

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

様式第 18

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

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(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
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

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(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

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。

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、浸潤性非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。

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阻害薬治療例から選出されたlong responder・自然耐性例、EGFR阻害薬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をもたらす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 EGFR		
T790M 変異	50	24
D761Y, T854A, and L747S 変異	< 5	25, 26, 27
EGFR 増幅	8	18
バイパス経路活性化		
MET 増幅	5-22	20, 24
HER2 増幅	12	28
PIK3CA 変異	5	24
BRAF 変異	1	29
CRKL 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		
ALK 2 次変異 (eg, L1196M)	22-36	32-35
ALK 増幅	7-18	34, 35
バイパス経路活性化		
EGFR 活性化	44	34
KIT 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% で見つかっている[32-35]。Choi らは、5 ヶ月の Crizotinib 治療後に再増悪した ALK 陽性肺癌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（1151Tins、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) α 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- κ 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

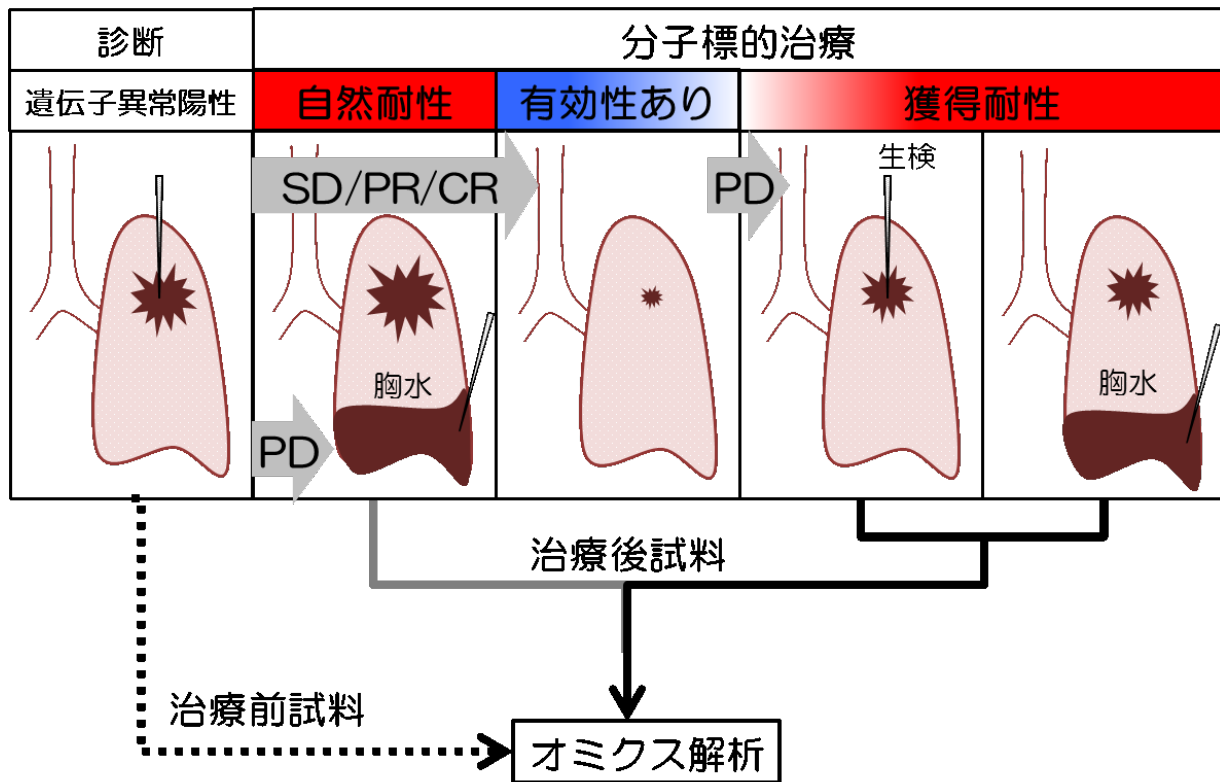
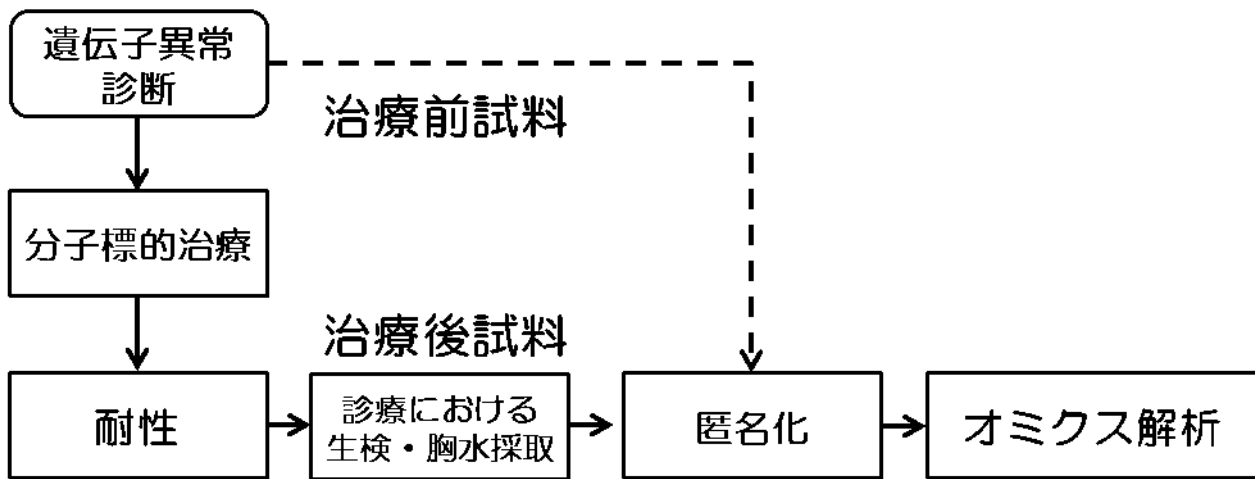


