

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：平成 20 年度 ～ 平成 21 年度
 課題番号：20790293
 研究課題名（和文） アルク転座肺癌の臨床病理学的特徴および分子病理学的特徴の解明
 研究課題名（英文） The clinicopathologic and genetic analysis of lung cancers with *ALK* translocation
 研究代表者
 稲村 健太郎 (INAMURA KENTARO)
 (財)癌研究会・癌研究所・病理部・研究員
 研究者番号：40442545

研究成果の概要（和文）：

ALK 転座肺癌に注目し、*EML4-ALK* 肺癌の検出方法、新たな variant の検出、臨床病理学的特徴・遺伝子学的特徴の解析、他の *ALK* 転座肺癌の検出を試みた。cDNA スクリーニング法や multiplex RT-PCR 系の構築などにより、あらたな *EML4-ALK* variant を発見した。*EML4-ALK* 肺癌の臨床病理学的特徴は若年者発症、非・軽度喫煙者、TTF-1 陽性 cell lineage、acinar structure with mucin が特徴の中～低分化腺癌であった。遺伝子学的には *EGFR* 変異、*KRAS* と相互排他的であった。また新規の高感度免疫染色法を開発することにより、新たな *EML4-ALK* variant や新たな転座遺伝子 *KIF5B-ALK* を発見した。

研究成果の概要（英文）：

Focusing on lung cancers with *ALK* translocation, we have been attempting to establish the appropriate method to detect *EML4-ALK* lung cancers, to detect their new variants, to analyze the clinicopathologic and genetic characteristics of them, and to find out the other *ALK* translocated lung cancers. We have identified novel variants for *EML-ALK* fusion gene with cDNA screening and multiplex RT-PCR. We have found out that *EML4-ALK* lung cancers are characterized by rare other mutations, TTF-1 cell lineage, less-differentiated acinar histology with mucin, young onset, and non- or light smoking status. Furthermore, by developing a sensitive immunohistochemical method appropriate for detecting *ALK* translocation, we have discovered *KIF5B-ALK*, a novel fusion oncokinase, in lung cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：肺癌、*EML4-ALK*、遺伝子変異、病理、免疫組織化学、RT-PCR

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌は日本人の死亡原因の第1位を占め、国民の3人に1人は癌で死亡している。癌の中でも、肺癌は増加傾向にあり、胃癌を抜いて死因1位である。

(2) 肺癌は腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌の4種類の組織型に大別され、それぞれ固有の発育進展様式を示し、抗癌剤や放射線に対する感受性や臨床的予後にも差がみられる。しかし同じ組織型のものでも、治療感受性や予後に差がみられ、適切な亜型に個別化して理解したり治療したりする必要性がある。

(3) 現在、癌の薬物療法は分子標的治療薬へと移行しつつあり、最近の肺癌研究の大きな発見は*EGFR*変異とGefitinib（イレッサ）に関するものである。肺腺癌の中には*EGFR*変異を有するものがあり、この変異を有する肺腺癌の治療には分子標的治療薬であるGefitinib（イレッサ）が有効であることがわかった。*EGFR*変異を有するものは、臨床的に日本人を含むアジア系人種、女性、非喫煙者に多いという特徴をもつことも判明した。病理組織学的にも*EGFR*変異を有する肺腺癌は肺胞置換性増生成成分をもつものが多く、細胞系はhobnail系が多いこともわかってきている。これは肺癌の個別化の大きな一歩であり、遺伝子変異の有無、臨床病理学的所見により治療有効性の有無が判明し、臨床的にも大きな貢献を果たすこととなるだろう。

(4) 2007年の8月、共同研究者である自治医科大学 間野研のグループが肺非小細胞癌の一部は*EML4-ALK*という染色体転座を有していることをNature誌に発表(Soda et al. Nature 2007)し話題となった。*EML4-ALK*の転座を持たせた細胞株は非常に高い癌原性をもつことをマウス実験によって示すとともに、*EML4-ALK*転座肺癌は*EGFR*変異がなく、互いに独立した亜型であることを明らかにした。また*EML4-ALK*転座肺癌は非常に強い癌原性を持つALKが活性化状態にあるため、活性化したALKを抑制する分子標的治療薬に

高感受性であることが期待される。このように発癌メカニズムがわかると、その発癌経路を標的とした治療が可能となる。このように癌の個別化は臨床的にも非常に重要である。

2. 研究の目的

(1) 2007年のNature誌の報告では*EML4-ALK*のvariantは2つと紹介されているが、厳密にはVariantは複数存在すると考えられる。全てのvariantを網羅できるmultiplex RT-PCR法を開発することにより、variant 1, variant 2以外の*EML4-ALK*転座の網羅的検出を試みる。このmultiplex RT-PCR法を用いたスクリーニングにより、*EML4-ALK*転座肺癌全体の臨床病理学的特徴を調べる。variant 1,2以外のvariantに癌原性があるかについても動物実験により検証する。

(2) 同時並行として、Inverse PCR法を用いた*ALK*転座の相方探しも試みる。

3. 研究の方法

*EML4-ALK*転座肺癌の有無を網羅的に検出できるmultiplex PCR法を開発し、*EML4-ALK*転座肺癌を検出し、その特徴を明らかにする。また、*EML4*以外の*ALK*転座パートナーを検索する。

(1) 材料

癌研究所に保存されている手術凍結検体を用いる。インフォームド・コンセントは既に得られている。肺癌363例(肺腺癌250例、扁平上皮癌75例、大細胞癌5例、大細胞神経内分泌癌(LCNEC)5例、多形癌(Pleomorphic carcinoma)3例、小細胞癌25例)を検索対象とする。

