

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462193

研究課題名(和文) ALK肺癌の阻害薬耐性機構の解明とその克服

研究課題名(英文) The strategies to overcome resistance to ALK inhibitor in lung cancer.

研究代表者

横井 左奈 (Yokoi, Sana)

千葉県がんセンター(研究所)・がんゲノムセンター・部長

研究者番号：30372452

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)：受容体型チロシンキナーゼanaplastic lymphoma kinase (ALK)は、染色体転座により活性化し肺癌(ALK肺癌)を引き起こす。ALK阻害薬は著効を示すが耐性化するため、セカンドラインの治療標的をALK肺癌に生じたゲノム異常を指標に探索した。その結果、ゲノム欠失およびDNAメチル化によりALK肺癌において発現低下する新規標的候補分子を同定した。ALK肺癌においてこの分子の発現を回復させると、細胞の増殖は抑制されたため、新たな治療標的となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Anaplastic lymphoma kinase (ALK) which is one of the receptor tyrosine kinase is activated by chromosomal translocation and causes lung cancer (ALK lung cancer). ALK inhibitor shows remarkable effect for ALK lung cancer. However, ALK lung cancer becomes tolerance to ALK inhibitor in short time. To find a new therapeutic target for ALK lung cancer, the genomic abnormality was analyzed. As a result, we found a putative candidate gene which is decreased expression in ALK lung cancer by genomic deletion or DNA methylation in promoter region. A forced expression of this gene leads to the growth retardation in lung cancer cell line with ALK translocation.

研究分野：腫瘍遺伝学

キーワード：肺癌

1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼ anaplastic lymphoma kinase (ALK) の阻害薬 (TKI) は ATP 結合部位を阻害することでその活性を抑制し、抗腫瘍効果を発揮する。本邦では 2012 年 3 月に ALK 阻害薬 Crizotinib が承認され、ALK 遺伝子座の再構成による活性化が認められる肺癌患者に著効を示している。しかしながら、他の分子標的薬と同様に、ALK 陽性肺癌においても薬剤耐性例が報告され、治療の成功は限られており、その克服は重要な課題である。

2. 研究の目的

耐性獲得機序としてはいずれも、受容体型チロシンキナーゼ経路上の分子の二次的変化の獲得による増殖シグナルの再活性化をおこしている。そこで私たちは、チロシンキナーゼ群以外の側副経路の活性化を同定して、耐性の生じにくい治療法の開発が必要であるとの着想に至った。この側副経路が解明されれば、再発した場合のセカンドラインの治療の標的分子の同定も可能となる。そこで、本研究を推進するために、以下の準備を行ってきた。

国内有数の肺癌凍結検体の蓄積

千葉県がんセンターでは 1996 年より病院をあげて患者の検体保存に取り組んでおり、国内有数のバイオバンクを構築している。肺癌検体の凍結保存数は 15 年間で 1600 検体を越え、現在も毎年 150 例以上蓄積されている。

ゲノム情報を指標とした癌の治療標的の探索

申請者は、これまで CGH 法を用いた肺癌のゲノム一次構造異常の網羅的解析とこれにより見出した遺伝子増幅領域から癌関連遺伝子の同定を行ってきた。中でも、肺小細胞癌における 5p13 増幅領域において SKP2 が活性化を受けて増殖に関与していることを示した (Yokoi et al. Am J Pathol)。また、肺癌細胞において SKP2 の発現を抑制すると、アポトーシスが誘導され、oncogene addiction があることを見出した (Yokoi et al. Cancer Sci)。また、肺非小細胞癌症例においても、SKP2 は過剰発現しており、肺癌細胞

の遊走・浸潤に関与することを明らかにしてきた (Yokoi et al. Am J Pathol)。そのため、ALK 陽性肺癌についてもアレイ CGH 法を用いてゲノムコピー数スクリーニングを行うことができる。また近年、次世代シーケンサー技術の発展により、多数の癌の全ゲノムシーケンス、エクソームシーケンス、RNA シーケンス等が実施されるようになった。これらの解析結果は、例えば The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<http://cancergenome.nih.gov/>) に代表されるように、公共データベースに登録され、誰でも利用可能になっている。そのため自験例に加え、データベースに登録された癌のゲノム情報も活用することで、解析を進展させることができる。

3. 研究の方法

症例の抽出

凍結組織の保存のある当院の肺癌患者 1800 検体のうち、ALK 発現が未確認である 1400 検体を抽出し、ALK を高発現している肺癌症例を選び出す。また、ALK 陰性肺癌症例から対照群として、ALK 陽性肺癌と年齢・性別・喫煙歴・病理病期等の患者背景のマッチした肺腺癌症例を選択する。ALK 陽性症例につき、RT-PCR 法により融合パートナー遺伝子およびバリエーションタイプを同定する。

