

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム  
セットアップスキーム (ACT-MS)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 肺がんの個別化医療を目指した ACTN4 遺伝子増幅検出機器の開発  
(英語) Development of an ACTN4 gene quantification system for the individualized medical treatment of lung cancer

研究開発実施期間：2016年10月28日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 山田哲司  
(英語) Tesshi Yamada

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 国立がん研究センター研究所・細胞情報学分野・客員研究員  
(英語) Visiting Scientist, Division of Cell signaling, National Cancer Center Research Institute

## II 研究開発の概要

### 1) 背景

#### 【早期非小細胞肺がんの治療成績】

人口の高齢化に加え、低線量 CT の普及により、肺がん手術件数は年々増加し、日本胸部外科学会の集計によると、日本における肺がん手術件数は 2010 年に 3 万件を超えている。これらの殆どは非小細胞肺がん、半数以上が遠隔臓器のみならず、リンパ節にも転移のない術後ステージ I 期と推定される。

しかし、肺がんは早期に発見され、外科的に完全切除されたとしても、転移・再発は稀でない。5 年生存率は IA 期で 87%、IB 期では 74%にとどまり (Sawabata, *et al.*, *J Thorac Oncol.*, 6: 1229, 2011)、十分な成績とは言えない。

#### 【Actinin-4 の機能に関する基礎研究】

アクチニン 4 (actinin-4) (遺伝子名: *ACTN4*) は、細胞の運動性に関わる新規アクチン結合タンパク質として (Honda, Yamada, *et al.*, *J Cell Biol.*, 140: 1383, 1998)、研究開発代表者らが遺伝子クローニングを行った分子で、細胞の運動性、がんの浸潤・転移、上皮間葉転換に関わることが様々な基礎研究で明らかになっている (Honda, Yamada, *et al.*, *Gastroenterology*, 128: 51, 2005, Hayashida Yamada, *et al.*, *Cancer Res.*, 65: 8836, 2005)。

#### 【Actinin-4 遺伝子増幅症例の臨床データ】

研究開発代表者らは、国立がん研究センター中央病院で切除された肺腺がん 543 例の切除病理切片で、19 番染色体にある *ACTN4* の遺伝子コピー数を Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) 法で解析し、79 例 (15%) で遺伝子増幅 (19 番セントロメアとの平均シグナル比 2.0 以上) を検出した (Noro, Yamada, *et al.*, *Ann Oncol.*, 24:2594, 2013)。

ACTN4 遺伝子増幅症例の術後再発リスクは I 期であっても高く、増幅陽性例で 5 年生存率 57%と陰性例 95%で、ハザード比で 10 倍を超える差がみられた。さらに 2 施設 3 コホート合計 1201 例で大規模検証を行い、ACTN4 の遺伝子増幅が、従来にない肺腺がんの再発予測バイオマーカーであることを明らかにした。

この成果がマスコミで報道されたところ、国際企業（アブノバ社、台北市）が興味を持ち、研究開発代表者らの特許（日英仏独中で成立、米で出願中）の実施権をヒューマンサイエンス振興財団より取得し、研究開発代表者らが単離した ACTN4 の遺伝子領域と 19 番染色体のセントロメア領域の混合 BAC (Bacterial Artificial Chromosome) クローンを GMP (Good Manufacturing Practice) 規格で工業生産した。術後再発リスク診断を目的とした体外診断用医薬品として、同社は主に海外で実用化を進めている。

### 【実用化への課題】

従来、がんの遺伝子増幅の検出には FISH 法が用いられ、臨床検査としても確立しているが、熟練した技師による顕微鏡下での判読が必要で、客観性や施設間の再現性に問題がある。また暗室での蛍光シグナルの判読は検査者に多大の労力を強い、現在標準である FISH 法に代わる新しい遺伝子増幅検査法の開発が必要であった。

## 2) 研究開発課題の成果と今後の計画

### 【目的と成果】

シスメックス株式会社では、臨床現場で使用可能な、全自動で高感度なリアルタイム PCR システム（クリニカル PCR）を開発し、臨床検査機器として上市を目指している。クリニカル PCR では、必要量の検体（5 μm 厚の病理切片等）を装置にセットするだけで、精度管理された検査結果を 2~3 時間で得られる。クリニカル PCR を用いて遺伝子増幅を検出することが可能となれば、簡便に、高い再現性の担保された検査結果を得ることが可能となる。

