



公益財団法人 **がん研究会**
JAPANESE FOUNDATION FOR CANCER RESEARCH



平成 24 年 2 月 9 日

科学技術振興機構 (JST)
Tel : 03-5214-8404 (広報ポータル部)

がん研究会
Tel : 03-3570-0397 (広報部)

自治医科大学
Tel : 0285-58-7550 (研究支援課)

肺がんの原因となる新しい融合遺伝子を発見 - 新たな治療薬実現への道を開く -

JST 課題達成型基礎研究の一環として、がん研究会 (がん研究所および、がん研有明病院) の竹内 賢吾 プロジェクトリーダーらと自治医科大学 分子病態治療研究センターの間野 博行 教授 (兼 東京大学 大学院医学系研究科 特任教授) らの共同研究グループは、肺がんの原因となる新たな融合遺伝子を発見しました。

肺がんは先進国で最も死亡者数の多いがん (年間約 140 万人) で、発症部位やがん細胞の大きさなどによりさまざまな種類があり、有効な治療法の開発が待たれています。間野教授らは、2007 年に肺腺がんの細胞から肺がんの原因となる EML4 - ALK 融合遺伝子^{注1)} を発見しました。これは細胞増殖をつかさどる酵素「チロシンキナーゼ^{注2)}」の一種である ALK が、EML4 と融合することで活性化されて直接発がんを誘導するものです。この遺伝子が陽性の肺がん患者は全体の約 4% ですが、若年肺腺がんの約 3 割を占め、非喫煙者に多いという特徴があります。すでに米国においては ALK 阻害剤が承認販売され、その目覚ましい治療効果が確認されています。しかし、EML4 - ALK 陰性肺がんにおける有効な治療法は乏しく、新しい治療標的の同定が待たれていました。

病理診断医である竹内プロジェクトリーダーらは、2007 年以降、この ALK 肺がんの診断法を世界に先駆けて開発し、また、さまざまな種類のがんにおいて新たな ALK 融合遺伝子や ALK 関連がんを発見してきました。今回、その過程で得たノウハウを生かし病理形態学を応用したユニークな方法で、ALK 融合キナーゼとは別の、2 種類の RET 融合キナーゼ遺伝子、4 種類の ROS1 融合キナーゼ遺伝子を、肺がんにおいて世界で初めて発見しました。また、がん研有明病院の臨床データを用いて、RET 肺がん、ROS1 肺がん、ALK 肺がんの臨床的特徴を明確にしました。間野教授らはマウスの細胞を用い、これらすべての融合キナーゼの発がん性を証明し、また、今回発見された KIF5B - RET 融合キナーゼのがん化能を、RET 阻害剤を用いて抑えることに成功しました。従って、本研究で発見された RET 肺がん、ROS1 肺がんを正しく診断できれば、ALK 肺がんと同様に、特異的な阻害剤による極めて有効な分子標的治療法が実現すると考えられます。

本研究成果は、2012 年 2 月 12 日 (英国時間) に英国科学誌「Nature Medicine」のオンライン速報版で公開されます。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

戦略的創造研究推進事業 研究加速課題

研究課題名: 「新規がん遺伝子同定プロジェクト」

研究代表者: 間野 博行

(自治医科大学 分子病態治療研究センター 教授 / 東京大学 大学院医学系研究科 特任教授)

研究期間: 平成 21 年 1 月 ~ 平成 26 年 3 月

上記研究課題では、研究代表者らが開発した遺伝子機能スクリーニング法と次世代 DNA シークエンサーを用いたゲノミクス解析法とを組み合わせることで、がん臨床検体から発がん原因遺伝子を同定し、その知見に基づく新たな分子診断法・分子標的療法を開発することを目指しています。

< 研究の背景と経緯 >

たんぱく質のチロシン残基をリン酸化する酵素であるチロシンキナーゼは、私たちの細胞の増殖を誘導する重要な分子ですが、点突然変異や遺伝子融合などさまざまなゲノム変異によって恒常的活性型となることでがんの発生を誘導します。