ALK 陽性肺癌のゲノム構造異常の検出

腫瘍組織には heterogeneity があり、薬剤耐性に関わることが知られている。そのため、治療前の ALK 陽性肺癌症例の腫瘍には、既に耐性や再発に関わるゲノム変化が検出できる可能性がある。そこで、ALK 陽性肺癌の腫瘍組織の DNA を、アジレント社のオリゴアレイを用いて CGH 法によりゲノムコピー数変化を解析する。高度遺伝子増幅領域およびホモ欠失領域に着目し、コピー数に応じて発現が変化する標的遺伝子を同定する。特に、ホモ欠失領域の解析においては、DNA メチル化によるサイレンシングと遺伝子変異の有無についても検討する。

再発例のターゲット・リシーケンス解析

当院にて経験した ALK 阻害剤治療歴のある

ALK陽性症例のうち、治療前生検検体と治療後剖検での再発巣の検体のペアが揃う症例2症例については、イオンレント・シークエンサーを用いたターゲット・リシークエンス解析による変異の探索およびアレイCGH解析によるゲノム一次構造異常を探索し、ALK阻害薬治療後に新たに出現したゲノム変化を指標に、再発・耐性に関わる分子を同定する。

新規治療標的分子の機能解析

見出された標的候補分子につき、ALK転座を有する肺癌細胞株に対して、発現コンストラクトによる強制発現系やsiRNAによる発現抑制系を用いて腫瘍の増殖への影響を解析する。

ヒト肺癌臨床検体の初代培養の確立

ALK陽性肺癌症例の臨床検体での解析を可能にするために、肺癌の腫瘍組織を用いた初代培養法を確立し、in vitroでのヒト肺癌モデルを構築する。

4. 研究成果

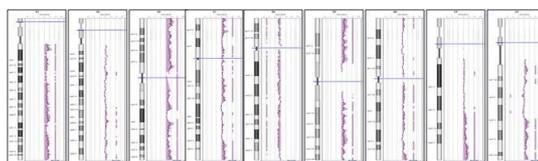
ALK陽性肺癌のスクリーニング法の開発

当院で2007年から2009年の3年間に切除を受けた非小細胞肺癌症例404例につき、免疫染色にてALK蛋白の発現を調べた。ALK陽性例は15例、3.7%であり、これらはいずれも腺癌でEGFR変異は認められなかった。このうち、当院のバイオバンクに凍結検体が保存されていたのは12例であり、RT-PCRの結果、転座のパートナーは1例がKIF5B、他はEML4であった。これを探索セットとした。15症例の臨床病理学的因子は、年齢46 - 82歳(平均62歳)、性別男性:女性 = 8:7、臨床病期はstage III以上の進行癌が12例と大半を占めた。解析時点で遠隔転移を認めた症例は9例であった。

また、解析対象となるALK陽性肺癌症例を効率よく拾い上げるために、ALK転座点の前後の発現差を用いた新たなスクリーニング方法を開発した。ALKに転座が生じる際、その切断点は常にエクソン20である。正常な肺ではALKの発現はほとんどないが、転座を生じるとカイネースドメインを有する3'側が活性化される。そのため、

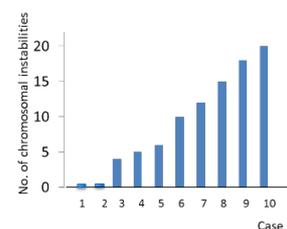
転座により活性化された場合、ALKの発現はエクソン20をはさんで5'側では低く、3'側では高くなる。この性質を利用して、ALKの5'側、3'側、正常肺のALKの発現量をリアルタイムPCR法により測定し、ALKの活性化された症例を同定した。凍結組織の保存のある、2009年以降の当院の肺癌患者504検体(手術症例、内視鏡生検症例)につき、RNA抽出、cDNA合成を行い、リアルタイムPCRにてスクリーニングしたところ、13症例の陽性者を見いだすことができ、これを検証セットとした。

ALK陽性肺癌のゲノムコピー数変化



ALKが最初にクロニングされた造血器腫瘍では、一般的には転座以外にはあまり複雑なゲノム構造異常は認められない。しかし、肺

がんは固形腫瘍の中でも著しいゲノム異常が起こることが知られており、腫瘍内のheterogeneityも報告されている。そこで、ALK陽性肺癌ではALK転座以外にもゲノム構造異常が起きているのではないかという仮説をたて、十分な核酸量のあった10例につき、arrayCGHによりゲノム変化を探索し、ALK転座関連分子を同定することとした。用いたプラットフォームは、アジレントの44KのアレイCGHである。

