

REVIEW ARTICLE

EML4-ALK 融合型癌遺伝子：発見から診断，治療へ

曾田 学¹・間野博行^{1,2}

Discovery of the *EML4-ALK* Fusion Oncogene; an Effective Target in Lung Cancer

Manabu Soda¹; Hiroyuki Mano^{1,2}

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

ABSTRACT — Using an original cDNA expression library system, we discovered a novel fusion oncogene between *EML4* and *ALK* that can be identified in 4-5% of non-small cell lung cancer (NSCLC) cases. Fusion to *EML4* induces a constitutive dimerization of the *ALK* kinase domain, and thereby its marked activation. Transgenic mice expressing *EML4-ALK* in lung generated hundreds of adenocarcinoma nodules soon after birth, but the oral administration of an *ALK* inhibitor successfully resolved these nodules. Our discovery led to the swift development of *ALK*-inhibitors, and one such compound, crizotinib, has already demonstrated outstanding efficacy in a phase I/II clinical trial. We observed a patient who was effectively treated once with crizotinib, but relapse occurred 6 months later. Molecular analysis of histological specimens led to a discovery of secondary mutations within *EML4-ALK*, accounting for the observed drug tolerance. Our data thus demonstrate that a subset of lung cancer expresses previously unidentified fusion kinases that could be a therapeutic target as well as a diagnostic molecular marker for this intractable disorder.

(*JJLC*. 2012;52:136-141)

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

Reprints: Hiroyuki Mano, Division of Functional Genomics, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke-shi, Tochigi 329-0498, Japan (e-mail: hmano@jichi.ac.jp).

要旨 — 我々は cDNA 発現レトロウイルスライブラリーの技術を用いて、微小管会合タンパク *EML4* と、受容体型チロシンキナーゼ *ALK* のチロシンキナーゼ領域を含む細胞内領域とが融合した新規融合型癌遺伝子 *EML4-ALK* が約 4~5% の非小細胞肺癌症例で発現していることを発見した。 *EML4* 内の二量体化領域により *EML4-ALK* は恒常的に二量体化され活性化されることで、 *EML4-ALK* は非常に強い癌化能を有している。 *EML4-ALK* を導入したトランスジェニックマウスは生後数週で肺癌を形成し、同マウスに *ALK* 阻害剤を投与

したところ、肺癌は速やかに消失したことから肺癌の新しい分子標的療法になることが期待され、既に本融合型遺伝子陽性肺癌患者を対象とした *ALK* 阻害剤である crizotinib による第 I/II 相臨床試験も終了し、その著しい効果が報告された。また我々は本薬剤に耐性となった症例を経験し、薬剤耐性の原因となる遺伝子変異も発見した。今後ますます *ALK* 融合型肺癌とその治療薬が注目されると予想される。

索引用語 — *EML4-ALK*, *ALK* 阻害剤, 癌遺伝子

¹自治医科大学ゲノム機能研究部；²東京大学大学院医学研究科ゲノム医学講座。
別刷請求先：間野博行，自治医科大学ゲノム機能研究部，〒329-

0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1 (e-mail: hmano@jichi.ac.jp).

※第 51 回日本肺癌学会総会シンポジウム「肺癌の分子標的治療—基礎から臨床へ」。

はじめに

2004年に肺癌の一部の症例に上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) 遺伝子の活性化型変異が生じていることが報告され、しかもこの遺伝子変異を持つ患者に対してEGFRのキナーゼ活性阻害剤である gefitinib (イレッサ®) や erlotinib (タルセバ®) が治療上有効であることが明らかになった。¹ ついに肺癌の分野に有効な分子標的治療法の時代が訪れたのである。しかしながら、EGFR 遺伝子変異を有さない症例における原因は不明のままであり、我々は機能スクリーニング法を用いて肺癌発症の新たな原因遺伝子を発見することを目指した。

新規融合型癌遺伝子 *EML4-ALK* の発見

手術や検査によって採取される微量な患者検体からでも癌細胞の中で発現している mRNA のレポトリーをできるだけ完全な形で調整し、遺伝子の機能を効率良くスクリーニングすることができれば、癌化に関連する原因遺伝子を同定することが可能であると考えられる。そこで我々は cDNA 発現レトロウイルスライブラリーを用いた 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法を構築し、発癌原因遺伝子の同定を目指した。^{2,3}