肺がんは、先進国におけるがん死因の第1位（年間約140万人）を占める予後不良の疾患で、発症部位やがん細胞の大きさなどによりさまざまな種類に分けられます（世界保健機構：<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>）。間野教授らの研究グループは、2007年に肺がんの一部で2番染色体内の微小な転座が生じた結果、EML4-ALK融合遺伝子が生じることを発見しました（図1、Nature.2007）。ALKは受容体型チロシンキナーゼですが、その酵素領域がEML4と融合することで酵素活性が上昇し、強力ながん化能を獲得したEML4-ALKキナーゼになります。さらに間野教授らの研究グループは2008年に、EML4-ALKキナーゼを肺特異的に産生する遺伝子改変マウスを作成し、このマウスが生後すぐに両肺に数百個もの肺腺がんを多発すること、またそのようなマウスにALK阻害剤を投与すると肺がんが消失することも報告しました（Proc Natl Acad Sci USA 2008）。

診療への応用という観点から、竹内プロジェクトリーダーらの研究グループは、2008年にマルチプレックスRT-PCR法、FISH法^{注3}を、2009年に高感度免疫染色法iAEP法を世界に先駆けて開発し、ALK肺がんの診断法として確立するとともに、この診断法を用いてALK肺がんの臨床的特徴を明らかとしました。さらに、腎がんなど肺がん以外のさまざまながんにもALK融合キナーゼを持つ一群があることを証明し、ALK阻害剤が、さまざまな種類のがんに対して有効な治療薬となる可能性を提示しています。

これらの発見を受け、実際の肺がん患者に投与するALK阻害剤の開発が多くの製薬会社で行われています。そのうちの1つ（クリゾチニブ）はすでにALK肺がんに対する目覚ましい治療効果が報告され、2011年8月に米国で承認されて販売が開始されました。2007年の本研究チームの遺伝子発見からわずか4年で治療薬として販売されたことは、世界のがん治療薬開発史上最速のスピードと言えます。

このように、現在、肺がんでは、がんの種類に合った適切な阻害剤が有効であるEGFR肺がんやALK肺がんなどが見つかってきています。しかしながら、ほかの肺がんに対する有効な治療薬は極めて少なく、発がん原因を解明し、それに基づく分子標的療法を開発することが切望されています。

< 研究の内容 >

染色体転座の結果、本来は別々の遺伝子が融合して融合遺伝子が作られます（図1）。慢性骨髄性白血病におけるBCR-ABL1や、肺がんにおけるEML4-ALKのように、融合遺伝子はしばしば発がんの本質的な役割を担い、その機能を抑制する薬剤は極めて有効な抗がん剤となることが知られています。

本研究グループは、EML4-ALK融合遺伝子に対するさまざまな診断法を開発してきましたが、これらの病理形態学的テクニックはほかの新しい融合遺伝子の探索に対しても有効と考え、EML4-ALKのような融合型チロシンキナーゼを新たに肺がん探索するプロジェクトを開始しました。

具体的には、がんのホルマリン固定・パラフィン包埋検体を用いて、さまざまなキナーゼ遺伝子の再構成の有無をFISH法で大規模にスクリーニングしました。FISH法による融合遺伝子の検出には2種類がありますが、今回の新しいキナーゼ融合遺伝子の探索にはスプリットFISH法という手法を使用しました（図2）。今回の研究ではがん研有明病

院で手術を受けた1500例の肺がん検体を使っています。

肺がんでは、すでに2007年にCD74-ROS1遺伝子とSLC34A2-ROS1遺伝子が別のグループによって発見されています。そこで、ROS1遺伝子に対するスプリットFISHを1500例の肺がん組織の全てに施行したところ、13例のROS1融合キナーゼ陽性例を認めました。しかも、その中から、新たに4つのROS1融合遺伝子を見出すことに成功しました(図3)。また、この研究からROS1肺がんは肺腺がんの1.2%を占めることが明らかになりました。