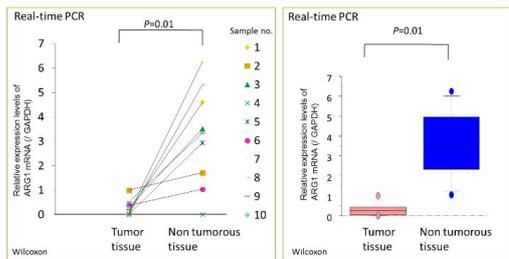


代表的なCGHの結果と各症例のコピー数変化をきたした染色体数のグラフをしめす。その結果、ALKのように非常に強力なドライバー遺伝子が活性化されていてもほぼ全ての症例の癌組織には多彩なゲノム構造異常が認められることを見出した。

総計では、35箇所の増幅領域および269箇所の欠失領域を見いだした。遺伝子増幅領域からは、ALK肺癌に共通して活性化を認めるが、チロシンキナーゼ経路にはない分子も標的候補

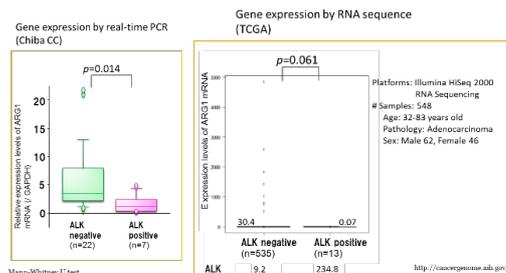
として同定された。遺伝子欠失領域においては、コピー数多型がなく、かつ遺伝子の座位し、かつ複数症例において欠失が認められたのは 38 領域であった。

ALK陽性肺癌において発現の低下する標的候補遺伝子の同定



共通欠失を認める 38 領域には 50 遺伝子が座位していた。そこで、ゲノムの欠失に伴う発現レベルの変化を調べた。このうちの 2 遺伝子は、ALK 転座を認める症例において、高頻度に発現が低下していた。このうちの 1 つの (Labo name; ARG1) 遺伝子は、ALK 陽性肺癌症例の腫瘍部では、ペアとなる非腫瘍部と比較して全例で発現が低下しており、有意差を認めた。

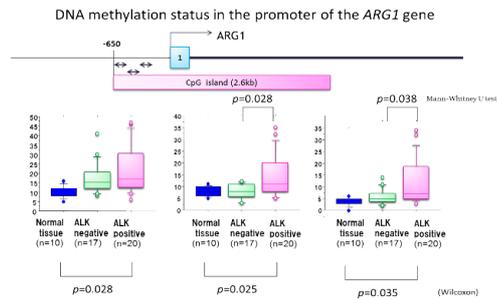
また、ARG1 遺伝子の発現は ALK 陽性肺癌に特徴的なものであるかどうかを確認するために、ALK 陽性肺癌と ALK 陰性肺腺癌とで ARG1 の発現を比較した。当院にて 2009 年以降に



ALK 陽性肺癌と診断された新たな症例 7 例と、同時期に肺腺癌と診断され ALK の発現上昇を認めない、年齢性別をマッチさせた肺腺癌 22 例で比較したところ、ALK 陽性肺癌群において有意に発現が低下していた。また自験例のみならず、公共の癌ゲノムデータベースである TCGA にある RNA シークエンスデータにより検証した。550 例の肺腺癌検体をイルミナ Hiseq で解析したデータセットを用いた。ALK 陰性群の 535 例におけるこの遺伝子の発現レベルの平均値が 30.4 であるのと比較して、ALK 陽性肺癌群の 13

例での発現の平均値は 0.07 と低く自験例と同じ傾向が示された。

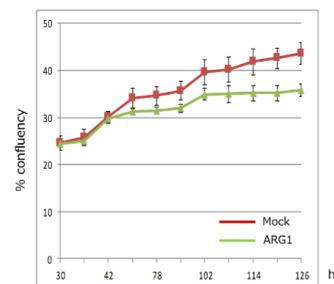
ALK 関連遺伝子の発現低下機構



ARG1 遺伝子は、ALK 陽性肺癌におけるゲノムの欠失領域から同定いたしたが、遺伝子欠失の頻度は発現低下頻度に比べ低かった。そこで、発現低下には別のメカニズムも関与していると考え、ARG1 プロモーター領域の DNA メチル化状態を解析した。ARG1 遺伝子の転写開始点を挟む形で約 2.6kb の CpG アイランドが存在しており、転写開始点より上流 650 ベースまでの部分を 3 か所に分け、パイロシークエンサーにより DNA メチル化を定量した。その結果、3 か所のいずれにおいても非腫瘍部と比較して腫瘍部において有意に DNA メチル化率が上昇しており、特に転写開始点に近い 2 か所においては ALK 陰性群と比較してメチル化率は有意に高値であった。そのため ARG1 は、遺伝子欠失またはプロモーター領域の DNA メチル化によりサイレンシングを受け発現が抑制されていることを明らかにした。