(2) 方法1

理論上考えられる*EML4-ALK*転座パターンを網羅したmultiplex PR-PCRにより*EML4-ALK*肺癌を正確にスクリーニングする。

①□まず、肺癌全例をmultiplex RT-PCRにか

ける。

- ② □バンドが検出されたものは Direct sequence して、*EML4-ALK* 転座を確認する。
- ③ □FISH 法で *EML4* と *ALK* が結合していることを確認し、また免疫染色法でも *ALK* が陽性であることを確認する。
- ④ □*EML4-ALK* 転座肺癌の臨床病理学的特徴を明らかにする。(本研究に用いる肺癌手術検体は既に喫煙歴と予後の調査、および組織診断が終了している) t-test, Fisher's exact test などの統計法を用いて検定する。

(3) 方法2

Inverse PCR 法を用いて *ALK* 転座パートナーを検索する

- ① まず、*ALK* の C 末に対するプライマーをつかった RT-PCR をかけて、発現のみられる検体を抽出する。
- ② 次にそれらの検体を Inverse PCR 法を行い、転座パートナー (の一部) を PCR で増幅する。
- ③ 増幅された転座パートナーを Direct sequence し、その配列をインターネット上の BLAST にかけて、遺伝子を同定する。
- ④ 同定した転座が DNA 上に確かに存在することを調べた後、その転座の癌原性について動物実験を試みる。

4. 研究成果

cDNA スクリーニングにより *EML4-ALK* variant3 を発見した。*EML4* と *ALK* の全ての in-frame fusion を検出する multiplex RT-PCR 系を構築し、あらたな *EML4-ALK* variant 4, variant 5 を発見した。臨床病理学的特徴を統計学的に解析するとともに、TTF-1 免疫染色により cell lineage を調べ、*EGFR*, *KRAS*, *TP53* の遺伝子変異の有無を調べた。11 人の *EML4-ALK* 肺癌患者のうち 4 人が 50 歳以下の発症であるなど、*EML4-ALK* 肺癌は若年者に多くみられた。また非・軽度喫煙者に多くみられた。TTF-1 免疫染色は全例陽性・または部分陽性であり、TTF-1 陽性 cell lineage であり、非・軽度喫煙者の癌として矛盾しない結果であった。病理組織学的に *EML4-ALK* 肺腺癌は中～低分化のものが多く、acinar structure with mucin が特徴であった。遺伝子学的には *EGFR* 変異、*KRAS* と相互

排他的であり、*TP53* 変異も稀であった。また新たな免疫染色法である intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP) 法の開発により、新たな *EML4-ALK* variant である variant 6, variant 7 を検出した。さらに inverse RT-PCR 法により新たな転座遺伝子 *KIF5B-ALK* を発見した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, Okui M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Niki T, Mano H, Ishikawa Y. *EML4-ALK* fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol.* 3(1):13-7, 2008
- ② Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Ueno T, Takada S, Yamashita Y, Sugiyama Y, Ishikawa Y, Mano H. Identification of novel isoforms of the *EML4-ALK* transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 68(13):4971-6, 2008
- ③ Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y, Mano H. Multiplex Reverse Transcription-PCR Screening for *EML4-ALK* Fusion Transcripts. *Clin Cancer Res.* 14(20):6618-24, 2008
- ④ Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, Mun MY, Sakao Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Mano H, Ishikawa Y. *EML4-ALK* lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol.* 22(4):508-15, 2009
- ⑤ Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T,

Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y, Mano H. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinas identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. Clin Cancer Res. 15(9):3143-9, 2009

- ⑥ Inamura K, Ninomiya H, Ishikawa Y, Matsubara O. Is the Epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features? Arch Pathol Lab Med. 134(1):66-72, 2010
- ⑦ Inamura K, Ishikawa Y. Lung cancer progression and metastasis from the prognostic point of view. Clin Exp Metastasis, 2010 Mar 12. [Epub ahead of print]

[学会発表] (計 25 件)

- ① 稲村健太郎, 他. EML4-ALK 融合遺伝子をもつ肺癌の病理組織学的解析. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢, 2008 年 5 月 15-17 日.
- ② Inamura K, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, October 28-30, 2008.
- ③ 稲村健太郎, 他. EML4-ALK 融合遺伝子を持つ癌と EGFR 変異をもつ癌の double cancer を発症した非喫煙 50 才男性症例. 第 154 回日本肺癌学会関東部会, 東京, 2009 年 3 月 14 日.
- ④ 稲村健太郎, 他. EML4-ALK 肺癌の臨床病理学的特徴. 第 98 日本病理学会総会, 京都 2009 年 5 月 1-3 日.
- ⑤ 稲村健太郎, 他. KIF5B-ALK 融合伝子を持つ肺癌 2 例の臨床病理学的特徴の検討. 第 155 回日本肺癌学会関東部会, 東京, 2009 年 7 月 11 日.
- ⑥ 稲村健太郎, 他. EML4-ALK 肺がんの臨床病理学的特徴. 第 50 回日本肺癌学会総会, 東京, 2009 年 11 月 12-13 日.
- ⑦ 稲村健太郎, 他. EML4-ALK 肺癌に発生した多重肺内病変の検討. 第 50 回日本肺癌学会総会, 東京, 2009 年 11 月 12-13

日.

- ⑧ 稲村健太郎, 他. 肺腺癌の相互排他的遺伝子異常と臨床病理組織像. 第 99 日本病理学会総会, 東京, 2010 年 4 月 27-29 日.

[図書] (計 2 件)

- ① Inamura K, Ishikawa Y. Lung Cancer. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention Cancer Report 2010, Tuncer MA (ed), New Hope in Health Foundation, Turkey, 202-4, 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲村 健太郎 (KENTARO INAMURA)

(財)癌研究会・癌研究所・病理部・研究員
研究者番号: 40442545

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし