

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24501359  
研究課題名(和文) 進行非小細胞肺癌における癌関連遺伝子の網羅的解析による治療標的分子探索研究  
  
研究課題名(英文) Multiplex molecular profiling in advanced non-small cell lung cancers  
  
研究代表者  
岡本 勇 (Okamoto, Isamu)  
  
九州大学・大学病院・特任准教授  
  
研究者番号：10411597  
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)：本研究ではMassARRAYシステムを用いて、200例の進行非小細胞肺癌症例のパラフィン包埋組織よりEML4-ALK融合遺伝子の検出を試み、全例が測定可能であり、うち18例(9.0%)にEML4-ALK融合遺伝子を検出することに成功した。プラチナ併用化学療法の効果はALK転座陽性例、EGFR遺伝子変異陽性例、野生型、いずれも大きな差は見いだされなかった。  
さらにMassARRAYを用いて26遺伝子変異をマルチプレックスに解析し気管支鏡で得られた90%以上の検体で解析が可能であり、微小検体が遺伝子診断に使用できることが示された。

研究成果の概要(英文)：The primary platform for genotyping of tumors adopted in the present study is the Sequenom MassARRAY system. Among 200 patients with advanced nonsquamous NSCLC, 18 (9.0%) were positive for EML4-ALK, 31 (15.5%) harbored EGFR mutations, and 151 (75.5%) were wild type for both abnormalities. Platinum-based combination chemotherapy showed similar efficacies in the EML4-ALK, EGFR-mutation, and wild-type cohorts in terms of response rate and progression-free survival, and overall survival.  
We further tested FFPE specimens of NSCLC tissue for multiple genetic abnormalities simultaneously with the use of multiplex assay panels based on MassARRAY. Although most of the collected specimens were obtained by transbronchial biopsy and were small in size, >90% were successfully genotyped, thus satisfying the dual requirements of pathological diagnosis and multiplex analysis of somatic mutations with a single biopsy sample.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：非小細胞肺癌 分子標的治療 EGFR遺伝子変異 EML4-ALK融合遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) *EML4-ALK* 融合遺伝子発現非小細胞肺癌に対する ALK チロシンキナーゼ阻害剤の臨床試験が進み本邦でも臨床導入されることが見込まれる。*EML4-ALK* 陽性患者における ALK 阻害剤の効果は劇的であることから、高感度検出法の確立が急がれる。我々は PCR 法をベースとした MassARRAY システムを応用し、ホルマリン固定パラフィン包埋検体からの *EML4-ALK* 融合遺伝子の高感度検出法を確立した(特願 2010-254179)。MassARRAY は PCR によって目的領域を増幅し、その PCR 産物に対して一塩基伸長反応を行い、伸長塩基の質量をマトリクス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析装置によって測定し塩基配列を決定する装置であり、その長所として、劣化した核酸での測定が可能、スループット性が高い、マルチプレックス化による他検体処理が可能、蛍光色素等の試薬を用いないため測定コストが安価、が挙げられる。本法を用いて多くの臨床検体を解析し臨床導入を図るとともに、本邦の非小細胞肺癌患者における *EML4-ALK* 融合遺伝子の発現様式を明らかにする。

(2) 劇的な臨床効果をもたらす分子標的治療薬の臨床開発経験から、非小細胞肺癌の悪性形質を維持している分子異常を捉え、これらを標的とする分子標的治療薬を開発していくことが予後不良の本疾患の治療開発戦略の重要な方向性であることが伺える。今後はさらにどのような分子異常を標的とすべきかを検討する必要がある、本邦における進行非小細胞肺癌患者における網羅的遺伝子変異解析とこれら患者群の臨床情報が重要となる。米国においては 1000 例の非小細胞肺癌患者を対象に遺伝子変異解析が行われている(Lung Cancer Mutational Consortium)が、*EGFR*、*KRAS* の変異頻度の人種差に見られるように、これらの遺伝子異常の頻度に関してはわが国独自の解析が必要と考えられる。米国にて同様の解析が進行中であるが、本研究によりその遅れを取り戻す端緒としたい。

## 2. 研究の目的

(1) 進行非小細胞肺癌組織ホルマリン固定パラフィン包埋検体より MassARRAY システムを用いた高感度検出法により日本人進行非小細胞肺癌における *EML4-ALK* 融合遺伝子発現状況を明らかにする。

(2) *EML4-ALK* 融合遺伝子発現非小細胞肺癌に対する、従来の薬物療法の治療効果、予後との相関を明らかにする。

(3) 進行非小細胞肺癌組織ホルマリン固定パラフィン包埋検体から DNA を抽出し

MassARRAY システムを用いて非小細胞肺癌において報告されている主要な癌遺伝子及び癌抑制遺伝子の半網羅的変異解析を行い、本邦進行非小細胞肺癌における体細胞遺伝子変異の種類と頻度を明らかにする。

## 3. 研究の方法

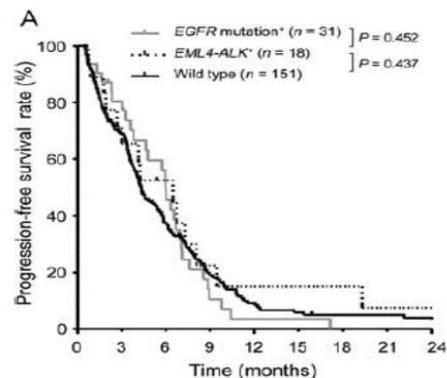
(1) 標準的な抗癌剤薬物療法が実施された進行非小細胞肺癌症例のうち、解析可能なパラフィン包埋組織が残存する 200 例より RNA を抽出し MassARRAY システムを用いた高感度検出法により *EML4-ALK* 融合遺伝子及び *EML4-ALK* バリエーションの発現解析を行い、治療効果、予後との相関を解析する。

(3) 進行非小細胞肺癌組織ホルマリン固定パラフィン包埋検体から DNA を抽出し MassARRAY システムを用いて非小細胞肺癌において報告されている主要な癌遺伝子及び癌抑制遺伝子の半網羅的変異解析を行い、本邦進行非小細胞肺癌における体細胞遺伝子変異の種類と頻度を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) 200 例のパラフィン包埋組織の全例が測定可能であり、うち 18 例(9.0%)に *EML4-ALK* 融合遺伝子を検出することに成功した。*EML4-ALK* 陽性症例の年齢中央値は 46 歳であり、*EGFR* 遺伝子変異陽性例よりもより若年である傾向が認められた。

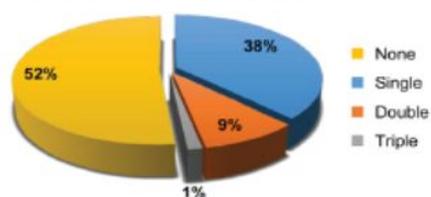
(2) 進行非小細胞肺癌の初回化学療法の標準的治療であるプラチナ併用化学療法の効果を *ALK* 転座陽性例、*EGFR* 遺伝子変異陽性例、野生型別に無増悪生存期間を指標として比較した(下図)。プラチナ併用療法は *ALK* 陽性例に対してもその効果は限られたものであることが示された。



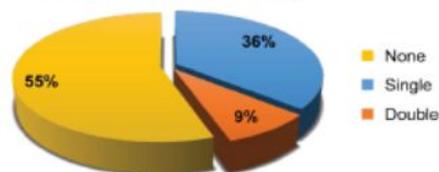
(3) 300 検体以上の進行非小細胞肺癌組織ホルマリン固定パラフィン包埋組織より DNA を抽出し MassARRAY を用いて 26 遺伝子変異をマルチプレックスに解析した結果、90% 以上の検体で一つ以上の遺伝子変異を検出

し得た。このことは気管支鏡で得られた微小検体が遺伝子診断に使用できることを示すものである。

#### Nonsquamous (N = 217)



#### Squamous (N = 58)



#### 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 2 件)

1. Takeda M, Okamoto I, Sakai K, Kawakami K, Nishio K, Nakagawa K.  
Clinical outcome for EML4-ALK-positive patients with advanced non-small cell lung cancer treated with first-line platinum-based chemotherapy  
Annals of Oncology (査読有)  
2012;23(11):2931-2936  
doi: 10.1093/annonc/mds124.
2. Okamoto I, Sakai K, Morita S, Yoshioka H, Kaneda H, Takeda K, Hirashima T, Kogure Y, Kimura T, Takahashi T, Atagi S, Seto T, Sawa T, Yamamoto M, Satouchi M, Okuno M, Nagase S, Takayama K, Tomii K, Maeda T, Oizumi S, Fujii S, Akashi Y, Nishino K, Ebi N, Nakagawa K, Nakanishi Y, Nishio K.  
Multiplex genomic profiling of non-small cell lung cancers from the LETS phase III trial of first-line S-1/carboplatin versus paclitaxel/carboplatin: results of a West Japan Oncology Group study  
Oncotarget (査読有) 2014; 5(8): 2293-2230  
[http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=1906](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=1906)

[学会発表](計 4 件)

1. Masayuki Takeda, Isamu Okamoto, Kazuko Sakai, Hisato Kawakami, Kazuto Nishio, Kazuhiko Nakagawa  
Clinical outcome for EML4-ALK-positive patients with advanced non-small cell lung cancer treated with first-line platinum based Chemotherapy

第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会  
2012 年 7 月 26 日 ~ 28 日 大阪市

2. 武田真幸、岡本勇、坂井和子、川上尚人、西尾和人、中川和彦  
EML4-ALK 陽性進行非小細胞肺癌における、初回白金併用化学療法の治療効果の検討  
第 50 回 日本癌治療学会学術集会  
2012 年 10 月 25 日 ~ 27 日 横浜市
3. 武田真幸・岡本勇・坂井和子・川上尚人・西尾和人・中川和彦  
EML4-ALK 陽性進行非小細胞肺癌における、初回白金併用化学療法の治療効果の検討  
第 53 回日本肺癌学会総会  
2012 年 11 月 8 日 ~ 9 日 岡山市
4. Yoshioka H, Okamoto I, Sakai K, Morita S, Kaneda H, Takeda K, Hirashima T, Kogure Y, Kimura T, Takahashi T, Atagi S, Seto T, Sawa T, Yamamoto M, Satouchi M, Okuno M, Nagase S, Takayama K, Tomii K, Maeda T, Oizumi S, Fujii F, Akashi Y, Nishino K, Ebi N, Nakagawa K, Nakanishi Y, and Nishio K  
Multiplexed genomic profiling of non-small-cell lung cancers (NSCLC) from the LETS phase III trial of first-line S-1/carboplatin versus paclitaxel/carboplatin (WJOG6611LTR).  
ASCO Annual Meeting  
2014 年 5 月 30 日 ~ 2014 年 6 月 3 日  
Chicago

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 勇(OKAMOTO Isamu)

九州大学 特任准教授

研究者番号：10411597

(2)研究分担者

中川 和彦(NAKAGAWA Kazuhiko)

近畿大学医学部 教授

研究者番号：40298964

西尾 和人 (NISHIO Kazuto)  
近畿大学医学部 教授  
研究者番号：10208134

坂井 和子 (SAKAI Kazuko)  
近畿大学医学部 助教  
研究者番号：20580559

(3)連携研究者  
なし