図 2：研究内容のパイプライン



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。

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。

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。

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。

研究とこの説明文書について

参加の自由について

治療における耐性について

この臨床研究の対象となる方の病状に関して

この研究の意義と目的について

この研究の方法について

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

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

遺伝情報の開示について

負担する費用について

個人情報の取り扱いについて

検体の取り扱いについて

残った検体の保存と、将来の研究への利用について

治療前の検体の使用について

研究成果の公表について

遺伝カウンセリングについて

この研究の資金と利益相反について

この研究の倫理審査について

研究組織について

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。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 2002 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ぶ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、個人情報が増加され、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ながら、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	-

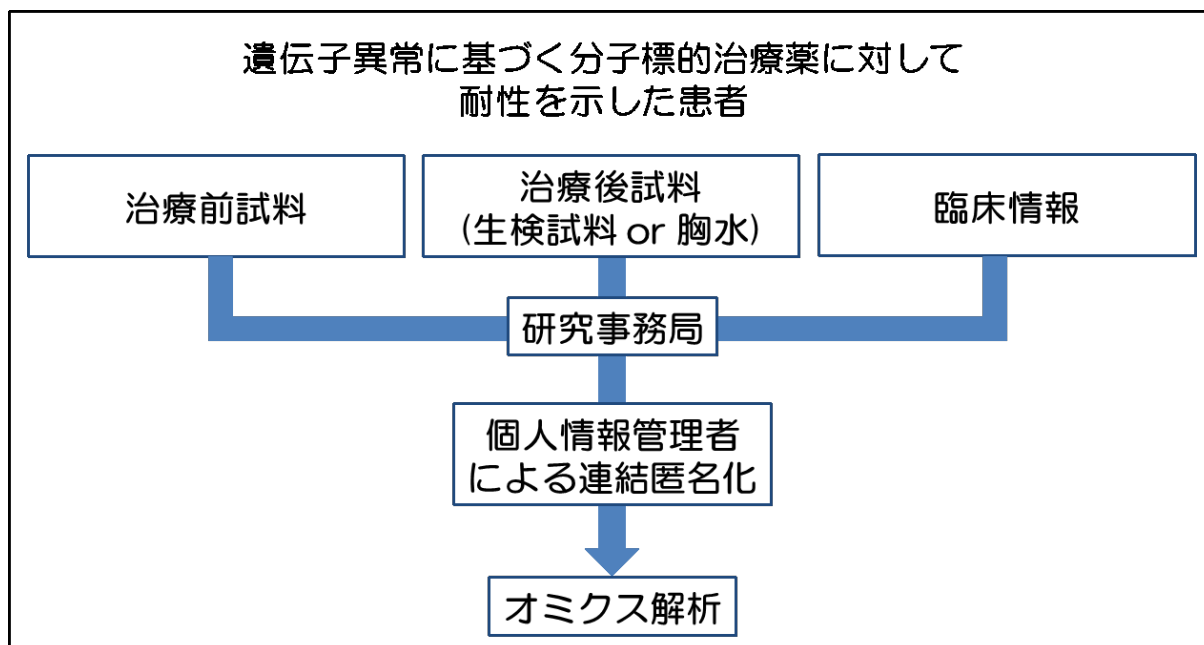
耐性に関わると考えられる分子やその周辺経路分子の発現動態を調べるために、免疫組織化学染色等のタンパク質の解析を行う。また、FISH 法による遺伝子増幅や遺伝子融合などのゲノム変化を調べる。新鮮な残余試料が入手できた際には、がん細胞を in vitro および in vivo で増殖させ、オミクス解析とともに同定されたゲノム異常と増殖・浸潤・転移等がんの特性や抗がん剤治療等への応答性との関係を生物学的に検証する。

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。

説明と同意

登録

臨床情報の収集

試料の採取

個人情報の匿名化

オミクス解析

候補遺伝子の機能解析

オミクス解析情報と臨床情報の関連解析

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
蔦 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応用されるためには、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なく、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、

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。

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

はその臨床的意義が不明であり、現時点では評価を得るには情報が不十分である。

個人情報の漏洩は起こり得ないが、万一遺伝情報が漏洩したとしても、提供者やその家族に対する差別などの不利益行為につながる可能性は極めて小さい。

7．試料提供者の費用負担

本研究では被験者の費用負担はない。解析に伴う費用は後述する研究費（15）より負担する。

8．研究実施前試料の使用

本研究では、以下の研究実施前試料を使用する。

治療前の組織・胸水などの診療残余試料。

阻害剤治療に際し、診療目的のために採取・保存された組織・胸水などの試料。

NCC バイオバンクに保存されている包括同意試料（診療残余試料+研究用血液試料）

「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」などの先行する研究で採取され、副次的な研究で 2 次利用することが同意された試料。

9．被験者への遺伝情報の開示

原則として患者への遺伝子解析結果の開示は行わないが、患者から解析結果について開示希望があった場合には、担当医から結果を説明する。解析結果については、①探索的な解析結果であること、②さまざまな臨床的解釈がなされる可能性があること、③解析結果と治療効果が結びつかない場合があること、などについて十分に説明を行う。

遺伝子解析の原データは研究事務局で保管するが、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、現時点ではその臨床的意義が不明なため、被験者および各施設へ通常は報告しない。ただし、遺伝子解析の結果、提供者及び血縁者の生命に重大な影響を与える遺伝情報があることが判明した場合で、意思表示書で解析結果を知りたいと意思表示された患者、もしくは意思表示していなくても、有効な対処方法があるときには、指針に則り、研究機関の長に報告し、研究倫理審査委員会の意見等に基づき、提供者への開示を行う場合がある。

10．試料・情報の廃棄の方法

試料等は、登録患者が廃棄を希望した場合、検体番号が読み取れなくなった場合、試料の取り違いや混入が起きたような場合、その他研究責任者が必要と認めた場合には、研究責任者の判断により必要に応じて廃棄される場合がある。臨床試料から抽出した RNA、DNA、タンパク質の廃棄は、試料の番号などのラベルを完全に削除し、次亜塩素酸ナトリウムなどで試料を破壊したうえで医療用廃棄物として廃棄する。

11．残余検体の他の研究への利用

NCC バイオバンク試料の残余は原則 NCC バイオバンクに返却し、それ以外の試料は将来的な研究への有用性が十分に考えうるため研究所内に保管する。

NCC バイオバンク試料や、診療残余試料を 2 次的な研究に利用する場合も考えうる。その際には、新たな研究計画書を作成し、国立がん研究センターの（場合によっては参加施設の）研究倫理審査委員会の承認を受ける。

1 2 . 外部機関への解析委託

試料の処理、遺伝子解析、保管、遺伝子変異の機能への影響の推定などの業務の一部を外部の医療検査機関や遺伝子解析受託企業に委託する場合がある。その際、試料や解析用データには匿名化番号のみを付与し委託する。委託契約の際には、情報の安全管理措置について規定する。

1 3 . ヒト細胞・遺伝子・組織バンクへの試料の提供しない。

1 4 . 遺伝カウンセリング

本研究で得られる結果は研究段階のものであり、臨床応用には今後多くの時間を要する。従って、本研究で得られた結果をもとに遺伝カウンセリングをおこなう段階ではないと考える。

1 5 . 研究に要する費用

厚生科学研究費補助金 (革新的がん医療実用化研究事業_26270101, 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)
がん研究開発費 (24-A-1; 遺伝子変異等の情報を活用した個別化医療開発のための基盤構築)
文部科学省科学研究費補助金 (基盤_B 26293200; 肺発がんドライバー変異であるがん遺伝子融合の発生機構の解明)

1 6 . 利益相反について

本研究は、厚生科学研究費補助金、がん研究開発費、及び文部科学省科学研究費補助金を資金源として実施する。この他に、特定の団体からの資金提供や薬剤等の無償提供などは受けておらず、研究組織全体に関して起こりうる利益相反はない。本研究の利益相反については、国立がん研究センターCOI委員会の承認を得る。また、研究経過を定期的に国立がん研究センターCOI委員会へ報告することにより、本研究の利害関係についての公正性を保つ。また、共同研究施設の利益相反の管理も上記に準じて行う。

1 7 . 研究成果の発表

本研究の成果に関しては、国内外の学会、論文で公表する。学会発表者、論文執筆者に関しては、研究代表者、研究事務局、共同研究者で相談のうえ、本研究へ関係した全ての研究協力者の中から、貢献度に応じて選定する。

