

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) クリニカルシーケンスによる肺腺がんの治療標的・抵抗性克服分子の  
同定に関する研究  
(英語) Identification of molecular targets of lung adenocarcinoma  
by clinical sequencing

研究開発担当者 (日本語) 河野隆志  
所属 役職 氏名 国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野 分野長  
(英語) Takashi Kohno  
Chief, Division of Genome Biology  
National Cancer Center Research Institute

実施期間： 平成26年 7月 11日 ～ 平成29年 3月 31日

研究開発分担者 (日本語) 松本慎吾  
所属 役職 氏名 国立がん研究センター 東病院 先端医療開発センター・  
ゲノムトランスレーショナルリサーチ分野 医員  
(英語) Shingo Matsumoto  
Clinical Fellow, Division of Translational Genomics  
Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center  
National Cancer Center Hospital East

研究開発分担者 (日本語) 後藤功一  
所属 役職 氏名 国立がん研究センター 東病院 呼吸器内科 科長  
(英語) Koichi Goto  
Chief, Department of Thoracic Oncology  
National Cancer Center Hospital East

研究開発分担者 (日本語) 石井 源一郎  
所属 役職 氏名 国立がん研究センター 先端医療開発センター・臨床腫瘍病理分野  
分野長  
(英語) Gen-ichiro Ishii  
Chief, Division of Pathology  
Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center  
National Cancer Center Hospital East

研究開発分担者 (日本語) 山本昇  
所属 役職 氏名 国立がん研究センター 中央病院・先端医療科 科長  
(英語) Noboru Yamamoto  
Chief, Department of Experimental Therapeutics  
National Cancer Center Hospital

研究開発分担者 (日本語) 軒原浩  
所属 役職 氏名 国立がん研究センター 中央病院 呼吸器内科 外来医長  
(英語) Hiroshi Nokihara  
Head, Department of Thoracic Oncology  
National Cancer Center Hospital East

研究開発分担者 (日本語) 今井俊夫  
所属 役職 氏名 国立がん研究センター 研究所 動物実験支援施設 支援施設長  
(英語) Toshio Imai  
Chief, Central Animal Division  
National Cancer Center Research Institute

研究開発分担者 (日本語) 高橋真美  
所属 役職 氏名 国立がん研究センター 研究所 動物実験支援施設 ユニット長  
(英語) Mami Takahashi  
Section Head, Central Animal Division  
National Cancer Center Research Institute

研究開発分担者 (日本語) 加藤護  
所属 役職 氏名 国立がん研究センター 研究所 バイオインフォマティクス部門 部門長  
(英語) Mamoru Kato  
Head, Division of Bioinformatics  
National Cancer Center Research Institute

- 研究開発分担者 (日本語) 永井桃子  
所属 役職 氏名 国立がん研究センター 研究所 バイオインフォマティクス部門  
特任研究補助員  
(英 語) Momoko Nagai  
Project Research Assistant, Division of Bioinformatics  
National Cancer Center Research Institute
- 研究開発分担者 (日本語) 本多隆行  
所属 役職 氏名 国立がん研究センター 研究所 ゲノム生物学研究分野 特任研究員  
(英 語) Takayuki Honda  
Project Researcher, Division of Genome Biology  
National Cancer Center Research Institute
- 研究開発分担者 (日本語) 清野透  
所属 役職 氏名 国立がん研究センター 研究所 発がん・予防研究分野 分野長  
(英 語) Tohru Kiyono  
Chief, Division of Carcinogenesis and Cancer Prevention,  
National Cancer Center Research Institute
- 研究開発分担者 (日本語) 田中 克征  
所属 役職 氏名 国立がん研究センター 研究所 ウイルス発がん研究分野  
特任研究補助員  
(英 語) Katsuyuki Tanaka  
Research Assistant, Division of Carcinogenesis and Cancer Prevention,  
National Cancer Center Research Institute

