

研究の分類・属性

基礎系

研究の概要

肺がんは、難治性のがんの一つであり、いち早く分子標的治療（EGFR 阻害剤, gefitinib）が臨床導入された固形がんである。EGFR 異常を有する症例の一部ではこの分子標的治療が高い治療効果を示すことが報告されている。性別・病理組織型・喫煙歴などの臨床情報と共に肺がんが生じた遺伝子異常を包括的に解析することは、発がん経路の解明と、主要な分子経路をターゲットとする分子標的薬を用いてがんを治療するという、エビデンスに基づいた治療や診断を行うための重要な研究基盤となる。これは、遺伝子異常の診断によって分子標的治療の対象患者を有効に絞って治療するという個別化医療の実現に欠かせないものである。

本研究では、非喫煙者進行肺がん症例を対象として、次世代シーケンサーを用いて RNA やゲノム DNA の詳細なシーケンス解析を行う。この情報を用いて、非喫煙者肺腺がんの発生・進展の鍵となっている遺伝子異常の本態解明を行い、新規治療標的遺伝子の洗い出しを行い、動物モデルを含めた新しい分子標的治療の解析系を樹立する。

研究経費

18,000 千円

研究班の組織

新井 康仁	研究所がんゲノミクス研究分野、主任研究員	研究の統括 ゲノム解析 生物学的解析
十時 泰	研究所がんゲノミクス研究分野、ユニット長	融合遺伝子候補・体細胞変異遺伝子候補の検出
河野 隆志	研究所ゲノム生物学研究分野、分野長	遺伝子変異頻度・既知変異との関連の検討
古田 耕	中央病院臨床検査科、医長	肺がんの遺伝子診断
軒原 浩	中央病院呼吸器内科、医長	肺がんの臨床病理因子解析
蔦 幸治	中央病院病理科、医長	肺がんの臨床病理診断
柴田 龍弘	研究所がんゲノミクス研究分野、分野長	分子標的モデル解析

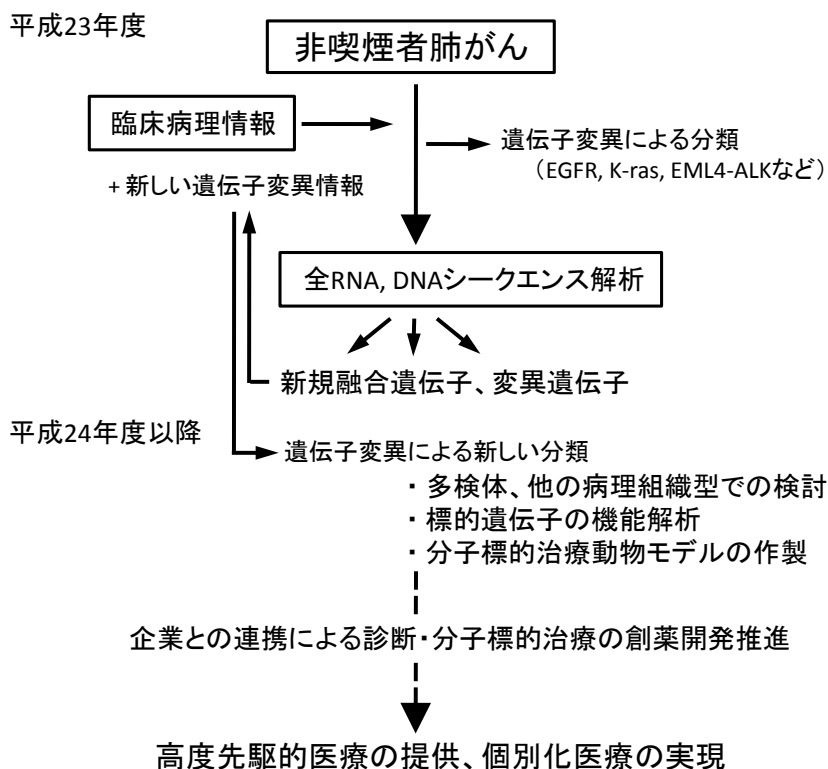
研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標) :

