>EGFR</i> 活性化	44	34
<i>KIT</i> 増幅	15	34

参考文献9より

## 1. 2次変異

EGFR 変異における獲得耐性例では、EGFR Exon20 の codon 790 の gatekeeper 残基にスレオニンからメチオニンに置換する2次変異が少なくとも50%に認められ、耐性に至る最大の原因となっている[24]。EGFR に Exon 19 欠損や L858R などの変異が起こると、受容体への ATP 結合能が低下するため、競合型 TKI の結合能が高まり、感受性が得られる。しかし、T790M 変異が起こると野生型程度まで ATP の結合能が回復し、TKI に比べ ATP がより結合しやすくなり、TKI の効果が減弱する[36]。また、T790M に比べて稀であるが、D761Y、T854A、L747S といった2次変異がTKI の獲得耐性に関連していることが報告されている[25-27]。

ALK 融合陽性例における2次変異は Crizotinib 耐性の約30%で見ついている[32-35]。Choiらは、5ヶ月の Crizotinib 治療後に再増悪した ALK 陽性肺がん患者を報告しており[32]、この患者から得られた胸水を解析した結果、2つの重複のない ALK キナーゼドメイン内の変異：L1196M、C1156Y が見つかった。in vitro で検証したところ、それぞれ独立した Crizotinib 耐性の原因となっていた。その内、L1196M 変異は、EGFR における T790M 変異と同様に、ALK の gatekeeper 残基に起こる変異であった。それ以降も ALK キナーゼドメイン内の2次変異（I1151Tins、L1152R、

G1202R、S1206Y、G1269A) が相次いで報告されている[33-35]。ALK の 2 次変異はキナーゼドメインに広く分布しており、可溶性 front (G1202R, S1206Y) や gatekeeper (L1196M)、ATP binding pocket (G1269A)、 $\alpha$ C-helix (1151Tins, L1152R) に認められる[33-36,40]。Katayama らは、in vitro で ALK の 2 次変異の差異が、Crizotinib に対する感受性の差異に関連していることを報告している[34]。例えば、ALK S1206Y 変異は G1202R、L1196M、1151Tins 変異に比較し、Crizotinib に対する耐性の程度は低い。加えて、ALK 融合陽性例が TKI 耐性になると、複数の 2 次変異が、単独もしくは複数生じ得ることも特記すべきで、EGFR 変異例では T790M 変異がほぼ唯一の 2 次変異であることは対照的である。

## 2. 遺伝子増幅

キナーゼ遺伝子の増幅はキナーゼと TKI の間のバランスをキナーゼ側に傾けることで、耐性に働く。EGFR-TKI へ耐性のある 37 人の EGFR 変異患者においては、EGFR 増幅は 3 人(8%)に認められた報告がある[18]。ALK 融合の増幅も Crizotinib 耐性の原因として知られている[34,35,38]。

## 3. バイパスシグナルの活性化

EGFR-TKI 耐性はバイパスを介したシグナル経路の再活性化によっても惹起される。その中でも有名なものは MET 増幅である[20,39]。MET 増幅は、EGFR-TKI 耐性の 22%に認められ、ERBB3 を経由する PI3K/AKT シグナルの活性化により、EGFR をバイパスし、下流シグナルを活性化させる[20]。MET のリガンドである HGF の過剰発現活によっても耐性は引き起こされる[31]。他のバイパス経路として、HER2 増幅[28]、PIK3CA 変異[18]、BRAF 変異[29]がそれぞれ、3/26 例(12%)、5%、1%に認められている。

ALK 融合陽性非小細胞肺癌においては、Crizotinib 耐性の一つの機序として EGFR の同時活性化が起こっていることが in vitro の実験から分かってきた[33,34,40]。その他、リガンドである EGF[40]や amphiregulin[34]の過剰発現も耐性に寄与している。Doebele らは、ALK 陽性肺癌に対して Crizotinib にて治療を行い、その後再度生検を行うと、EGFR 変異を有していることがわかり、一方で ALK は FISH にて陰転化していた症例を報告した[35]。この報告では、耐性獲得後には KRAS 変異も生じていた。また、他の経路として KIT 増幅も 2/13 例(15%)に見つかっており、耐性へのバイパス経路と考えられている[34]。

