

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25250020

研究課題名(和文) 病理組織学的アプローチによるtargetableながん遺伝子の新規同定

研究課題名(英文) Identification of targetable oncogenes using histopathological approaches

研究代表者

竹内 賢吾 (TAKEUCHI, KENGO)

公益財団法人がん研究会・分子標的病理プロジェクト・研究員

研究者番号：40323612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間中に、肺癌、婦人科癌、乳癌、大腸癌、膵癌、頭頸部癌、リンパ腫などにおいてのべ10万件以上のFISHスクリーニングを行った。婦人科癌、大腸癌、膵癌、頭頸部癌、リンパ腫において未報告の融合遺伝子を同定した。各種のリンパ腫において、遺伝子異常の網羅的探索を行い報告した。ROS1肺癌のトランスジェニックマウスを作成し、治療実験も行い、報告した。ALK肺癌の耐性機構の報告を行った。RET肺癌、ALK肺癌に関して阻害剤を用いた臨床試験、治験がそれぞれ行われ、中央診断を担当した。ALK肺癌の診断法につき提言を行った。

研究成果の概要(英文)：During the study period, more than 100,000 FISH screenings were performed in lung cancer, gynecological cancer, breast cancer, colon cancer, pancreatic cancer, head and neck cancer, and lymphoma. Several fusion genes were identified (unpublished) in gynecological cancer, colon cancer, pancreatic cancer and head and neck cancer and lymphoma. Genetic abnormalities were comprehensively examined and reported in various lymphomas. Transgenic mice simulating ROS1-positive lung cancer was developed and reported with the results of experiments using ROS1 inhibitors. Novel resistant mechanisms in ALK-positive lung cancer were reported. Clinical trials using corresponding inhibitors were performed for the patients with RET-positive lung cancer or ALK-positive lung cancer, in which I took charge of a central diagnosis. Several recommendations about the diagnosis of ALK-positive lung cancer were made.

研究分野：人体病理学

キーワード：チロシンキナーゼ 融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

2004年、Mitelmanらは染色体分析により、上皮性腫瘍の均衡転座の頻度は造血器腫瘍や肉腫と比較して決して低いものではなく、単に分析症例数に依存する結果であることを示した。転座による break point 上にある遺伝子の脱制御は、上皮性腫瘍においても造血器腫瘍や肉腫と変わらない頻度で病因として重要であると予想した (Mitelman F. et al., *Nat Genet.* 2004)。

2007年、自治医科大学のSodaらは、受容体型 TK である ALK が、代表的な上皮性悪性腫瘍である肺癌において染色体転座の結果、強力な融合型癌遺伝子 *EML4-ALK* となることを報告した (Soda M. et al., *Nature* 448, 561-566, 2007)。

ALK は 1994 年リンパ腫において NPM との融合分子として発見された受容体型キナーゼである。申請者はリンパ腫研究における知識と経験を転用し *EML4-ALK* 肺癌の新規診断法を考案、その診断法により新規融合遺伝子 *KIF5B-ALK* を肺癌において発見した。このノウハウを元に炎症性筋線維芽細胞腫における *PPFIBP1-ALK*、腎癌における *TPM3-ALK*、*EML4-ALK* を新規同定した。リンパ腫においては、*SQSTM1-ALK* を新規同定している。また、融合遺伝子の同定法として RACE 法をフォルマリン固定・パラフィン包埋検体 (FFPE) 用に最適化し、肺癌において *KLC1-ALK* を同定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでに構築した独自の探索システムを用い、多種の固形がんにおいて、新しいチロシンキナーゼ (TK) 融合遺伝子を同定することにある。TK 融合遺伝子は多くの場合がんの第一義的病因であり、多くの阻害剤が存在または開発中であるので、その発見はがんの診断および治療の革新的進歩に直結する。申請者は、研究開始前の 5 年間で 16 種の新規 TK 融合遺伝子を同定してきた。応用面では、自ら開発した ALK 融合遺伝子陽性肺癌の診断法が商業化、キット化され、新規 ALK 阻害剤治療における患者選択に採用された。また、著作、講演活動を通じこれらの from bench to bed ともいふべき貴重な経験を国民の福祉に還元することに努めている。既に同定、または今後同定される TK 融合遺伝子に関しても同等以上の社会貢献につなげたい。