肺がんは、難治性のがんの一つであり(部位別死亡率男性1位、女性2位)、いち早く分子標的治療(EGFR阻害剤, gefitinib)が臨床導入された固形がんである。EGFR異常を有する症例の一部ではこの分子標的治療が高い治療効果を示すことが報告されている。性別・病理組織型・喫煙歴などの臨床情報と共に肺がんが生じた遺伝子異常を包括的に解析することは、発がん経路の解明と、主要な分子経路をターゲットとする分子標的薬を用いてがんを治療するという、エビデンスに基づいた治療や診断を行うための重要な研究基盤となる。これは、遺伝子異常の診断によって分子標的治療の対象患者を有効に絞って治療するという個別化医療の実現に欠かせないものである。

正確かつ詳細な診療病理情報の付随した試料を多く確保できる当センターにおいては、病院と研究所の連携による集学的研究によってこのような遺伝子異常を広く解析することが可能である。そこで本研究では、非喫煙者進行肺がんなどの臨床病理学的に特徴のある肺がん症例を対象として、RNAやゲノムDNAの詳細なシーケンス解析を行う。これにより、非喫煙者肺腺がんの発生・進展の主要因となっている遺伝子異常の本態解明を行い、新規治療標的を洗い出し、動物モデルを含めた新しい分子標的治療解析系を樹立し、企業との共同研究を視野に入れながら診断薬・治療薬の候補を開発することを目的とする。



第1年次

(到達目標)

- 1 非喫煙者症例を含む10例の進行肺腺がんについて全RNAシーケンス解析および全ゲノムDNAシーケンス解析を行い、融合遺伝子と体細胞変異の検出を行う。
- 2 新規融合キナーゼ遺伝子について機能解析を行う。
- 3 新規融合キナーゼ遺伝子について動物モデルの作製を行う。

(年次評価時点の実績要点)

非喫煙者症例7例を含む10症例の進行肺腺がんについて全RNAシーケンス解析を行った。この内7症例については腫瘍部と非腫瘍部の全ゲノムDNAのシーケンス解析を行った。これにより新規融合キナーゼ遺伝子を同定し、そのtransformation activityにはキナーゼ活性や5'側遺伝子部分が必要であることを示した。融合キナーゼ遺伝子を肺

胞上皮特異的に発現するトランスジェニックマウスを樹立し、肺腺がんが生ずることを明らかにした。

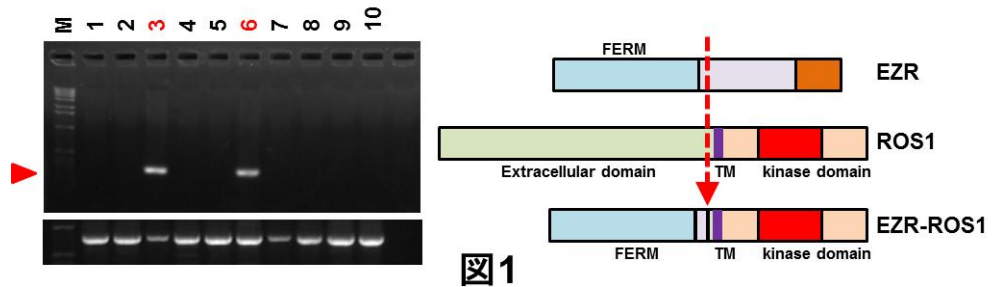
研究成果と考察

第1年次評価時点

1. 肺腺がんのゲノム解析研究

当センターのバイオバンクから、Stage III の肺腺がん 53 症例を選び出し、EGFR, Kras, p53, EML4-ALK 等の遺伝子異常の有無および喫煙歴を調べた。EGFR 変異は 23 症例 (43%)、Kras 変異は 6 症例 (11%)、EML4-ALK は 2 症例 (4%) に認められた。EGFR 変異は非喫煙者に多く検出 (17 症例) された。非喫煙者症例 7 例を含む 10 症例 (EGFR 変異 L858R 陽性 3 症例、EML4-ALK 陽性 1 症例) の進行肺腺がんについて全 RNA シークエンス解析を行った。独自に開発したプログラムを使用して、EML4-ALK 陽性症例にて問題なく EML4-ALK 融合遺伝子を検出することを確認した。そして他の症例に新規の融合遺伝子候補