## 4. その他の機序

EGFR 変異および ALK 融合陽性例において、原因不明の TKI 耐性を示す群が存在している。in vitro の実験では、insulin growth factor receptor signaling [41]や NF- $\kappa$ B 活性化[42]や PTEN loss[43]などの関連性も示唆されている。ALK 陽性患者においては、ALK 融合遺伝子自体の消失が耐性に関与していることも報告されている[36]。加えて、耐性は薬物動態による要因も考えられている。TKI は経口剤であり吸収不良や、他の薬剤との相互作用による効果の減弱の可能性も考慮される。最近、Crizotinib より ALK キナーゼに対しておよそ 20 倍有効性が高いとされる、Ceritinib (LDK378) は、ALK 耐性として挙げられる、L1196M、G1269A、1151Tins、S1206Y の 2 次変異や ALK 増幅例に対しても、有効性が認められたことが報告された[44]。

## 5. 耐性の不均一性

一つの腫瘍検体内に、複数の異なった耐性機序が存在していることが知られている。また、同一患者内で、離れた腫瘍検体から異なった耐性機序が見つかることもあることもあり、耐性獲得の過程は heterogeneous であることを考慮する必要がある[18,32,33]。

### 【RET 融合遺伝子等陽性の非小細胞肺癌に対する治療薬の開発】

平成 25 年 1 月より国立がん研究センター東病院を研究事務局に「RET 融合遺伝子等の低頻度の遺伝子変化陽性肺癌の臨床病理学的、分子生物学的特徴を明らかにするための前向き観察研究」が開始され、全国の研究協力施設から提出された臨床検体の遺伝子解析を行い、肺癌の原因遺伝子として RET および ROS1 融合遺伝子や BRAF 変異等が陽性の肺癌を特定し、その臨床病理学的、分子生物学的特徴を明らかにする研究が進んでいる。

また、国立がん研究センター東病院を事務局とし、平成 24 年度より厚生労働科学研究の臨床応用基盤研究事業として、「RET 融合遺伝子陽性の進行非小細胞肺癌に対する新規治療法の確立に関する研究」が開始されている。この医師主導治験は、国立がん研究センター東/中央病院、がん研究会有明病院、静岡がんセンター、兵庫県立がんセンター、四国がんセンター、九州がんセンターの 7 施設で実施され、「RET 融合遺伝子等の低頻度の遺伝子変化陽性肺癌の臨床病理学的、分子生物学的特徴を明らかにするための前向き観察研究」で RET 融合遺伝子などが陽性と判明した進行肺癌が登録され、バンデタニブなどの種々の分子標的治療薬の治療効果を調べる臨床試験が行われている。また、他の RET 阻害剤の企業治験や ROS1 遺伝子融合陽性肺癌に対する ROS1 阻害剤や BRAF 変異陽性肺癌に対する BRAF 阻害剤の臨床試験も開始されている。

## 2. 目的

本研究は、「RET 融合遺伝子等の遺伝子変化陽性の肺癌」に対して遺伝子異常に基づいた分子標的治療を行い、自然耐性および治療過程で獲得耐性を示した症例を対象に、耐性を規定するメカニズムを分子レベルで明らかにし、耐性を克服することを目的とする。

## 3. 研究の内容

### 3-1. 研究の概略

「RET 融合遺伝子等の低頻度の遺伝子変化陽性肺癌の臨床病理学的、分子生物学的特徴を明らかにするための前向き観察研究」や治験治療などにおいて遺伝子異常が同定され、分子標的治療を受けた肺癌患者の診療残余試料を用い、オミクス解析を行う。国立がん研究センター病院で診療を受け、包括的同意制度により既存検体の研究利用について同意の得られている症例については、バイオバンク試料（診療残余試料と研究用血液試料）を解析に供する。