3. 研究の方法

計画 以下に述べた方法を、各癌種、各 TK に適用していく探索的研究である。

方法

#1. フォルマリン固定パラフィン包埋検体より径 1mm 大の組織アレイを癌種ごとに作成

する。

#2. 組織アレイに代表的チロシンキナーゼ (数十種) に対する split FISH を施行する。
#3. #2 で得られた候補症例に対し、5'-RACE、inverse RT-PCR 法などにより fusion partner を同定。

#4. 融合遺伝子の完全長 cDNA を取得し癌化能の証明およびキナーゼ阻害剤を用いた治療実験おこなう (focus formation assay、ヌードマウス造腫瘍 assay、in vitro kinase assay、および IL3 依存性 BA/F3 細胞を用いたサイトカイン非依存性増殖の確認など)。

#5. 臨床病理学的研究を行い融合遺伝子陽性症例の特色を明らかにする。

4. 研究成果

研究期間中に 肺癌 (26,752 件)、婦人科癌 (34,933 件)、乳癌 (6,410 件)、大腸癌 (30,541 件)、膵癌 (5,400 件)、頭頸部癌 (7,782 件)、リンパ腫 (5,389 件) の FISH スクリーニングを行った。

新規キナーゼ融合遺伝子として、腎癌における *STRN-ALK*⁴、リンパ腫における *EML4-ALK*⁵、*RANBP2-ALK*¹³、肺癌における *HIP1-ALK*⁴、の報告を行った。また、婦人科癌、大腸癌、膵癌、頭頸部癌において未報告のものがある。

リンパ腫において、JAK ファミリー遺伝子群の構造異常を解析し学会報告した。

リンパ腫の遺伝子異常の網羅的探索として、鼻型節外性 NK/T 細胞性リンパ腫⁶、成人 T 細胞性白血病・リンパ腫⁸、に関して報告を行った。

TK 融合遺伝子の機能解析として、ROS1 肺癌のトランスジェニックマウスを作成し、治療実験も行い、報告した¹。

ALK 肺癌の耐性機構として、P 糖タンパクの過剰発現³、ALK 遺伝子変異¹¹、の報告を行った。

RET 肺癌²、ALK 肺癌²⁰、に関して阻害剤を用いた臨床試験、治験がそれぞれ行われ、中央診断を担当した。後者の治験の結果、当該阻害剤アレクチニブが承認され、コンパニオン診断薬として申請者が開発した免疫染色キットが承認された。また、このときの患者選択の経緯を報告し⁷、その他の症例群における経験と共に ALK 肺癌の診断法につき提言を行った^{17,18}。

乳腺における TK 融合遺伝子陽性病型である分泌癌につき、組織学的に鑑別が問題となる他の病型と共に鑑別法の要点をまとめて報告した¹⁶。

これらの他、融合遺伝子陽性である各種の悪性腫瘍について症例報告 (リンパ腫^{9,12,22}、肺癌^{10,19,21}、炎症性筋線維芽細胞腫¹⁵) を行った。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 22 件)

