

令和元年6月28日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10698

研究課題名(和文) 転座生成機構であるクロモスリプシスを標的としたALK肺癌の新規治療法開発

研究課題名(英文) Therapeutic option for ALK-positive lung cancer targeting the chromosomal translocation based on chromosliptis

研究代表者

横井 左奈 (Yokoi, Sana)

千葉県がんセンター(研究所)・遺伝子診断部・部長

研究者番号：30372452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ALK阻害薬はALK転座を認める肺癌症例に著効を示すが、わずか1年程度で耐性が生じる。そこで、染色体転座の生成過程では、ALKの座位する二番染色体に特定の領域のゲノム構造異常が生じていると考え、ALK転座症例のゲノム構造異常解析を行った。その結果、ALKと同じ二番染色体に座位し、ゲノムの欠失およびプロモーターのメチル化による発現制御異常により発現低下をきたすALK転座関連遺伝子を同定した。また、国際的な癌の公共データベースのバイオインフォマティクス解析により、ALK転座に特徴的な発現変化をきたす遺伝子群を同定した。これらは、ALK転座肺癌の治療標的候補となると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の中でも特に難治性で悪性度が高いALK転座肺癌において、転座を起こしている二番染色体には特定のゲノム構造異常が生じていることを明らかにした。また、これら二番染色体上の欠失や構造異常が、ALK転座肺癌症例において特定の遺伝子の発現を変化させることを明らかにした。ALK転座の近傍に座位し、発現制御異常をきたし、癌化や悪性度に関わるこれらの遺伝子は、ALK転座肺癌の治療標的候補であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：ALK inhibitors are effective for lung cancer with ALK translocation but become resistant within one year. In this study, genome-wide structural analysis of lung cancer with ALK translocation was performed, assuming that a reproducible genomic structural variation has occurred during the generation of chromosomal translocation on the chromosome 2 where ALK is located. As a result, we identified an ALK translocation-related gene that is located on the same chromosome 2 as ALK and causes reduced expression due to genomic deletion and promoter methylation. We also identified ALK translocation-related genes by bioinformatics analysis using an international cancer public database. These genes were considered to be potential therapeutic targets for lung cancer with ALK translocation.

研究分野：腫瘍遺伝学

キーワード：肺癌 染色体転座

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ALK 阻害薬は ALK 転座を認める肺癌症例に著効を示すが、わずか 1 年程度で耐性が生じる。これまで解明された耐性獲得機序は、主に ALK の点突然変異によるキナーゼ再活性化である。これに対し、第二世代の ALK 阻害薬が登場したが、ALK の新たな変異によるキナーゼシグナルの再活性化を生じさせてしまった。その結果、クリゾチニブ、アレクチニブ、セレチニブのいずれも耐性が獲得され、キナーゼ阻害薬の開発と、新たな変異の誘発が繰り返されており、患者の長期生命予後改善効果は得られてない。

そこで、ALK 転座肺癌に対しては、転座生成機構に基づく新規治療法の実現が必要ではないかという着想に至った。染色体転座は、造血器腫瘍や肉腫において以前から報告されていたが、その成因は明らかにされていなかった。肺癌はゲノム一次構造異常が多い癌の一つであるが、増幅や欠失のみならず ALK や RET など染色体転座も起きていることがわかってきた。従来これらの多彩なゲノム変化は、経時的に徐々に蓄積するものであり、その結果として癌化に至るとする多段階発がんモデルが提唱されてきた。しかし、次世代シーケンサーを用いた癌のゲノム解析の情報が集積したことにより、これら転座や欠失が一度に生じる「クロモスリプシス」というメカニズムの存在が明らかにされた。これは、1 つの染色体が数十～数千箇所同時多発的に粉砕する染色体崩壊と、その後の再編成がたった一度のイベントでおこる現象をさす。この再構成の時に部分的な欠失や逆位が起こるとされる。ALK の転座のパートナーは EML4 や RANBP2、AT1C など ALK と同じ二番染色体上に座位する遺伝子が多く、逆位生成の際にクロモスリプシスが起きていると考えた。

