

REVIEW ARTICLE

肺癌原因遺伝子 *EML4-ALK* の発見と臨床応用

間野博行<sup>1,2</sup>

Discovery of a Lung Cancer Oncogene, *EML4-ALK*, and Its Clinical Application

Hiroyuki Mano<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Functional Genomics, Jichi Medical University, Japan; <sup>2</sup>Department of Medical Genomics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Japan.

**ABSTRACT** — We discovered a novel fusion-type oncogene *EML4* (echinoderm microtubule-associated protein-like 4)-*ALK* (anaplastic lymphoma kinase) in 4-5% of human lung cancers, which is generated via a small inversion within the short arm of human chromosome 2 (inv [2p]). Through this process, an N-terminal half of the *EML4* protein becomes fused to the intracellular tyrosine kinase area of *ALK*. A coiled-coil region within *EML4* leads to constitutive dimerization of *EML4-ALK*, and thereby induces a marked transforming activity in the fusion kinase. Transgenic mice expressing *EML4-ALK* in lung epithelial cells generate hundreds of lung cancer nodules soon after birth, but such nodules rapidly disappear in response to the administration of an *ALK* inhibitor. Therefore, *EML4-ALK* is likely to be the essential growth driver in those tumors in which fusion occurs. Furthermore, targeting the catalytic activity of *EML4-ALK* could be a promising means of treating such types of cancer. Phase I/II clinical trials with an *ALK* inhibitor have already been completed on patients positive for *EML4-ALK*, which have confirmed the marked therapeutic efficacy of the compound. Today, a phase III trial with the compound is ongoing worldwide. We hope our discovery will thus positively affect the prognosis of hundreds of thousands of lung cancer patients around the world.

(*JJLC*. 2010;50:889-893)

**KEY WORDS** — *EML4-ALK*, Tyrosine kinase, Oncogene, *ALK* inhibitor

**要旨** — 我々は肺腺癌の4~5%において2番染色体短腕内に微小な逆位が生じた結果、新たな癌遺伝子 *EML4-ALK* が生じることを発見した。この逆位により、受容体型チロシンキナーゼ *ALK* の細胞内領域が微小管会合タンパク *EML4* と融合したタンパクが産生されるが、*EML4* 内の二量体化領域により *EML4-ALK* は恒常的に二量体化・活性化され肺癌の直接的原因となるのである。*EML4-ALK* 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は生後速やかに両肺に数百個もの肺腺癌を多発発症するが、同マウスに *ALK* 酵素活性阻害剤を投与すると肺癌は速やかに消失した。したがって

*EML4-ALK* は同遺伝子陽性肺癌の本質的な発癌原因であり、だからこそその機能を阻害する薬剤は肺癌の全く新しい分子標的療法となることが期待されるのである。既に実際の *EML4-ALK* 陽性肺癌症例に対する *ALK* 酵素活性阻害剤による第 I/II 相臨床試験も終了し、その目覚ましい治療効果が確認され、現在日本を含む国際第 III 相臨床試験へと移行している。我々の発見により、今後世界中で何万人・何十万人の肺癌患者の生命予後が大きく変わろうとしている。

**索引用語** — *EML4-ALK*, チロシンキナーゼ, 癌遺伝子, *ALK* 阻害剤

<sup>1</sup>自治医科大学ゲノム機能研究部; <sup>2</sup>東京大学大学院医学系研究科ゲノム医学講座.