## II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究は、クリニカルシーケンス解析を基盤とし、申請者らが築き上げた研究体制・微小試料に対するゲノム解析技術、さらに患者試料の先駆的培養技術を最大限に活用することで、現存抗がん剤治療では効果の見込めない進行肺がんの治療標的分子および治療抵抗性克服分子を同定し、新規治療開発に繋げることを目的としている。

組織学的に浸潤性粘液腺がんの特徴を有する Pan-negative 症例の一部に NRG1 (7%), ERBB4 (1%), BRAF (1%) の遺伝子融合が存在することを明らかにした。NRG1 遺伝子融合は HER2/HER3 タンパク質を介したシグナル伝達を介して、がん化に寄与していることが見出され、in vitro、in vivo で HER タンパク質阻害薬であるラパチニブ、アフアチニブが治療に有効である等のデータを得た。加えて、NRG1 融合遺伝子の機能解析を加える事で、その融合遺伝子産物は IGF2 の発現を亢進させることにより、がん細胞の幹細胞様形質を増強することを明らかにした。ERBB2、PI3K、NF- $\kappa$ B、IGF2 の阻害剤を用いることでその幹細胞様形質は抑制されたことから、NRG1 シグナルの異常な活性化が、がん幹細胞形質に影響を与えること、また、それによるシグナルの阻害を行うことで、がん治療に寄与できる可能性を示した。

MET キナーゼの活性化をもたらす exon skipping 診断法の確立、国内臨床検査企業に技術移管を行った結果、SCRUM-Japan 機構での全国遺伝子スクリーニングに基づき MET 阻害剤 (capmatinib、tepotinib) の臨床試験が稼働し、MET exon 14 skipping 陽性例のエントリーが進められた。また、SCRUM-Japan では、そのほかに、HER2 挿入変異、BRAF 変異、FGFR2 融合、FGFR3 融合が治療標的となる遺伝子異常として同定され、各種治験に結びついた。さらに、今後 SCRUM-Japan で計画されている薬剤耐性例を対象とした遺伝子スクリーニングの基盤研究として、新規 EGFR 阻害剤の耐性機序解明および克服のための基礎的検討を行ったところ、EGFR 野生型アレルの増幅が薬剤耐性に関与していることを見出した。また、Pan-negative 症例は、全体の変異数が多く免疫チェックポイント阻害治療に適している可能性があること、また当該症例群にクロマチン制御遺伝子群の失活変異が集中していることから、クロマチン制御異常をもたらすがん細胞の脆弱性が治療標的となることを見出した。一方、RET 等のがん遺伝子融合陽性例では、特に他のがん関連遺伝子の異常が少なく、融合産物を標的とした現在の治療法開発のストラテジーの正しさが支持された。

EGFR 阻害薬治療例については、EGFR 阻害薬で治療された術後再発症例 124 例を選出し奏効期間 2 年以上の long responder (n=20) とそれ以外の症例 (n=104) の比較ゲノム解析を行った。その結果、EGFR 阻害薬の長期奏効に関わる候補遺伝子異常を同定した。新規キナーゼ阻害薬等の治療耐性例については、RET 阻害剤、ALK 阻害剤の獲得耐性腫瘍のゲノム解析を行った。ALK 阻害剤では、既知の薬剤結合部位のキナーゼ二次変異が同定された。RET 阻害薬では同定されなかった。これは以下に示すように、RET 阻害剤自体は治療効果を示すものの (Yoh et al, Lancet Resp Med, 2017)、ALK 阻害剤と異なり、活性化シグナル移行など、他の分子機構による耐性化機構が主体であることを示唆する。

肺がん患者試料の in vitro 培養では希少な ALK 融合遺伝子や RET 融合遺伝子陽性の肺がんを含み、8 割以上の検体からの初期培養に成功しており、5 割以上の検体から長期継代培養を続けている。また、7 症例のゼノグラフト株樹立に成功し、EGFR 阻害剤耐性変異例のほか、BRAF 変異例、HER2 変異例が存在し、今後の創薬開発や POC 取得に極めて有用な材料になると考えられる。

新規治療標的分子の臨床導入に貢献するとともに、治療開発や耐性克服の指針となりうる結果を得ている。また、併せて、希少ながん遺伝子異常陽性がん PDX など、今後の治療薬開発に有益な資材を得ており、企業との共同研究につながった。

This project was undertaken by using our advanced methodologies, such as clinical sequencing and tissue/cell culturing methods for patients' biopsy samples, to identify new therapeutic seed for advanced/recurrent/resistant lung cancers.

We identified oncogenic fusions of NRG1, ERBB4 and BRAF in a subset of invasive mucinous lung adenocarcinoma. NRG1 fusion, which drives carcinogenesis through activation of signal circuit, containing HER2/HER3, NF- $\kappa$ B and IGF2, leading to increase in cancer stem cell property, was considered druggable by interrupting the circuit.

Pan-Japan screening of exon 14 skipping of MET, causing MET kinase activation, has been started in LC-SCRUM-Japan using our original diagnostic method, and a few positive cases have been enrolled into clinical trials of MET-TKIs. A novel mechanism of resistance to EGFR-TKI, i.e., amplification of EGFR-wt allele DNA, was clarified. In addition, high mutation burden as well as frequent inactivating mutations in chromatin modifier genes was identified as characters of oncogene-negative lung adenocarcinoma, indicating a possible benefit of immune-checkpoint and synthetic lethal therapies. On the other hand, lung adenocarcinomas with RET and other oncogenic gene fusions lack aberrations of other cancer-related genes, supporting the use of monotherapy with TKIs targeting the fusion products in these cases.

Genes associated with long response to EGFR-TKIs were searched for in a cohort of 124 lung adenocarcinoma cases with EGFR mutation. Comparative genome analysis between long responders (n=20) and others (n=104) led us to identify candidate genes. Genetic mechanisms responsible for acquired resistance to RET-TKI were indicated to be different from those for ALK-TKIs.

Primary culture of lung cancer cells obtained from patients have been successful for 80% cases, while xenografts for seven lung cancer patients, including those with BRAF and HER2 mutations, have been established.

This study has contributed to translation of new druggable oncogenic products into cancer clinic and also provided new seeds and materials for development of novel therapeutic methods for lung cancer.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 13 件)

1. Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, Shiraishi K, Sakamoto H, Enari M, Furuta K, Shimada Y, Ogiwara H, Watanabe SI, Nokihara H, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Ishigame T, Schetter AJ, Okayama H, Harris CC, Kim YH, Mishima M, Yokota J, Yoshida T, Kohno T\* Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma. Clin Cance Res. 20(12) :3087-3093, 2014.
2. Saito M, Shimada Y, Shiraishi K, Sakamoto H, Tsuta K, Totsuka H, Chiku S, Ichikawa H, Kato M, Watanabe S, Yoshida T, Yokota J, Kohno T. Development of lung adenocarcinomas with exclusive dependence on oncogene fusions. Cancer Res. 75(11):2264-71, 2015.
3. Kohno T, Nakaoku T, Tsuta K, Tsuchihara K, Matsumoto S, Yoh K, Goto K. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. Transl Lung Cancer Res. 4(2):156-64, 2015.
4. Kohno T, Saito M. Comparisons between Mouse and Human Studies Will Help the Prevention, Diagnosis, and Treatment of the Deadliest Type of Lung Cancer. J Thorac Oncol. 10(4):551-2, 2015.
5. Seki Y, Mizukami T, Kohno T. Molecular process producing oncogene fusion in lung cancer cells by illegitimate repair of DNA double-strand breaks. Biomolecules 5(4):2464-76, 2015.
6. Yagishita S, Horinouchi H, Sunami K, Kanda S, Fujiwara Y, Nokihara H, Yamamoto N, Sumi M, Shiraishi K, Kohno T, Furuta K, Tsuta K, Tamura T, Ohe Y. Impact of KRAS mutation on response and outcome of patients with stage III non-squamous non-small cell lung cancer. Cancer Sci. 106(10):1402-7, 2015.
7. Yagishita S, Horinouchi H, Katsui Taniyama T, Nakamichi S, Kitazono S, Mizugaki H, Kanda S, Fujiwara Y, Nokihara H, Yamamoto N, Sumi M, Shiraishi K, Kohno T, Furuta K, Tsuta K, Tamura T. Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Is Associated With Longer Local Control After Definitive Chemoradiotherapy in Patients With Stage III Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 91(1):140-8, 2015.
8. Sunami K, Furuta K, Tsuta K, Sasada S, Izumo T, Nakaoku T, Shimada Y, Saito M, Nokihara H, Watanabe S, Ohe Y, Kohno T\*. Multiplex Diagnosis of Oncogenic Fusion and MET Exon Skipping by Molecular Counting Using Formalin-Fixed Paraffin Embedded Lung Adenocarcinoma Tissues. J Thorac Oncol. 2016, 11(2):203-12.
9. Murayama T, Nakaoku T, Enari M, Nishimura T, Tominaga K, Nakata A, Tojo A, Sugano S, Kohno T, Gotoh N. Oncogenic Fusion Gene CD74-NRG1 Confers Cancer Stem Cell-like Properties in Lung Cancer through a IGF2 Autocrine/Paracrine Circuit. Cancer Res. 2016, 76(4):974-83.
10. Kamata T, Sunami K, Yoshida A, Shiraishi K, Furuta K, Shimada Y, Katai H, Watanabe S, Asamura H, Kohno T, Tsuta K\*. Frequent BRAF or EGFR Mutations in Ciliated Muconodular Papillary Tumors of the Lung. J Thorac Oncol. 2016, 11(2):261-5.

11. Saito M, Shiraishi K, Kunitoh H, Takenoshita S, Yokota J, Kohno T\*. Gene Aberrations for Precision Medicine against Lung Adenocarcinoma (invited review). *Cancer Sci.* 2016, 107(6): 713-720.
12. Yoh K, Seto T, Satouchi M, … Matsumoto S, Kohno T, Goto K\*. Vandetanib in patients with previously treated RET-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (LURET) : an open-label, multicenter phase 2 trial. *Lancet Resp Med*, 2017, 5(1):42-50.
13. Nukaga S, Yasuda H, Tsuchihara K, Hamamoto J, Masuzawa K, Kawada I, Naoki K, Matsumoto S, Mimaki S, Ikemura S, Goto K, Betsuyaku T, Soejima K. Amplification of EGFR Wild-Type Alleles in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Confers Acquired Resistance to Mutation-Selective EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res.* 2017, 77(8):2078-2089.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 中奥敬史、蔦幸治、渡邊俊一、軒原浩、金永学、三嶋理晃、横田淳、河野隆志:Lung invasive mucinous adenocarcinoma (IMA)における治療標的となる新規遺伝子融合、第55回日本肺癌学会学術総会、京都、11月、2014年
2. 中奥敬史、市川仁、白石航也、坂本裕美、江成政人、荻原秀明、軒原浩、岡山洋和、金永学、三嶋理晃、横田淳、吉田輝彦、河野隆志: Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma、横浜、第73回日本癌学会学術総会。9月、2014年
3. 中奥敬史、蔦幸治、村山貴彦、中田飛鳥、白石航也、荻原秀明、金永学、三嶋理晃、後藤典子、河野隆志 Blocking HER2/HER3 signaling to treat NRG1/neuregulin gene fusion-positive lung cancer・口頭発表 第74回日本癌学会学術総会。2015年10月 国内
4. Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, Shiraishi K, Sakamoto H, Enari M, Furuta K, Shimada Y, Ogiwara H, Watanabe SI, Nokihara H, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Ishigame T, Kim YH, Mishima M, Yokota J, Yoshida T, Kohno T Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma・口頭発表 AACR annual meeting 2015年4月 国外
5. Sunami K, Furuta K, Tsuta K, Sasada S, Izumo T, Nakaoku T, Shimada Y, Saito M, Nokihara H, Watanabe S, Ohe Y, Kohno T. Multiplex Diagnosis of Oncogenic Fusion and MET Exon Skipping by Molecular Counting Using Formalin-Fixed Paraffin Embedded Lung Adenocarcinoma Tissues.・ポスター発表 ECCO Annual meeting 2015年9月 国外
6. 角南久仁子、出雲雄大、中奥敬史、齋藤元伸、軒原浩、大江裕一郎、河野隆志 Multiplex Diagnosis of Oncogenic Fusion and MET Exon Skipping by Molecular Counting・口演発表 日本癌学会 2015年10月 国内
7. 高橋真美、石ヶ守里加子、河野隆志、市村幸一、吉田朗彦、川井章、近藤格、今井俊夫: 患者由来ゼノグラフィパネルの整備とがん基礎研究への応用の可能性、口演発表、第31回発癌病理研究会 2016年8月、国内
8. Takuma Yokoyama, Shingo Matsumoto, Kiyotaka Yoh, Takashi Seto, Haruyasu Murakami, Eiji Iwama, Yuichiro Ohe, Masato Shingyoji, Kadoaki Ohashi, Koji Takeda, Yoshihiro Hattori, Shunichi Sugawara, Sho Saeki, Tomoya Fukui, Makoto Nishio, Masahiro Kodani, Takashi Kohno,