### 3-1. 研究内容の概略図

図 1：研究内容の概要

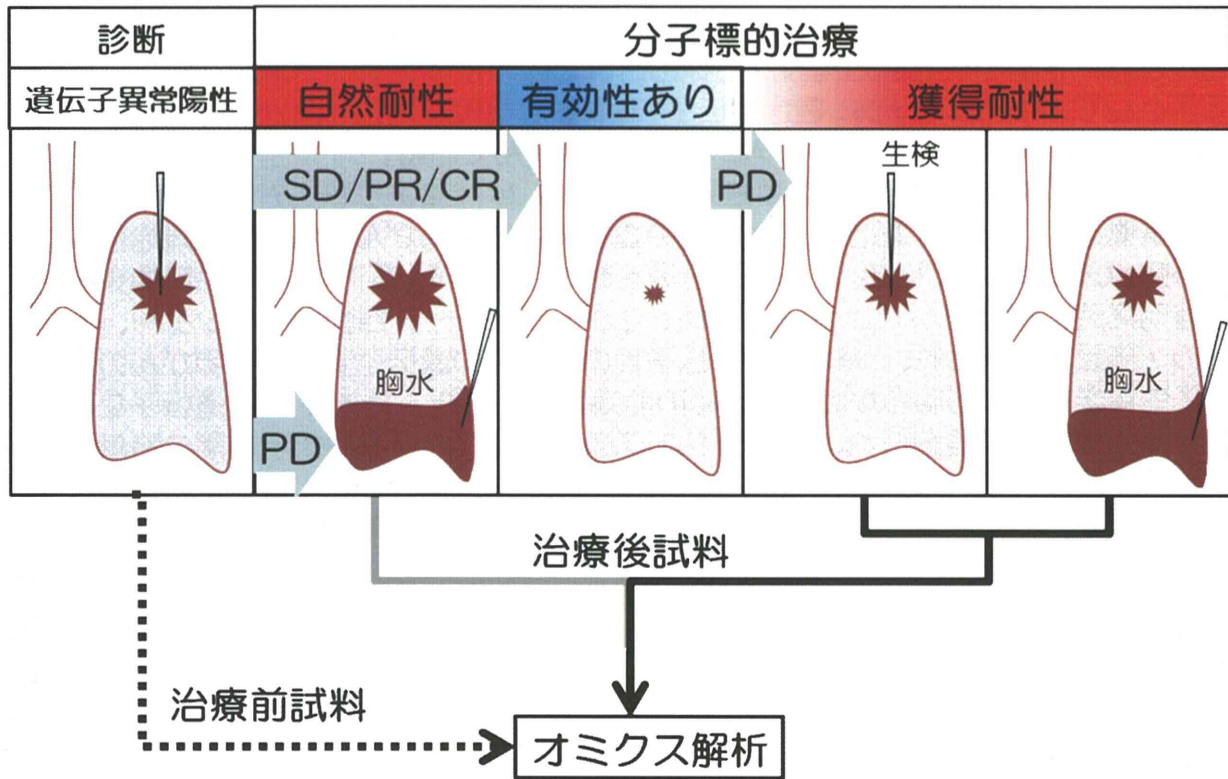
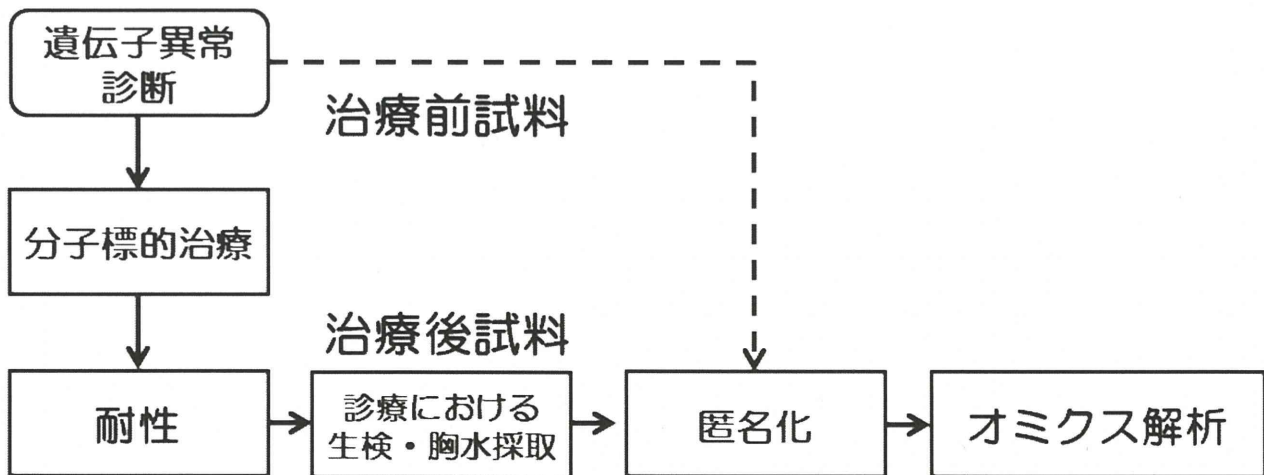


図 2：研究内容のパイプライン



### 3-2. 研究期間

研究許可日から平成 31 年 3 月 31 日までとする。ただし、研究の進行状況等により延長する場合がある。

### 3-3. 試料提供者の適格性基準

下記の全てを満たす成人患者を登録可能とする。

- ① 治療標的となる遺伝子変化陽性の肺がんと診断されている。
- ② 遺伝子異常に対する分子標的治療薬による治療を行った。
- ③ 分子標的治療薬に対して自然耐性もしくは獲得耐性を示し、診療において再増悪してきた病変部より組織もしくは胸水を採取し、保管している。

### 3-4. インフォームド・コンセント

本研究の実施にあたり、診療残余試料の使用について、可能な限り、当センターおよび共同研究医療施設の担当医師は対象となる患者に説明同意文書にもとづき、事前に本研究の意義、目的、方法、予測される結果や不利益などについて下記の項目に従って説明し、患者の自由意思による同意を文書にて得る。同意文書の写しは患者に渡し、原本はカルテ内に保管する。

- ① 研究とこの説明文書について
- ② 参加の自由について
- ③ 治療における耐性について
- ④ この臨床研究の対象となる方の病状に関して
- ⑤ この研究の意義と目的について
- ⑥ この研究の方法について
- ⑦ この研究全体の実施予定期間と参加いただく患者さんの数について
- ⑧ この研究への参加により予想される利益と不利益について
- ⑨ 遺伝情報の開示について
- ⑩ 負担する費用について
- ⑪ 個人情報の取り扱いについて
- ⑫ 検体の取り扱いについて
- ⑬ 残った検体の保存と、将来の研究への利用について
- ⑭ 治療前の検体の使用について
- ⑮ 研究成果の公表について
- ⑯ 遺伝カウンセリングについて
- ⑰ この研究の資金と利益相反について
- ⑱ この研究の倫理審査について
- ⑲ 研究組織について
- ⑳ 研究事務局および、当施設での連絡先

ただし、国立がん研究センター病院で診療を受け、包括的同意制度により既存検体の研究利用について同意の得られている症例については、新たに同意を取得せず、本研究のため、バイオバンク試料（診療残余試料と研究用血液試料）を研究に用いる。これらの試料は以下の試料より成る。①それぞれ2011年5月13日、2011年6月13日以降に採取され国立がん研究センター中央および東病院において「診療目的で採取された血液・組織などの医学研究への利用と研究用採決へのご協力をお願い（新包括同意）」及び②2002年1月からそれぞれ2011年5月12日、2011年6月12日までに採取され国立がん研究センター中央および東病院において遺伝子解析研究での利用を明示した「検査試料、生検組織、摘出標本などの研究利用についての意思表示書」で同意が表明されている試料。

対象者が治療を終了している、もしくは、死亡している等の理由で、同意取得が困難である場合、あらためて同意を取得せずに行う。その理由を以下に挙げる。(ア) 当該研究は、肺がん治療における治療耐性に関わる遺伝子の解析に限定されるため提供者等に危険や不利益が及びおそれが極めて少ない。(イ) 当該研究は肺がんの治療耐性に関わる遺伝子を同定・克服すると



いう医学向上に必要な研究である（ウ）他の方法ではこのような貴重な症例の収集が難しく、事実上、当該研究の実施が不可能である。（エ）当該研究の実施状況について国立がん研究センター等参加施設のホームページ上で情報の公開を行い、併せて提供者又は代諾者等に問合せ及び試料・情報の研究への利用の拒否をする機会を保障するための情報も提示する。

### 3-5. 提供試料

オミクス解析が可能であれば検体の形式は問わない。診療残余試料としては、ホルマリン固定パラフィン包埋された生検試料、胸水等の液状検体などが想定される。

試料の分譲は行わない。共同研究機関からは、3-8に記すように、個人情報除かれ、症例登録番号の付された試料の提供を受ける。

### 3-6. 登録予定症例数

上記の適格規準を満たす 100 例程度を対象とする。この例数は、研究期間内に参加施設が「RET 融合遺伝子等の低頻度の遺伝子変化陽性肺がんの臨床病理学的、分子生物学的特徴を明らかにするための前向き観察研究」や治験等のために遺伝子検査を行う 2000 例の 10% に治療標の変異が同定され、その 1/2 が治験治療を受けると想定した数に相当する。