実際にこの手技を用いて、62歳の原発性肺腺癌手術切除検体から *EML4* (echinoderm microtubule associated protein-like 4)-*ALK* (anaplastic lymphoma kinase) 融合型遺伝子を同定することに成功した。⁴ 本遺伝子の5'側は微小管会合タンパクの一種である *EML4* 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* 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 (Figure 1)。興味深いことに、ヒトにおいて *EML4* と *ALK* 遺伝子はどちらも2番染色体短腕 (2p) 上のわずか12 Mbpしか離れていない位置に反対向きに存在していた。すなわち、各遺伝子上でゲノムが一度切断され、逆位となって再結合した結果、*EML4-ALK* は作られたのである。実際に我々は患者ゲノム DNA レベルで両遺伝子のイントロンが結合していることを確認している。⁴ 正常の *ALK* キナーゼはその細胞外領域で何らかのリガンドと結合して活性化され細胞増殖を誘導すると考えられるが、*EML4-ALK* は *EML4* 内の coiled-coil ドメインにより恒常的に二量体化して、常に活性化されたチロシンキナーゼとなり発癌を誘導する。^{4,5}

次にどのくらいの頻度でこのような遺伝子融合が生じているのかを75例の非小細胞肺癌症例で reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いてスクリーニングした結果、5例 (6.7%) で陽性であり、⁴ その後の報告^{6,7} でも4~5%の頻度で生じているこ

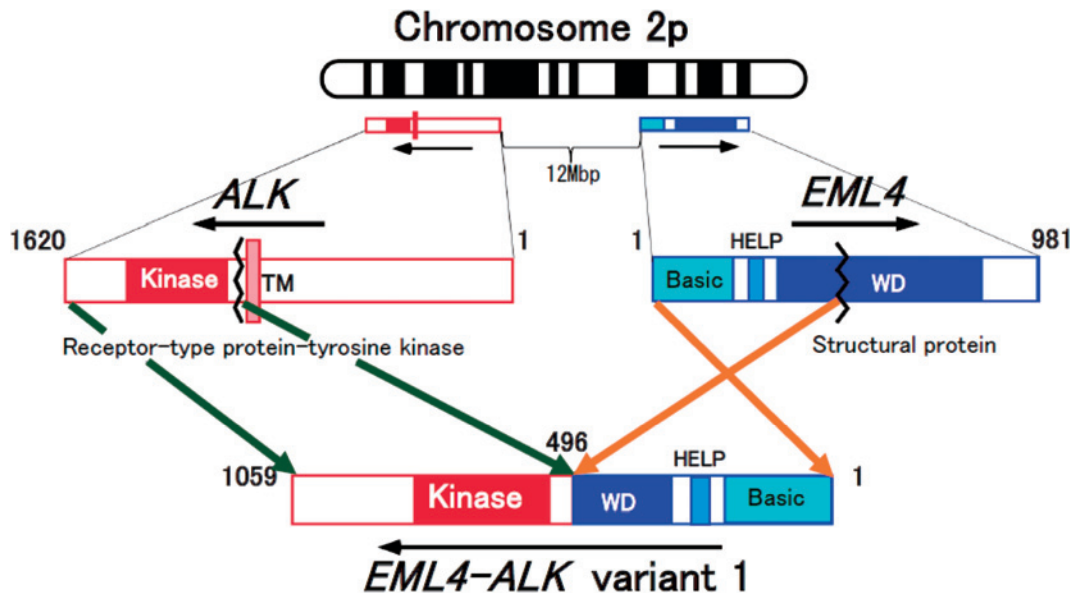


Figure 1. The fusion receptor-type protein-tyrosine kinase *EML4-ALK*. One of the amplified cDNAs rescued from the transformed foci comprised 3926 bp and contained an open reading frame for a protein of 1059 amino acids. The N-terminal portion (residues 1-496) of the predicted protein is identical to that of human *EML4*, whereas the C-terminal portion (residues 497-1059) is identical to the intracellular domain (residues 1058-1620 of wild-type protein) of human *ALK*, suggesting that the cDNA is derived from a fusion product of *EML4* and *ALK* (modified from Soda et al.⁴).