ALK 関連遺伝子の癌抑制効果の評価

ARG1 が ALK 陽性肺癌細胞の増殖能に影響しているかどうかを解析した。ALK 転

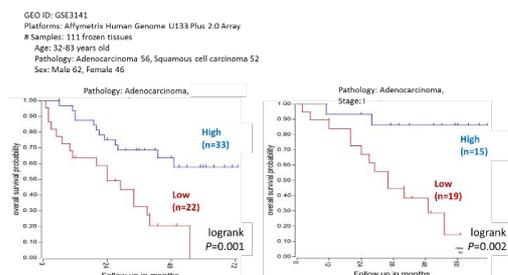


座を有する肺癌細胞株 H2228 に ARG1 発現ベクターを強制発現させ、細胞の増殖を測定した。ARG1 過剰発現群では、細胞の増殖は有意に抑制された。そのため、ARG1 は ALK 転座肺癌において増殖抑制機能を有すると考えられた。

ALK 関連遺伝子の増殖抑制効果に関わる シグナル伝達経路の解析

ARG1 はチロシンキナーゼ分子ではなく、癌の増殖抑制効果の分子メカニズムは知られていない。そこで、次世代シーケンサーを用いた発現解析により、ARG1 のシグナル伝達経路を探索した。ALK 転座を有する肺癌細胞株 H2228 に、ARG1 発現ベクターを強制発現させ回収した RNA と、ALK 転座を有しない腺癌細胞株である A549 および VMRC-LCD を ARG1 に対する siRNA 処理した RNA をイルミナ HiSeq により RNA シークエンス解析し、共通して発現変動する分子を絞り込んだ。その結果、H2228-ARG1 において発現亢進し、A549-siARG1 および VMRC-LCD-siARG1 において発現低下した共通制御遺伝子は 60 個同定された。これらには cell cycle に関与している分子が有意に多く存在しており、ARG1 は細胞周期を制御することにより ALK 陽性肺癌細胞の増殖を抑制していると考えられた。

ALK 関連遺伝子と予後



NCBI GEO データベースにある非小細胞肺がん 111 例の発現アレイのデータを用いて、ARG1 の発現低下と予後との関連を解析した。予後情報のある肺腺癌 55 例では、ARG1 の発現が低下すると有意に予後不良であった。また、腺癌の中でも stage I の早期がんに絞っても有意差は明確であった。

肺癌検体の高効率な初代培養法の開発

臨床検体において解析結果を検証するために、従来からある癌組織の初代培養法を改良し、ほぼ 100% の高効率で培養可能な方法を開発した。これまでに、150 症例の肺癌初代培養細胞の保存が完了している。

以上より、ALK 陽性肺癌における共通欠失領域に座位する遺伝子 ARG1 は、ゲノム欠失および DNA メチル化により腫瘍部において発現が抑制され、患者の予後不良に関わっていた。この分子は、細胞周期を制御することにより、ALK 陽性肺癌細胞の増殖を抑制する新規癌抑制遺伝子であると思われ、ALK 転座肺癌における新規の治療標的候補分子と考えられた。

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 4 件)

Iuchi T, Shingyoji M, Itakura M, Yokoi S, Moriya Y, Tamura H, Yoshida Y, Ashinuma H, Sakaida T, Hasegawa Y, Kawasaki K, lizasa T. Frequency of brain metastases in non-small-cell lung cancer and their association with epidermal growth factor receptor mutations. *Int J Clin Oncol*. 20: 674-9, 2015

Iuchi T, Shingyoji M, Sakaida T, Hatano K, Nagano O, Itakura M, Kageyama H, Yokoi S, Hasegawa Y, Kawasaki K, lizasa T. Phase II trial of gefitinib alone without radiation therapy for Japanese patients with brain metastases from EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 82: 282-287, 2013