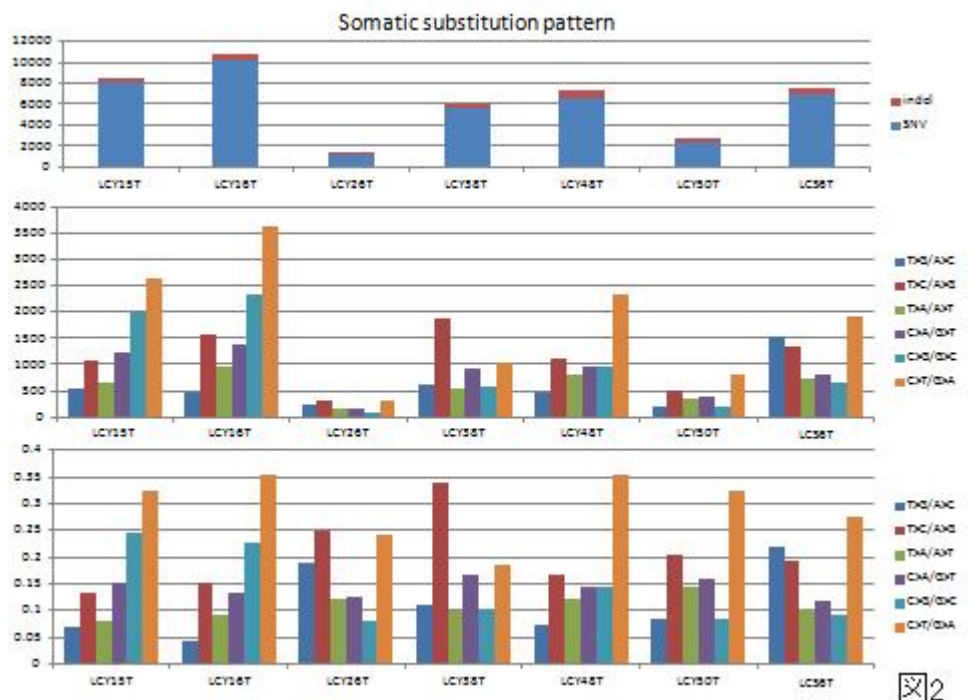
を多数検出した。この融合遺伝子候補の中から新規のキナーゼ融合遺伝子 EZR-ROS1 に着目し、in-frame で融合キナーゼ遺伝子が腫瘍部に発現していることを確認した。他の肺腺がんサンプルのスクリーニングの結果、3 症例に同じ融合キナーゼ遺伝子を検出したことから、頻度は低いものの肺がんの発症に関わる融合キナーゼ遺伝子であると考えられた。



BCR-ABL や EML4-ALK などの融合キナーゼ遺伝子と同様に、キナーゼの恒常的活性化が腫瘍発生原因となっているとすれば、融合キナーゼ遺伝子の遺伝子診断と共に、キナーゼ阻害剤による分子標的治療の可能性があると考えられた。このため、2.で述べるように動物モデルの作製を行い、本融合キナーゼ遺伝子の機能解析を行うこととした (図 1)。

全ゲノムシーケンスに関しては、EGFR 変異陽性 3 症例を含む 7 症例 (非喫煙者 6 症例、喫煙者 1 症例) (女性 6 症例、男性 1 症例) の腫瘍部と非腫瘍部について解析を行った。各症例の sequence depth の分布を調べたところ、非腫瘍部では平均 sequence depth の 50x あたりに狭いピークを示す正規分布を示した。腫瘍部でもコピー数の増減があるためピークの幅は多少広がるが、およそ正規分布を示し、sequence depth に偏りが少ない解析に非常に適した全ゲノムシーケンスのデータが得られたことが解った。

