

令和元年6月14日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09637

研究課題名(和文) 新生児肺腫瘍 (FLIT) における ALK と発症機序の解明

研究課題名(英文) Identification of novel ALK rearrangements in neonates with fetal lung interstitial tumor

研究代表者

小野田 正志 (Onoda, Tadashi)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10582562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新生児肺腫瘍 Fetal Lung Interstitial Tumor (FLIT) の疾患特異的遺伝子を同定するため、病理学的に FLIT と診断した 3 例を系統解析した。腫瘍から G-band 法で  $t(2;12)(p23;p13)$ 、FISH 法で ALK break signal を検出した。5'RACE 法、全ゲノムシーケンス法を応用した転座解析系で、ALK の新規融合遺伝子 alfa-2 macroglobulin (A2M)-ALK を同定、さらに FISH 法による A2M-ALK 転座簡易解析系を確立した。A2M-ALK 転座の発見は、FLIT の病態解明、治療戦略に大きく寄与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児肺腫瘍 Fetal Lung Interstitial Tumor (FLIT) は、2010年に新たに報告された稀な新生児間質性肺腫瘍である。治療法に一定の見解はなく、発症機序、疾患特異的遺伝子は未解明であった。本研究では、FLIT が ALK 2p23 転座、特に A2M-ALK 転座を有する ALK 関連腫瘍の一つである可能性が示唆された。ALK 転座の同定と新規腫瘍関連分子としての A2M の発見は ALK とともに FLIT の病態解明に大きく寄与するとともに、分子標的薬の応用による治療成績の向上が見込まれることから、稀な腫瘍の治療方法の拡大につながり、学術的な意義は極めて高い。

研究成果の概要(英文)：Fetal lung interstitial tumor (FLIT) is a recently reported type of congenital lung lesion comprising solid and cystic components. FLIT is extremely rare and its gene expression profile has not been fully understood. In this study, we report a novel chromosomal rearrangement resulting in alfa-2-macroglobulin (A2M) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene fusion in neonates with FLIT. The tumor cells contained a  $t(2;12)(p23;p13)$ . Break apart FISH demonstrated chromosomal rearrangement at ALK 2p23. Using 5'-RACE or WGS, we further identified a novel transcript fusing exon 22 of A2M to exon 19 of ALK. The corresponding chimeric gene was subsequently confirmed by sequencing, including the genomic break point between intron 22 and 18 of A2M and ALK, respectively. Discovery of A2M as a novel ALK fusion partner, together with the involvement of ALK, provides new insights into the pathogenesis of FLIT, and suggests the potential for new therapeutic strategies based on ALK inhibitors.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ALK 転座 新生児間質性肺腫瘍 FLIT ALK 関連腫瘍 A2M-ALK FISH 5'RACE 全ゲノムシーケンス

## 1. 研究開始当初の背景

新生児肺腫瘍 Fetal Lung Interstitial Tumor (FLIT) は、2010 年に新規分類・報告された稀な新生児間質性肺腫瘍である<sup>1</sup>。腫瘍は在胎 20-24 週相当の胎児肺組織に類似し、均一な未熟間葉系間質細胞で構成される。病理学的に、悪性度の高い肺芽腫 (PPB) に類似するが、臨床経過は大きく異なる。PPB の発症には *Dicer 1* 変異等の報告があるが、FLIT の発症機序は未解明で、疾患特異的遺伝子は同定されていない。

FLIT 同様、間葉系間質細胞で構成される腫瘍に、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍 (IMT) がある。筋線維芽細胞と炎症細胞浸潤を伴う組織像は FLIT とは異なるが、約半数に *Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) 2p23* 転座が関与する。