Itakura M, Terashima Y, Shingyoji M, Yokoi S, Ohira M, Kageyama H, Matui Y, Yoshida Y, Ashinuma H, Moriya Y, Tamura H, Harigaya K, Matushima K, lizasa T, Nakagawara A, Kimura H. High CC chemokine receptor 7 expression improves postoperative prognosis of lung adenocarcinoma patients. *Br J Cancer*. 109: 1100-1108, 2013

Yamaki T, Suenaga Y, Iuchi T, Alagu J, Takatori A, Itami M, Araki A, Ohira M,

Inoue M, Kageyama H, Yokoi S, Saeki N, Nakagawara A. Temozolomide suppresses MYC via activation of TAp63 to inhibit progression of human glioblastoma. Sci Rep. 3:1160, 2013

[学会発表] (計 9 件)

横井左奈、兼松宗太郎、近藤仁美、大塚紀子、末永雄介、木村秀樹、飯笹俊彦染色体転座に伴ってゲノム・エピゲノム制御を受ける ALK 関連分子の解析第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 愛知県名古屋市

Yusuke Suenaga, Masato shingyoji, Mamoru Kato, Isao Kurosaka, Miki Ohira, Tishihiko Iizasa, Hiroki Nagase, Sana Yokoi. Frequent somatic mutations in neuroendocrine differentiation-related pathways in SCLC-transformed lung adenocarcinomas 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 愛知県名古屋市

新行内雅斗、芦沼宏典、吉田泰司、石橋史博、田村創、松井由紀子、守屋康充、飯笹俊彦、横井左奈、中島崇裕、関根郁夫 EBUS-TBNA を利用した小細胞肺癌における Topoisomerase の発現に関する検討日本呼吸器内視鏡学会 2015 年 6 月 12 日 東京

横井左奈、兼松宗太郎、近藤仁美、末永雄介、木村秀樹、飯笹俊彦染色体転座により発現制御をされる ALK 関連分子の解析第 62 回日本臨床検査医学会学術集会 2015 年 11 月 岐阜

S. Yokoi, H. Kimura, E. Xia, M. Ohira, D. Ikebe, T. Sugiyama, M. Itami, J. Katayama, H. Nagase, T. Iizasa Acquired genetic changes identified in ALK-positive lung adenocarcinoma 第 73 回日本癌学会学術総会・平成 26 年 9 月・横浜

Yusuke Suenaga, Masato Shingyoji, Miki Ohira, Toshihiko Iizasa, Hiroki Nagase, Sana Yokoi Analysis of a recurrent small-cell lung carcinoma originated from primary lung adenocarcinoma by whole-exome sequencings 第 73 回日本癌学会学術総会・平成 26 年 9 月・横浜

井内 俊彦、新行内 雅斗、板倉 明司、横井 左奈、守屋 康充、吉田 泰司、芦沼 宏典、松井 由紀子、田村 創、石橋史博、長谷川 祐三、川崎 宏一郎、堺田 司、飯笹 俊彦肺がん治療戦略の Up to Date 肺がんにおける感受性研究と新治療 EGFR-TKI 時代の非小細胞肺癌脳転移治療 非照射 TKI 単独治療の効果と安全性 日本癌治療学会

横井左奈、夏恩迪、木村秀樹、中村友紀、大平美紀、影山肇、池部大、杉山孝弘、伊丹真紀子、永瀬浩喜、飯笹俊彦 Novel

cancer related gene in ALK-positive lung cancer 第 72 回日本癌学会学術総会・2013 年 10 月 3 日～5 日・横浜

飯笹俊彦、横井左奈、守屋康充、丸喜明、大平美紀、影山肇、中村友紀、近藤仁美、夏恩迪、新行内雅斗、板倉明司、伊丹真紀子、吉野一郎、永瀬浩喜 Targeted exome sequencing of cancer related genes in lung cancer 第 51 回日本癌治療学会学術集会・2013 年 10 月 24 日 京都

[図書] (計 2 件)

横井左奈 がんのゲノム医学入門 遺伝子医学 MOOK 別冊「いまさら聞けない『遺伝子医学』」(斎藤加代子、近藤恵里 編) メディカル・ドゥ 大阪 2014; pp.99-115

丸喜明、佐々木泰史、中村有紀、横井左奈、大平美紀、時野隆至、永瀬浩喜 Clinical Genomics を目指した半導体 NGS によるがんゲノム解析実験医学 2014; 32,1781-1788

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 左奈 (Yokoi Sana)

千葉県がんセンター研究所 がんゲノムセンター 部長

研究者番号: 30372452

(2) 研究分担者

飯笹 俊彦 (Iizasa Toshihiko)

千葉県がんセンター呼吸器外科 部長

研究者番号: 10272303