## はじめに

慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia : CML) 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 が産生されることが知られる。CML の発症には BCR-ABL 活性が中心的な役割を果たすが、その阻害剤である imatinib は CML に対して特効薬とも言うべき治療効果を有している。<sup>1</sup> Imatinib の登場によって CML の治療は大きく変貌を遂げ、かつては不治の病に近かった同疾患が一部の薬剤耐性例を除いてコントロール可能な疾患になったのは目覚ましい成果であった。<sup>2</sup> Imatinib を追うように、近年、肺癌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 EGFR 阻害剤である gefitinib が有効なことが明らかになった。<sup>3</sup> こうして CML に次いで肺癌にも分子標的療法の時代が訪れたのである。しかし EGFR 変異を有さない肺癌がどのような活性型がん遺伝子を有しているのかは全く不明であった。

現状を打破するべく米国では Cancer Genome Atlas プロジェクトとして疾患ゲノムのリ・シーケンズが推進されており、その解析対象には肺癌が含まれている。そのような大規模配列解析によって変異 EGFR に次ぐ第二のがん遺伝子が発見されることが期待されるが、我々は古典的とも言える「機能スクリーニング」によって肺癌の原因追及を試みた。

## EML4-ALK の発見

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ためには、微量の細胞から cDNA を作成し、これを他の細胞に遺伝子導入する cDNA 発現スクリーニングシステムが有効であろう。我々はこの目的のために、レトロウイルスを遺伝子導入ベクターに選んだ。さらに微量の患者検体の mRNA レパートリーをできるだけ完全な形で発現させるため、Clontech 社の SMART 法を応用して完全長 cDNA を少量の RNA から選択的に増幅・作成するシステムを構築し、これを用いて cDNA 発現用組換えレトロウイルスライブラリー作成法を開発した。<sup>4,5</sup>

本法を用いて肺癌の臨床検体から cDNA 発現レトロウイルスライブラリーを構築し、3T3 線維芽細胞によるフォーカスフォーメーションアッセイを行った。すなわち、がん細胞内で発現している mRNA を線維芽細胞で発現させ形質転換を誘導するがん遺伝子を単離することを目指したのである。一般の線維芽細胞株を培養すると全体が confluent になった時点で細胞増殖がストップす

る。これを接触阻止 (contact inhibition) と言うが、がん遺伝子が発現する細胞においては接触阻止機能が消失してしまい、形質転換して盛り上がった腫瘍塊を形成すると考えられている。この腫瘍塊からゲノム DNA を回収し、さらに元々レトロウイルスの cDNA 挿入箇所を挟むように作っておいたプライマー配列で PCR をかけることで簡便に cDNA インサートを回収できるように設計した。

実際、62 歳の喫煙者に生じた肺腺癌検体から 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 週間でモコモコと盛り上がった異常クローン (形質転換フォーカス) が数十種類生じた。そこでそれら 3T3 クローンのゲノム DNA から PCR 法で cDNA を増幅回収したところ、驚くべきことに、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 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)。<sup>6</sup> 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。したがって 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。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。すなわち実際に肺癌細胞において 2p 内の微小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癌において極めて稀なイベントなのだろうか? 我々が 75 例の肺癌症例で 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癌に生じているのである。

## EML4-ALK の臨床応用—新しい分子診断

旧来の肺癌診断には喀痰の病理診断が重要な役割を果たしてきた。しかし肺癌の病理診断が正確に行われるためには、喀痰細胞内の少なくとも数%はがん細胞で占められている必要があり、その結果喀痰検査により肺癌が診断された時点では既にかんが進行している例が多い。したがって「喀痰の病理診断」は肺癌の「早期診断」のためにはあまり有効ではなく、例えば喀痰内の細胞中わずか 0.01% 程度しかがん細胞が存在しなくても診断可