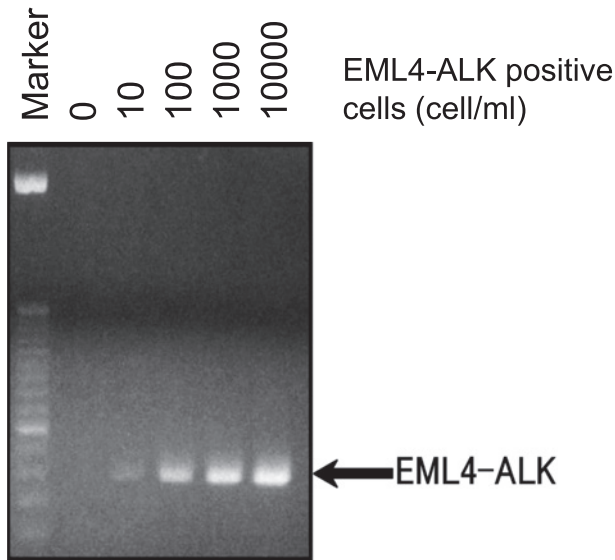


Figure 2. The fusion mRNA was detected in sputum containing as few as 10 cells/ml BA/F3 expressing the fusion gene. One milliliter of sputum was mixed with 0, 10, 100, 1000 or 10000 of BA/F3 cells expressing the fusion gene, and was subjected to RT-PCR with the Fusion-RT primer set to detect the fusion cDNA. Marker, 50 bp DNA ladder (modified from Soda et al.⁴).

とが確認されている。ここで重要なのは、*EML4-ALK* 陽性群と変異 *EGFR* 陽性群とは相互排他的な関係にあるということである。すなわち、イレッサ®やタルセバ®の恩恵にあずかれなかった肺癌患者群に *EML4-ALK* は存在しているのである。

分子診断法の開発と分子標的治療

1. *ALK* 融合型遺伝子の検出法

EML4-ALK の検出法には大きく3つの手法が考えられる。第一はRT-PCR法、第二に抗 *ALK* 抗体による免疫組織染色法、そして第三にFISH法である。最初にRT-PCR法について述べる。*EML4*、*ALK* 遺伝子は正常細胞内の2番染色体短腕(2p)上で互いに反対向きに存在するが、両者が融合した *EML4-ALK* 遺伝子は肺癌細胞でのみ発現している。したがって、両遺伝子の融合点を挟むように設定したPCRプライマーによるRT-PCR法では、正常細胞ならびに2p逆位のない癌細胞からは決してPCR産物は得られないはずである。実際に *EML4-ALK* 陽性細胞の含有量を変えて混和したモデル喀痰を作製し、RT-PCR法にて *EML4-ALK* cDNA の同定を試みた結果、わずか10個/mlの陽性細胞しか存在しない喀痰からでも陽性バンドが確認できた (Figure 2)。⁴ この結果から、*EML4-ALK* をターゲットとしたRT-PCR法は、極めて高感度かつ高精度な肺癌の分子診断法になると考



Figure 3. Structure of *EML4* protein. Exon boundaries of *EML4* for possible in-frame fusion to exon 20 of *ALK* are shown as vertical bars together with the exon numbers at the corresponding positions in the *EML4* protein. CC, coiled-coil domain; HELP, hydrophobic echinoderm microtubule-associated protein-like protein domain; WD, WD-repeat domain (modified from Mano⁵).

えられる。

ここで問題になるのが *EML4-ALK* は1種類だけではなく、*EML4* 遺伝子ならびに *ALK* 遺伝子のゲノム上での切断点・融合点の違いによりいくつもの融合バリエーションが存在するということである。^{4,5,8} しかし *NPM* (nucleophosmin)-*ALK* を含め、既知の *ALK* 融合型遺伝子における *ALK* の融合点はエクソン20になることがほとんどであった。^{9,10} 実際に我々が最初に見つけた *EML4-ALK* も *EML4* のエクソン13が *ALK* のエクソン20と結合していた。*ALK* のエクソン20に対してアミノ酸翻訳フレームを保つように融合し得る *EML4* のエクソンはFigure 3に示す通り6カ所考えられるが、そのいずれの融合バリエーションも検出可能なPCRシステムを構築すれば、ほぼすべての融合バリエーションを検出できるはずである。