本研究グループは、以前、肺がんにおいてKIF5B-ALK融合キナーゼを発見していました。そこで、KIF5B遺伝子がALK以外のキナーゼとも融合している可能性を探索するために、KIF5B遺伝子に対するスプリットFISHスクリーニングを施行しました。その結果、KIF5Bが別のチロシンキナーゼであるRET遺伝子と融合していることを発見しました(図4)。本研究グループは、「粘液性篩(ふるい)状構造」と名付けた肺がんの組織構造がALK肺がんに多いことを明らかにしていました。この構造を持つにもかかわらずEML4-ALKが陰性である肺がんに対して、RETスプリットFISH法を施行したところ、CCDC6-RETという新しい融合キナーゼを持っていることを発見しました。これは、がん細胞の形から新しいがん遺伝子を見つけたという珍しい事例です。この研究からRET肺がんは肺腺がんの1.2%であることが明らかになりました。また今回の肺腺がん(1100例)の解析結果を統計学的に検討することで、RET、ROS1またはALKいずれかの融合キナーゼを持つ肺がんは、若年者、非喫煙者または軽度喫煙者に多く、予後が比較的良好という特徴があることも明らかにしました。

さらに、今回発見したROS1融合遺伝子とRET融合遺伝子それぞれをマウス線維芽細胞に発現させ、ヌードマウスの皮下に接種したところ、全ての融合キナーゼで明瞭な腫瘍が確認され(図5)ROS1とRETキナーゼが融合によって強いがん化能を獲得することが確認されました。実際、成長因子がないと増殖できないマウスBA/F3細胞にKIF5B-RETを導入すると、もはや成長因子を添加しなくても細胞は増殖化能になります(図6)。EML4-ALK導入によっても、同様な作用が観察され、KIF5B-ALKおよびEML4-ALKの両者ともに強いがん化能がBA/F3細胞によっても検証されました。RETのキナーゼ活性阻害剤であるバンデタニブ(vandetanib)を、EML4-ALK導入BA/F3に添加しても細胞増殖への影響はほとんど観察されませんが、一方、KIF5B-RET導入BA/F3にバンデタニブを加えると、濃度依存性に速やかな細胞死が確認されました。すなわち優れたRET活性阻害剤を開発すれば、RET肺がんに対して極めて有効な分子標的治療法が現実化すると予想されます。

<今後の展開>

今回、新たなRET融合型がん遺伝子およびROS1融合型がん遺伝子を肺がんで見つけました。RETもROS1もALKと同じチロシンキナーゼのため、EML4-ALKの場合と同様に、それぞれのキナーゼに対する特異的阻害剤が有効な治療薬になると期待されます。実際、これらのがん遺伝子陽性細胞がキナーゼ阻害剤によって死に至ることを確認しました。ALK肺がんの場合と同様に、これら遺伝子を持つ肺がん患者に全く新しい、しかも極めて有効な分子標的療法が速やかにもたらされると期待されます。

< 参考図 >

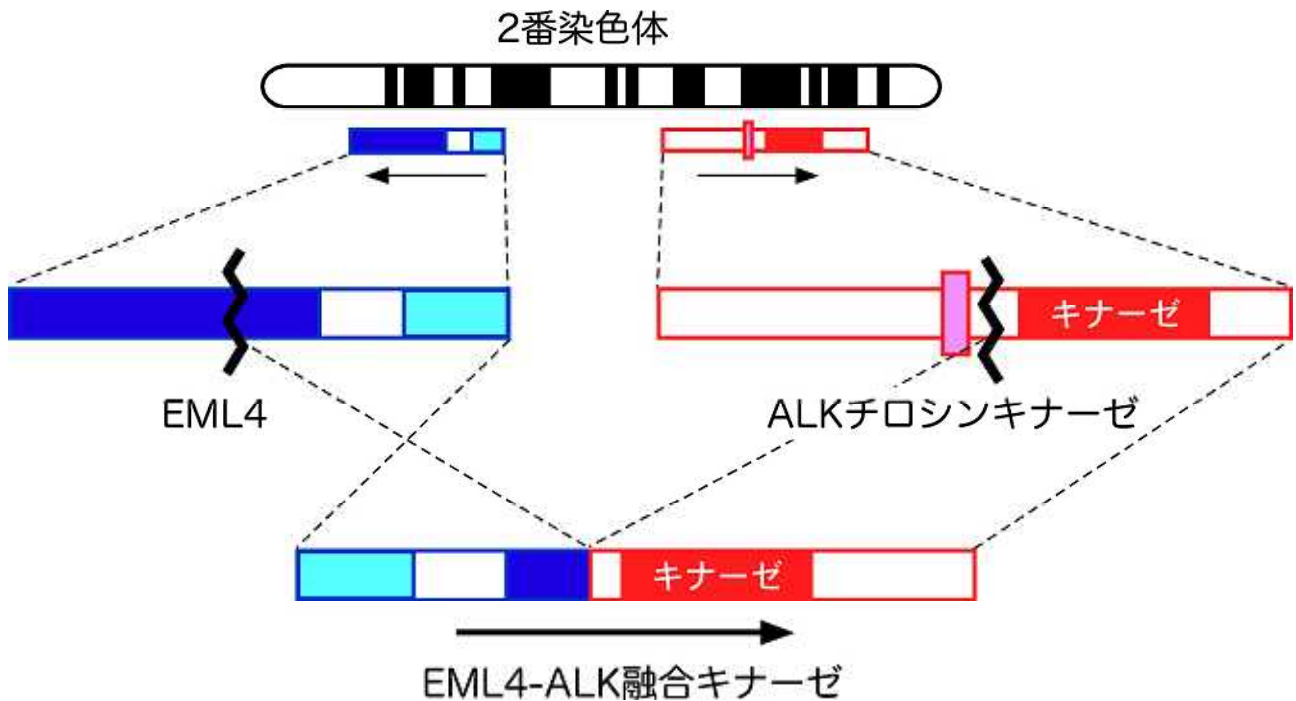


図1 EML4 - ALK融合遺伝子

EML4遺伝子とALK遺伝子は、正常細胞においてどちらもヒト2番染色体上のごく近い位置に互いに反対向きに存在するが、両遺伝子を挟む領域が逆位となることでEML4 - ALK融合遺伝子が生じる。その結果、微小管会合たんぱく質であるEML4のアミノ末端側約半分と受容体型チロシンキナーゼALKの細胞内キナーゼ領域とが融合した活性型融合キナーゼであるEML4 - ALK融合キナーゼが肺癌の中で産生されることになる。

