

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月21日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300326

研究課題名（和文） 融合型チロシンキナーゼによる肺がん発症機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of molecular oncogenesis for lung cancer with fusion kinases

研究代表者

崔 永林（SAI EIRIN）

東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：40458295

研究成果の概要（和文）：

EML4-ALKがん遺伝子は我々が2007年に報告した肺がんの新規原因遺伝子であり、既に治療薬としてのALK阻害剤が承認・販売されている。我々は本研究計画において、ALK阻害剤治療中に再発した症例の解析から、薬剤耐性の原因となるEML4-ALK内二次変異を同定した。またEML4-ALKの様々なバリエーションを一度のRT-PCR実験で検出可能なマルチプレックスRT-PCR法を確立し、これを用いて日本人肺がんコホートの大規模な前向き検討を行った。

研究成果の概要（英文）：

In 2007, we discovered the EML4-ALK fusion-type oncogene in lung cancer, and a specific inhibitor against ALK kinase is already approved and used as a therapeutic drug. Here we examined lung cancer specimens before and after relapse against the ALK inhibitor treatment, and have identified secondary mutations within EML4-ALK that account for drug resistance. Further, we established multiplex RT-PCR system for the diagnosis of EML4-ALK-positive lung cancer, and confirmed its reliability in a large scale Japanese cohort.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん遺伝子

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

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。我々は、肺がんの治療標的を探索するため、がん化能を有する遺伝子を単離する機能スクリーニング法を開発した（崔ら *Leuk Res* 29:943）。本手法を用いて喫煙歴を持つ肺腺がん切除検体から cDNA ライブラリーを作成しがん遺伝子を探索したところ、微小管結合タンパクをコードする EML4 遺伝子と受容体型チロシンキナーゼをコードする ALK 遺伝子とが融合した新しいがん遺伝子 EML4-ALK を発見することに成功したのである（曾田、崔ら *Nature* 448:561、崔ら *Cancer Res* 68:4971）。

2. 研究の目的

我々の発見を基に、数多くの ALK 阻害剤が臨床試験を行っており、その一つ（crizotinib）は既に日本・米国を含む多くの国で承認販売されている。本研究計画において我々は、今後の ALK 阻害剤の急速な臨床普及の上で極めて重要な課題である、「正確な臨床診断法の確立」と「薬剤耐性機構の解明」を目指した。

3. 研究の方法

1) 臨床診断法の確立

ALK 遺伝子のエクソン 20（チロシンキナーゼ領域の上流）に in-frame で融合しうる EML4 エクソンは計 6 種類存在する。そこでこれらのどの領域から ALK へ融合した cDNA も、全て検出可能なように複数の forward primer を設計した。さらに我々が独自に発見した KIF5B-ALK 遺伝子も同時に検出可能なように KIF5B 上に 4 種類の forward primer を設計し

た。これら 8 種類の forward primer に 1 種類の reverse primer（ALK のエクソン 20 上に設計）を混和して、EML4-ALK および

KIF5B-ALK のいずれにおいても全ての融合バリエーションを検出可能なシステムを構築した。

2) ALK 阻害剤耐性機構の解明

上記診断システムで前向きに収集した肺がん検体コホートのうち、EML4-ALK 陽性が確認され ALK 阻害剤治療に入った症例が複数存在しており、その中には一部薬剤耐性となった症例がある。そこでこれら症例検体よりゲノム DNA・cDNA を調製し、治療前と耐性獲得後の検体を次世代シーケンサーで比較した。

4. 研究成果

1) 臨床診断法の確立

良質な RNA が確認された 808 種類の検体（754 例の前向きコホート）に対して EML4-ALK/KIF5B-ALK を検出するマルチプレックス RT-PCR 法解析を行った。その結果 34 検体（32 症例）が EML4-ALK 陽性である事が確認され、その内訳は variant 1 が 19 例、variant 2 が 1 例、variant 3 が 10 例、および新規バリエーションが各 1 例ずつであった。EML4-ALK 陽性例は全て肺腺がんであり、腺がんの約 6% に陽性であった。平均発症年齢は 48.3 才であり、EML4-ALK 陰性例の 65.5 才に比べて有意に若年発症であった（ $P < 0.001$ ）。EML4-ALK は女性に好発し（ $P < 0.001$ ）、非喫煙者あるいは軽度喫煙者に多いことも示された（ $P < 0.001$ ）。また RT-PCR の診断結果は、他の診断法（免疫組織染色法、FISH 法）による解析結果と良く一致した。