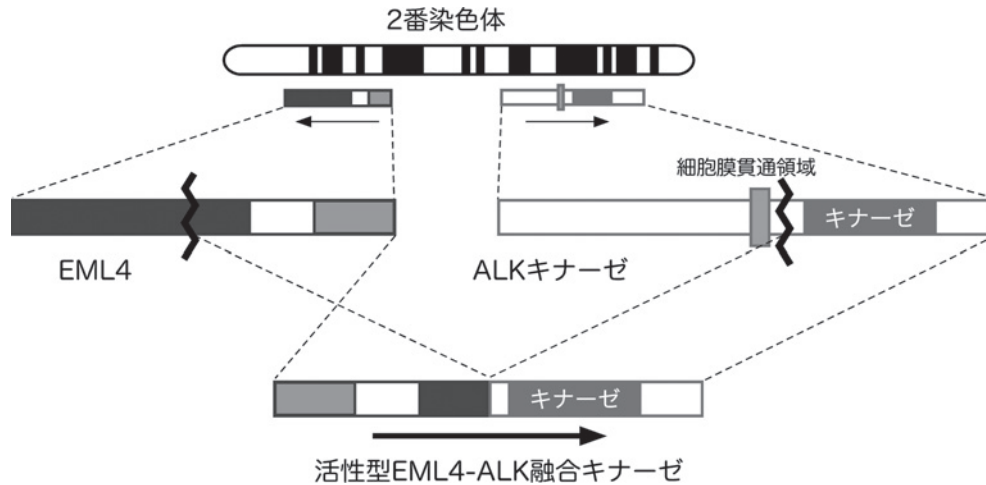


図1. 肺癌における EML4-ALK 融合キナーゼの産生. *EML4* 遺伝子と *ALK* 遺伝子はどちらも 2 番染色体短腕内の極めて近い位置に (約 12 Mbp 離れている) 互いに反対向きに存在する. しかし両遺伝子を挟む領域が微小な逆位を形成することで, 両遺伝子が同方向に融合したがん遺伝子が生じ, 活性型融合キナーゼが産生される.

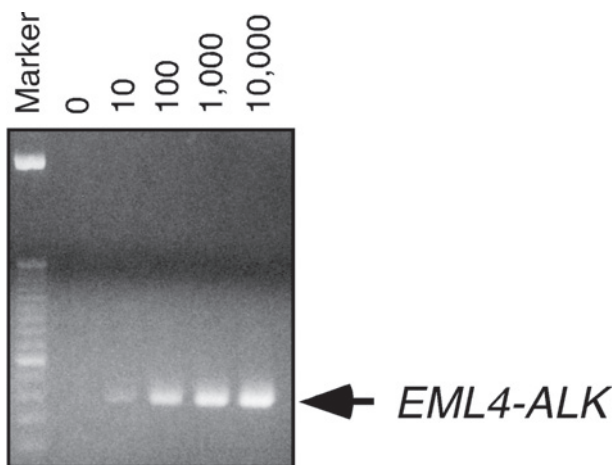


図2. 喀痰を用いた肺癌の分子診断. 慢性気管支炎患者より調整した喀痰 1 ml に, *EML4-ALK* 発現細胞を 0, 10, 100, 1,000, あるいは 10,000 個添加し, 混和した後 *EML4-ALK* 融合点を挟むプライマーによる RT-PCR を行った. 10 細胞/ml の検体から明瞭に *EML4-ALK* の PCR 産物が検出される. Marker (50 bp ladder, Invitrogen). 文献 6 より改変.

能な高感度分子診断法のようなものが早期発見のためには必要であった.

*EML4*, *ALK* 両遺伝子はともに正常細胞内で存在しているが, 両者が融合した *EML4-ALK* 遺伝子は肺癌細胞内ではしか存在しない. しかも両遺伝子は本来染色体内で反対向きに存在しているため, *EML4-ALK* の融合点を挟むように設置したプライマーによる RT-PCR 法は, 同融合遺伝子が存在しない限り決して PCR 産物を生じない. したがって正常肺細胞あるいは 2p 逆位がない肺癌細胞に

おいては決して PCR 反応は陽性とならないのである. すなわち臨床試料を用いた RT-PCR 法により *EML4-ALK* mRNA を検出するシステムは, 極めて鋭敏かつ精度の高い肺癌の分子診断法になると期待される.

実際我々が *EML4-ALK* 陽性細胞を喀痰 1 ml 中に 0~10,000 個と様々な濃度で混和し RT-PCR にて *EML4-ALK* cDNA の検出を試みたところ, 図 2 に示すように, わずか 10 個/ml の細胞を含む喀痰からも明瞭なバンドが検出された.<sup>6</sup> 以上より喀痰を用いた *EML4-ALK* 陽性肺癌の分子診断は実現可能であり, PCR の増幅率を考えると喀痰内にごくわずかしかな肺癌細胞がなくても診断可能なことが期待される. すなわち肺癌の早期発見が現実性を持ってくると言えよう. また解析対象としては喀痰だけでなく, 胸水, 肺胞洗浄液, 肺生検試料ももちろん適切であり, 末梢血を用いる早期発見さえ可能性は存在する.

我々が当初発見した *EML4-ALK* は *EML4* のエクソン 13 が *ALK* のエクソン 20 に結合したものであったが, その後直ぐに *EML4* の様々なエクソンが *ALK* のエクソン 20 に融合するバリエーションが存在することが明らかになった. したがって RT-PCR 法で *EML4-ALK* 陽性肺癌を精度良く検出するためには, これらバリエーションの全てを検出できる multiplex RT-PCR システムを構築する必要がある.<sup>7-9</sup>

## EML4-ALK の臨床応用—新しい分子標的治療

Imatinib が CML に著効するように, 同様な融合型発がんキナーゼである *EML4-ALK* を有する肺癌にも *ALK* 阻害剤が著効するのであろうか? 我々は, *EML4-*

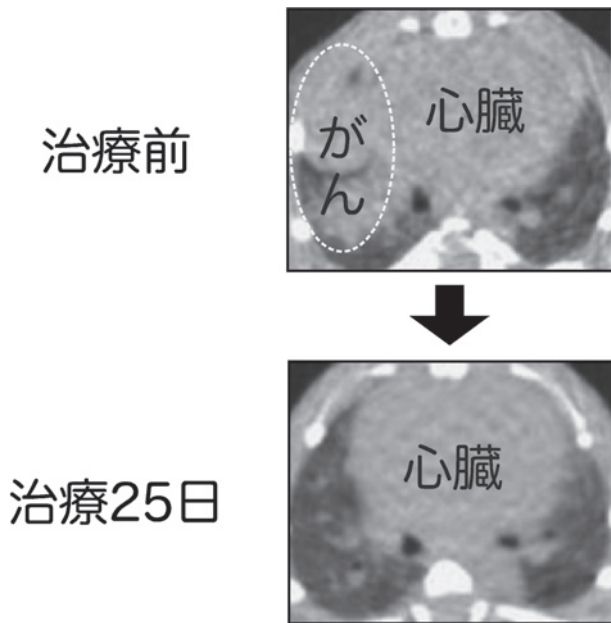


図 3. 治療モデル実験の成功. EML4-ALK 発現マウスに 2,4-pyrimidinediamine (10 mg/kg/日) を 1 日 1 度経口投与した. 治療前と治療開始後 25 日目の時点で CT スキャンを行い, 腫瘍サイズの変化を計測した. 左肺にあった巨大な 2 個の腫瘍が, 治療後はほぼ消失していることが明らかである. 文献 10 より改変.

ALK キナーゼが実際の生体で肺癌の原因となることを直接証明する目的で, 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. 驚くべきことに, これらマウスはいずれも生後わずか数週で両肺に数百個の肺腺癌を多発発症したのである (図 3).<sup>10</sup> 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癌発症時期の早さを考えると, 同遺伝子陽性肺癌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.