本課題では、国立がん研究センターとシスメックス株式会社の共同研究でクリニカル PCR を用いた全自動の遺伝子増幅検出機器の開発を目指し、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded) 組織からの RNA 回収技術の獲得、ACTN4 遺伝子増幅検出用プライマー・プローブの作成、反応条件の最適化等を行った。それを用いて、肺非小細胞がんの組織ブロックから薄切直後に RNA を抽出し、ACTN4 の遺伝子発現量を定量したところ、FISH 法の結果と良く一致することが明らかになった。

### 【今後の計画】

FISH 法は遺伝子増幅検出の標準的な臨床検査法として確立しているため、今後国立がん研究センターを中心として大規模な術後補助化学療法の臨床試験参加者の病理組織検体を用いて FISH 法を行い、ACTN4 遺伝子検査に術後補助化学療法の適応を決定するコンパニオン診断として有用性があることを証明する付随研究を行う。術後補助化学療法の前向きな臨床試験は通常 10 年以上かかるが、既に実施された臨床試験のデータと検体を利用することで、短期に高いレベル（レベル 2 相当）のエビデンスが得られることが期待される。

その上で、FISH 法とクリニカル PCR との間で高い同等性 (>90%) があることを示す臨床性能試験を、2 施設 150 名の規模でシスメックス株式会社が行い、保険収載を目指す計画である。

## Development of an *ACTN4* gene quantification system for the individualized medical treatment of lung cancer

**Background:** The adoption of low-dose helical computed tomography (CT) screening is expected to increase the rate of detection of early-stage lung cancer. However, early detection does not always guarantee cure of the disease. A significant number of early-stage lung cancers paradoxically relapse even after complete surgical resection. For example, the 5-year survival rate of patients with stage IB lung cancer is only 74% (Sawabata, *et al.*, *J Thorac Oncol.*, 6: 1229, 2011), and further improvement of its outcome would be necessary. Selection of patients at high risk of recurrence might improve the efficacy of platinum-based adjuvant chemotherapy.

Actinin-4, actin-binding protein originally discovered in our laboratory (Honda, Yamada, *et al.*, *J Cell Biol.*, 140: 1383, 1998), is an oncogene product that plays a key role in regulation of cell migration, invasion and metastasis (Honda, Yamada, *et al.*, *Gastroenterology*, 128: 51, 2005, Hayashida Yamada, *et al.*, *Cancer Res.*, 65: 8836, 2005). Amplification of its gene (*ACTN4*) defines a small but substantial subset of patients with stage I lung adenocarcinoma showing a distinct outcome (Noro, Yamada, *et al.*, *Ann Oncol.*, 24:2594, 2013). Such patients require intensive medical attention and might benefit from postoperative adjuvant chemotherapy. In fact, using deposited gene expression data from a phase III clinical trial of adjuvant chemotherapy (JBR.10), we recently revealed that *ACTN4* could be used as a biomarker that would predict patients with stage IB-II NSCLC who would benefit from adjuvant platinum-based chemotherapy (Miura, Yamada, *et al.*, *Oncotarget*, 7:33165, 2016).

**Purpose:** The final goal of this study is to develop an *ACTN4* gene amplification test for companion diagnostics that would identify early-stage NSCLC patients at high risk of recurrence and suitable for platinum-based adjuvant chemotherapy. However, Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH), the current standard test of gene amplification, is laborious and time consuming. It would be necessary to develop an alternate automated methods. A clinical PCR system was under development in Sysmex Corporation (Kobe, Japan). The system allows fully automated multiple processes from DNA and RNA extraction to detection/analysis of genetic abnormalities. In this study, we collaborate with Sysmex Corporation (Kobe, Japan), designed primers and probes for *ACTN4* gene quantification, and optimized the processes of RNA extraction and gene amplification and quantification.

**Results:** The *ACTN4* gene copy number was determined and compared with the *ACTN4* gene expression levels of in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens of non-small cell lung cancer (NSCLC). There was a significant correlation between FISH and clinical PCR, and 90% of cases with gene amplification were diagnosed correctly by clinical PCR.

**Future plan:** We will further optimize the clinical PCR system for the detection of *ACTN4* gene amplification in FFPE specimens for the commercialization as an *in-vitro* diagnostics. Accurate diagnosis of stage IB-III A NSCLC patients with *ACTN4* gene amplification would greatly improve their cure rate and eliminate the need for unnecessary treatment of low-risk patients. We are planning to perform a retrospective clinical study of patients who participated in a multicenter randomized controlled study of paclitaxel plus carboplatin versus oral UFT as the adjuvant chemotherapy in stage IB-III A resected NSCLC.