そのために、*EML4* の複数のエクソン上にセンスプライマーを設定したマルチプレックスRT-PCR法を開発して、それを用いて既にある肺癌検体をスクリーニングしたところ予想通り、様々なところでin-frameで融合するようなバリエーションが見つかった。^{6,11} したがって、RT-PCR法による診断を実施する場合には、*EML4* のどのエクソンから *ALK* に結合していてもすべての *EML4-ALK* のバリエーションを検出可能なマルチプレックスRT-PCR法を用いる必要がある。

次に抗 *ALK* 抗体を用いた免疫染色法だが、これには長所と短所がある。長所としては正常の *ALK* は正常の肺組織で発現していることはほとんどないので、免疫染色で *ALK* が陽性であれば *EML4-ALK* を検出している可能性が非常に高いと言える点である。しかし欠点は *EML4* のプロモーター活性が弱いため *EML4-ALK* の蛋白量が非常に少なく、従来の免疫染色法では陽性になりにくい点である。この難点を克服するために、免疫染色の感度を適度に増加させる手技をがん研究会がん研究所の竹内賢吾先生らが開発した。¹¹

この高感度免疫染色法 (intercalated antibody-

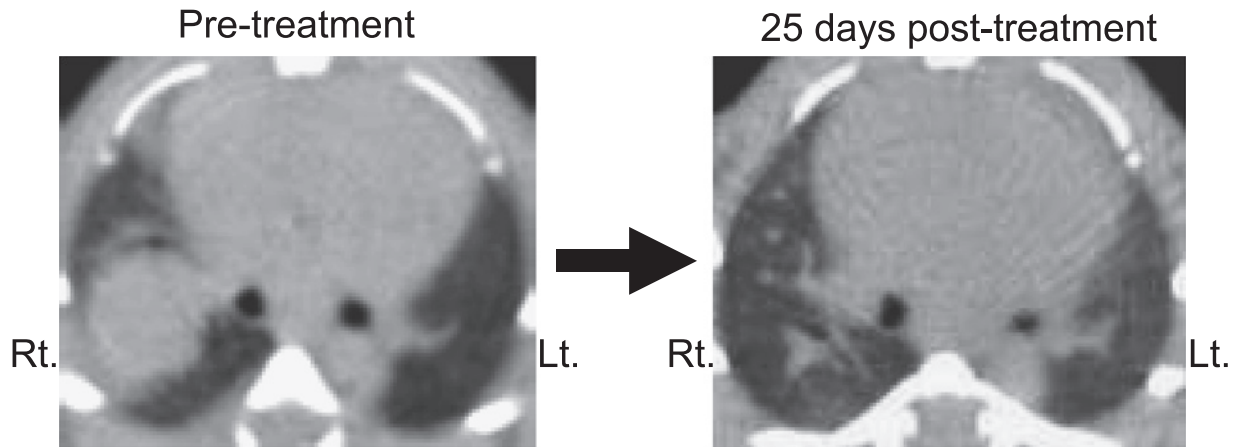


Figure 4. Treatment of the transgenic mice with a specific ALK inhibitor. The peroral administration of the anti-ALK inhibitor was started in the transgenic mice of 4 weeks old, and CT scans were conducted on days 0 and 25. Tumors in both lungs became diminished in the treatment mice (modified from Soda et al.¹³).

enhanced polymer : iAEP)を用いることで、従来法の抗ALK免疫染色では陽性と判定できなかった症例もiAEP法では正確に陽性の判定が可能になった。

なおFISH法については、先にも述べたように*EML4*と*ALK*の両遺伝子が2p上で12Mbpしか離れていない位置に存在しているため、標本の切断面によっては、シグナルの重なり具合や離れ具合の判定が難しい場合が出てくる。すなわち偽陽性や偽陰性を示す要因となり得る。したがって、少なくとも検体のプライマリースクリーニングにはFISH法は不適切であり、RT-PCR法もしくは免疫組織染色で陽性と診断された検体の確認手段として用いる方が良いと考える。