ALK は、未分化大細胞型リンパ腫 (ALCL) に同定された受容体チロシンキナーゼで、転座、ミスセンス変異等の修飾を受け、ALK が恒常的に活性化し、肺非小細胞がん等の固形腫瘍や血液がんのがん化に関与する (図 1)。小児例でも ALCL の他、神経芽腫、横紋筋肉腫の一部に ALK 修飾の報告がある。近年では、ALK 阻害薬の治療応用が進められ、成人の ALK 陽性肺非小細胞がんの他、小児 ALK 関連腫瘍の難治・再発例に使用され、良好な成績をおさめている。

我々は、これまでの研究で、典型的な FLIT の組織像を有する例に、疾患特異的遺伝子として ALK 転座が関与する可能性を示し、報告した<sup>2</sup>。間葉系間質細胞由来の FLIT 類縁疾患の発症に関与する ALK 融合遺伝子を同定、発現様式を体系的に明らかにすることで、発症機序の解明、ALK 阻害薬の治療応用、有効性に多くの知見が得られると期待される。

[1] Dishop, MK., et al. *Am J Surg Pathol* 2010, 34: 1762-1772.

[2] Onoda, T., et al. *Genes Chromosomes Cancer* 2014, 53: 865-874.

## 2. 研究の目的

FLIT の疾患特異的遺伝子を同定し、発症のメカニズムを明らかにすることを目的とする。疾患関連遺伝子の同定は、診断のみならず、分子標的薬による治療成績の向上が見込まれることから、稀な腫瘍の治療方法の拡大につながり、研究遂行の意義は極めて高い。

## 3. 研究の方法

### 1) G-Band 法による染色体転座の解析

腫瘍摘出時に、腫瘍組織から直接得られる腫瘍細胞の染色体を G-Band 法で解析し、腫瘍特異的染色体異常の有無のスクリーニングを行った。

### 2) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法による ALK 転座解析

ALK 2p23 転座 (ALK break signal) の有無を Abbott 社の Vysis ALK Break Apart FISH probes を用い、通常病理組織切片 (FFPE) から、FISH 法で証明した。

### 3) 5' RACE 法による ALK 新規融合遺伝子の解析

FISH 法で ALK の関与が示唆された例について、5' RACE 法を用い、ALK 融合遺伝子の同定を行った。Clontech 社 SMARTer RACE cDNA amplification Kit の手法に準じて行い、腫瘍組織から RNA を直接抽出し、材料とした。ALK 融合遺伝子は、ユニバーサルプライマー (5') と ALK kinase domain の上流に設計した ALK 特異的リバースプライマー (3') を用いて増幅させた後、Nest 法でダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定し、融合遺伝子の同定と切断点の同定を行った。融合遺伝子は、RT-PCR 法で別途確認した。

さらに、腫瘍組織からゲノム DNA を抽出し、切断点と推測される領域の前後の翻訳領域およ

びイントロン領域を PCR で増幅した後、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、ゲノム DNA 上の切断点を同定した。

#### 4)全ゲノムシーケンス(WGS)法による ALK 新規融合遺伝子の解析

FISH 法で ALK の関与が示唆されながら、RNA の抽出が困難な例を対象とし、全ゲノムシーケンス法を応用した ALK 融合遺伝子の同定と切断点の同定を行った。FFPE 標本からゲノム DNA を直接抽出し、全ゲノムシーケンスを行った。検出された ALK 融合遺伝子は、切断点と推測される領域の前後の翻訳領域およびイントロン領域を PCR で増幅した後、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、ゲノム DNA 上の切断点を同定した。

#### 5)免疫組織化学的手法を用いた ALK 融合遺伝子の発現解析

ALK 新規融合遺伝子の発現様式、細胞内局在を、摘出された腫瘍病理組織標本を用い、免疫組織化学的に明らかにした。ALK 融合パートナー、融合部位による発現様式、細胞内局在の違いを比較検討した。

#### 6)FISH 法による A2M-ALK 転座スクリーニング解析

ALK break signal が検出された例を対象に、切除標本 (FFPE) を用い、A2M-ALK 転座の有無を FISH 法でスクリーニング解析した。A2M-ALK Fusion probes を用い、通常病理組織切片 (FFPE) から、FISH 法で証明した。