ではそのような肺癌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 肺癌発症マウスに 1 日 1 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 3 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, わずか 25 日間経口摂取するだけでほぼ消失していることがわかる. 他のマウスでも同様な治療効果が確認された.<sup>10</sup> 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, 2010 年米国臨床腫瘍学会総会においてもその成

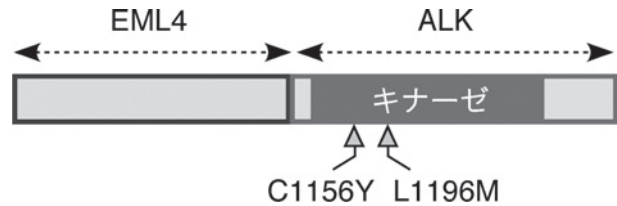


図 4. EML4-ALK 内付加変異. Crizotinib 耐性となった症例の EML4-ALK cDNA より 2 種類の塩基置換を発見した. それぞれは 1156 番目のシステイン (C) をチロシン (Y) へ, また 1196 番目のロイシン (L) をメチオニン (M) に置換した. 文献 14 より改変.

果が発表された. その治療成績は response rate = 64%, tumor control rate = 90% と目覚ましいものであり, 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.<sup>11</sup> まさに上記のトランスジェ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 III 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.

#### ALK 阻害剤耐性変異

変異 EGFR 陽性肺癌に対する 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.<sup>12,13</sup> では同様に EML4-ALK の場合も耐性変異は出現するのだろうか?

我々は, EML4-ALK 陽性肺腺癌症例で 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癌検体を次世代シーケンサーによって解析することにより, 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 4).<sup>14</sup> 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 5). ところが C1156Y あるいは L1196M を有する EML4-ALK はどちらも crizotinib 耐性になるのである. 以上より肺癌内で 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

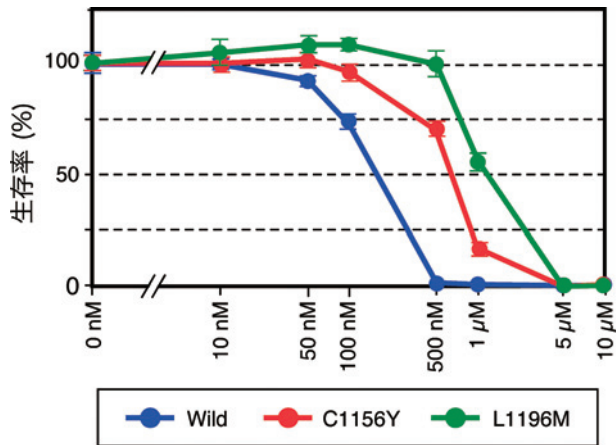


図 5. EML4-ALK 内付加変異は crizotinib 耐性を誘導する。マウス BA/F3 細胞に EML4-ALK (Wild) およびその C1156Y 変異体あるいは L1196M 変異体を導入した。治療に用いた crizotinib を添加するとその濃度依存性に BA/F3 細胞はアポトーシスに至るが、C1156Y および L1196M 変異体はいずれもその感受性が著明に低下していた。文献 14 より改変。

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

我々の肺癌原因遺伝子 EML4-ALK の発見報告が 2007 年であったが、そのわずか 3 年後に第 III 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。こうして肺癌の世界において、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。なお驚くべきことに、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。

## REFERENCES

1. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001;344:1031-1037.

2. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2006;355:2408-2417.
3. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350:2129-2139.
4. Fujiwara S, Yamashita Y, Choi YL, Watanabe H, Kurashina K, Soda M, et al. Transforming activity of purinergic receptor P2Y<sub>6</sub>, G protein coupled, 8 revealed by retroviral expression screening. *Leuk Lymphoma.* 2007;48:978-986.
5. Choi YL, Kaneda R, Wada T, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, et al. Identification of a constitutively active mutant of JAK3 by retroviral expression screening. *Leuk Res.* 2007;31:203-209.
6. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448:561-566.
7. Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008;68:4971-4976.
8. Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6618-6624.
9. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15:3143-3149.
10. Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:19893-19897.
11. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010;363:1693-1703.
12. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2005;352:786-792.
13. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2005;105:2640-2653.
14. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med.* 2010;363:1734-1739.