

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430149

研究課題名(和文) ALK融合遺伝子肺癌におけるゲノム不安定性

研究課題名(英文) Genomic instability of ALK fusion positive lung adenocarcinoma

研究代表者

二宮 浩範 (NINOMIYA, HIRONORI)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 病理部・研究員

研究者番号：20462228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ALK融合遺伝子陽性及び陰性肺腺癌におけるゲノム不安定性の比較を全ゲノムにわたるコピー数変化の検出が可能なCopy number analyzer for GeneChip (CNAG)を用いて解析を行った。ALK融合遺伝子陽性肺腺癌においてはALKおよびEML4を含む2番染色体短腕において35例中10例(28.5%)に頻回のコピー数変化がみられ、ALK融合遺伝子陰性例では0%(0/95)であった。ALK融合遺伝子の形成にはゲノムの断片化と再構成、いわゆるchromothripsisが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed surgically resected pulmonary adenocarcinomas with Copy number analyzer for GeneChip (CNAG). The result revealed that frequent copy number change occurred on the short arm of chromosome 2 among ALK fusion positive cases. Same genomic alteration pattern was detected in 10 cases among 35 (28.5%). On the other hand, no case showed similar copy number change among ALK fusion negative cases. The result revealed that genomic fragmentation and reconstruction is a notable mechanism of ALK fusion gene formation leading to carcinogenesis.

研究分野：呼吸器病理

キーワード：肺腺癌 ALK融合遺伝子 ゲノム不安定性 クロモトリプシス

1. 研究開始当初の背景

肺癌における ALK 融合遺伝子の発見により、ALK 阻害剤による高い治療効果を期待できる一群が肺腺癌において見出された。その臨床病理学的背景として若年非喫煙者肺腺癌であることが症例の蓄積により明らかにされた。これは東アジアの非小細胞癌症例で高頻度にみられる EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌と類似した背景である。しかしながらその融合遺伝子の成因については明らかでない。我々は以前より EML4-ALK 陽性肺腺癌の病理学的特徴についての検討や (Inamura K et al. J Thorac Oncol. 2008; 3: 13-7)、Multiplex RT-PCR による EML4-ALK 症例のスクリーニング法を確立しており (Takeuchi et al. Clin Cancer Res. 2008; 14: 6618-24.)、過去の手術症例を含めて consecutive に陽性例の抽出を行っていた。ALK 融合遺伝子陽性例の染色体レベルでの変化を網羅的に検索した報告はこれまでになく、遺伝子異常の蓄積が少ないと推測される臨床背景 (若年非喫煙者) を持ち、発癌に至った症例のゲノム変化は興味深いテーマである。

2. 研究の目的

EML4-ALK 融合遺伝子陽性および陰性肺腺癌のゲノムワイドなコピー数の比較を行うことにより、変化部位を含めたその特徴及び成因についての解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

当院にて外科切除された肺腺癌症例のうち、ALK 融合遺伝子陽性 35 例、ALK 融合遺伝子陽性 95 例の解析の比較から、ALK 融合遺伝子陽性例に特徴的なゲノムの構造変化を見出し、さらに確立された EML4-ALK 陽性症例の細胞株 1 例においても検索を行った。その解析には全ゲノムにわたるコピー数変化の詳細な検出が可能な Copy number analyzer for GeneChip (CNAG) を用い、融合遺伝子の有無によるゲノム数変化の比較を行った (Nannya et al. Cancer Res. 2005; 65: 6071-9)。コピー数変化のパターンにより臨床病理学的背景の比較 (年齢、性別、喫煙の有無、組織学的分化度、病理病期、静脈・リンパ管侵襲の有無) および術後生存率の比較を行った。

4. 研究成果

Copy number analyzer for GeneChip (CNAG) による解析の結果、ALK 遺伝子および EML4 遺伝子を含む 2 番染色体短腕において EML4-ALK 融合遺伝子陽性 35 例中 10 例 (28.5%) に頻回のコピー数変化がみられた (図 2)。一方、ALK 融合遺伝子陰性例 (95 例) では 0 例 (0/95, 0%) であった。同様の変化は細胞株による解析でも証明された (図 1)。V1-V5 の variant ごとにその変化部位を検索すると、融合遺伝

子を形成するのに必要な exon が保持される形で、ゲノムの欠失が起こっており、ALK 領域内での変化を有する 10 例 (25.7%)

(V2/V3/V4/V5/unknown:2/5/1/1/1)、EML4 領域内では 3 例 (8.5%) (V3:3) にコピー数変化を認めた。ALK 融合遺伝子陽性例のうちコピー数変化の有無により分けられた 2 群間で年齢、性別、喫煙の有無、組織学的分化度、病理病期、静脈・リンパ管侵襲の有無についての有意差はみられなかった (表 1)。また全生存率についてはコピー数変化を有する群において術後早期死亡例がみられたものの、2 群間に有意差はみられなかった (図 3)。切除検体および細胞株における 2 番短腕染色体上における頻回のコピー数変化から、ゲノムの断片化と再構成が起こっていることが示唆され、いわゆる chromothripsis が ALK 融合遺伝子陽性例の一部に関与していると考えられた。