### 3-7. オミクス解析法

治療後試料は、遺伝子異常に基づいた分子標的治療に対して耐性を示した肺がん検体から RNA/DNA を抽出しオミクス解析に用いる。また、免疫組織化学染色等のタンパク質の解析を行う。

抽出した RNA/DNA は、エクソームシーケンシング、トランスクリプトームシーケンシングなどの解析を行うことにより、耐性の原因となる遺伝子異常や BIM 欠損多型などの遺伝子多型を検索する。解析対象遺伝子は表 2 に示すがん遺伝子、がん抑制遺伝子、DNA 修復遺伝子、クロマチンリモデリング遺伝子などである。なお、本研究では、昨今急速に開発されるゲノム解析技術、膨大な公開がんゲノム情報、学術誌・学会等で公表される情報等を利用して、柔軟かつ効率的に探索的研究を遂行していく。なお、本研究では、遺伝子多型は薬剤耐性に関連した遺伝子に関わると考えられるもののみを対象とし、網羅的な解析は行わない。

表 2. 検索対象のがん関連遺伝子

ABL1	BIM	EGFR	FLT3	KRAS	NOTCH1	PTCH1	SMO
AKT1	BRAF	ENO1	HRAS	MAP2K1	NOTCH2	PTEN	STAT3
AKT2	BRCA1	EP300	IDH1	MAP2K4	NOTCH3	RAC1	STK11
AKT3	BRCA2	ERBB2	IDH2	MAP3K1	NRAS	RAC2	TP53
ALK	CCND1	ERBB3	IGF1R	MAP3K4	NRG1	RAD51C	TSC1
APC	CDK4	ERBB4	IGF2	MDM2	NT5C2	RAF1	VHL
ARID1A	CDKN2A	EZH2	IL7R	MET	PALB2	RB1	-
ARID2	CHEK2	FBXW7	JAK1	MTOR	PBRM1	RET	-
ATM	CREBBP	FGFR1	JAK2	MYC	PDGFRA	ROS1	-
AXIN1	CTNNB1	FGFR2	JAK3	MYCN	PDGFRB	SETD2	-
BAP1	CUL3	FGFR3	KEAP1	NF1	PIK3CA	SMAD4	-
BARD1	DDR2	FGFR4	KIT	NFE2L2	PIK3R1	SMARCA4	-



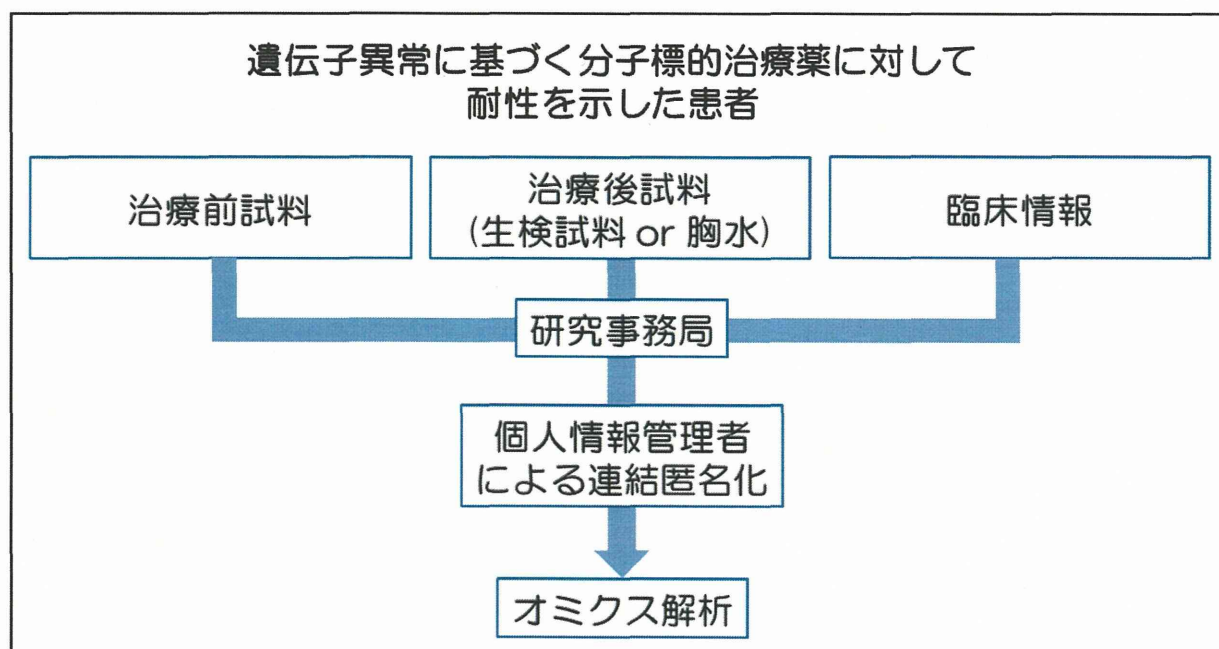
耐性に関わると考えられる分子やその周辺経路分子の発現動態を調べるために、免疫組織化学染色等のタンパク質の解析を行う。また、FISH 法による遺伝子増幅や遺伝子融合などのゲノム変化を調べる。新鮮な残余試料が入手できた際には、がん細胞を in vitro および in vivo で増殖させ、オミクス解析とともに同定されたゲノム異常と増殖・浸潤・転移等がんの特性や抗がん剤治療等への応答性との関係を生物学的に検証する。