2) ALK 阻害剤耐性機構の解明

上記収集コホート内で、一旦 crizotinib が著効した後に薬剤耐性となった症例群を

得た。これらペア症例群に対してゲノム DNA および cDNA を調整し、次世代シーケンサー解析を行うことで、1 例の耐性期においてのみ、EML4-ALK 内に、C1156Y と L1196M という 2 種類の二次アミノ酸置換を発見した。両変異共に crizotinib 耐性を付与する変異である事を確認した。またこれら変異を有する EML4-ALK は crizotinib だけでなく、他の ALK 阻害剤に対しても耐性になり、ユニバーサルな ALK 阻害剤耐性メカニズムであると考えられた。興味深いことに L1196M 変異の場所は、BCR-ABL 陽性白血病が imatinib に対して耐性を獲得する T315I 変異、および変異 EGFR 陽性肺癌が gefitinib に耐性を獲得する T790M 変異と全く同じ場所に位置していた。

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 12 件)

1. 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, *N Engl J Med*, 査読有, 363, 2010, 1734-1739, DOI: 10.1056/NEJMoa1007478
2. 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, *Cancer Sci*, 査読有, 101, 2010, 60-64, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01355.x
3. 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, *Cancer Sci*, 査読有, 101, 2010, 54-59, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01348.x
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, *Intern Med*, 査読有, 49, 2010, 603-606, DOI: 10.2169/internalmedicine.49.3126
5. 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, *Oncogene*, 査読有, 29, 2010, 3723-3731, DOI: 10.1038/onc.2010.117
6. Sasaki D, Imaizumi Y, Hasegawa H, Osaka A, Tsukasaki K, Choi YL, Mano H, Marquez VE, Hayashi T, Yanagihara K, Moriwaki Y, Miyazaki Y, Kamihira S, Yamada Y, *Haematologica*, 査読有, 96, 2011, 712-719, DOI: 10.3324/haematol.2010.028605
7. Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K, *Mol Cell*, 査読有, 44, 2011, 424-436, DOI: 10.1016/j.molcel.2011.09.012
8. Choi YL, Soda M, Ueno T, Hamada T, Haruta H, Yamato A, Fukumura K, Ando M, Kawazu M, Yamashita Y, Mano H, *Carcinogenesis*, 査読有, 33, 2012, 956-961, DOI: 10.1093/carcin/bgs099
9. Soda M, Isobe K, Inoue A, Maemondo M, Oizumi S, Fujita Y, Gemma A, Yamashita Y, Ueno T, Takeuchi K, Choi YL, Miyazawa H, Tanaka T, Hagiwara K, Mano H, *Clin Cancer Res*, 査読有, 18, 2012, 5682-5689, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2947
10. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Choi YL, Satoh Y,

Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa
Y, Nat Med, 査読有, 18, 2012, 378-381, DOI:
10.1038/nm.2658

11. Ueno T, Yamashita Y, Soda M, Fukumura K,
Ando M, Yamato A, Kawazu M, Choi YL,
Mano H, Cancer Sci, 査読有, 103, 2012,
131-135, DOI:
10.1111/j.1349-7006.2011.02105.x

12. Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando
M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi
K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T,
Yamashita Y, Katada T, Choi YL, Mano H,
Proc Natl Acad Sci U S A, 査読有, 110, 2013,
3029-3034, DOI: 10.1073/pnas.1216141110

〔学会発表〕（計 1 件）

崔 永林「ALK チロシンキナーゼ阻害剤耐性
獲得機構の解明」第 70 回日本癌学会学術集
会(名古屋、2011 年 10 月 3 日～5 日)

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崔 永林 (SAI EIRIN)
東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授
研究者番号：40458295

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし