パネルディスカッション

内科学の知の構築：専門分化を超えて 2. 肺がん原因遺伝子の発見から臨床への展開

間野 博行

Key words : oncogene, EML4-ALK, molecular targeted therapy, lung cancer

はじめに

肺がんは欧米及び日本でがん死数の第一位を占める予後不良の疾患であり，日本だけでも年間 6 万人以上，また米国でも年間 16 万人ほどの患者が肺がんによって亡くなっている．肺がんは早期に発見することが困難なため，根治が期待できる外科手術が行える症例は極めて稀である．しかも旧来の抗がん剤による化学療法では延命効果が少なく，病因に基づいた新しい肺がんの治療法開発が待たれていた．

近年，肺がんの一部の症例に上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) 遺伝子の活性型変異が生じていることが報告され，しかも EGFR 異常を有する症例の一部に対して EGFR のチロシンキナーゼ活性を阻害する gefitinib あるいは erlotinib が有効なことが明らかになった¹⁾．こうして肺がんにも分子標的療法の時代がついに訪れたのである．しかしそれ以外の症例がどのような活性型がん遺伝子を有し

ているのかはほとんど不明であった．そこで我々は機能スクリーニング法を用いて，新たな肺がんの原因遺伝子を同定することを目指した．

1. EML4-ALK の発見—肺がんにおける初めての融合型がん遺伝子

我々は患者検体で発現している遺伝子の機能を効率よくスクリーニングする目的のため，cDNA 発現用組換えレトロウィルスライブラリー作成法を開発した．本法を用いて 62 歳の喫煙者に生じた肺腺がん検体から cDNA 発現ライブラリーを構築し 3T3 線維芽細胞に導入したところ，2～3 週間で形質転換した異常クローンが数十種類生じた．これら 3T3 クローンの挿入 cDNA を回収したところ，驚くべき事に，ある cDNA の 5' 側と 3' 側は違う遺伝子由来であった．5' 側は微小管会合タンパクの一種である EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) のアミノ末端側約半分をコードし，3' 側は受容体型チロシンキナーゼ ALK (anaplastic lymphoma

自治医科大学ゲノム機能研究部，東京大学大学院医学系研究科ゲノム医学講座

108th Scientific Meeting of the Japanese Society of Internal Medicine : Panel discussion : 2. Discovery and clinical application of a novel oncogene in lung cancer.

Hiroyuki Mano : Division of Functional Genomics, Jichi Medical University, Japan and Department of Medical Genomics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Japan.

図 1. 肺がんにおけるEML4-ALK融合キナーゼの産生

EML4遺伝子とALK遺伝子はどちらも2番染色体短腕内の極めて近い位置に(約12 Mbp離れている)互いに反対向きに存在する。しかし両遺伝子を挟む領域が微小な逆位を形成することで、両遺伝子が同方向に融合したがん遺伝子が生じ、活性型融合キナーゼが産生される。

kinase) の細胞内チロシンキナーゼドメインをコードしていたのである(図1)²⁾。さらに驚いたことに、本来EML4とALK遺伝子はヒト2番染色体短腕内の近い場所(12 Mbp離れている)に互いに反対向きに存在するのである。従ってEML4-ALK融合遺伝子が作られるためには、この12 Mbpの領域が2p内で非常に小さな逆位を形成する必要があるのだ。固形腫瘍は一般に染色体転座は稀であると言われてきたが、我々が患者ゲノムを基質としてEML4とALK上にそれぞれプライマーを設置してPCRを行ったところ単一の産物が得られ、その塩基配列を解析することでEML4遺伝子とALK遺伝子内での切断点・融合点が決定された。すなわち実際肺がん細胞において2p内の微少な逆位が生じていることが確認されたのである。果たしてこのような遺伝子融合は肺がんにおいて極めて稀なイベントなのであろうか?我々が75例の肺がん症例でEML4-ALK cDNAをRT-PCRでスクリーニングしたところ5例(6.7%)で陽性であった。すなわちこの染色体逆位はある程度の頻度で肺がんが生じているのである。

2. EML4-ALKの臨床応用—新しい分子標的治療

慢性骨髄性白血病においてABLチロシンキナーゼ遺伝子とBCR遺伝子が融合した結果、活性型チロシンキナーゼBCR-ABLが産生される事が知られている。慢性骨髄性白血病の発症にはBCR-ABL活性が中心的な役割を果たすが、このチロシンキナーゼ活性を阻害する低分子化合物imatinibは今日の慢性骨髄性白血病の第一治療選択剤となっている。すなわち発がんの中心的役割を担う異常チロシンキナーゼを抑制することは極めて有効な分子標的治療となるのである。では実際に、BCR-ABLと同様にEML4-ALKも肺がんにおける新たな治療剤のターゲットとなるのであろうか?