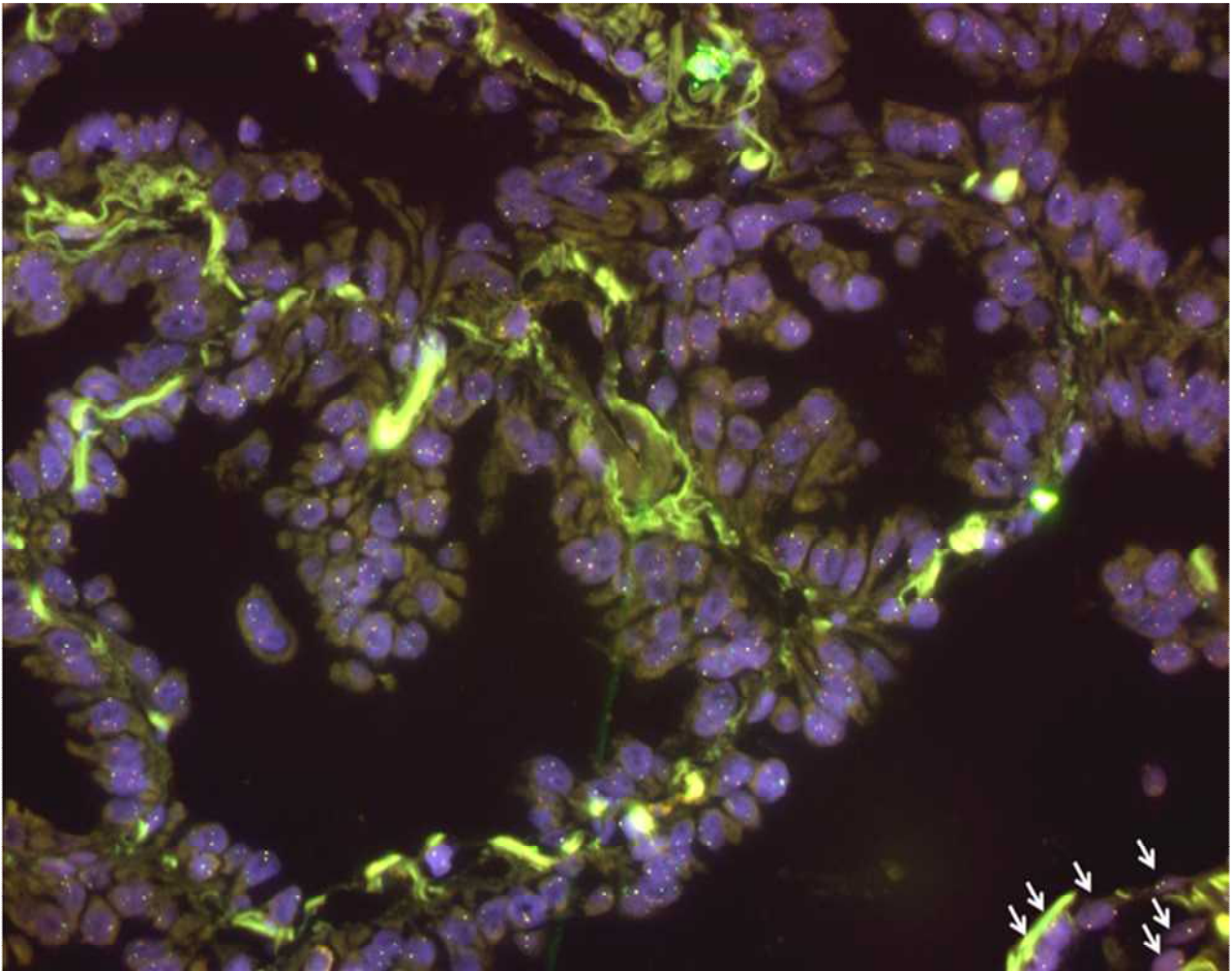


図2 RET肺がんにおけるRETスプリットFISH法

RET遺伝子の上流と下流を赤と緑で染色し、4 μm (マイクロメートル: 100万分の1メートル) に薄切された病理組織切片上で可視化している。細胞の核は青で染色されている。右下に見える正常の肺の細胞 (矢印) においては赤と緑が重なり黄色に見える。これはRET遺伝子が分断してない (転座していない) ことを示している。一方、がん細胞では黄色のシグナルのほかにも赤と緑のシグナルが見られ、RET遺伝子が分断している (転座している) ことが明らかになる。