診断法に関して最も重要なことは、*EML4-ALK*を一つの検査法であらゆる検体の診断を行うことは不可能だという点である。例えばRNAを抽出可能な検体(喀痰や胸水、気管支洗浄液、生組織検体など)ならばRT-PCR法を、RNAの抽出が困難な検体(ホルマリン固定パラフィン包埋検体)では免疫染色法やFISH法で診断する、という検査方法の使い分けが重要なのである。逆に言えば、喀痰や胸水などは免疫染色法やFISH法での診断は通常困難であるし、パラフィン包埋検体はRT-PCR法での診断に不向きである。これらの特徴を踏まえ、検体ごとに検査法を組み合わせることで正確な診断を行うことこそが、ALK阻害剤の適応患者を決定する上で重要となる。

2. ALK阻害剤

BCR-ABLのキナーゼ活性阻害剤であるimatinib(グリベック®)が慢性骨髄性白血病の治療に著効すること¹²、また*EGFR*遺伝子変異を有する肺癌症例の治療にイレッサ®やタルセバ®が有効であること¹から、*EML4-ALK*陽性肺癌の治療にALK阻害剤が有効ではないか

と考えられる。そこで我々は*EML4-ALK*が肺癌発症に本質的な役割を持つことを直接証明する目的で、*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を作製した。¹³驚くべきことに同マウスは生後数週で両肺に多数の肺癌を発症し、しかもこれらのマウスにALK特異的阻害剤である2,4-pyrimidinediamineを1日1回連日経口投与して、小動物用CTで経時変化を観察したところ、肺癌はわずか25日で消失した(Figure 4)。¹³したがって*EML4-ALK*こそが同遺伝子陽性肺癌の本質的な発症原因であり、しかもALK特異的阻害剤は*EML4-ALK*陽性肺癌の全く新しい分子標的治療剤となり得ることを証明したのである。

実際に、既に複数の製薬会社がALK阻害剤を開発しているが、その一つであるcrizotinibを用いた*EML4-ALK*陽性肺癌に対する第I/II相臨床試験の成果が2009年ならびに2010年の米国臨床腫瘍学会で発表され、^{14,15}2010年のNew England Journal of Medicine誌にも結果が報告された。¹⁶その内容は、治療開始8週での病勢コントロール率が87%、奏効率57%のうち1例の完全寛解症例も認めるといふ目ざましいものであった。

ALK阻害剤耐性変異の発見

我々は、*EML4-ALK*陽性肺癌症例でcrizotinibの臨床試験に参加し当初治療効果が得られていたものの、治療開始6カ月後に原発巣の再増大ならびに胸水が再増加するという再発例を経験した。

Crizotinibに対する何らかの*EML4-ALK*耐性変異が出現した可能性を考えて、治療前後の検体を次世代シーケンサーで解析して比較した結果、*EML4-ALK*のキナーゼドメイン内に2カ所のアミノ酸置換を伴う変異

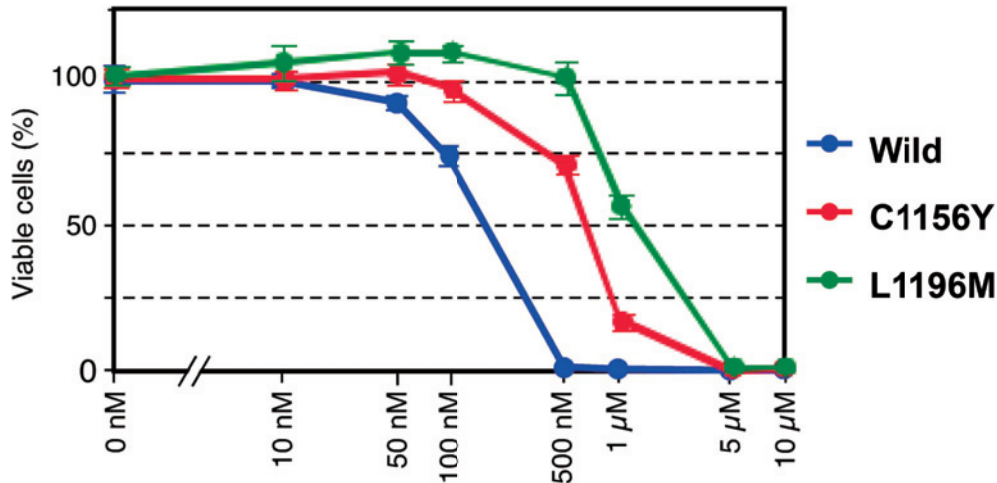


Figure 5. Acquired mutations responsible for the drug resistance. Mouse BA/F3 cells expressing EML4-ALK, EML4-ALK with the C1156Y mutation or EML4-ALK with the L1196M mutation were incubated for 48 hours with the indicated concentration of crizotinib. The viability of each cell fraction is expressed as the mean value \pm SD, calculated from three separate experiments (modified from Choi et al.¹⁷).

が、再発後の検体のみに生じていることを発見した。¹⁷ 一つは、1156番目のシステインをチロシンに(C1156Y)、もう一つは1196番目のロイシンをメチオニンに(L1196M)置換するもので、2つの変異は別々の癌細胞クローン上にそれぞれ存在していた。

この2つの変異体がALK阻害剤耐性に寄与するのかどうかを検証するために、EML4-ALKを導入したマウスBA/F3細胞の培養上清にcrizotinibの濃度を変えて添加したところ、C1156YならびにL1196M変異を有するEML4-ALKではcrizotinib耐性になることが明らかになった (Figure 5)。

今後は、この耐性変異に対しても有効な第二世代のALK阻害剤を開発することで薬剤耐性を克服することが可能になると考えられる。

おわりに

今回我々が発見したEML4-ALK融合型チロシンキナーゼは、肺癌においてEGFRに次ぐ新たな分子標的と考えられ、これからの肺癌の臨床に大きな影響を及ぼすものと思われる。同遺伝子陽性症例に対してはALK阻害剤が著効することから、既に米国では2011年8月26日付けでALK遺伝子異常を有する非小細胞肺癌の治療薬としてcrizotinibが認可された。本邦でも早急に同薬剤が承認され一般市販されることを期待するが、ALK遺伝子異常を有する患者にのみ適切に投与するためにEML4-ALKを鋭敏かつ正確に診断していくことが今後ますます重要となる。

本論文内容に関連する著者の利益相反：間野博行〔企業の職員・法人の代表〕(株) CureGene, 〔株式〕(株) CureGene, 〔寄付金〕アステラス製薬(株), イルミナ(株), 〔専門的助言・証言〕アステラス製薬(株), 中外製薬(株), ファイザー(株), 第一三共(株)

REFERENCES

- 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.
- Kisanuki H, Choi YL, Wada T, Moriuchi R, Fujiwara S, Kaneda R, et al. Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma. *Eur J Cancer.* 2005; 41:2170-2175.
- Choi YL, Moriuchi R, Osawa M, Iwama A, Makishima H, Wada T, et al. Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia. *Leuk Res.* 2005;29: 943-949.
- 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.
- Mano H. Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer Sci.* 2008;99: 2349-2355.
- 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.
- Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, Yoshizawa A,

- Menju T, Nakayama E, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with *EML4-ALK* fusion gene. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:889-897.
8. 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.
 9. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, *ALK*, to a nucleolar protein gene, *NPM*, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994;263:1281-1284.
 10. Pulford K, Morris SW, Turturro F. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *J Cell Physiol*. 2004;199:330-358.
 11. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. *KIF5B-ALK*, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for *ALK*-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:3143-3149.
 12. 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.
 13. 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.
 14. Kwak EL, Camidge DR, Clark J, Shapiro GI, Maki RG, Ratain MJ, et al. Clinical activity observed in a phase I dose escalation trial of an oral *c-met* and *ALK* inhibitor, PF-02341066. *J Clin Oncol*. 2009;17:15s (suppl; abstr 3509).
 15. Bang YJ, Kwak EL, Shaw AT, Camidge DR, Iafrate AJ, Maki RG, et al. Clinical activity of the oral *ALK* inhibitor PF-02341066 in *ALK*-positive patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol*. 2010;28:18s (suppl; abstr 3).
 16. 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.
 17. 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.