

機関番号：32202

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2010

課題番号：21689023

研究課題名（和文） EML4-ALK 陽性肺がんの病態解明

研究課題名（英文） Molecular analyses of EML-ALK-positive lung cancer

研究代表者

曾田 学 (SODA MANABU)

自治医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10406118

研究成果の概要（和文）：

我々は2007年に肺がんの新規原因遺伝子EML4-ALKを発見したが、本遺伝子は inv(2) (p21p23) という染色体転座の結果EML4遺伝子とALK遺伝子とが融合したものである。ALKは本来受容体型チロシンキナーゼをコードするが、染色体転座によってその酵素活性領域が微小管会合タンパクEML4のアミノ末端側と融合したタンパクが産生され、恒常的に活性化されたチロシンキナーゼとして肺がんを導く。既にEML4-ALK陽性肺がんに対するALK酵素活性阻害剤の臨床試験が始まっており、その著明な臨床効果が報告された。今後のALK阻害剤の普及に際し、EML4-ALK陽性肺がんを正確かつ感度良く検出する診断技術の開発が重要になる。本研究計画においてはEML4-ALK cDNAの融合点を検出するマルチプレックスRT-PCR法が優れたEML4-ALK陽性肺がんの分子診断法となる事を確認した。

研究成果の概要（英文）：

We discovered in 2007 that a chromosomal rearrangement inv(2) (p21p23) in lung cancer generates a novel oncogene EML4-ALK which produces a constitutively activated, fusion protein between the amino-terminal half of a microtubule-associated protein EML4 and the catalytic domain of ALK. Clinical trials with ALK inhibitors are ongoing worldwide, and one of such early trials has already proved a marked efficacy of the compound against EML4-ALK-positive lung cancer. The swift introduction of ALK inhibitors to clinics raises a concern as to how EML4-ALK-positive tumors are diagnosed both accurately and sensitively. Here we developed multiplex RT-PCR system to capture EML4-ALK cDNAs, and further proved such technology to be a reliable means for clinical use.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
年度			
総計	9,900,000	2,970,000	12,870,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：EML4-ALK、肺がん、遺伝子診断

1. 研究開始当初の背景

肺がんは日本および米国におけるがん死亡の第1位を占めている予後不良の疾患であり、今後も肺がん患者数は増加することが予測されている。しかし、手術切除術の適応がない進行期肺がんの平均生存期間は、旧来の抗がん剤による化学療法や放射線療法では今日においても1年以下と極めて不良である。また、発がんメカニズムについては不明な点が多いが、2004年にPaezらおよびLynchらによって、一部の肺がん細胞において上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor: EGFR）遺伝子の配列異常が存在することが示され、しかもこれらEGFR変異を持つ患者に対してEGFRのキナーゼ活性阻害剤であるgefitinib（イレッサ）やerlotinib（タルセバ）が治療上有効であることの報告があった。これらの知見は、肺がんに対する有効な分子標的療法の開発のためには肺がん発症に中心的な役割をはたす遺伝子を同定し、それを標的とした治療剤の開発が必要であることを明示している。

そこで我々は、肺がん患者臨床検体を用いた機能スクリーニング法により、肺がん発症の新たな原因遺伝子を同定することを目指した。患者検体で発現している遺伝子の機能を効率よくスクリーニングするためには、微量の細胞からcDNAを作成し、これを他の細胞に遺伝子導入するcDNA発現スクリーニングシステムを用いることが必要である。この目的のために我々は、Clontech社のSMART PCR法を応用して患者検体より完全長cDNAを選択的に増幅し、cDNA発現組換えレトロウィルスライブラリーを作成する手法を開発し

た。本法を用いて、肺腺がん患者の切除検体からcDNA発現レトロウィルスライブラリーを構築し、マウス線維芽細胞3T3を用いたフォーカスフォーメーションアッセイを行った。その結果、微少管会合タンパクEML4と、受容体型チロシンキナーゼALKの細胞内領域とが融合した新しい活性型チロシンキナーゼEML4-ALKが肺がん症例の一部で発現していることを発見した（申請者が筆頭著者*Nature* 448:561）。本融合遺伝子は本邦の非小細胞肺がん症例の約5~10%に認められ、また同遺伝子陽性症例には既知のがん遺伝子であるKRAS, EGFRの変異は認められなかった。従ってEML4-ALKは、肺がんの新たな分子標的療法剤の開発を可能にする優れた標的分子と考えられる。実際、同遺伝子を肺胞上皮特異的に発現するトランスジェニックマウスは生後まもなく両肺に数百個の肺腺がんを発症し、しかもこのマウスにALKキナーゼ阻害剤を投与すると速やかに肺がんは消失した（*PNAS* 105:19893）。以上よりEML4-ALK陽性肺がんは同遺伝子産物をターゲットとした分子標的治療のよい対象と考えられた。