申請者は、これまで CGH 法を用いた肺癌のゲノムコピー数解析を行ってきており、肺癌にはコピー数の増加や欠失が高頻度に認められることを報告してきた。さらに、それらのゲノム変化はランダムに起きているのではなく、ある特定の染色体領域に再現性をもって認められ、それら増幅領域や欠失領域に座位する遺伝子は癌遺伝子や癌抑制遺伝子として癌化や悪性度に寄与していることを明らかにしてきた。そこで ALK 転座が生じる場合も、二番染色体の崩壊の際の染色体切断がランダムではなく、特定の領域に再現性を持って起きるのではないかと考えた。その 1 つの証拠に、ALK 転座の切断点は常に ALK 遺伝子のイントロン 19 であることが挙げられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、染色体逆位の生成機序であるクロモスリプシスに着目し、ALK 転座症例に二番染色体上の特定の領域のゲノム構造異常が生じていることを明らかにし、その領域に座位し、染色体崩壊後のゲノム再構成により発現制御異常をきたす、癌化や悪性度に関わる癌関連遺伝子を同定することとした。それにより、ALK 転座肺癌に共通し異常をきたす側副経路を遮断する新しい治療法の実現を目指す。

### 3. 研究の方法

これまでに当院を受診し肺腺癌の診断を受けた症例を対象として、iAEP 法による免疫染色を行い肺癌部において ALK タンパクが高発現している症例をスクリーニングする。

当院には 23 年前から継続する癌の凍結組織のバイオバンクがある。このバイオバンクの中で最も保管検体数が多いのが肺癌である。において同定した症例の凍結組織をバンクから検索し、ゲノム DNA および RNA を抽出する。RNA を用いて RT-PCR を行い、染色体転座により生じる ALK 融合遺伝子のパートナーを同定する。

のゲノム DNA を用いて、Agilent Human Genome CGH Microarray 44K を使ったアレイ CGH 法によるゲノムワイドなコピー数解析を行い、染色体転座を認めた症例に生じているゲノム一次構造異常を網羅的に捕らえ、ALK 陽性肺癌に共通のコピー数異常領域を検索する。

により見出した共通欠失領域のうち、ALK の座位する二番染色体上にマップされるものを選定し、その領域に座位する遺伝子のうち、転座に伴い発現制御異常をきたす遺伝子を絞り込む。

見出した遺伝子につき、肺癌の臨床病理学的因子との関連を解析し、治療標的となるかどうか検討する。また、遺伝子の発現を制御する薬剤を、化合物ライブラリーを用いてスクリーニングする。

自験例のみならず、癌ゲノムの公共データベースを用いた検索もすすめる。TCGA データベースに登録されている肺腺癌 517 症例の RNA シーケンシングデータを用いて、ALK 発現の上昇した症例を抽出する。

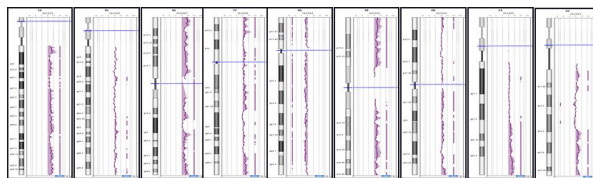
の症例につき、ALK 遺伝子の各エクソンのリード数をマップし、ALK 遺伝子 3' 側と 5' 側の発現差を検索する。発現差の大きい症例を ALK 転座ありと判定し、ALK 転座症例を抽出する。ALK 遺伝子発現上昇症例を ALK 転座の有無により 2 群に分け、クラスタリング解析を行い、転座により発現が変動する遺伝子群を抽出する。と同様にすすめる。

本研究では、二番染色体崩壊 ゲノム再構成 ALK 逆位、二番染色体の部分欠失およびエピゲノム制御異常、を仮説としている。これを証明するには、ALK 融合遺伝子の発現ベクターによる強制発現系や、ゲノム編集では十分ではない。そこで、正常組織由来の不死化細胞にストレスをかけて ALK 転座を誘導する細胞解析系を構築する。これを ALK 転座の生成モデル細胞として用いることで、標的候補遺伝子の機能的な解析を行う。

細胞株のみならず、肺癌臨床検体から初代培養を行い、患者のモデルとなる細胞を樹立する。作製した患者由来初代培養細胞を薬剤スクリーニングパネルにかけ、増殖抑制する薬剤を同定する。また、初代培養細胞を免疫不全マウスに植えてゼノグラフトモデルを作成し、*in vivo* で上記の分子の阻害または過剰発現による増殖抑制効果を検証する。同定した薬剤を投与し、増殖抑制効果を確認する。

#### 4. 研究成果

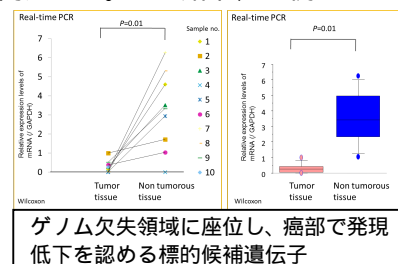
これまでに当院を受診し肺腺癌の診断を受けた 404 症例を対象として、iAEP 法による免疫染色を行い肺癌部において ALK タンパクが高発現している症例 15 例を同定した。これらは 3.7% に相当し、過去の報告と矛盾しない。この他の方法でもスクリーニングを実施し、総計 30 例の ALK 転座肺癌を同定した。これらはいずれも EGFR 変異を認めない野生型であり、過去の報告と矛盾しない。