全ゲノムシーケンスのデータから独自に開発した mutation call のプログラムを使用して、somatic substitution と somatic indel (insertion or deletion)を検出した (図 2 上)。Somatic substitution の数は症例によって約 1,000 個から約 10,000 個と非常に多様であるのに対して、somatic indel の数は予測精度の低いリピート領域を除いて比較すると、約 200 個から約 600 個と、somatic substitution と比較して多様性が低いことが解った。検出した somatic substitution と somatic indel からタンパク質を変える変異が recurrent に起こっている遺伝子を調べたところ、3 症例で起こっている遺伝子を



EGFR の他に 1 個、2 症例で起こっている遺伝子を 14 個同定した。

検出した somatic substitution から somatic substitution pattern の計算を行った (図 2 下)。非喫煙者なので喫煙者に多い C>A/G>T 変異は多くを示さず、コントロールの喫煙者の LCY26 でも、全体の mutation 数は少ないが、C>A/G>T 変異が多くない傾向を示した。この症例は女性であるため、または heavy smoker ではないためか、男性の喫煙者と異なる somatic substitution pattern を示す可能性が示唆された。がんで共通に多い C>T/G>A 変異は全ての症例で多い傾向にあるが、全体的に一様な傾向はなく多様な somatic substitution pattern を示した。このことから非喫煙者または女性の肺がんでは共通の強いがん化要因がない可能性が示唆された。somatic substitution pattern の主成分分析を行ったところ、C>G/G>C が多い症例 (LCY15, LCY16, 乳がん、卵巣がんが多い)、T>G/A>C が多い症例 (LCY26, LCS6, 卵巣がんと腎がんで少し多い)、T>C/A>G が多い症例 (LCY28, LCY38, 肝がんと腎がんに多い)、その他 (LCY48, LCY50) に分かれた(図 3)。今後、これらの分類と臨床情報との相関関係を調べて、さらには他のがん種の somatic substitution pattern を含めた主成分分析を行って、somatic substitution pattern と臨床情報の関係から somatic substitution pattern の新しい要因を探りたい。

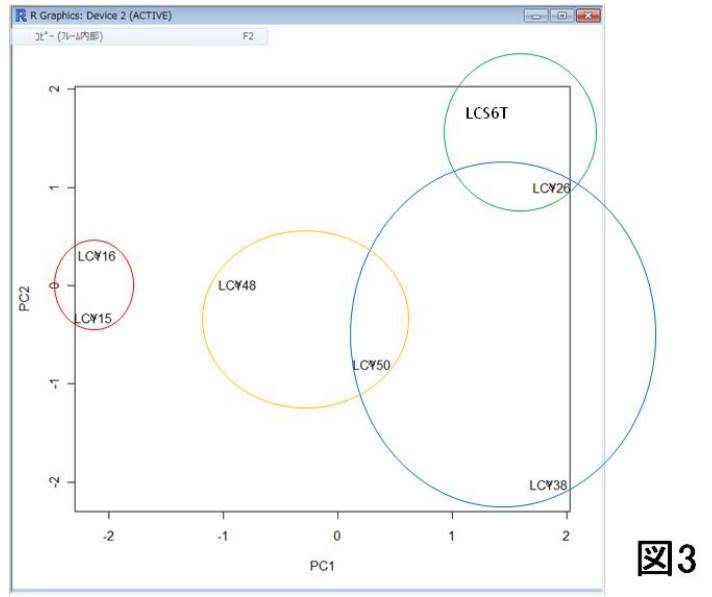


図3

検出した somatic substitution pattern について、翻訳鎖・非翻訳鎖間での変異頻度の比較を行った。共通に翻訳鎖で変異が減少している変異パターンはなく、DNA 修復の一種である転写共役修復(TCR: Transcription-coupled repair)による翻訳鎖の変異の修復が異なった変異パターンで優先的に起こっていることが解った。これまでの報告から最も高頻度な変異パターンに転写共役修復が優先的に起こると思われていたが、今回の somatic substitution pattern と同様に、非喫煙者、女性の肺がんでは転写共役修復についても非常に多様であることが解った。これも非喫煙者、女性の肺がんでは共通の強いがん化要因がないことに起因するのか、今後の詳細な解析が必要である。

