

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461155

研究課題名(和文) 肺がんの新規分子標的治療法開発

研究課題名(英文) Development of a new molecular target therapy for lung cancer

研究代表者

曾田 学 (SODA, Manabu)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：10406118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用いてnon-TRUタイプの肺腺がん43症例86検体(腫瘍部と非腫瘍部のペア)の全エクソン解析を施行した。その結果、43例中7例においてNKX2-1/TTF-1遺伝子に8種類の非同義変異の存在が認められた。これら8つのNKX2-1/TTF-1変異体はいずれも失活変異体であることが確認され、変異陽性の7症例はいずれもTTF-1免疫染色が陰性で、そのうち5例にはKRAS変異も併存していた。組織学的にはNKX2-1/TTF-1変異陽性7例中5例が粘液産生腺癌で、本遺伝子変異は直接的な癌化能を持たないものの、non-TRUタイプの肺腺がんの発生機序に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the whole exome sequencing of 43 non-TRU-type lung adenocarcinoma specimens (tumor-normal pairs) using the next generation sequencer. As a result, in 7 of 43 cases, there were 8 kinds of nonsynonymous mutations in NKX2-1/TTF-1 gene. All of these eight NKX2-1/TTF-1 mutants were confirmed to be inactivating mutants, and TTF-1 immunostaining was negative for all 7 mutation-positive cases. KRAS mutations were confirmed in 5 of 7 cases. Histologically, 5 of 7 NKX2-1/TTF-1 mutation-positive cases were classified as invasive mucinous adenocarcinomas, and it was suggested that NKX2-1 gene mutations were involved in the developmental mechanism of non-TRU type lung adenocarcinoma.

研究分野：肺がんのゲノム機能解析

キーワード：肺がん

## 1. 研究開始当初の背景

肺がんは我が国及び欧米先進国におけるがん死数の第一位を占める予後不良の疾患であり、世界中で毎年 130 万人が、また日本だけでも年間 6 万人以上が肺がんのために亡くなっている。旧来の抗がん剤による化学療法は殆ど有効でなく、肺がん患者への延命効果が証明された治療剤は少ない。2004 年に主にアジア人の若年非喫煙者に発症する肺がんの 2~4 割において上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異が認められ、これら肺がんに対して EGFR の特異的酵素活性阻害剤であるゲフィチニブやエルロチニブが著効を示すことが報告された。

2007 年に我々は、非小細胞肺がん (NSCLC) の約 3-5% に *EML4* (echinoderm microtubule associated protein-like 4) -*ALK* (anaplastic lymphoma kinase) 融合型遺伝子が存在することを発見した (申請者ら *Nature* 448:561, 2007)。*EML4-ALK* は非常に強いがん化能を有しており、本遺伝子陽性例における発がん原因であることが証明され、*ALK* キナーゼ活性阻害剤であるクリゾチニブの臨床試験が米国を中心に行われた。2010 年にその著しい治療効果が報告され (Kwak *et al.*, *N Engl J Med* 363 :1693, 2010) 2011 年には同阻害剤が米国で、2012 年 3 月には日本でも薬剤承認を受け実地医療での処方が開始され、*ALK* 陽性肺がんに対する *ALK* 阻害剤は肺がん診療におけるキードラッグと位置づけられるようになった。

我々はさらに肺がんにおける治療標的を発見するプロジェクトを進展させ、*RET* チロシンキナーゼと *ROS1* チロシンキナーゼがそれぞれ肺腺がんの数%において融合型キナーゼとなっていることを発見した (竹内、申請者ら *Nat Med* 18:378, 2012)。いずれのキナーゼも遺伝子融合の結果恒常的に活性化されたがん化酵素となっており、それぞれに対する特異的阻害剤が新しい分子標的治療薬になると期待される。実際、本成果をもとに、*RET* 特異的阻害剤および *ROS1* 特異的阻害剤を

用いた肺がんに対する医師主導試験が行われ、*EML4-ALK* の発見に続いて、我々の研究成果が新たな特効薬を肺がん患者に届ける事につながると予想されていた。

## 2. 研究の目的

「悪性腫瘍の主要がん遺伝子を同定してその阻害剤を開発すること」が有効な分子標的療法を開発する上で極めて重要である。そこで本研究計画の第一の目標を、*EGFR*、*EML4-ALK*、*RET*、*ROS1* 以外の新たな肺がん原因遺伝子の同定とする。この目的のために、我々がこれまでに集積した肺がん臨床検体を用いて「cDNA 発現ライブラリーシステム」ならびに「次世代シーケンサーを用いた paired-end sequencing」による遺伝子解析を行う。さらに本研究の第二の目標として、*ALK* 阻害剤耐性機構の解明とする。すでに我々は、次世代シーケンサーを用いて耐性原因となる *ALK* 内の二次変異の発見に成功しているが (崔、申請者ら *N Engl J Med* 363:1734, 2010)、同様のアプローチで *ALK* 阻害剤耐性となった症例の治療前後の検体について解析を行う。