2. 研究の目的

EML4-ALK陽性細胞においては、両遺伝子の融合点を挟むように設置したプライマーを用いたRT-PCRにより、EML4-ALK cDNAを簡便に増幅可能である。しかし正常細胞においてはEML4遺伝子、ALK遺伝子どちらも2番染色体短腕上に互いに反対向きに存在しているため、同じプライマーセットでは特異的PCR産物をまったく生じない。すなわち同遺

伝子の融合点を標的とした RT-PCR 法は、これまでとは全く異なる高感度を有する肺がんの早期診断法となると期待される。そこで本研究計画においては、臨床検体による EML4-ALK 陽性肺がんの分子診断法の有用性について大規模な前臨床スタディを行う。

3. 研究の方法

EML4-ALK 遺伝子の融合点を標的とした RT-PCR 法は、これまでとは全く異なる高感度を有する肺がんの早期診断法となる。申請者らはこれまで、EML4 遺伝子内の異なるイントロンで ALK につながった EML4-ALK バリエントが肺がんにおいて複数存在することを明らかにしており、これらすべてのバリエントを一本のチューブで検出可能な multiplex RT-PCR 法を開発する事を目指す。既に我々は、全国に広がるボランティア診断ネットワーク活動によって約 1000 例の肺がん症例より喀痰を収集し cDNA を合成している。本研究計画ではこれら cDNA を用いた multiplex RT-PCR 診断法の有用性について大規模な前臨床スタディを行う。

また申請者らが樹立した EML4-ALK 発現トランスジェニックマウスは、ALK 酵素阻害剤の有効なスクリーニングシステムとなる。そこで本マウスを用いて「EML4-ALK キナーゼの下流分子についてプロテオミクスアプローチによる探索を行う」、「EML4-ALK 陽性肺がんに生じている他の遺伝子異常を探索する」、「低分子化合物のスクリーニングを行い、生体における有用性を検討する」について解析を行う。

4. 研究成果

我々が最初に発見した EML4-ALK 融合型がん遺伝子は EML4 cDNA のエクソン 13 が ALK cDNA のエクソン 20 に融合したものであったが、ALK のエクソン 20 に論理的に in-frame で融合しう

る EML4 のエクソンには 13 だけでなく 2、6、18、20、21 が存在する。そこでこれらのエクソンで ALK に融合した新たな EML4-ALK バリエント cDNA も検出可能なように、EML4 遺伝子のエクソン 1、3、13、20 上にそれぞれ forward primer を設計した。また我々は ALK の別の融合型がん遺伝子 KIF5B-ALK も発見したが、上記と同様に KIF5B のエクソン 2、11、17、24 それぞれにも別の 4 種類の forward primer を設計し、これら計 8 種類の primer と ALK のエクソン 20 上に設置した reverse primer とを混和した multiplex RT-PCR 法による検出プロトコールを開発した。

さらに本法を用いて多数の肺がん検体(喀痰+生検標本)から RNA を調製して PCR を行った。実際の解析は、我々のボランティア診断活動「ALK 肺がん研究会: ALK Lung Cancer Study Group (ALCAS)」において、上記 RT-PCR 法を用いて前向き診断を行った。これらの活動を通して数十例の EML4-ALK 陽性例を検出し、そのうち 15 名が韓国ソウル大学で行われた ALK 阻害剤 (crizotinib) による第一相臨床試験に参加することができた。なお我々が検出した EML4-ALK には新規バリエントが存在しただけでなく、本ライン in-frame に融合しないエクソンからでも ALK エクソン 20 の内部にスプライシングが飛ぶ形で最終的に in-frame の癒合キナーゼが産生される異型バリエントも 2 種類含まれていた。以上よりマルチプレックス RT-PCR 法は EML4-ALK/KIF5B-ALK を感度・精度良く検出可能な分子診断法であると言える。

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 11 件)

- 1) Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Ota Y, Sekiguchi Y, Hatano S, Asaka R, Noguchi M, Mano H. Identification of a novel fusion,

- SQSTM1-ALK, in ALK-positive large B-cell lymphoma. *Haematologica* 96, 2011, 464-467.
- 2) Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene* 29, 2010, 3723-3731.
 - 3) Sakairi Y, Nakajima T, Yasufuku K, Ikebe D, Kageyama H, Soda M, Takeuchi K, Itami M, Iizasa T, Yoshino I, Mano H, Kimura H. EML4-ALK Fusion Gene Assessment Using Metastatic Lymph Node Samples Obtained by Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration. *Clin Cancer Res* 16, 2010, 4938-4945.
 - 4) Osoegawa A, Nosaki K, Miyamoto H, Kometani T, Hirai F, Ondo K, Seto T, Sugio K, Choi YL, Soda M, Mano H, Ichinose Y. Incidentally proven pulmonary "ALKoma". *Intern Med* 49, 2010, 603-606.
 - 5) Nakajima T, Kimura H, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Yasufuku K, Iizasa T. Treatment of Lung Cancer with an ALK Inhibitor After EML4-ALK Fusion Gene Detection Using Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration. *J Thorac Oncol* 5, 2010, 2041-2043.
 - 6) Hatanaka H, Tsukui M, Takada S, Kurashina K, Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Haruta H, Hamada T, Ueno T, Tamada K, Hosoya Y, Sata N, Yasuda Y, Nagai H, Sugano K, Mano H. Identification of transforming activity of free fatty acid receptor 2 by retroviral expression screening. *Cancer Sci* 101, 2010, 54-59.
 - 7) Hatanaka H, Takada S, Tsukui M, Choi YL, Kurashina K, Soda M, Yamashita Y, Haruta H, Hamada T, Tamada K, Hosoya Y, Sata N, Nagai H, Yasuda Y, Sugano K, Mano H. Identification of the transforming activity of Indian hedgehog by retroviral expression screening. *Cancer Sci* 101, 2010, 60-64.
 - 8) Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, Takeuchi K, Hamada T, Haruta H, Ishikawa Y, Kimura H, Mitsudomi T, Tanio Y, Mano H. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med* 363, 2010, 1734-1739.
 - 9) Wada T, Yamashita Y, Saga Y, Takahashi K, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Mano H, Suzuki M. Screening for genetic abnormalities involved in ovarian carcinogenesis using retroviral expression libraries. *Int J Oncol* 35, 2009, 973-976.
 - 10) 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 oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 15, 2009, 3143-3149.
 - 11) 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, 2009, 508-515.

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会
肺がんにおける新規融合型がん遺伝子 EML4-ALK の発見: 曾田学 (2009. 6. 12-14, 東京)
- 2) 第 68 回日本癌学会学術総会
EML4-ALK fusion-type protein tyrosine kinase in carcinogenesis : 曾田学 (2009. 10-1-3, 横浜)
- 3) 第 50 回日本肺癌学会総会
ALCAS 診断ネットワークの中間報告 -multiplex RT-PCR 法による診断- : 曾田学, 杉山幸比古, 間野博行 (2009. 11. 12-13, 東京)
- 4) AACR 100th Annual Meeting 2009
An experimental model for in vivo treatment with ALK inhibitors of EML4-ALK-positive lung cancer: Manabu Soda, Shuji Takada, Kengo Takeuchi, Hisashi Hatanaka, Yoshihiro Yamashita, Yuichi Ishikawa, Yukihiro Sugiyama, Hiroyuki Mano. (2009. 4. 18-22, アメリカ, デンバー)
- 5) ATS 2009 International Conference
Analysis of a Mouse Model for EML4-ALK-Positive Lung Cancer: Manabu Soda, Shuji Takada, Kengo Takeuchi, Yuichi Ishikawa, Yukihiro Sugiyama, Hiroyuki Mano. (2009. 5. 15-20, アメリカ, サンディエゴ)
- 6) 6th Tucson Symposium
ALK-positive Lung Cancer: Discovery of EML4-ALK Fusion Tyrosine Kinase : Manabu Soda (2010. 3. 10-11, アメリカ, ツーソン)
- 7) Keystone Symposia
EML4-ALK fusion-type protein tyrosine

kinase in lung cancer: Manabu Soda, Toshihide Ueno, Yoshihiro Yamashita, Hiroyuki Mano. (2010. 3. 23-28, カナダ, ビクトリア)

- 8) 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会
Multiplex RT-PCR 法による ALK 融合型がん遺伝子の診断; ALK-lung cancer study group (ALCAS) 診断ネットワークの中間報告: 曾田学, 間野博行 (2010. 4. 23-25)
- 9) 第 69 回日本癌学会学術総会
肺がんにおける新規がん遺伝子 EML4-ALK の発見 (Discovery of EML4-ALK oncogene; an effective target in lung cancer): 曾田学, 間野博行 (2010. 9. 22-24, 大阪)
- 10) 第 50 回日本肺癌学会総会
肺癌の分子標的治療 基礎から臨床へ 非小細胞肺がんにおける ALK 融合遺伝子検出法: 曾田学, 間野博行 (2010. 11. 3-4, 広島)
- 11) ASCO Annual Meeting 2010
A Japanese nationwide network for the diagnosis of EML4-ALK-positive lung cancer: A joint study of ALCAS and NEJ004: Manabu Soda, Hiroyuki Mano, et al. (2010. 6. 4-8, アメリカ, シカゴ)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

取得年月日：
国内外の別：

〔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)

自治医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10406118

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：