### 4. 研究成果

新生児期に指摘された肺腫瘍性病変の摘出標本を病理学的に検討し、FLIT と診断された 3 例を検討対象とした。

腫瘍摘出時に、G-band 法で腫瘍組織の染色体の解析が行われたのは、FLIT 3 例中 1 例であった。検討された 1 例では、腫瘍細胞 20 細胞中 4 細胞に t(2;12)(p23;p13) が証明された (図 1)。既報には固形腫瘍と 12p13 転座の関連を結びつける報告はなかったが、2p23 から推測される転座には、IMT で知られる ALK があげられた。FLIT の病理像は、基本的に IMT の病理像とは異なるが、炎症細胞浸潤に欠く IMT の間質像には似ることから、FLIT の疾患特異的転座同定の鍵は、2p23 転座にあり、その有力な候補は ALK 2p23 であると推察した。

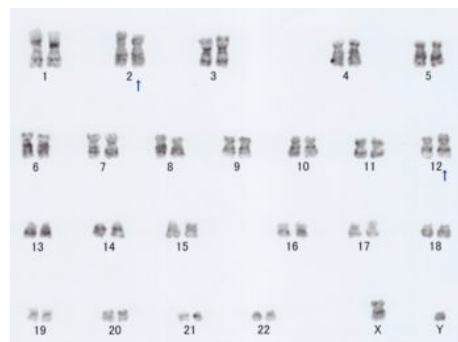


図 1 腫瘍細胞の染色体分析

FISH 法での ALK 転座解析が行われたのは、FLIT 3 例中 3 例で、うち 2 例で ALK break signal が検出された (図 2)。ALK break signal は、いずれも 90%以上の腫瘍細胞で陽性と判断され、FLIT に ALK 転座が関与していることが判明した。

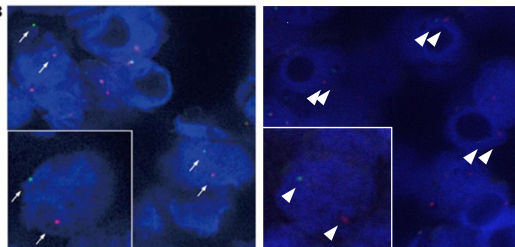


図 2 FISH 法による腫瘍細胞の ALK 2p23 切断点解析(左: 症例 1, 右: 症例 2)

ALK 転座のパートナーとして、12p13 の報告はなく、全く新しい ALK 転座のパートナーが検出される可能性が示唆され、5' RACE 法による ALK 転座のパートナー解析が行われた。5' RACE 法による ALK 新規融合遺伝子解析が行われたのは、3 例中 2 例であった。1 例は腫瘍組織から直接抽出した RNA を用い、5' RACE 法で ALK のパートナー解析を行った。ALK kinase domain (KD) の 5' 側に約 3 kb の fusion transcripts を検出した。この transcripts を、Nest 法で直接シーケンスすると、ALK の転座パートナーは、

*alfa-2 macroglobulin (A2M)* であることが判明した (図3). さらに, *A2M-ALK* 転座のゲノム上の切断点を直接シーケンス法で解析すると, *A2M* intron 22 と *ALK* intron 18 にそれぞれ切断点を有し, 融合していることが判明した (図4).

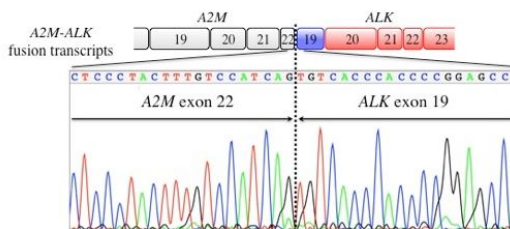


図3 5' RACE 法による *ALK* 転座パートナー解析

*ALK 2p23* 転座が証明された他の一例は, FISH 法, 免疫組織化学的染色法で *ALK* 転座が証明されたが, 腫瘍組織から抽出, 精製した RNA は, 5' RACE 法による転座解析に適さなかった. FFPE 標本からゲノム DNA を抽出し, 全ゲノムシーケンス法による *ALK* 融合遺伝子の同定と切断点解析を行うと, *ALK* の転座パートナーは, 同様に *A2M* で *A2M* intron 22 と *ALK* intron 18 に同じく切断点を有していた.