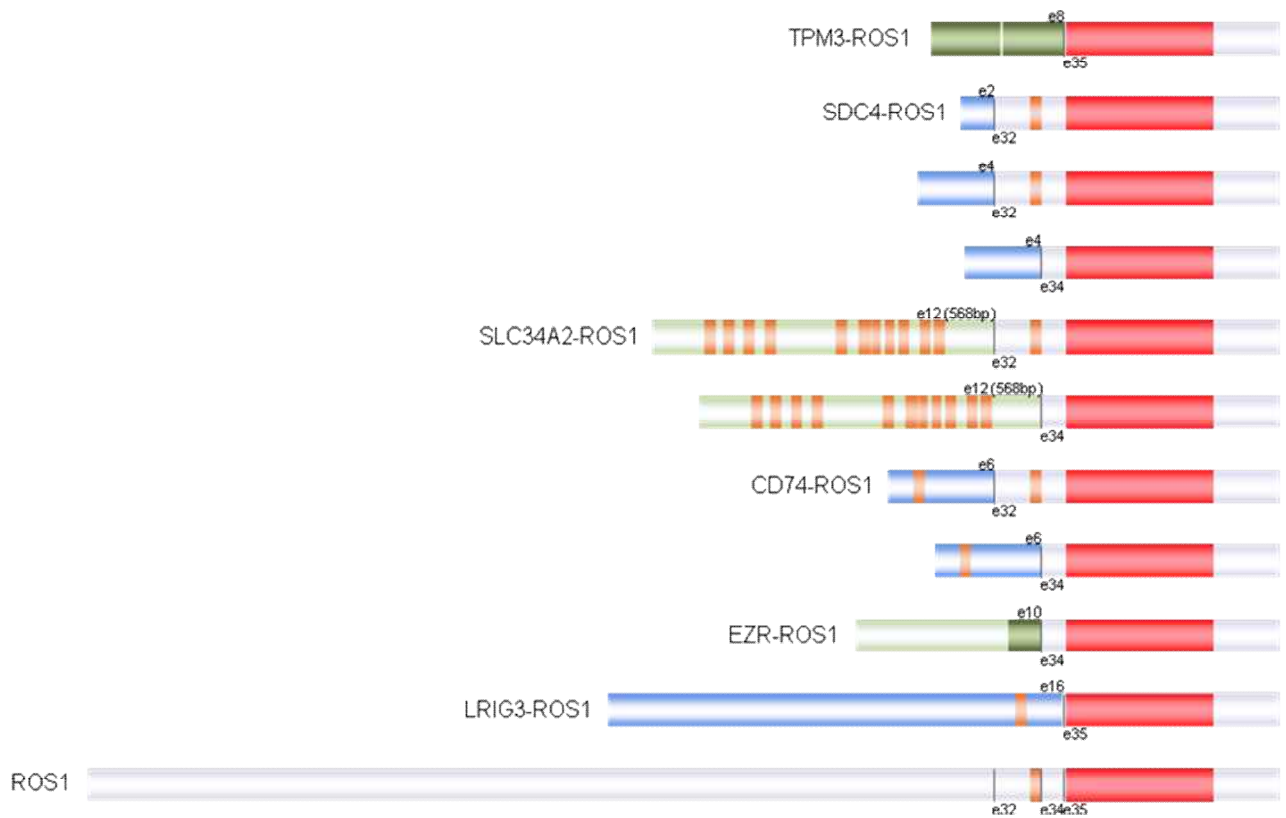


図3 さまざまなROS1融合キナーゼ

最下段が正常のROS1キナーゼたんぱく質の模式図。赤い部分ががん化に重要な酵素活性領域(キナーゼ)部である。ROS1融合キナーゼではROS1のエキソン32、34、35のいずれかの部分が融合パートナーと結合している。SLC34A2とCD74はほかのグループが以前報告していたものだが、TPM3、SDC4、EZRおよびLRIG3は今回の研究で発見された。