Inoue M, Toki H, Matsui J, Togashi Y,

- Dobashi A, Fukumura R, Gondo Y, Minowa O, Tanaka N, Mori S, Takeuchi K, Noda T. Mouse models for ROS1-fusion-positive lung cancers and their application to the analysis of multikinase inhibitor efficiency. *Carcinogenesis*, 査読有、2016、37(5)、452-460、doi:10.1093/carcin/bgw028.
- Horiike A, Takeuchi K, Uenami T, Kawano Y, Tanimoto A, Kaburaki K, Tambo Y, Kudo K, Yanagitani N, Ohyanagi F, Motoi N, Ishikawa Y, Horai T, Nishio M. Sorafenib treatment for patients with RET fusion-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 査読有、2016、93、43-46、doi:10.1016/j.lungcan.2015.12.011.
- Katayama R, Sakashita T, Yanagitani N, Ninomiya H, Horiike A, Friboulet L, Gainor JF, Motoi N, Dobashi A, Sakata S, Tambo Y, Kitazono S, Sato S, Koike S, John Iafrate A, Mino-Kenudson M, Ishikawa Y, Shaw AT, Engelman JA, Takeuchi K, Nishio M, Fujita N. P-glycoprotein Mediates Ceritinib Resistance in Anaplastic Lymphoma Kinase-rearranged Non-small Cell Lung Cancer. *EBioMedicine*, 査読有、2015、3、54-66、doi:10.1016/j.ebiom.2015.12.009.
- Kusano H, Togashi Y, Akiba J, Moriya F, Baba K, Matsuzaki N, Yuba Y, Shiraishi Y, Kanamaru H, Kuroda N, Sakata S, Takeuchi K, Yano H. Two Cases of Renal Cell Carcinoma Harboring a Novel STRN-ALK Fusion Gene. *Am J Surg Pathol*, 査読有、2016、40、761-769、doi:10.1097/PAS.0000000000000610.
- Sakamoto K, Nakasone H, Togashi Y, Sakata S, Tsuyama N, Baba S, Dobashi A, Asaka R, Tsai CC, Chuang SS, Izutsu K, Kanda Y, Takeuchi K. ALK-positive large B-cell lymphoma: identification of EML4-ALK and a review of the literature focusing on the ALK immunohistochemical staining pattern. *Int J Hematol*, 査読有、2016、103、399-408、doi:10.1007/s12185-016-1934-1.
- Dobashi A, Tsuyama N, Asaka R, Togashi Y, Ueda K, Sakata S, Baba S, Sakamoto K, Hatake K, Takeuchi K. Frequent BCOR aberrations in extranodal NK/T-Cell lymphoma, nasal type. *Genes Chromosomes Cancer*, 査読有、2016、55、460-471、doi:10.1002/gcc.22348.
- Takeuchi K, Togashi Y, Kamihara Y, Fukuyama T, Yoshioka H, Inoue A, Katsuki H, Kiura K, Nakagawa K, Seto T, Maemondo M, Hida T, Harada M, Ohe Y, Nogami N, Yamamoto N, Nishio M, Tamura T. Prospective and clinical validation of ALK immunohistochemistry: results from the phase I/II study of alectinib for ALK-positive lung cancer (AF-001JP study). *Ann Oncol*, 査読有、2016、27、185-192、doi:10.1093/annonc/mdv501.
- Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Shiraishi Y, Shimamura T, Yasunaga J, Totoki Y, Chiba K, Sato-Otsubo A, Nagae G, Ishii R, Muto S, Kotani S, Watatani Y, Takeda J, Sanada M, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Yoshida K, Makishima H, Iwanaga M, Ma G, Nosaka K, Hishizawa M, Itonaga H, Imaizumi Y, Munakata W, Ogasawara H, Sato T, Sasai K, Muramoto K, Penova M, Kawaguchi T, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Nakamaki T, Ishiyama K, Miyawaki S, Yoon SS, Tobinai K, Miyazaki Y, Takaori-Kondo A, Matsuda F, Takeuchi K, Nureki O, Aburatani H, Watanabe T, Shibata T, Matsuoka M, Miyano S, Shimoda K, Ogawa S. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet*, 査読有、2015、47、1304-1315、doi:10.1038/ng.3415.
- Lin SY, Chuang SS, Jhuang JY, Sakamoto K, Takeuchi K, Bahrami A, Tsai CC. ALK positive large B-cell lymphoma with a massive neutrophilic infiltrate: report of a case mimicking epithelioid inflammatory myofibroblastic tumour. *J Clin Pathol*, 査読有、2015、68、496-498、doi:10.1136/jclinpath-2014-202847.
- Nakada T, Okumura S, Kuroda H, Uehara H, Mun M, Takeuchi K, Nakagawa K. Imaging Characteristics in ALK Fusion-Positive Lung Adenocarcinomas by Using HRCT. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 査読有、2015、21、102-108、doi:10.5761/atcs.oa.14-00093.
- Katayama R, Friboulet L, Koike S, Lockerman EL, Khan TM, Gainor JF, Iafrate AJ, Takeuchi K, Taiji M, Okuno Y, Fujita N, Engelman JA, Shaw AT. Two novel ALK mutations mediate acquired resistance to the next-generation ALK inhibitor alectinib. *Clin Cancer Res*, 査読有、2014、20、5686-5696、doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1511.
- Hashimoto T, Fujimoto M, Nishikori M, Takeuchi K, Kimura M, Nakajima N, Miyagawa-Hayashino A, Takaori-Kondo A, Haga H. Plasmacytic ALK-positive large B-cell lymphoma: a potential mimic of extramedullary plasmacytoma. *Pathol Int*, 査読有、2014、64、292-294、doi:10.1111/pin.12160.
- Lee SE, Kang SY, Takeuchi K, Ko YH. Identification of RANBP2-ALK fusion in ALK positive diffuse large B-cell