ALKはEML4とは別に、悪性リンパ腫の一部でNPM遺伝子と融合して活性型チロシンキナーゼNPM-ALKを産生することが知られている。EML4-ALKも同様にがん化能を有する活性型融合チロシンキナーゼであるのか否かを検証するために、EML4-ALKを3T3線維芽細胞に導入したところ、多数の形質転換フォーカスが生じた。

図2. 治療モデル実験の成功

*EML4-ALK*発現マウスにALK活性阻害剤である2,4-pyrimidinediamine (10 mg/kg/日)を一日一度経口投与した。治療前と治療開始後25日目の時点でCTスキャンを行い、腫瘍サイズの変化を計測した。左肺にあった巨大な2個の腫瘍が、治療後はほぼ消失していることが明らかである。文献3より改変。

しかもこの細胞をヌードマウスの皮下に接種すると巨大な腫瘍を形成した²⁾。逆に、*EML4-ALK*の酵素活性領域中のATP結合部位にアミノ酸置換を導入しキナーゼ活性を失活させるとこの造腫瘍能は消失した。正常の全長*EML4*あるいは全長ALKを発現させても形質転換フォーカスや皮下腫瘍は生じなかったため、ALKは*EML4*と融合することによってがん化能を獲得したと考えられた。しかもそのがん化能にはチロシンキナーゼ活性が必須であるので、*EML4-ALK*はキナーゼ活性依存性に発がんを誘導すると考えられた。

さらに我々は、*EML4-ALK*キナーゼが実際の生体で肺がんの直接の原因となることを証明する目的で、同キナーゼ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作成した。Surfactant protein C (SPC)は肺胞上皮にのみ発現する遺伝子であり、これまでそのプロモーターフラグメントが様々な肺がんモデルマウスの作成に用いられてきた。そこで我々もSPC遺伝子プロモーター下流に*EML4-ALK* cDNAを接続した発現ユニットを作成し、これを用いてトランスジェニックマウスラインを複数樹立した。驚くべき事に、これらマウスはいずれも生後僅か数週で両肺に数百個の肺腺がんを多発発症したの

である(図2)³⁾。すなわち*EML4-ALK*は極めて強力ながん遺伝子であり、このマウスにおける肺がん発症時期の早さを考えると、同遺伝子陽性の肺がん症例における主たる原因遺伝子である可能性が極めて高いと予想される。

ではそのような肺がん発症マウスに対してALKの酵素阻害剤を投与すると治療効果はあるのであろうか？我々は経口摂取可能なALK特異的阻害剤2,4-pyrimidinediamineを*EML4-ALK*肺がん発症マウスに一日一回投与し、その治療効果を系時的CTスキャンにて評価した。図2に示されるように、治療開始前には左肺に存在した巨大な2個の腫瘍が、僅か25日間経口接種するだけでほぼ消失していることが判る。他のマウスでも同様な治療効果が確認された³⁾。すなわち*EML4-ALK*融合キナーゼを標的とする治療法は、同キナーゼ陽性腫瘍に著明な臨床効果が期待できるのである。

実際我々の発見を受けてALK酵素活性阻害剤crizotinib (PF-02341066)の第I/II相臨床試験が海外において行われ、既にその治療効果が発表された⁴⁾。第I/II相試験の結果は、適切に診断された*EML4-ALK*陽性患者の奏功率は約9割におよび、しかも完全寛解症例が含まれるという驚くべきものであった。まさに上記のトランスジェ

図 3. EML4-ALK内付加変異

Crizotinib耐性となった症例の, EML4-ALK cDNAより2種類の塩基置換を発見した. それぞれは1156番目のシステイン(C)をチロシン(Y)へ, また1196番目のロイシン(L)をメチオニン(M)に置換した. 文献7より改変.

ニックマウスの治療効果がヒトにおいて再現されるような成果が確認されたのである. Crizotinibは現在国際第三相臨床試験に入っており, 幸いにも我が国もその治験に加わっている.

3. ALK阻害剤耐性変異

変異EGFR陽性肺がんに対するgefitinib/erlotinibやBCR-ABL陽性CMLに対するimatinibはいずれも有効なキナーゼ阻害剤であるが, どちらの場合も薬剤抵抗性となる二次変異が出現することが知られている^{5,6)}. では同様にEML4-ALKの場合も耐性変異は出現するのであろうか?

我々は, EML4-ALK陽性肺腺がん症例でcrizotinibの臨床試験に参加し当初は著効したものの, 約半年後突然再発しcrizotinib不応性となった症例を経験した. 本症例の治療前と再発後の肺がん検体を次世代シーケンサーによって解析する事により, 再発時にのみEML4-ALKのキナーゼドメイン内に新たな付加変異を2種類発見したのである(図3)⁷⁾. これら変異の一つはALK内の1156番目のシステインをチロシンに置換し, もう一つは1196番目のロイシンをメチオニンに置換する. 興味深いことにこれら2種類の変異は互いに別々のcDNA上に存在していたことから, 腫瘍内に新たに独立した2種類の細胞クローンが出現したと考えられた. EML4-ALKを導入したBA/F3細胞はEML4-ALKの活性依存性に増

図 4. EML4-ALK内付加変異はcrizotinib耐性を誘導する

マウスBA/F3細胞にEML4-ALK (Wild) およびそのC1156Y変異体あるいはL1196M変異体を導入した. 治療に用いたcrizotinibを添加するとその濃度依存性にBA/F3細胞はアポトーシスに至るが, C1156YおよびL1196M変異体はいずれもその感受性が著明に低下していた. 文献7より改変.

殖するが, 培養上清にcrizotinibを添加するとその濃度依存性に細胞死が誘導される(図4). ところがC1156YあるいはL1196Mを有するEML4-ALKはどちらもcrizotinib耐性になるのだ. 以上より肺がん内でcrizotinibに耐性となる2種類の細胞クローンが独立に進化を遂げたことになる. さらに本症例の治療には用いられなかった別のALK阻害剤にも両変異は耐性であることも確認され, 今回発見された変異はALK阻害剤に対するユニバーサルな耐性獲得機構であると考えられた.

おわりに

我々の肺がん原因遺伝子EML4-ALKの発見報告が2007年であったが, その僅か3年後に第三相臨床試験が行われ, また2010年より日本においてはEML4-ALKの商業診断サービスが始まっている. こうして肺がんの世界において, gefitinib/erlotinibに次ぐ第二のテーラーメイド医療が

もたらされたことになる。なお驚くべき事に、今回我々が発見したcrizotinib耐性変異のうちL1196 部位は、gefitinibやimatinibに対してそれぞれのキナーゼが耐性になる代表的な変異部位「gate keeper」そのものであった。Gefitinibやimatinibと全く違う構造体のcrizotinibに対して、EGFRやABLと近似性が低いALKが耐性を獲得した部位が共通であったことは極めて示唆的である。Gate keeper部位はチロシンキナーゼが阻害剤に耐性を獲得する際のユニバーサルな場所なのであろう。我々の知見を元にした「第二世代のALK阻害剤」が世に出ることが望まれる。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：間野博行：報酬 (Cure Gene, 中外製薬), 株式利益 (Cure Gene), 寄付講座 (アステラス製薬, イルミナ)

文 献

- 1) Lynch TJ, et al : Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350 : 2129-2139, 2004.
- 2) Soda M, et al : Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448 : 561-566, 2007.
- 3) Soda M, et al : A mouse model for *EML4-ALK*-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 : 19893-19897, 2008.
- 4) Kwak EL, et al : Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 363 : 1693-1703, 2010.
- 5) Kobayashi S, et al : EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 352 : 786-792, 2005.
- 6) Deininger M, et al : The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 105 : 2640-2653, 2005.
- 7) Choi YL, et al : *EML4-ALK* mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med* 363 : 1734-1739, 2010.