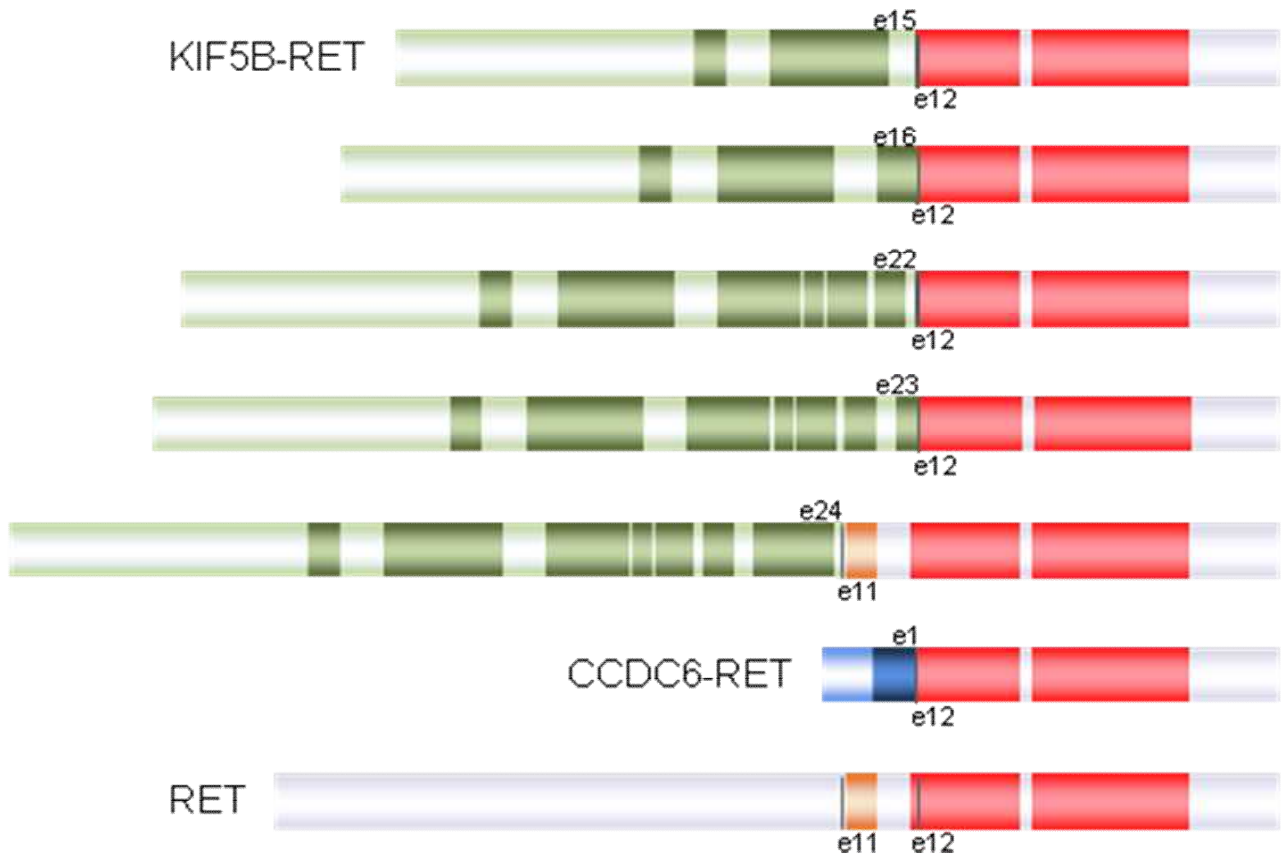


図4 さまざまなRET融合キナーゼ

最下段が正常のRETキナーゼたんぱく質の模式図。赤い部分ががん化に重要なキナーゼ部である。RET融合キナーゼではRETのエキソン11、12のいずれかの部分が融合パートナーと結合している。KIF5Bとの結合様式は5種類。CCDC6-RETは甲状腺がんで知られていたものであるが、今回の研究により肺がんにも存在することが明らかとなった。



図5 ALK、RET、ROS1融合遺伝子のがん化能

各融合型キナーゼをマウス3T3線維芽細胞に導入し、その細胞をヌードマウスの皮下に接種した。遺伝子を導入しない場合（コントロール）には皮下腫瘍が生じないが、それ以外の全ての融合型キナーゼにおいては明瞭な皮下腫瘍が形成された。