lymphoma. *Hematol Oncol*. 査読有、2014、32、221-224、doi:10.1002/hon.2125.

Hong M, Kim RN, Song JY, Choi SJ, Oh E, Lira ME, Mao M, Takeuchi K, Han J, Kim J, Choi YL. HIP1-ALK, a novel fusion protein identified in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 査読有、2014、9、419-422、doi: 10.1097/JTO.0000000000000061.

Li J, Yin WH, Takeuchi K, Guan H, Huang YH, Chan JK. Inflammatory myofibroblastic tumor with RANBP2 and ALK gene rearrangement: a report of two cases and literature review. *Diagn Pathol*, 査読有、2013、13、147、doi:10.1186/1746-1596-8-147.

Osako T, Takeuchi K, Horii R, Iwase T, Akiyama F. Secretory carcinoma of the breast and its histopathological mimics: value of markers for differential diagnosis. *Histopathology*, 査読有、2013、63、509-519、doi:10.1111/his.12172

Takamochi K, Takeuchi K, Hayashi T, Oh S, Suzuki K. A rational diagnostic algorithm for the identification of ALK rearrangement in lung cancer: a comprehensive study of surgically treated Japanese patients. *PLoS One*, 査読有、2013、8、e69794、doi:10.1371/journal.pone.0069794.

Takeuchi K. Interpretation of anti-ALK immunohistochemistry results. *J Thorac Oncol*, 査読有、2013、8、e67-8、doi:10.1097/JTO.0b013e318293e1ff.

Miyanaga A, Shimizu K, Noro R, Seike M, Kitamura K, Kosaihiira S, Minegishi Y, Shukuya T, Yoshimura A, Kawamoto M, Tsuchiya S, Hagiwara K, Soda M, Takeuchi K, Yamamoto N, Mano H, Ishikawa Y, Gemma A. Activity of EGFR-tyrosine kinase and ALK inhibitors for EML4-ALK-rearranged non-small-cell lung cancer harbored coexisting EGFR mutation. *BMC Cancer*, 査読有、2013、13、262、doi:10.1186/1471-2407-13-262.

Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, Hida T, Yamamoto N, Yoshioka H, Harada M, Ohe Y, Nogami N, Takeuchi K, Shimada T, Tanaka T, Tamura T. CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol*, 査読有、2013、14、590-598、doi:10.1016/S1470-2045(13)70142-6.

④Matsuda I, Takeuchi K, Mizuguchi S, Kaji M, Ueda K, Teramura K, Hirota S. A case of synchronous bilateral lung cancers: EML4-ALK positive adenocarcinoma in the right lung and adenocarcinoma in situ (the

former bronchioloalveolar carcinoma) in the left lung. *BMC Pulm Med*, 査読有、2013、13、25、doi:10.1186/1471-2466-13-25.

②Nishida Y, Takeuchi K, Tsuda K, Ugai T, Sugihara H, Yamakura M, Takeuchi M, Matsue K. Acquisition of t(11;14) in a patient with chronic lymphocytic leukemia carrying both t(14;19)(q32;q13.1) and +12. *Eur J Haematol*, 査読有、2013、91、179-182、doi:10.1111/ejh.12119.

