

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300345

研究課題名(和文)肺腺癌ゲノム解析に基づく治療標的キナーゼの探索

研究課題名(英文) Exploring therapeutic target kinases by comprehensive genome analysis of lung adenocarcinoma

研究代表者

土原 一哉 (Tsuchihara, Katsuya)

独立行政法人国立がん研究センター・早期探索臨床研究センター・分野長

研究者番号：00415514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺癌で変異しているタンパク質キナーゼを、97例の肺腺癌症例の網羅的ゲノム解析から探索し治療標的としての有用性を検討した。すべての症例において、何らかの細胞増殖を司る遺伝子に変異を認めた。肺腺癌のゲノム多様性を反映した実験系を構築するため26株の肺腺癌細胞株の網羅的ゲノム、エピゲノム情報を収集しデータベース化し公開した。LC-2/ad細胞ではCCDC6-RET融合遺伝子が発現しRETのキナーゼ活性を阻害する薬剤バンデタニブが抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。これらの情報は肺がんの新規治療開発を推進する全国規模の患者スクリーニングや、治療薬の臨床試験にもすでに応用されている。

研究成果の概要(英文)：We conducted a comprehensive genome analysis of 97 cases of lung adenocarcinoma and explore the mutated protein kinases those could be potential therapeutic targets. All the cases harbored one or more altered kinase or related genes involved in cell proliferation. To establish a cell line-based experimental system that represents the diversity of lung adenocarcinoma, comprehensive genome and epigenome data of 26 cell lines were collected and these data are open for public at our database (<http://dbtss.hgc.jp/>). We found that LC-2/ad cells express the CCDC6-RET fusion gene and a RET-targeting compound, vandetanib exhibited anti-tumor effect. These findings and experiences encouraged us and other researchers to establish a nation-wide lung cancer genome screening platform and to accomplish investigator-initiated clinical trials targeting lung cancers with rare driver mutations/alterations.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：肺がん ゲノム キナーゼ 分子標的薬 ゲノムスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

肺癌による死亡者数は国内の全がん死の中で最も多く有効な抗がん療法の開発が求められている。EGFR 変異陽性例や EML4-ALK 融合遺伝子陽性例に特異的なキナーゼ阻害剤が著効を示すなど近年分子標的薬の登場により非小細胞肺癌の治療は劇的に変化した。肺腺癌には組織学的に多種の亜型が知られており、こうした多様性は癌の発生、進展過程が多岐にわたり、様々なゲノムないしはエピゲノムの異常が蓄積した結果を反映していると考えられる。肺腺癌ゲノムの網羅的解析は各国の研究機関が取り組んでいるが、われわれが実施した 97 例の全エクソン解析は日本人症例のデータとして最大規模である。全例で何らかのキナーゼに変異、融合が検出されこれらのキナーゼ変異の細胞生物学的な特性が明らかとなれば、有望な新規治療標的となると考えられた。

2. 研究の目的

肺腺癌の網羅的ゲノム解析から明らかとなった新規、既知のゲノム構造異常を持つキナーゼの中から、がん細胞の増殖、生存の制御に重要な役割を果たしているものを同定する。特に肺腺癌において一定の頻度で異常が見いだされるものや EGFR 変異と相互排他的に異常が存在するものについては、新規抗がん療法の標的分子となる可能性が高いと考えられる。既存および新規のキナーゼ阻害剤により、これらのキナーゼ活性が特異的に抑制されるかを *in vitro* の実験系で検討する。さらにこれら化合物の抗腫瘍効果を動物実験系で検証する。これらにより新たな分子標的療法のシーズを創出し、臨床応用への展開をめざす。