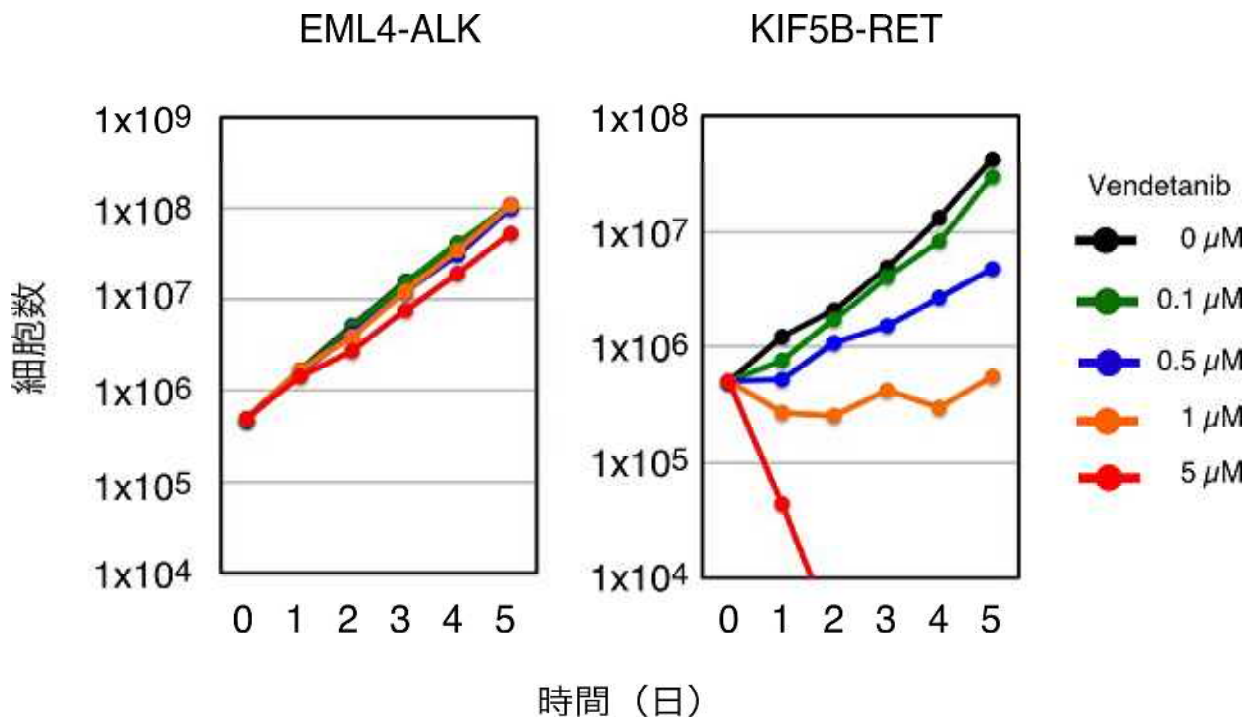


図6 K I F 5 B - R E T陽性細胞に対する治療実験の成功

EML4-ALKおよびKIF5B-RETそれぞれをマウスBA/F3細胞に導入すると成長因子を添加しなくても細胞が増殖可能になる。これら細胞の培養上清にRET阻害剤であるバンデタニブをさまざまな濃度で添加し、系時的に細胞数を計測した。EML4-ALK発現BA/F3細胞にバンデタニブを加えても細胞増殖への影響はほとんど認められなかったが、KIF5B-RET導入細胞においてはバンデタニブの濃度依存性に速やかな細胞死が誘導された。

<用語解説>

注1) EML4-ALK融合遺伝子

肺がん細胞内において2番染色体内の小さな逆位が生じ、EML4遺伝子とALK遺伝子が融合してEML4-ALK融合遺伝子が生じます。EML4-ALK融合遺伝子は、本来細胞内骨格に結合するEML4たんぱく質のアミノ末端側約半分と、ALK受容体型チロシンキナーゼの細胞内領域とが融合した異常たんぱく質を産生します。EML4-ALK融合遺伝子は非小細胞肺がんの4~5%(50才以下の肺がんの35%)に生じることが知られています。

注2) チロシンキナーゼ

キナーゼとは基質をリン酸化する酵素の総称であり、そのうちチロシンキナーゼは基質たんぱく質のチロシン残基をリン酸化する酵素のこと。一般にその活性化は私たちの細胞の増殖を正に誘導します。

注3) FISH法

「FISH」は、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (*fluorescence in situ hybridization*) の略称。蛍光物質などで標識したDNAプローブを使い、目的の遺伝子と結合させ蛍光顕微鏡で検出できるように染め出す手法で、細胞そのものや、病理組織切片などに対して行われます。

< 論文名 >

“RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer”
(肺がんにおけるRET、ROS1、ALK融合)

< お問い合わせ先 >

< 研究に関すること >

竹内 賢吾 (タケウチ ケンゴ)

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

〒135-8550 東京都江東区有明3 - 8 - 31

Tel : 03-3570-0447 Fax : 03-3570-0230

E-mail : kentakeuchi-tky@umin.net

間野 博行 (マノ ヒロユキ)

自治医科大学 分子病態治療研究センター ゲノム機能研究部 教授

〒329-0498 栃木県下野市薬師寺3311 - 1

Tel : 0285-58-7449 Fax : 0285-44-7322

E-mail : hmano@jichi.ac.jp

東京大学 大学院医学系研究科 ゲノム医学講座 特任教授

〒113-0033 東京都文京区本郷7 - 3 - 1

Tel : 03-5841-0633 Fax : 03-5841-0634

E-mail : hmano@m.u-tokyo.ac.jp

< JSTの事業に関すること >

原口 亮治 (ハラグチ リョウジ) 井上 聡子 (イノウエ サトコ)

科学技術振興機構 イノベーション推進本部 研究推進部 (研究推進担当)

〒102-0076 東京都千代田区五番町7番地 K's五番町ビル

Tel : 03-3512-3525 Fax : 03-3222-2063

E-mail : presto@jst.go.jp