アレイ CGH の結果

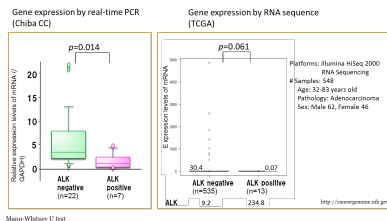
当院ではバイオバンクを 1996 年から開始しており、肺癌の凍結組織は約 3000 検体保存されている。このうち、上記で ALK 転座を同定した患者組織は 12 症例保管されていた。これらから RNA を抽出し、RT-PCR により ALK の融合パートナー遺伝子を同定した。その結果、11 例は EML4 - ALK、1 例は KIF5B - ALK であった。

また、ALK 転座を認めた症例に生じているゲノム一次構造異常を網羅的に捕らえるために、上記の ALK 転座肺癌症例の腫瘍組織からゲノム DNA を抽出した。このうち、十分な DNA 量が確保できた 10 症例につき、アレイ CGH 法を用いたゲノムコピー数を行った。44000 プローブを用いたコピー数解析の結果、遺伝子増幅は 13 領域に、欠失は 111 領域に認められた。このうち、複数症例に共通して欠失を認めた領域に座位する遺伝子は 50 個であった。このうち ALK と同じ二番染色体にマップされる遺伝子は 5 つであり、これらにつき発現解析をすすめた。



ゲノム欠失領域に座位し、癌部で発現低下を認める標的候補遺伝子

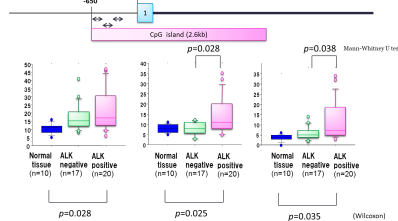
そのうちの一つは、ゲノム欠失領域に座位し、欠失を認める症例のみならず欠失のない症例においても正常部と比較して腫瘍部において有意に発現が低下していた。この発現低下が ALK 転座と関わるかどうかを確認するために、当院にて ALK 転座陽性肺癌と診断された新たな症例 7 例と、同時期に肺腺癌と診断され ALK の発現上昇を認めない、年齢性別をマッチさせた 22 例で確認したところ、ALK 陽性例において有意に発現が低下していた。



この標的候補遺伝子は、ALK 転座症例において発現が低下している

また、自験例のみならず、TCGA データベースの RNA seq のデータセットでも確認した。517 例の肺腺癌検体をイルミナ HiSeq で読んだデータを用いた。ALK 転座陰性の肺腺癌 535 例におけるこの遺伝子の発現レベルの平均値が 30.4 であるのと比較して、ALK 転座陽性例の 13 例での発現の平均値は 0.07 と低く自験例と同じ傾向が示された。

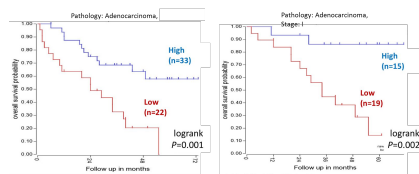
ゲノム欠失を認めない症例における発現低下メカニズムは、染色体転座に伴うゲノム構造変化による遺伝子発現制御異常であるという仮説を立て、この遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化状態を比較した。この遺伝子の転写開始点を挟む形で約 2.6kb の CpG アイランドが存在しており、転写開始点より上流 650 base までの部分を 3 か所に分け、パイロシークエンサーにより DNA メチル化を定量した。



この標的候補遺伝子のプロモーター領域は、ALK 転座症例においてメチル化率が上昇していた

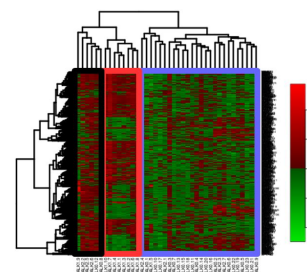
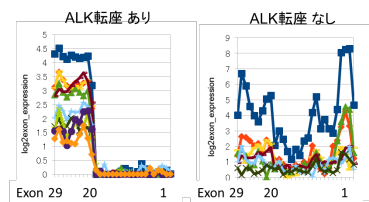
その結果、3 か所のいずれにおいても非腫瘍部と比較して腫瘍部において有意に DNA メチル化率が上昇しており、そのメチル化レベルは転写開始点に近い 2 か所においては ALK 転座陰性例と比較しても有意に高値であった。