2. 上記の肺腺がんのゲノムシーケンス解析によって同定した新規融合キナーゼ遺伝子 EZR-ROS1 について、機能解析を行った。まず、融合キナーゼ遺伝子の野性型と kinase dead (kd) 型の発現ベクターを作製し NIH3T3 に導入したところ、野性型では focus 形成が認められたが kd 型にはほとんど認められなかった。更に融合キナーゼ遺伝子の 5'側の遺伝子部分を N 側から削ったもの(DL1, DL2, DL3)を作製し Soft-agar でのコロニー形成を調べたところ、融合キナーゼ遺伝子の野性型にのみ顕著なコロニー形成能が認められた。このように、この融合キナーゼ遺伝子の transformation activity にはキナーゼ活性や 5' 側遺伝子部分が必要であることが判った。次に、融合遺伝子を発現させた NIH3T3 株をヌードマウスに皮下移植して造腫瘍性を検討した。融合キナーゼ遺伝子 EZR-ROS1 の野性型はコントロールの EML4-ALK 同様に腫瘍を形成するのに比べ、kd 型や DL1 型, DL2 型, DL3 型では腫瘍は形成されなかった(図 4)。

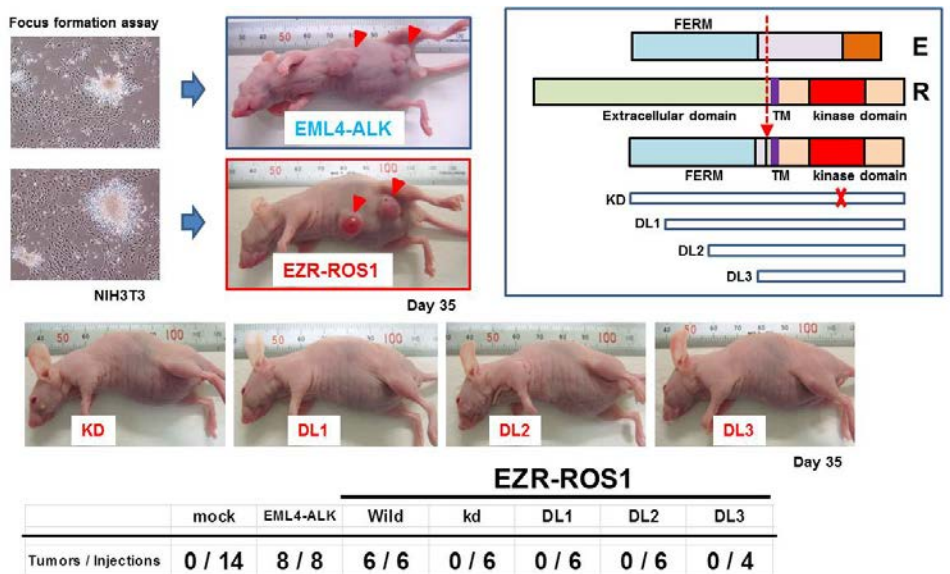


図4

肺がん形成への関与を調べるため、融合遺伝子 **EZR-ROS1** を肺胞上皮細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを樹立した(図 5)。このトランスジェニックマウスにおいては肺腫瘍の **nodule** が多数認められ、肺腺がん形成が確認された。このため、**Kaplan-Meier plot** に示されるようにマウスは早期(十数週)に死亡してしまう。このキナーゼに対する特異的阻害剤をスクリーニングし、トランスジェニックマウスを用いて腫瘍他萎縮効果を調べることによって有用な分子標的薬の開発を進めていきたい。