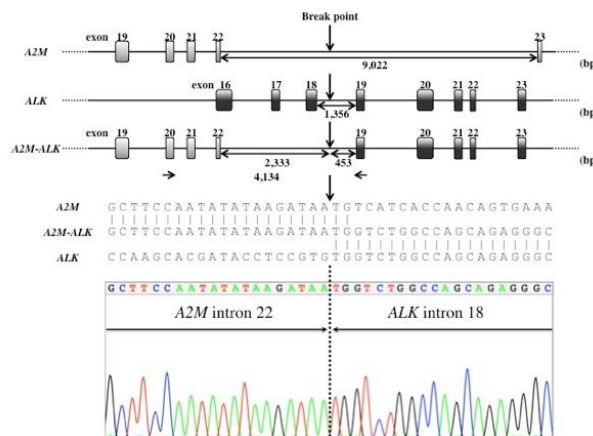


図4 *A2M-ALK* 転座切断点解析

免疫組織化学的染色法で *ALK* 発現解析が行われたのは, FLIT 3 例中 3 例で, うち 2 例で *ALK* 発現が陽性と判断された. FISH 法で *ALK* 転座が証明された 2 例はいずれも陽性と判断された. *ALK* は, 細胞内の Cytoplasm に豊富に発現していた.

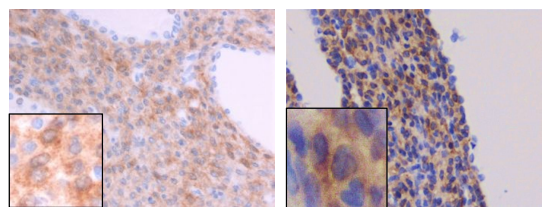


図5 腫瘍細胞における *ALK* 発現解析 (左: 症例 1, 右: 症例 2)

*A2M* intron 22 と *ALK* intron 18 に切断点を有する *A2M-ALK* 転座を簡易スクリーニングできるようにするため, *A2M-ALK* Fusion probe を作成し, FISH 法による *A2M-ALK* 転座スクリーニング解析系を確立した.

*ALK* 関連腫瘍は, *ALK* 融合タンパクの発現様式が腫瘍の性格を決定することが多い. 正常組織に発現する *ALK* は, Oncoprotein としての意義には乏しいが, *ALK* に転座等の修飾が加わると, *ALK* が恒常的に活性化し, Oncokinase として働くと考えられる. *ALK* 関連腫瘍では, 転座の切断点は, 細胞内の Kinase domain (KD) の 5' 側にあることが知られ, 転座によって *ALK* の 5' 側にどのようなパートナー遺伝子が融合するかによって, 融合タンパクの発現部位, 発現量, 腫瘍の性格を大きく変えることが知られている. 本研究で証明された *ALK* 融合遺伝子 *A2M-ALK* は, *ALK* の Transmembrane domain (TD) の 5' 側に, プロモーターを有する *A2M* が融合していた. *A2M* が, 血漿中に豊富に存在するタンパクであることから, 腫瘍細胞の細胞質内で *A2M-ALK* 融合タンパクの発現を増大させたと推察した. また, 新規腫瘍関連分子としての *A2M* の発見は, FLIT を含む間葉系間質細胞腫瘍, *ALK* 関連腫瘍の病態解明に大きく寄与すると考えられた.