次に、GEO データベースにある非小細胞肺癌 111 例の発現アレイのデータを用いて、この遺伝子の発現低下が予後に関わるかどうかを確認した。予後情報のある肺腺癌 55 例では、この遺伝子の発現が低下すると有意に予後不良であった。また、腺癌の中でも stage I の早期癌に絞っても有意差は明確であった。



この標的候補遺伝子の発現が低下すると有意に予後不良であった

自験例のみならず、公共の癌ゲノムデータベースを活用した解析もすすめた。国際的な癌ゲノムデータベースである CTGA から肺腺癌 550 症例の SNP アレイ、全エクソーム、全 RNA シークエンス、マイクロ RNA アレイ、臨床情報を取得した。RNA シークエンスデータを用いて、ALK 発現の上昇した症例を抽出し、ALK 遺伝子の各エクソンのリード数をマップした。ALK 転座は常にエクソン 20 で起こることから、エクソン 20 を境界に、ALK 遺伝子 3' 側と 5' 側の発現差の大きい症例を ALK 転座ありと判定し、ALK 転座症例を抽出できた。ALK 遺伝子発現上昇症例を ALK 転座の有無により 2 群に分け、クラスタリング解析を行い、転座により発現が変動する遺伝子群を抽出した。その結果、染色体転座群に共通する発現変動遺伝子は 468 個であり、非転座群に共通して変動する発現変動遺伝子は 349 個であった。しかし、両群に共通する遺伝子はわずか 22 個であり、ゲノム構造異常の有無により、発現変動する遺伝子群に大きな違いがあることを明らかにした。



本研究では、二番染色体崩壊 ゲノム再構成 ALK 逆位、二番染色体の部分欠失およびエピゲノム制御異常、を仮説としている。これを証明するには、ALK 融合遺伝子の発現ベクターによる強制発現系や、ゲノム編集では十分ではない。そこで、ALK 転座を誘導する細胞解析系を構築した。正常組織由来の不死化細胞を用意し、これを親株として次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を行った。ALK 転座肺癌における側副路を標的とした治療法開発のため、現在市販されているさまざまな分子経路の阻害剤から、標的分子がはっきりとしていて、バイオプローブとして有用な低分子化合物と既存の制がん剤から構成される約 360 種類の化合物ライブラリーを導入した。親株を用いて、5  $\mu$ M の低分子化合物を添加し 72 時間後に MTT 法による比色定量にて細胞増殖を測定し、増殖を抑制する分子もしくはシグナル伝達経路を同定するためのスクリーニング系を構築した。次にこの細胞を過酸化水素、または放射線照射によりストレスを与え、ゲノム構造異常を誘発した。RT-PCR により ALK 転座が生じたかどうかを確認した。その結果、複数ラインで ALK 転座が誘導された。これらを濃縮、株化し、ゲノム DNA を用いて次世代シーケンサーによる全ゲノム解析による親株との比較をすすめている。

患者のモデルとなる初代培養による細胞モデルを樹立するために、肺癌患者の生検検体および手術切除検体を用いた三次元初代培養を行い、361 症例の培養細胞を保存した。同時に、培養を介さない状態での凍結保存も実施した。これらの症例の細胞株化をすすめるとともに、EML4-ALK 転座の有無の解析を行った。また、ヌードマウスおよび NOD-SCID マウスの皮下に初代培養細胞を移植し、ゼノグラフトモデル作成をすすめた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Xia E., Kanematsu S., Suenaga Y., Elzawahry A., Kondo H., Otsuka N., Moriya Y., Iizasa T., Kato M., Yoshiko I., Yokoi S., MicroRNA induction by copy number gain is associated with poor outcome in squamous cell carcinoma of the lung, Sci Rep. 8, 15363, 2018
2. Ashinuma H, Shingyoji M, Hasegawa Y, Yokoi S, Yoshida Y., Ceritinib Treatment for Carcinomatous Meningitis with a Secondary Mutation at I1171T in Anaplastic Lymphoma Kinase., Intern Med 57: 3153-3155, 2018

〔学会発表〕(計 17 件)

国際学会 招待講演

1. Sana Yokoi, Cell context-dependent molecular markers in lung cancer, The 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine, 2017