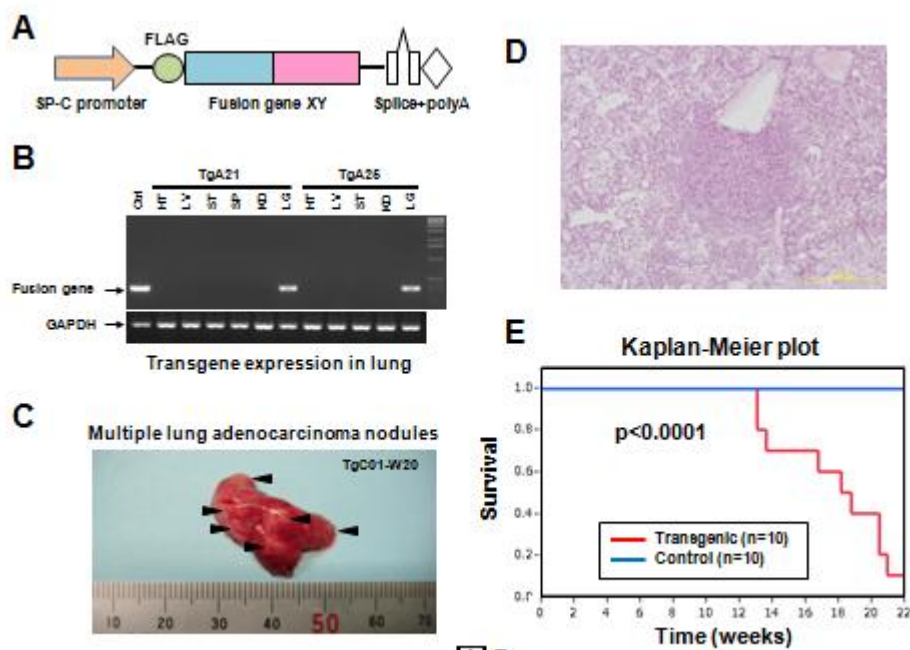


図5

倫理面への配慮

本研究は体細胞遺伝子について発現・変異・機能の解析を行うものであり、ヒトの生殖系列の遺伝子解析は行わない。「疫学研究に関する倫理指針」を遵守し、試料提供者の人権とプライバシーに十分な配慮の下に検体は連結可能匿名化した上で研究を実施する。本研究には組換え遺伝子を導入した動物作成実験が含まれるため、遺伝子組み換え実験は国立がん研究センター遺伝子組み換え安全管理規定を、動物実験は国立がん研究センター動物実験倫理委員会規定を、それぞれ遵守して実施する。ゲノム解析を行う検体に関しては、当センターで構築されているバイオバンクによる収集試料を研究の中心とすることで、試料提供の負担減に心がける。本研究は、国立がん研究センター倫理審査委員会の承認を受けている。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

(雑誌論文)

第1年次(2011)

- 1) Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, Arai Y, Hosoda F, Ishikawa S, Tsutsumi S, Sonoda K, Totsuka H, Shirakihara T, Sakamoto H, Wang L, Ojima H, Shimada K, Kosuge T, Okusaka T, Kato K, Kusuda J, Yoshida T, Aburatani H, Shibata T. High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet*, 43:464-9, 2011.
- 2) Okayama H, Kohno T, Ishii Y, Shimada Y, Shiraishi K, Iwakawa R, Furuta K, Tsuta K, Shibata T, Yamamoto S, Watanabe S, Sakamoto H, Kumamoto K, Takenoshita S, Gotoh N, Mizuno H, Sarai A, Kawano S, Yamaguchi R, Miyano S, Yokota J. Identification of genes up-regulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. *Cancer Res*, 2011, in press.
- 3) Tsuta K, Kozu K, Mimae T, Yoshida A, Kohno T, Sekine I, Tamura T, Asamura H, Furuta K, Tsuda H. c-MET/Phospho-MET protein expression and MET gene copy number in non-small-cell lung carcinoma. *J Thorac Oncol*. in press
- 4) Mimae T, Tsuta K, Takahashi F, Yoshida A, Kondo T, Murakami Y, Okada M, Takeuchi M, Asamura H, Tsuda H. Steroid receptor expression in thymomas and thymic carcinomas. *Cancer*. 2011 Oct 1;117(19):4396-405.
- 5) Yoshida A, Tsuta K, Nitta H, Hanatnaka Y, Kohno T, Asamura H, Sekine I, Grogan TM, Fukayama M, Shibata T, Furuta K, Tsuda H. Bright-field dual color chromogenic in situ hybridization for diagnosing EML4-ALK-positive lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol*. 2011 Oct;6(10):1677-86.