〔学会発表〕(計 17 件)

竹内賢吾、肺がんにおける融合型がん遺伝子、第 56 回日本肺癌学会学術集会、2015 年 11 月 28 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

竹内賢吾、肺腺癌のドライバー遺伝子変異：病因と治療に根ざした分子病理診断、第 53 回日本癌治療学会学術集会、2015 年 10 月 29 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

竹内賢吾、組織病理学的手法を用いた融合遺伝子探索と診断法の開発、第 35 回日本分子腫瘍マーカー研究会、2015 年 10 月 7 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

竹内賢吾、病理医のための ALK 免疫染色、第 104 回日本病理学会総会、2015 年 5 月 1 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

竹内賢吾、Fusion for Fusion:形態学、分子生物学、ゲノム解析の融合による融合遺伝子探索、第 104 回日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

竹内賢吾、ALK positive lymphomas、The Korean Society of Hematology、2015 年 4 月 11 日、Seoul (Korea)

竹内賢吾、Hodgkin lymphoma: 境界線の病理、日本放射線腫瘍学会第 27 回学術大会、2014 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

竹内賢吾、リンパ増殖性疾患におけるこれまで提案してきたいくつかの新しい概念について、第 76 回日本血液学会学術集会、2014 年 11 月 2 日、大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

竹内賢吾、ドライバー融合遺伝子を同定する病理診断、第 73 回日本癌学会各術総会、2014 年 9 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

竹内賢吾、ALK 融合遺伝子陽性腫瘍に対する分子標的療法のコンパニオン診断、第 15 回日本検査血液学会学術集会、2014 年 7 月 20 日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

坂本佳奈、坂田征士、富樫由紀、土橋映仁、馬場郷子、朝賀礼美、津山直子、横山雄大、照井康仁、畠清彦、竹内賢吾、大規模リンパ腫症例を用いた JAK ファミリー遺伝子の数的・構造的異常の解析、第 54 回日本リンパ網内系学会総会、2014 年 6 月 20 日、山形国際ホテル (山形県・山形市)

竹内賢吾、固形癌における治療標的・診断マーカーとしての融合遺伝子、第38回日本頭頸部癌学会、2014年6月13日、東京ファッションタウンビル（東京都・江東区）

竹内賢吾、分子標的の発見と診断、第103回日本病理学会総会、2014年4月26日、広島国際会議場（広島県・広島市）

内賢吾、各種がんにおける新規融合キナーゼ遺伝子の発見、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

竹内賢吾、ALK陽性腫瘍の治療病理学、第102回日本病理学会総会、2013年6月8日、ロイトン札幌（北海道・札幌市）

竹内賢吾、ALKoma: lymphoma, sarcoma and carcinoma、第102回日本病理学会総会、2013年6月7日、さっぽろ芸文館（北海道・札幌市）

竹内賢吾、A low-grade B-cell lymphoma with prolymphocytic/paraimmunoblastic proliferation and IRF4 rearrangement、The 4th JSH International Symposium 2013 in EHIME、2013年5月24日、大和屋本店（愛媛県松山市）

〔産業財産権〕

○出願状況（計4件）

名称：希少造血器腫瘍の診断マーカー、検査方法、及び治療薬

発明者：竹内賢吾、坂本佳奈、坂田征土、片山量平

権利者：同上

種類：特許

番号：2016-23141

出願年月日：2016年2月9日

国内外の別：国内

名称：新規融合体及びその検出法

発明者：竹内賢吾、坂田征土、富樫由紀、藤田直也、片山量平

権利者：同上

種類：特許

番号：2016-006473

出願年月日：2016年1月15日

国内外の別：国内

名称：新規融合体及びその検出法

発明者：竹内賢吾、坂田征土、富樫由紀、藤田直也、片山量平

権利者：同上

種類：特許

番号：2016-006472

出願年月日：2016年1月15日

国内外の別：国内

名称：NK/T細胞リンパ腫の診断および治療方法 227

発明者：竹内賢吾

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2015/066156

出願年月日：2015年6月4日

国内外の別：外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 賢吾 (TAKEUCHI, Kengo)

公益財団法人がん研究会・がん研究所分子標的病理プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：40323612