本研究では, FLIT が *ALK 2p23* 転座, 特に *A2M-ALK* 転座が関与する *ALK* 関連腫瘍の一つである可能性が示唆された. 今後, *A2M-ALK* 転座と腫瘍化のメカニズムの解明に発展させていく計画である. 現在, FLIT の治療には外科的切除が検討されるが, 術前後の治療に一定の見解はない. FLIT 及び FLIT の類縁疾患には, Crizotinib に代表される *ALK* 阻害薬が有効かつ重要

な治療選択肢となる可能性があり、治療成績の向上が見込まれる。FISH法によるスクリーニング解析系の確立により、稀な腫瘍の治療法の拡大につながることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1) Okamura K, Uchida T, Hayashi M, Yaguchi Y, Hemmi A, Murata I, Ichikawa K, Koyama S, Onoda T, Sasahara Y, Suzuki T. Neutrophilic dermatosis associated with an NFKB2 mutation. *Clinical Experimental Dermatology*; 44(3):350-352, 2019. (査読有)

2) Kanno M, Onoda T, Meguro T, Sato H, Mitsui T. Eltrombopag with i.v. immunoglobulin for safe splenectomy in refractory immune thrombocytopenia. *Pediatrics International*; 60(2):191-192, 2018. (査読有)

3) Onoda T, Meguro T, Kanno M, Ohta H, Nakamura M, Ohtake H, Mitsui T. Giant thymolipoma in a young child initially diagnosed as cardiomegaly. *Pediatrics International*; 57(5):1051-2, 2015. (査読有)

4) Onoda T, Kanno M, Sato H, Takahashi N, Izumino H, Ohta H, Emura T, Katoh H, Ohizumi H, Ohtake H, Asao H, Dehner LP, Hill AD, Hayasaka K, Mitsui T. Identification of novel ALK rearrangement A2M-ALK in a neonate with fetal lung interstitial tumor. *Genes Chromosomes Cancer*; 53(10):865-74, 2014. (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

1) 沼倉周彦, 西村玄, 小野田正志, 木村敏之, 三井哲夫. Roifman 症候群の 1 例. 日本人類遺伝学会第 63 回大会. パシフィコ横浜. 横浜. 2018.10.12

2) 小野田正志, 佐藤裕子, 目黒亨, 高橋憲幸, 簡野美弥子, 三井哲夫. 結節性紅斑様皮疹で発症し診断に苦慮した分類不能型免疫不全症の一男児例. 第 108 回日本小児科学会山形地方会. 山形大学医学部. 山形. 2018.5.27

3) 小野田正志, 佐藤裕子, 目黒亨, 高橋憲幸, 簡野美弥子, 三井哲夫. 結節性紅斑様皮疹で発症し診断に苦慮した分類不能型免疫不全症の一男児例. 第 8 回東北免疫不全症研究会. JAL シティ仙台. 仙台. 2018.2.10

4) 岩崎拓也, 山本俊至, 村松秀城, 奥野友介, 小野田正志, 佐藤裕子, 三井哲夫, 矢野未央, 小松博史, 坂本謙一, 青木貴子, 岡本好雄, 槍澤大樹, 小倉浩美, 小島勢二, 菅野仁. 先天性溶血性貧血の診断におけるターゲットシーケンシングの有用性. 第 78 回日本血液学会学術集会. パシフィコ横浜. 横浜. 2016.10.14

5) 小野田正志, 近岡秀二, 前原菜美子, 遠藤早紀, 三浦啓暢, 本間貴士, 鈴木恵美子, 藤山純一. 乾燥症状を伴わず無菌性髄膜炎が先行した原発性シェーグレン症候群の一例. 第 102 回日本小児科学会山形地方会. 山形大学医学部. 山形. 2016.4.24

6) 小野田正志, 五十公野博子, 三井哲夫. 肺膿瘍で気付かれた常染色体優性高 IgE 症候群の一男児例. 第 6 回東北免疫不全症研究会. JAL シティ仙台. 仙台. 2016.2.13

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

浅尾裕信 (Asao Hironobu)

山形大学・医学部・教授

研究者番号: 80250744

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。