- 6) Tsuta K, Kalhor N, Raso MG, Wistuba II, Moran CA. Clinicopathologic and immunohistochemical analysis of spindle-cell carcinoid tumour of the lung. *Histopathology*. 2011 Sep;59(3):526-36.
- 7) Yoshida A, Tsuta K, Nakamura H, Kohno T, Takahashi F, Asamura H, Sekine I, Fukayama M, Shibata T, Furuta K, Tsuda H. Comprehensive histological analysis of ALK-rearranged lung carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2011 Aug;35(8):1226-34.
- 8) Tsuta K, Liu DC, Kalhor N, Wistuba II, Moran CA. Using the mitosis-specific marker anti-phosphohistone H3 to assess mitosis in pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2011 Aug;136(2):252-9.
- 9) Tsuta K, Tanabe Y, Yoshida A, Takahashi F, Maeshima AM, Asamura H, Tsuda H. Utility of ten immunohistochemical markers including novel markers (Desmocollin-3, Glypican 3, S100A2, S100A7, and Sox-2) for differential diagnosis of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung. *J Thorac Oncol*. 2011 Jul;6(7):1190-9.
- 10) Koza Y, Tsuta K, Kohno T, Sekine I, Yoshida A, Watanabe S, Tamura T, Yokota J, Suzuki K, Asamura H, Furuta K, Tsuda H. The usefulness of mutation-specific antibodies in detecting epidermal growth factor receptor mutations and in predicting response to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung adenocarcinoma *Lung Cancer*. 2011 Jul;73(1):45-50
- 11) Yoshida A, Tsuta K, Watanabe SI, Sekine I, Fukayama M, Tsuda H, Furuta K, Shibata T. Frequent ALK rearrangement and TTF-1/p63 co-expression in lung adenocarcinoma with signet-ring cell component. *Lung Cancer*. 2011 Jun;72(3): 309-15.
- 12) Tsuta K, Kalhor N, Raso MG, Wistuba II, Moran CA. Oncocytic neuroendocrine tumors of the lung: The histopathological spectrum and immunohistochemical analysis of 15 cases. *Hum Pathol*. 2011 Apr;42(4):578-85.
- 13) Tsuta K, Raso MG, Kalhor N, Liu DC, Wistuba II, Moran CA. Sox10-positive sustentacular cells in neuroendocrine carcinoma of the lung. *Histopathology*. 2011 Jan;58(2):276-85.
- 14) Tsuta K, Raso MG, Kalhor N, Liu DD, Wistuba II, Moran CA. Histologic features of low and intermediate grade neuroendocrine carcinoma (typical and atypical carcinoid tumors) of the lung. *Lung Cancer*. 2011 Jan;71(1):34-41.

(学会発表)

THE 100 TH United States and Canadian Academy of Pathology Annual Meeting (USCAP 2011) February 26-March 4, 2011 (Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, USA) Tsuta K, Yoshida A, Tsuda H.

c-Met Amplification and Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancers THE 14TH WORLD CONFERENCE ON LUNG CANCER (WCLC 2011) July 3-7, 2011 (Amsterdam RAI, the Netherlands) Tsuta K.

(知的財産権)

融合キナーゼ遺伝子 EZR-ROS1 による肺がんモデルマウスを用いた企業との連携について知的財産戦略室と協議中