国際学会 一般演題

2. Sana Yokoi, Endi Xia, Yasumitsu Moriya, Toshihiko Iizasa, Ichiro Yoshino, Three microRNAs associated with poor Prognosis are up-regulated in amplified regions of

squamous cell Lung carcinoma, 第 17 回世界肺癌学会議、2016

3. Sana Yokoi, Endi Xia, Yusuke Suenaga, Sotaro Kanematsu, Hitomi Kondo, Noriko Otsuka, Yasumitsu Moriya, Toshihiko Iizasa, Ichiro Yoshino, Three microRNAs are associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the lung, 第 13 回国際人類遺伝学会, 2016
4. Sana Yokoi, Endi Xia, Sotaro Kanematsu, Yusuke Suenaga, Yasumitsu Moriya, Ichiro Yoshino, Toshihiko Iizasa, Oncogenic microRNAs associated with poor prognosis are up-regulated on the amplicon in squamous cell lung carcinoma, IASLC 18TH WORLD CONFERENCE ON LUNG CANCER, 2017

#### 国内学会 招待講演

5. 横井左奈、個別化医療のためのがんゲノム研究と診療の連携、東京理科大学総合研究院トランスレーショナルリサーチ (TR) センター第 5 回シンポジウム、2016
6. 横井左奈、ゲノムコピー数増加により活性化される 3 つのマイクロ RNA の発現は肺扁平上皮癌の予後不良と関わる、第 27 回 日本癌病態治療研究会、2018

#### 国内学会 一般演題

7. 芦沼 宏典、新行内 雅斗、長谷川 祐三、横井 左奈、吉田 泰司、板倉 明司、山本高義、石橋 史博、松井 由紀子、吉田 成利、飯笹 俊彦、Crizotinib と Alectinib に耐性化後、髄液で ALK の二次変異 I1171T を認めた 1 症例、第 178 回日本肺癌学会関東支部学術集会 2017
8. Sana Yokoi, Endi Xia, Yusuke Suenaga, Sotaro Kanematsu, Hitomi Kondo, Noriko Otsuka, Yasumitsu Moriya, Toshihiko Iizasa, Ichiro Yoshino, Three microRNAs are associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the lung, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016
9. 兼松宗太郎、末永雄介、近藤仁美、大塚紀子、横井左奈、肺扁平上皮癌における onco-miRNA による遺伝子発現調節機構の統合的解析、第 23 回日本遺伝子診療学会大会、2016
10. 末永雄介、新行内雅斗、兼松宗太郎、飯笹俊彦、加藤護、横井左奈、神経内分泌分化を制御する転写因子の下流遺伝子は小細胞肺癌において鋳型鎖・非鋳型鎖の変異率に強い非対称性を示す、第 75 回日本癌学会学術総会、2016
11. 横井 左奈、岩田 剛和、飯笹 俊彦、非小細胞肺癌における EGFR エクソン 21 レアバリエントの検討、日本臨床検査医学会、2017
12. 横井 左奈、末永 雄介、飯笹 俊彦、守屋 康充、ゲノムコピー数増加により活性化され肺扁平上皮癌の予後不良に関わるマイクロ RNA、第 76 回日本癌学会学術総会、2017
13. 巽 康年、筆宝 義隆、横井 左奈、下里 修、清宮 淳、滝口 伸浩、伊丹 真紀子、山口 武人、永瀬 浩喜、千葉県がんセンター・バイオバンクの取り組みについて、第 3 回クリニカルバイオバンク研究会、2017
14. 末永 雄介、新行内 雅斗、兼松 宗太郎、飯笹 俊彦、加藤 護、横井 左奈、下垂体前葉発生に関与する転写因子は小細胞肺癌の神経内分泌性格を制御する、ConBio 2017、2017
15. 末永雄介、新行内雅斗、兼松宗太郎、飯笹俊彦、加藤護、横井左奈、肺癌の神経内分泌性格を制御する分子機構の解析、第 27 回 日本癌病態治療研究会、2018
16. 末永 雄介、新行内 雅斗、兼松 宗太郎、飯笹 俊彦、加藤 護、横井 左奈、下垂体分化の阻害剤は小細胞肺癌の細胞増殖を抑制する、第 77 回日本癌学会学術総会、2018
17. 松井 由紀子、川名 秀忠、横井 左奈、西井 開、田中 教久、芦沼 宏典、水野 里子、吉田 泰司、新行内 雅斗、岩田 剛和、吉田 成利、飯笹 俊彦、女性非喫煙者扁平上皮癌における EGFR 遺伝子変異、第 59 回 日本肺癌学会学術集会、2018

#### 〔図書〕(計 1 件)

1. 末永雄介、中川原章、横井左奈、神経内分泌腫瘍と脳腫瘍における MYC ファミリー遺伝子、実験医学. Vol. 36 (3月号) No.4 501-507、2018

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<https://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/soshiki/rinshogenome/index.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 1名

連携研究者氏名：飯笹 俊彦

ローマ字氏名：Iizasa Toshihiko