1 8 . 研究から生じる知的財産権の帰属

本研究の結果、特許などが生じる場合には、その権利は国、研究機関、共同研究機関および研究遂行者などに属し、被験者には属さない。

1 9 . 引用文献

- [1] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350:2129–2139.
- [2] Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004;304:1497–1500.
- [3] Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2004;27:4247–4253.
- [4] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009;361:947–957.
- [5] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med.* 2010;362:2380–2388.
- [6] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13:239–246.
- [7] Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010;363:1693–1703.
- [8] Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: Updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol.* 2012;13:1011–1019.
- [9] Gainor JF, Shaw AT. Emerging paradigms in the development of resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(31):3987-96.
- [10] Kohno T and Ichikawa H, Totoki Y, Oike T, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma *Nat Med* 2012; 18: 375-377. □
- [11] Takeuchi K, et al: RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med.* 2012;18: 378-381.
- [12] Lipson D, et al: Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med.*2012;18:382-384.
- [13] Kohno T, Tsuta K, Tsuchihara K, et al. RET fusion gene: Translation to personalized lung cancer therapy. *Cancer Sci.* 2013;104:1396-400.
- [14] Drilon A, Wang L, Hasanovic A, Suehara Y, Lipson D, Stephens P, et al. Response to Cabozantinib in Patients with RET Fusion-Positive Lung Adenocarcinomas. *Cancer Discov .* 2013;3:630-5.
- [15] Gautschi O, Zander T, Keller FA et al. A patient with lung adenocarcinoma and RET fusion treated with vandetanib. *J Thorac Oncol* 2013; 8: e43–4.
- [16] Yasuda H, Kobayashi S, Costa DB. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: Preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol.* 2012;13:e23–e31.
- [17] Wu JY, Wu SG, Yang CH, et al. Lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 20 mutations is associated with poor gefitinib treatment response. *Clin Cancer Res.* 2008;14:4877–4882.
- [18] Sequist LV, Martins RG, Spigel D, et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol.* 2008;26:2442–2449.
- [19] Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell.* 2010;17:77–88.
- [20] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 2007;316:1039–1043.
- [21] Heuckmann JM, Balke-Want H, Malchers F, et al. Differential protein stability and ALK inhibitor sensitivity of EML4-ALK fusion variants. *Clin Cancer Res.* 2012;18:4682–4690.
- [22] Engelman JA, Jänne PA. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14:2895–2899.
- [23] Ellis LM, Hicklin DJ. Resistance to targeted therapies: Refining anticancer therapy in the era of molecular oncology. *Clin Cancer Res.* 2009;15:7471–7478.
- [24] Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* 2005;2:e73.
- [25] Costa DB, Halmos B, Kumar A, et al. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med* 4:1669–1679, discussion 1680,

2007.

- [26] Balak MN, Gong Y, Riely GJ, et al. (2006) Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 12:6494–6501.
- [27] Bean J, Riely GJ, Balak M, et al. (2008) Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 14:7519–7525.
- [28] Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME, et al. HER2 amplification: A potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer Discov.* 2012;2:922–933.
- [29] Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, et al. Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:E2127–2133.
- [30] Cheung HW, Du J, Boehm JS, et al. Amplification of CRKL induces transformation and epidermal growth factor receptor inhibitor resistance in human non-small cell lung cancers. *Cancer Discov.* 2011;1:608–625.
- [31] Yano S, Wang W, Li Q, et al. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res.* 2008;68:9479–9487.
- [32] Choi YL, Soda M, Yamashita Y, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med.* 2010;363:1734–1739.
- [33] Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res.* 2011;71:6051–6060.
- [34] Katayama R, Shaw AT, Khan TM, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancers. *Sci Transl Med.* 2012;4:120ra17.
- [35] Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18:1472–1482.
- [36] Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:2070–2075.
- [37] Lovly CM, Pao W. Escaping ALK inhibition: Mechanisms of and strategies to overcome resistance. *Sci Transl Med.* 2012;4:120ps2.
- [38] Katayama R, Khan TM, Benes C, et al. Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:7535–7540.
- [39] Bean J, Brennan C, Shih JY, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:20932–20937.
- [40] Tanizaki J, Okamoto I, Okabe T, et al. Activation of HER family signaling as a mechanism of acquired resistance to ALK inhibitors in EML4-ALK-positive non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18:6219–6226.
- [41] Guix M, Faber AC, Wang SE, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *J Clin Invest.* 2008;118:2609–2619.
- [42] Bivona TG, Hieronymus H, Parker J, et al. FAS and NF- κ B signalling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR. *Nature.* 2011;471:523–526.
- [43] Yamasaki F, Johansen MJ, Zhang D, et al. Acquired resistance to erlotinib in A-431 epidermoid cancer cells requires down-regulation of MMAC1/PTEN and up-regulation of phosphorylated Akt. *Cancer Res.* 2007;67:5779–5788.
- [44] Alice T. Shaw, Dong-Wan Kim, Ranee Mehra, et al. Ceritinib in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2014;370:1189-1197.

1. 研究と説明文書について

病気の診断や治療方法の開発のためには多くの研究が必要です。現在行われている診断や治療方法も長い時間をかけて研究され、進歩してきました。当機関でも、がん医療の発展に貢献するため、さまざまな研究に積極的に取り組んでいます。

この説明文書は、「肺がん治療への耐性に関わる遺伝子に関する研究（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）」という、国立がん研究センターと各機関が共同して進める研究について説明するものです。この研究の内容を理解して頂き、協力するかどうかを考えて頂くための資料です。担当医師から説明を聞き、分からないことがありましたら何でも質問してください。

2. 参加の自由について

この研究に参加するかどうかは、あなた自身の考えでお決めください。

この研究に参加しない場合でも、あなたはなんら不利益を受けませんし、担当医師と気まづくなることを心配する必要もありません。また、研究の参加に同意した後でも、いつでも、またどんな理由でも研究への参加をとりやめることができます。その場合も、あなたはなんら不利益を受けません。

これから、この研究についての詳しい説明をお読みになり、また、担当医師からの説明を受け、研究の内容を理解し、参加を希望する場合は、最後のページの同意書にサインをお願いします。

3. 治療における耐性について

現在、非小細胞肺がんの分子標的薬として、上皮成長因子受容体（EGFR）変異陽性患者さんには、チロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブ（イレッサ®）およびエルロチニブ（タルセバ®）が、ALK 融合遺伝子陽性の患者さんには、ALK チロシンキナーゼ阻害剤であるクリゾチニブ（ザコリ®）が認可されています。また、新たな治療薬も開発が進められています。これらの薬は高い治療効果が見込まれますが、効果のあった場合でも多くの患者さんが再びがんが大きくなることが知られています。また、標的とする遺伝子異常があるにも関わらず、治療への期待された効果が得られない患者さんがいることが知られています。これらを治療に対するがんの耐性と言います。こうした治療への耐性の克服が求められており、耐性のメカニズムを解明する研究が急務となっています。

今回、治療を行っている遺伝子異常を背景とした肺がんも、原因となる遺伝子異常に対する分子標的治療薬によって効果を得られることが期待されていますが、これまでの EGFR 変異や ALK 遺伝子融合に対する治療で得られた経験から、同様に治療への耐性が生じることが懸念されています。

4. この臨床研究の対象となる方の病状に関して

この研究の対象は、遺伝子異常に基づいた肺がん治療にも関わらず、治療への耐性が認められた成人の患者さんです。この研究では肺がん治療への耐性に関わる遺伝子を調べるため、肺がんの組織や細胞などの診療で残余試料が得られる患者さんを対象にしています。

5. この研究の意義と目的について

同じ種類のがんに対する同じ抗がん剤の治療でも、効果の出方には患者さんごとに差があります。がん細胞のなかで起きている遺伝子の後天的な変化（「体細胞遺伝子変異：たいさいぼういでんしへんい」と呼ばれます）に違いがあることや、抗がん剤を輸送・代謝（活性化および不活性化）・排出するタンパク質を作る遺伝子などに先天的な個人差（「遺伝子多型（いでんし

たけい)」もしくは「生殖細胞系列遺伝子変異(せいしよくさいぼうけいれついでんしへんい)」と呼ばれます)があることなどが理由と考えられています。しかしながら、「なぜ治療への耐性が起こるのか?」その疑問に答える十分な回答はまだありません。耐性のメカニズムが解明できれば、肺がんの治療をより効果のあるものにつなげられると考えます。この研究では、上に示す2種類の遺伝子の変化を調べることで、耐性のメカニズムの解明とその克服に向けた治療法の開発を目的としています。

6. この研究の方法について

最適な肺がん治療を行うためには、診断や治療の各段階で、生検や手術の時に摘出された組織や細胞を調べ、正確な病理診断や遺伝子検査などを行うことが必要となります。多くの場合、これらの組織や細胞は、診断に利用された後に一部が残ります(「残余試料:ざんよしりょうと呼びます」)。これらには、肺がん組織や胸水があげられます。あなたがこの研究に参加された場合には、最初から効かなかった病変部や再び悪化してきた病変部から臨床診断を目的に採取された肺がんの組織や細胞などの、残余試料を解析させていただきます。同時に、治療の前後でがん細胞に起こっている変化を調べるため、はじめに肺がんと診断された時の保管されている試料などを比較のため解析させていただきます。

国立がん研究センター病院で診療を受けられた患者さんで「診療目的で採取された血液・組織などの医学的研究への利用と、研究用採血へのご協力をお願い」で同意をいただいている方は、すでに採取されNCC バイオバンク試料として保存されています組織・血液についても解析させていただきます。

NCC バイオバンク試料に関するお問い合わせ窓口は以下の通りです。

国立がん研究センター中央病院 1階 バイオバンク窓口

TEL: 03-3542-2511 内線 7899

これらの検体は、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厳重に保管され、DNA、RNA、タンパク質等の解析を行い、治療の耐性に関わる遺伝子を詳細に調べます。

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人数について

この研究は、各施設の倫理委員会における研究許可日から平成31年3月31日まで行います。研究に参加いただく患者さんは最大100名を予定しています。

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

1) 予想される利益

この研究により、遺伝子異常を標的とする治療に対する耐性に関わるメカニズムが解明され、肺がんの治療成績を向上するための情報が得られることが期待できます。しかしながら、本研究の成果が実際のがん治療に応用されるためには、多くの時間を要すると考えられます。よって、ご参加いただいた方への直接的な利益はほぼないと考えられます。

2) 予想される不利益

臨床目的で採取された血液、組織の残余試料を利用するため、この研究によって新たに生じる身体的な危険性はありません。この研究に参加しなくても、肺がんに対する診療は通常通り受けられます。

9. 遺伝情報の開示について

この研究では、肺がんの薬物治療に対する耐性に関わる遺伝子を調べます。また、この研究により得られる結果は探索的なもので、さまざまな科学的・医学的解釈がされます。従って、個々の遺伝子解析結果を開示することは原則的にはいたしません。しかしながら、もし結果の開示をご希望される場合には、担当医師にご相談ください。

遺伝子を解析した結果、偶発的にあなたやあなたの血縁者の生命に重大な影響を与える遺伝情報があることが判明した場合には、開示を希望された場合や、開示を希望されなくても有効な対処方法があるときには、研究機関の長に報告し、国立がん研究センター研究倫理審査委員会の意見等に基づいて、開示を行う場合があります。

10. あなたが負担する費用について

解析費用については、公的研究費で負担しますので、あなたの経済的な負担となることはありません。また、この研究への参加に伴い、謝礼や交通費などをお支払いすることはありません。