3. 研究の方法

97 例の肺腺癌全エクソン解析を中心としたゲノム解析を完成させ、変異が認められたキナーゼ群から、症例間での重複、変異の機能的分類などを考慮し新規治療標的候補となる分子をリストアップする。候補となるキナーゼの変異型および野生型を培養細胞実験系において強制発現ないし発現抑制によってキナーゼ変異が細胞の増殖や生存、浸潤など生物学的特性に及ぼす影響を検証する。また化合物ライブラリー等から特異的阻害剤を探索し、キナーゼの阻害が抗腫瘍効果を誘導できるか、培養細胞系、マウスゼノグラフトモデルを用いて検証する。

4. 研究成果

(1) 97 例の全エクソン解析の結果から EGFR, KRAS, BRAF, ERBB2 など既知のドライバー変異が検出された(図 1)。こ

れら既知の変異を有さない症例の中に KDR に変異を有する症例が複数あり、組織におけるタンパク質レベルでの発現も確認できた。これら変異型キナーゼを HEK293 細胞に強制発現させ下流シグナルの変化と阻害剤に対する反応性を検討したが、細胞増殖に対する影響は認められなかった。

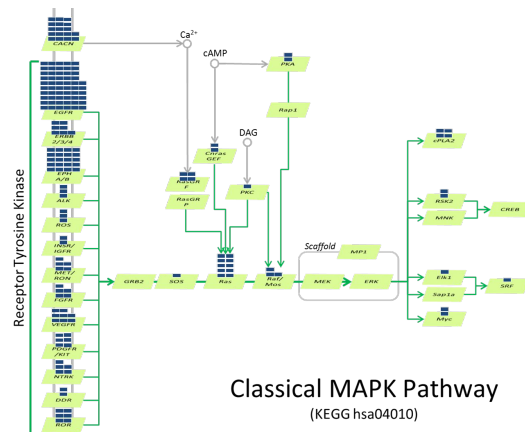


図 1. 97 例の肺腺癌全エクソン解析で明らかになった MAPK 経路に関わる遺伝子変異の分布

(2) 臨床検体の解析で明らかとなったゲノム多様性を反映する実験系を構築するため 26 株の肺腺癌細胞株の網羅的ゲノム、エピゲノム情報を収集しデータベース化し公開した(<http://dbtss.hgc.jp/>)。このうち LC-2/ad 株において CCDC6-RET 融合遺伝子が発現し RET のキナーゼ活性を阻害する薬剤バンデタニブが抗腫瘍効果を示すことを明らかにした (図 2, 図 3)。

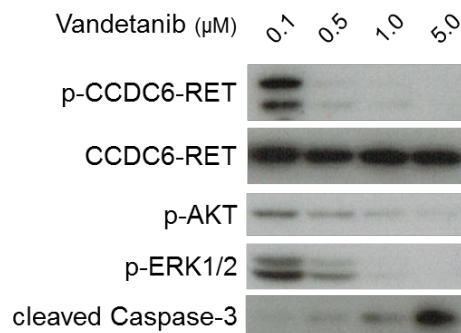


図 2. LC-2/ad 細胞における CCDC6-RET 融合遺伝子産物の発現とバンデタニブによる抑制効果

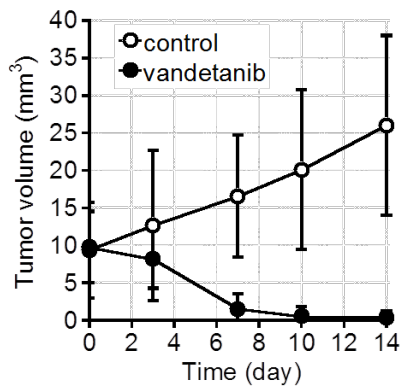


図 3 . LC-2/ad 細胞ゼノグラフトモデルにおけるバンデタニブの抗腫瘍効果

(3) 今後本課題で構築した臨床検体、培養細胞実験系のデータベース(図 4)を、薬物療法を予定する進行肺腺癌患者の全国規模のスクリーニングプログラム (SCRUM-Japan) と連動させ、わが国における新規治療開発の基盤として整備していく。

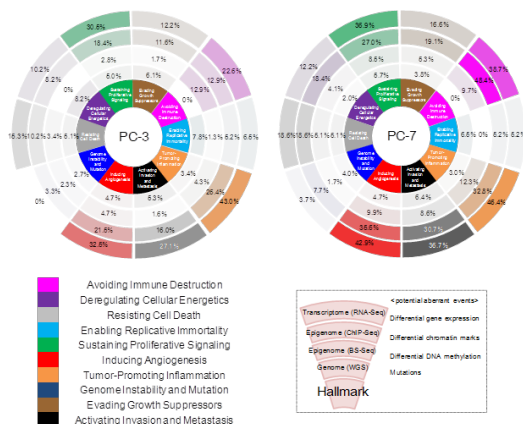


図 4 . 肺腺癌 26 株のゲノム, エピゲノム情報を網羅したデータベース構築

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 7 件)

1. Makinoshima H, Tsuchihara K et al. (13 人中 13 番目), Signaling through the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/ Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Axis is Responsible for Aerobic Glycolysis mediated by Glucose Transporter in Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-mutated Lung Adenocarcinoma. *J Biol Chem.* 2015 May 28. pii: jbc.M115.660498. [Epub ahead of print]

2. Suzuki A, Tsuchihara K et al. (7 人中 6 番目), Single-cell analysis of lung adenocarcinoma cell lines reveals diverse expression patterns of individual cells invoked by a molecular target drug treatment. *Genome Biol.* 2015 Apr 3;16(1):66. doi: 10.1186/s13059-015-0636-y.
3. Suzuki A, Tsuchihara K et al. (8 人中 7 番目), Aberrant transcriptional regulations in cancers: genome, transcriptome and epigenome analysis of lung adenocarcinoma cell lines. *Nucleic Acids Res.* 2014 Dec 16;42(22):13557-72. doi: 10.1093/nar/gku885.
4. Suzuki A, Tsuchihara K et al. (8 人中 5 番目), DBTSS as an integrative platform for transcriptome, epigenome and genome sequence variation data. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D87-91. doi: 10.1093/nar/gku1080.
5. Makinoshima H, Tsuchihara K et al. (7 人中 7 番目), Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling regulates global metabolic pathways in EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *J Biol Chem.* 2014 Jul 25;289(30):20813-23.
6. Suzuki A, Tsuchihara K et al. (11 人中 11 番目), Identification and characterization of cancer mutations in Japanese lung adenocarcinoma without sequencing of normal tissue counterparts. *PLoS One.* 2013 Sep 12;8(9):e73484. doi: 10.1371/journal.pone.0073484. eCollection 2013.
7. Suzuki M, Tsuchihara K et al. (16 人中 16 番目), Identification of a lung adenocarcinoma cell line with CCDC6-RET fusion gene and the effect of RET inhibitors in vitro and in vivo. *Cancer Sci.* 2013 Jul;104(7):896-903. doi: 10.1111/cas.12175.

[学会発表](計 4 件)

1. 土原一哉: "がんゲノムの網羅的解析とその臨床応用" 第 72 回日本癌学会学術集会総会. (20131003-20131005). 横浜市
2. 土原一哉: "次世代シーケンスの肺癌治療への展開" 第 54 回日本肺癌学会総会 (招待講演). (20131121-20131122). 東京都
3. 土原一哉: "網羅的がんゲノム変異解析と個別化医療への応用" 第 71 回日本癌学会学術集会. (20120921). 札幌

- 市
- 4 . 土原一哉: "The single nucleotide resolution landscape of somatic mutations of lung adenocarcinoma"
第 35 回日本分子生物学会年会.
(20121211). 福岡市(招待講演)

〔図書〕(計 0 件)
特記なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
特記なし

〔その他〕
ホームページ等
Database of Transcriptional Start
Sites: <http://dbtss.hgc.jp/>

- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
土原一哉(TSUCHIHARA, Katsuya)
国立がん研究センター・早期探索臨床
研究センター・分野長

研究者番号: 00415514