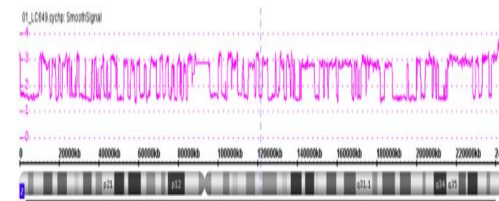


図 1. 細胞株における 2 番染色体のコピー数変化 (コピー数 1-3 の間で染色体全体にわたって頻回の変化あり)

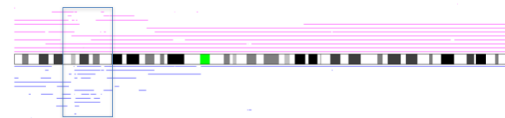


図 2. CNAG (Copy number analyzer for GeneChip) による 2 番染色体でのコピー数変化 (ALK および EML4 を含む領域 (囲み線) にてコピー数を示す実線の途絶を認める)

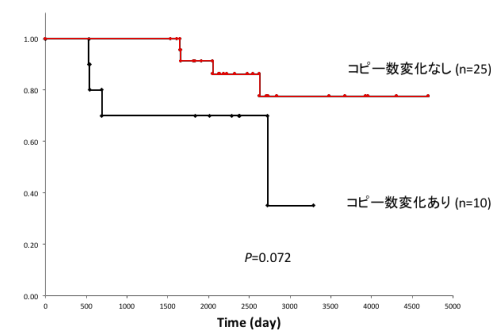


図 3. EML4, ALK 領域におけるコピー数変化の有無による全生存率の比較 (統計学的有意差なし)

ALK copy数変化の有無による比較		ALK copy数変化		P
		+	-	
症例数		10	25	
age		56.7	59.2	0.656
gender	male	5	9	0.474
	female	5	16	
smoking status	non-smoker	7	18	1.000
	smoker	3	7	
pStage	I	3	17	0.062
	II-IV	7	8	
differentiation	wel	1	3	1.000
	mod+por	9	22	
lymphatic invasion	+	5	6	0.227
	-	5	19	
vessel invasion	+	7	13	0.458
	-	3	12	

t-test, square test

表 1. ALK 領域内でのコピー数変化の有無による臨床病理学的背景の比較

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 1 件)

A novel mechanism of EML4-ALK rearrangement mediated by chromothripsis in a patient-derived cell line.

Kodama T, Motoi N, Ninomiya H, Sakamoto H, Kitada K, Tsukaguchi T, Satoh Y, Nomura K, Nagano H, Ishii N, Terui Y, Hatake K, Ishikawa Y.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Lung adenocarcinoma with unique pathological features. Hironori Ninomiya, Yuichi Ishikawa 2014年10月25日~2014年10月26日 IAP日台スライドカンファレンス台湾 台北
2. Unique pattern of copy number changes including chromothripsis in pulmonary adenocarcinoma with EML4-ALK fusion. Hironori Ninomiya, Masahiro Kato, Seishi Ogawa, Tatsushi Kodama, Hiroshi Sakamoto, Nobuhisa Ishii, Noriko Motoi, Kengo Takeuchi, Mutsunori Fujiwara, Yuichi Ishikawa AACR annual meeting

2015 2015年04月18日~2015年04月22 日

Pennsylvania Convention Center

3. EML4-ALK陽性扁平上皮癌成分を有する2症例の分子生物学的解析 二宮浩範, 稲村健太郎, 西尾誠人, 奥村栄, 石川雄一 第75回日本癌学会 (2016年10月06日~2016年10月08日パシフィコ横浜)
4. EML4-ALK陽性腺扁平上皮癌の2例. 二宮浩範, 稲村健太郎, 榊原里江, 一瀬淳二, 松浦陽介, 中尾将之, 文 敏景, 大柳文義, 堀池 巧, 柳谷典子, 北園聡, 曾田学, 間野博行, 西尾誠人, 奥村 栄, 石川雄一 第57回日本肺癌学会学術集会 (2016年12月19日~2016年12月21日福岡国際会議場)

〔図書〕(計 1 件)

病理と臨床【臨時増刊号】

第2部 癌の分子病理学 B 臓器癌

13. 肺癌 2016 vol. 34 文光堂

稲村健太郎 二宮浩範 石川雄一

〔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

二宮 浩範 (NINOMIYA, Hironori)
公益財団法人がん研究会・がん研究所 病理部・研究員
研究者番号: 20462228

(2)研究分担者

石川 雄一 (ISHIKAWA, Yuichi)
公益財団法人がん研究会・がん研究所 病理部・部長
研究者番号: 80222975

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者
なし