### 3-8. 登録と個人情報の保護の方法、遺伝情報の安全管理の方法

試料や、診療録等から収集する診療情報などの個人情報は、文部科学省、厚生労働省、経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき、適用研究における個人情報取り扱い細則に定めるゲノム研究個人情報管理者が連結可能匿名化並びにその対応表を管理し、研究者は研究事務局を通じ、ゲノム研究個人情報管理者に委託する。具体的には、本研究に登録された時点で、まず当センターおよび共同研究機関の共同研究者により、試料及び臨床情報に症例登録番号がふられ、個人情報が除かれる。その後、試料及び臨床情報は国立がん研究センター内研究事務局に収集され、直ちにセンター内個人情報管理室の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に定める個人情報管理者により連結可能匿名化される。オミクス解析研究者は、個人情報管理者により匿名化された試料及び臨床情報を取り扱う。個人情報管理者は情報の管理を、ネットワークに繋がっていない専用のコンピューター上で行う。よって、個人情報の付帯した遺伝情報が漏えいする危険はない。

遺伝子解析担当研究者は、当センター研究所内のパスワードで保護されたコンピューター上で遺伝子情報を管理・解析する。物理的措置として、国立がん研究センターは、部外者の入館が厳しく管理され、ファイアーウォール等の措置により、外部からのコンピューターへの違法侵入を防いでいる。

図3：個人情報および臨床情報の匿名化の流れ



### 3-9. 試料の保管

試料は、国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センターや研究所の-80℃冷凍庫、液体窒素タンクに保管される。これらの組織から抽出された DNA、RNA、タンパク質なども同様に保管される。

### 3-10. 臨床情報の収集、種類

本研究では、分子標的治療の経過における再増悪の様式とそれに至るまでの治療経過および期間、その他、患者の基本的な治療関連情報(年齢、性、喫煙等)や阻害剤治療開始前の診療情報などの臨床情報を収集する。

また、「RET 融合遺伝子等の低頻度の遺伝子変化陽性肺がんの臨床病理学的、分子生物学的特徴を明らかにするための前向き観察研究」などの先行する個別研究で収集され、副次的な研究で情報を2次利用することが同意されている臨床情報を用いる。

#### \*本研究で収集する臨床情報

受診した医療機関名、生年月日、性別、年齢、肺がんの組織型および遺伝子異常、喫煙歴、検体の採取部位、検体の採取方法、治療経過、また、必要な場合には、治療を開始する前の臨床経過等

## 4. 研究実施場所

オミクス解析は国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター、研究所で行う。  
本研究内容(下記①～⑧)を以下のとおり分担する。

- ① 説明と同意
- ② 登録
- ③ 臨床情報の収集
- ④ 試料の採取
- ⑤ 個人情報の匿名化
- ⑥ オミクス解析
- ⑦ 候補遺伝子の機能解析
- ⑧ オミクス解析情報と臨床情報の関連解析
- ⑨ 病理解析

国立がん研究センター東病院 呼吸器内科：①②③④

研究支援病院：①②③④

国立がん研究センター中央病院 個人情報管理室：⑤

国立がん研究センター早期探索臨床研究センター、研究所：⑥⑦⑧

国立がん研究センター中央病院 病理検査科：⑨

国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 臨床腫瘍病理分野：⑨

## 5. 研究責任者および研究分担医師

共同研究組織においては、研究への参加にあたり、本研究の実施に関して各施設の倫理審査委員会の承認を受けることを必須とする。

### 5-1. 研究責任者

研究代表者

河野 隆志

国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター TR 分野

国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野

〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1  
電話：03-3542-2511（代表）  
FAX：03-3545-3567

後藤 功一  
国立がん研究センター東病院 呼吸器内科  
〒277-8577  
千葉県柏市柏の葉 6-5-1  
電話：04-7133-1215（事務局直通，FAX 兼用）

#### 研究事務局

河野 隆志、中奥 敬史  
国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター TR 分野  
国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野

加藤健  
国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター  
先端医療開発支援室

〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1  
電話：03-3542-2511（代表）  
FAX：03-3545-3567

後藤 功一、葉 清隆  
国立がん研究センター東病院 呼吸器内科  
〒277-8577  
千葉県柏市柏の葉 6-5-1  
電話：04-7133-1215（事務局直通，FAX 兼用）

#### 5-2. 研究分担者

##### 【共同研究者】

国立がん研究センター東病院 呼吸器内科  
葉清隆、大松 広伸、仁保 誠治、梅村 茂樹、松本 慎吾

国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター トランスレーショナルリサーチ分野  
市川 仁、土原 一哉、松本 慎吾

国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野  
白石 航也、中奥 敬史

国立がん研究センター中央病院 病理検査科  
薦 幸治、古田 耕

国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 臨床腫瘍病理分野

石井 源一郎

国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 臨床試験支援室  
佐藤 暁洋

国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 先端医療開発支援室  
加藤 健、山中 竹春

国立がん研究センター中央病院 呼吸器内科  
大江裕一郎、山本 昇、軒原 浩、藤原 豊、堀之内 秀仁、神田 慎太郎、角南 久仁子

がん研究会有明病院  
西尾 誠人、柳谷 典子

静岡がんセンター  
高橋 利明、村上 晴泰、内藤 立暁、鋤持 広知、小野 哲、赤松 弘朗、  
太良 哲彦、今井 久雄、遠藤 正浩

兵庫県立がんセンター  
里内 美弥子、根来 俊一、浦田 佳子、服部 剛弘、島田 天美子、奥野 恵子、内堀 健、福正 り  
さ、佐久間 淑子

四国がんセンター  
野上 尚之

九州がんセンター  
瀬戸 貴司、一瀬 幸人、竹之山 光広、山口 正史、竹中 朋祐、諸富 洋介、白石 祥理、  
豊川 剛二、平井 文彦、古城 都、豊澤 亮、稲益 英子、玖須 さつき

## 6. 被験者の利益と不利益

### 6-1. 被験者の利益

本研究により、将来的に肺がんの治療体制の機構が遺伝子レベルで解明され、肺がんの分子標的治療法の開発や遺伝子マーカーを用いての治療応答性および耐性等の改善に資する情報が得られると期待できる。しかしながら、本研究の成果が実際のがん臨床に应用されるためには、さらに多くに時間を要すると考えられるため、被験者が本研究に参加することで直接的に得る利益はほぼないと考えられる。

### 6-2. 被験者の不利益

既に保存されている検体を本研究に提出するため、患者への新たな肉体的負担は発生することはない、既提供の試料の提供者およびその家族等に危険や不利益が及ぶ可能性が低い。何故ならば、

- ① 個人情報管理者により厳重に管理・匿名化された上で遺伝子解析が行われ、個人情報と明示的に連結された遺伝子解析情報が第三者は元より、遺伝子解析を担当する研究者にも渡ることはない。
- ② 本研究等を通して、明らかとなった耐性に関わる体細胞遺伝子異常については、現時点で