11. 個人情報の取り扱いについて

あなたから得られた臨床情報および検体は、あなたの名前ではなく、個人を特定できないようにつけられた番号（症例登録番号）を用いて管理されます。その後、あなたの臨床情報を含んだデータと検体は、国立がん研究センター内研究事務局に収集され、個人情報管理者により匿名化され、センター内で遺伝子研究が行われます。個人情報が外部に出ることはありません。この研究で得られた臨床情報および検体を、新しい研究のために第三者へ提供する必要が生じた場合も、データは個人を特定できない症例登録番号により管理され、第三者があなたの個人情報を個人が特定できる形で使用することはありません。研究事務局では、これらの情報が外部に漏れないように、また、この研究の目的以外に使われないように、細心の注意を払い管理します。この研究にご参加頂ける場合は、これらの個人情報の取り扱いについてご了承下さいますようお願いいたします。

なお、この研究が適切に行われているかどうかを第三者の立場で確認するために、担当者が、あなたのカルテやその他の診療記録などを拝見することがあります。このような場合でも、担当者には守秘義務があり、あなたの個人情報は守られます。またこの研究で得られたデータを、この研究以外の目的で使用することはありません。

もし、あなたが提供に同意した臨床情報および検体の破棄を希望される場合は、担当医師までご連絡下さい。ご希望に添って、全ての臨床情報および検体を完全に破棄します。

* 本研究で利用される臨床情報は下記の通りです。

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。

12. 検体の取り扱いについて

採取した検体は、研究事務局に提出され、国立がん研究センター個人情報管理室にて、個人名が特定できないように登録番号が付けられた後、臨床情報および、全ての遺伝子解析の結果がデータとして符号化された番号（症例登録番号）のもと、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管理されます。つまり、得られた遺伝子解析の情報は、個人を認識する情報とは完全に切り離されて保管されるため、国立がん研究センター中央病院ゲノム研究個人情報管理室以外では、遺伝子情報から個人名を特定できなくなります。また、この研究を通して得られた臨床情報については、プライバシーを保護するため、秘密が守られます。あなたの名前や個人を識別する情報は、この研究の結果を発表する際に使用されることはありません。

13. 残った検体の保存と、将来の研究への利用について

今回、提供していただいた検体は非常に貴重なものです。更に、今回解析する治療耐性に関わる遺伝子の診断および治療を今後確立していくうえで、再現性を確認するためにも非常に重要な検体になります。そこで、ご理解を頂けるなら、今回の研究で利用した後の残りの検体については、研究事務局において厳重な管理の元で保存して、今後、がんに関連する新たな研究が計画された場合に役立てていきたいと考えていますので、ぜひご協力をお願いします。もちろん、その際にも、この研究と同様に参加者のプライバシーと利益は厳重に守られます。なお、今後の研究への使用にあたっては、その都度、国立がん研究センター（場合によっては担当施設）の国立がん研究センター研究倫理審査委員会で研究の妥当性やプライバシーの保護の方法について審査を受けます。保存している検体を勝手に研究に利用することはできませんので、ご安心ください。もし、この研究のみの参加を希望される場合は、検体の残りは、この研究が終了した後直ちに廃棄いたします。

今後の他の研究への利用に関して同意して頂ける場合は、この研究の同意書の下段にも併せてご署名をお願いします。

14. 治療前の検体の使用について

最初から薬剤が効かなかった（自然耐性）原因や治療途中で薬剤が効かなくなった（獲得耐性）原因を調べるため、治療を開始する前の検体を比較して解析を行います。そのため、診断の際に同意をいただいた、「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」などにより、保管されていた試料を研究に用います。

15. 研究成果の公表について

この研究から得られた結果は、学会や医学雑誌などで公表します。発表に際し、あなたの名前など個人を特定できる情報を使用することはありません。なお、この研究の結果から特許権等が生まれることもありますが、その権利は本研究グループに帰属します。

16. 遺伝カウンセリングについて

あなたがこのような遺伝子解析に関して不安に思う場合や、相談したいことがある場合に備えて、国立がん研究センターでは、遺伝外来を行っています。ここでは、担当者があなたの相談を受けることが可能です。ご希望がある場合には、担当医師にその旨申し出てください。

17. この研究の資金と利益相反について

研究における利益相反とは、研究者が企業等から経済的な利益（謝金、研究費、株式等）の提供を受け、その利益の存在により研究の結果に影響を及ぼす可能性がある状況のことをいいます。この研究は、厚生科学研究費補助金、がん研究開発費、文部科学省科学研究費補助金の研究費を主な資金源として実施します。よって、企業等からの利益相反はありません。また、この研究における利益相反は、国立がん研究センターや参加施設の利益相反委員会が行っています。

18. この研究の倫理審査について

この研究を実施するにあたり、患者さんの人権や安全への配慮について、また、医学の発展に役立つかどうかについて、国立がん研究センター研究倫理審査委員会で検討され、承認を受けています。また、この研究は、国の定めたガイドラインである「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき行われています。

19. 研究組織について

この研究は以下の組織で行われています。

国立がん研究センター

(東病院、中央病院、早期探索臨床研究センター、研究所)

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

20. 研究事務局および、当施設での連絡先

この研究について何か知りたいことや、何か心配なことがありましたら、担当医師または研究事務局に遠慮なくおたずね下さい。また、研究終了後の結果についてお知りになりたい方も担当医師におたずね下さい。

1) 研究事務局

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)

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

〒104 - 0045 東京都中央区築地 5 - 1 - 1

電話：03 - 3542 - 2511 (代表)

FAX：03 - 3545 - 3567

2) 当施設での連絡先

[医療機関名] [診療科名]

担当医師/研究担当者：_____

住所：

電話番号：

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（業務項目）

肺がんゲノム解析

担当責任者 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、患者試料のゲノム解析を用い、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進めた。

A．研究目的

本研究の目的は、クリニカルシーケンス解析を基盤とし、申請者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分子および治療抵抗性克服分子を同定し、新規治療開発に繋げることである。具体的には、EGFR阻害剤 long responder および自然耐性・獲得耐性症例、RET阻害剤耐性を示したRET融合遺伝子陽性症例、Pan-negative症例の遺伝子変異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やPan-negative例に生じる新規遺伝子異常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、治療標的および治療抵抗性克服遺伝子を同定する。

EGFR遺伝子変異陽性肺がんに対しては分子標的治療薬であるEGFRチロシンキナーゼ阻害薬が高い奏効率を示し、従来の殺細胞性抗癌剤よりも長い奏効期間が得られることが知られている。しかし、ほぼ全例で治療耐性となり、耐性獲得後の予後は不良である。耐性機序はいくつか解明されているが未だ不明な点が多い。一方で、耐性獲得までの期間中央値は約1年だが、一部の患者で2年以上の奏効期間が得られている。長期奏効に関わる因子はほとんど報告されていない。EGFR遺伝子変異陽性肺がんに対するEGFRチロシンキナーゼ阻害薬の治療耐性及び長期奏効に関わる因子を同定することで、分子標

的薬全体の奏効期間の延長や肺がん患者の予後改善のための新薬開発のシーズを得る。

また、RET融合遺伝子は肺腺がんの約2%に存在するとされ、RETキナーゼを標的としたチロシンキナーゼ阻害薬に感受性を示すことが報告されている。この結果を受け、本邦においてRET融合陽性肺がん患者を対象に 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。RET融合陽性例に対するRETキナーゼ阻害剤の治療効果が期待されているが、EGFR変異等の遺伝子異常陽性肺がん等に対する治療経験から、RET融合遺伝子陽性例においても同様に治療耐性の出現が予想される。治療効果をより高めるため、耐性を示した症例の試料をもとにゲノムの解析を行うことで、分子機構の解明とその克服を明らかにし、新たな治療法の開発を行う。

加えて、上記のように治療標的となるドライバー遺伝子異常を同定することは肺腺がんの個別化治療の進展に重要である。いずれの遺伝子異常も同定されていない症例（Pan-negative例）を対象に、ゲノム解析を行い、肺がんに起こっている遺伝子異常を総合的に把握することで、肺腺がんの遺伝的特性を明らかにし、新たな治療標的となるシーズを得る。

B．研究方法

a．プロジェクトの総合推進

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（業務項目）

以下 b - d を統括し、総合推進を図る。

b . ゲノム解析試料の収集・選定

以下に示す症例のゲノムDNA, RNAを調整するとともに、診療情報（治療期間等）を収集する。

b-1) EGFR阻害剤(gefitinib)治療例から選出されたlong responder、自然耐性例等。

2007年から2013年の間にEGFR遺伝子変異陽性術後再発肺がんのうち、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬であるgefitinibの投与を受けた症例を対象として、奏効期間2年以上をlong responderと暫定的に定義し、解析対象として選定した。

b-2) 既採取肺がん試料に存在するEGFR/ALK/RET陰性(Pan-negative)例。

予後の悪い肺腺がんのサブタイプである浸潤性粘液肺腺がんは、他の肺腺がんとは異なり、KRAS変異が高頻度であるが、その他の治療標的となるドライバー遺伝子異常は見つかっていない。90例の浸潤性粘液肺腺がんの手術摘出標本のうち、いずれの遺伝子異常も持たない症例を選定した。

b-3) RET阻害剤等分子標的治療への耐性例のゲノム解析試料の収集体制を構築し、収集に着手する。

「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」においてRET融合遺伝子が診断され、RETキナーゼ阻害剤による治療を受けた肺がん患者の診療残余試料を用い、オミクス解析を行うための臨床試験計画を立案し、承認を得た。治療耐性獲得後の症例から試料の収集体制を構築した。

c . 分子標的薬阻害剤治療例の解析

b-1試料について、long responderに着目しながら、targetリシーケンス・全エクソンシーケンス等の解析を行い、治療抵抗性に関わる候補遺伝子変化を探索するとともに、それ以外の症例との比較解析を行う。具体的には、手術標本からDNA及びRNAを抽出し、ゲノム網羅的な解析、具体的には50がん関連遺伝子のtarget deep sequence、全exome sequence解析、DNAメチル化チップ解析、RNA及びmiRNA発現解析に着手した。

また、b-3試料について、治療耐性獲得後の症例をより、試料を得、targetリシーケンス等の解析を行い、治療抵抗性に関わる候補遺伝子変化の探索に着手した。

全エクソン/RNAシーケンスを行い、治療耐性と考えうる候補遺伝子変化の探索に着手した。

d . Driver変異陰性例(Pan-negative例)の解析

b-2の試料について、浸潤性粘液産生肺腺がんのいずれの遺伝子異常も持たない症例を対象に、次世代シーケンサーを用いて全RNAシーケンスを行い、NRG1遺伝子融合を同定した。

（倫理面への配慮）

研究に利用する手術標本は、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。臨床情報も同様に匿名化しプライバシーに配慮する。更に、研究成果は個人情報公開されないよう発表・報告する。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ている。

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（業務項目）

C. 研究結果

2007年から2013年の間にEGFRチロシンキナーゼ阻害薬である gefitinib の投与を受けた EGFR 遺伝子変異陽性肺がん全 589 例から解析可能な手術検体を有する術後再発症例 124 例を抽出し、長期奏効例(n=20)に着目しながら、それ以外の症例(n=104)と比較して検証する方針とした。最初に対象症例について詳細な臨床的情報を収集し、臨床的特徴では長期奏効例が規定されていないことを確認した。次に、124 例の手術検体を収集した。80 例では凍結保存組織の入手が可能であり、残り 44 例ではホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を入手し、それぞれ DNA, RNA の抽出を行った。ゲノム解析としては、まず 50 がん関連遺伝子の変異（アレル頻度 4%以上）の解析を行った。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 (T790M) 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の DNA、RNA の調製を行った。また、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法による発現定量系のセットアップを行った。

RET阻害薬耐性に関しては、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。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。

Pan-negative の浸潤性粘液肺腺がんのゲノム解析を行い、その結果、NRG1, ERBB4, BRAFの遺伝子融合が存在することを明らかにした。シーケンスを行わなかった残りの症例を用い、RT-PCRにてスクリーニングを行い、CD74-NRG1とSLC3A2-NRG1を合わせ、NRG1融合が10%弱に認められ、KRAS変異について多い遺伝子異常であることがわかった。NRG1融合については、浸潤性粘液腺がん特異的に、また、女性非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のデータを得た。

D. 考察

これら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している。

いずれの試料も大変貴重な解析対象であり、症例集積力のある当施設だからこそ行える研究である。今後はゲノム網羅的な解析を行い、耐性因子やその克服因子の同定をおこなう。

E. 結論

現行および開発中の分子標的治療では効果の見込めない進行肺がん、不応・耐性獲得肺がんの治療標的・抵抗性克服分子の同定に向けた症例の解析基盤を整えつつあり、本研究の成果は、治療耐性の克服や奏効期間の延長の改善にむけた個別化医療の実現につながる。

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（業務項目）

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、第55回日本肺癌学会学術総会抄録集、P116、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回日本癌学会学術総会、第73回日本癌学会学術総会抄録集、P150、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)

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

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（業務項目）

患者がん試料のin vivo,in vitro培養

担当責任者 今井俊夫 国立がん研究センター研究所施設長

研究要旨

本研究では、患者がん試料をin vivoおよびin vitro培養し、得られた遺伝情報をもとに同定した分子の治療標的・抵抗性への関与の検証を行う。そのための基盤整備に着手した。

A．研究目的

本研究は、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分子および治療抵抗性克服分子を同定し、新規治療開発に繋げることを目的としている。具体的には、RET阻害剤耐性RET融合遺伝子陽性症例、EGFR阻害剤long responderおよび自然耐性、獲得耐性症例、Pan-negative症例の遺伝子変異profileを明らかにする。患者がん試料をin vivoおよびin vitro培養し、上記の得られた遺伝情報をもとに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

治療標的分子を有する、もしくは、分子標的治療薬耐性の肺がん試料（手術検体、胸水など）からin vivo、in vitro(ゼノグラフト)培養し、クリニカルシーケンス解析で同定した治療標的分子および治療抵抗性克服分子の関与の検証を行う。特に、ALK, ROS1, RETといった融合遺伝子陽性肺がん及び治療耐性例に重点を置き細胞株や動物モデルの樹立をめざす。具体的には、患者由来ゼノグラフトマウスモデルの樹立とそれをを用いた治療効果解析、および、in vitroがん細胞培養とその細胞を用いた細胞生物学的解析を行う。

（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

肺がん試料、手術症例、胸水試料の培養を開始した。現在、肺腺がん組織4例のin vitro培養と、2例のin vivo(ゼノグラフト)培養に成功した。

D．考察

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、患者試料の培養に取り組み、生物学的検証を進める。特に胸水試料については、先行データが乏しいことから、生育条件等を検討し、本研究に適した培養手段を選定する必要がある。

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（業務項目）

E．結論

本研究は、治療への不応・耐性獲得肺がんの治療標的の同定・抵抗性克服に力点に置いており、その成果により、治療耐性の克服や奏効期間の延長の改善にむけた個別化医療の実現につながる。培養の技術も向上しつつあり、今後の研究の展開が期待できる。

F．健康危険情報
なし

G．研究発表
なし

H．知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）
なし

学 会 等 発 表 実 績

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」

機関名 独立行政法人 国立がん研究センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Lung invasive mucinous adenocarcinoma (IMA)における治療標的となる新規遺伝子融合	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	第55回日本肺癌学会学術総会	2014年11月	国内
Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma	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	第73回日本癌学会学術総会	2014年9月	国内

2 . 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma	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	Clin Cance Res, 2014,20(12) :3087-3093	2014年6月	国外

（注1）発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

（注2）本様式は excel 形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。