Koji Tsuta, Katsuya Tsuchihara, Koichi Goto. Development of nationwide genomic screening project (LC-SCRUM-Japan) contributing to the establishment of precision medicine in Japan. 2016 ASCO Annual Meeting 2016年6月, 国外

9. Takashi Seto, Kiyotaka Yoh, Miyako Satouchi, Makoto Nishio, Noboru Yamamoto, Haruyasu Murakami, Naoyuki Nogami, Kaname Nosaki, Yoshiko Urata, Seiji Niho, Atsushi Horiike, Takashi Kohno, Shingo Matsumoto, Shogo Nomura, Sakiko Kuroda, Akihiro Sato, Yuichiro Ohe, Takeharu Yamanaka, Atsushi Ohtsu, Koichi Goto. A phase II open-label single-arm study of vandetanib in patients with advanced RET-rearranged non-small cell lung cancer (NSCLC): Luret study. 2016 ASCO Annual Meeting 2016年6月, 国外
10. 本多隆行, 政井恭兵, 坂下博之, 蔦幸治, 小林正嗣, 石橋洋則, 元井紀子, 渡辺俊一, 稲瀬直彦, 大久保憲一, 河野隆志. 間質性肺炎合併肺腺癌に関与するドライバーがん遺伝子異常. 日本肺癌学会総会 2016年11月, 国内
11. 中奥 敬史, 村山 貴彦, 中田 飛鳥, 後藤 典子, 河野 隆志. NRG1 Gene Fusion Enhances Cancer Stem Cell-like Properties in Lung Cancer. 第75回日本癌学会学術総会. 2016年10月 国内
12. 石ヶ守里加子, 高橋真美, 河野隆志, 佐々木博己, 今井俊夫. 転移性肺腺がん由来の細胞株を用いる同所・異所移植の比較検討. 第75回日本癌学会 ポスター 2016年10月, 国内

### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 河野隆志 第28回日本癌学会 市民公開講座「基礎研究からプレジジョンメディシンへ：現状と未来」2016/10/8, 国内.

### (4) 特許出願

該当ありません。