## 3. 研究の方法

研究代表者らが収集した肺がん外科切除試料 (何れもインフォームドコンセントを得ており、かつ東京大学ならびに共同研究機関における倫理審査委員会の承認済) を用いて、大規模に次世代シーケンサー解析を行い、肺がん発症メカニズムに起因し得るゲノム異常を同定する。具体的には各検体から正常部と腫瘍部のゲノム DNA を調整・増幅し、全エクソン領域をキャプチャーした後に次世代シーケンサー (イルミナ社 HiSeq2000/2500) による paired-end sequencing を行い、主に遺伝子変異解析を行う。同様に腫瘍部の total RNA をもとに次世代シーケンサーにて RNA シーケンス解析を行い、新規融合遺伝子の同定を試みる。

また「がん化能」を指標としたがん遺伝子

のスクリーニングを目的として、マウス繊維芽細胞 3T3 を用いた focus formation assay を行う。これは研究代表者らが *EML4-ALK* を同定した際と同じ手法で、肺がん臨床検体より作成した cDNA をレトロウィルスプラスミドに挿入することで、cDNA 発現組み換えレトロウィルスライブラリーを構築し、本ウィルスライブラリーを 3T3 細胞に感染させるものである。それぞれの cDNA は 3T3 細胞内でウィルスが持つ強力な転写制御ユニットである LTR (long terminal repeat) によって発現が誘導されるため、その結果全ての cDNA が感染細胞において高発現することになり、肺がん細胞内にもともと存在したがん遺伝子が効率よく同定されると期待される。

ALK 阻害剤耐性症例においては、その ALK 阻害剤治療前後の検体から試料を調製して次世代シーケンサーにて全エクソン解析を施行し、耐性期にのみ発現している遺伝子変異の存在を解析・評価する。

#### 4. 研究成果

数例の肺がん臨床検体から構築した cDNA 発現レトロライブラリーを用いたマウス繊維芽細胞 3T3 focus formation assay から複数個の肺がん原因遺伝子候補が得られたものの、現時点で真のがん遺伝子かどうかを特定することに難渋しており今後引き続き検証していく。

*EML4-ALK* 陽性肺がん症例に対して、ALK 阻害剤であるクリゾチニブを投与後に一度は薬剤に奏効したもののその後再増悪したため別の ALK 阻害剤であるアレクチニブを投与したところ一時的に奏効後、再度増悪 (薬剤耐性期) した症例の検体を入手した。本症例の治療前 (薬剤感受性期) と耐性期検体の全エクソン解析を施行し、感受性期と耐性期とで発現している遺伝子のプロファイリングを比較検討したところ、ALK のキナーゼドメイン内の G1202R 変異を薬剤耐性期でのみ認めた。残念ながら本遺伝子変異は新規発見ではなく、既にクリゾチニブやアレクチニブの薬剤耐性変

異として報告されている遺伝子変異であった。

次世代シーケンサーを用いて非小細胞肺がんを中心に発がんに関わる遺伝子異常を解明するためにそのゲノム解析を行った。そのうち non-TRU タイプの肺腺がん 43 症例 86 検体 (腫瘍部と非腫瘍部のペア) について全エクソン解析ならびに腫瘍部に関して RNA シーケンスを行い、腫瘍部検体でのみ発現が認められているアミノ酸置換を伴う遺伝子変異について肺がんとの関連を検証した。その結果 43 例中 7 例において *NKX2-1/TTF-1* 遺伝子に 8 種類の非同義変異の存在が認められた。

*NKX2-1/TTF-1* により転写活性化される標的遺伝子である *MYBPH* を指標としたルシフェラーゼアッセイにおいて、これら 8 つの

*NKX2-1/TTF-1* 変異体はいずれも失活変異体であることが確認された。これら 7 症例はいずれも *TTF-1* 免疫染色が陰性でうち 5 例に *KRAS* 変異の併存が認められた。7 例中 5 例が粘液産生性の肺腺癌に分類され、non-TRU タイプの肺腺癌の中でも同タイプに特徴的な失活変異体であることが示唆された。さらに

*NKX2-1/TTF-1* 遺伝子のメチル化をバイサルファイトシーケンスにより検討したところ、*NKX2-1/TTF-1* に変異を持たない *TTF-1* 免疫染色陰性例の多くが高度にメチル化されていることも確認され、遺伝子変異ならびに高メチル化により *TTF-1* の発現が抑制されていることが解明された。以上の結果は non-TRU タイプ肺腺癌の発生機序を解明する重要な知見と考えられる。

同コホートの RNA シーケンス解析結果からは、3 つの新たな融合型遺伝子を同定したものの現時点ではそのがん化能を確認するには至らなかった。本融合型遺伝子は分子標的薬治療の直接的な標的とは考えにくいものの、今後の解析により何らかの肺がん発症機構との関連が認められる可能性がある。

以上より、明らかな新規肺がん原因遺伝子の発見や ALK 阻害剤耐性に関する新規機序の同定には至らなかったものの、肺がんの発生機序に關与し得る組織特異的な遺伝子変異を

同定し、また複数の新規融合型遺伝子の存在を示す結果が得られた(投稿準備中)。

#### 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) Ando M, Kawazu M, Ueno T, Koinuma D, Ando K, Koya J, Kataoka K, Yasuda T, Yamaguchi H, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Sai E, Yamashita Y, Asakage T, Miyazaki Y, Kurokawa M, Miyazono K, Nimer SD, Yamasoba T, Mano H "Mutational Landscape and Antiproliferative Functions of ELF Transcription Factors in Human Cancer" *Cancer Res.* **76**: 1814-1824, 2016.
- 2) Fukumura K, Kawazu M, Kojima S, Ueno T, Sai E, Soda M, Ueda H, Yasuda T, Yamaguchi H, Lee J, Shishido-Hara Y, Sasaki A, Shirahata M, Mishima K, Ichimura K, Mukasa A, Narita Y, Saito N, Aburatani H, Nishikawa R, Nagane M, Mano H "Genomic characterization of primary central nervous system lymphoma" *Acta Neuropathol* **131**: 865-875, 2016.
- 3) Yamaguchi H, Kawazu M, Yasuda T, Soda M, Ueno T, Kojima S, Yashiro M, Yoshino I, Ishikawa Y, Sai E, Mano H. "Transforming somatic mutations of mammalian target of rapamycin kinase in human cancer" *Cancer Sci.* **106**: 1687-1692, 2015.
- 4) Yamato A, Soda M, Ueno T, Kojima S, Sonehara K, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Nagase T, Mano H. "Oncogenic activity of BIRC2 and BIRC3 mutants independent of nuclear factor- $\kappa$ B-activating potential" *Cancer Sci.* **106**: 1137-1142, 2015.
- 5) Hashizume O, Ohnishi S, Mito T, Shimizu A, Ishikawa K, Nakada K, Soda M, Mano H, Togayachi S, Miyoshi H, Okita K, Hayashi J "Epigenetic regulation of the

nuclear-coded GCAT and SHMT2 genes confers human age-associated mitochondrial respiration defects" *Sci Rep.* **5**: 10434, 2015.

- 6) Nakamura Y, Taniguchi H, Mizoguchi K, Ikeda T, Motoshima K, Yamaguchi H, Nagashima S, Nakatomi K, Soda M, Mano H, Kohno S "Secondary EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma in a patient previously treated for acute lymphoblastic leukemia in childhood: a case report" *Jpn J Clin Oncol.* **44**: 593-596, 2014.
- 7) Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H, Soda M, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Murata M, Kiyoi H, Naoe T, Mano H "Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation" *Leukemia.* **28**: 426-428, 2014.

[学会発表](計2件)

- 1) 第54回日本呼吸器学会学術講演会、ALK肺がんのALK-TKI耐性：曾田学、2014.4.25：大阪
- 2) 第54回日本呼吸器学会学術講演会、Targeting ALK fusion in lung cancer：曾田学、2014.4.26：大阪

[図書](計4件)

- 1) 曾田学、間野博行. 科学評論社、腫瘍内科：711-716, 2014.
- 2) 曾田学、間野博行. メディカルレビュー社、Pharma Medica: 27-31, 2014
- 3) 曾田学. 最新医学社、最新医学：2476-2481, 2015.
- 4) 澤田哲郎、曾田学、杉山幸比古. メディカルトリビューン社、ファーマトリビューン：7月号5-13, 2015.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

なし

取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

曾田 学 (SODA, Manabu)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10406118

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし