

Topics 4

次世代シーケンサーを用いた肺癌ゲノム解析と個別化治療

角南久仁子^{a,b}/ 河野 隆志^a

要旨：近年、肺癌でいくつもの肺発癌ドライバー遺伝子異常が同定され、それに対する個別化治療の拡大が試みられている。新たなドライバー遺伝子異常の同定には遺伝子解析技術が進化し一度に大量の遺伝子解析が可能になったことが大きく貢献している。特に肺腺癌ではゲノム解析が進み、最近では RET, NTRK1, NRG1 融合遺伝子などが次世代シーケンサーを用いた解析により相次いで発見された。RET融合遺伝子に関しては、現在、日本全国規模での遺伝子スクリーニングを行うことによって、RET遺伝子融合陽性肺癌の個別化治療を目指した臨床研究が行われている。本稿では、肺癌個別化治療拡大を目指したゲノム解析について述べる。

キーワード：次世代シーケンサー, 個別化治療,
ドライバー遺伝子異常, クリニカルシーケンス
Next-generation sequencer, Personalized therapy,
Driver gene aberration, Clinical sequencing

連絡先：河野 隆志

〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

^a 国立がん研究センター研究所ゲノム生物学研究分野

^b 同 中央病院呼吸器内科

(E-mail: tkkohno@ncc.go.jp)

はじめに：遺伝子異常に基づく肺癌の個別化治療

肺癌の治療は、分子標的治療薬の登場によって大きく変化した。その先駆けとなったのが2002年に我が国で承認された epidermal growth factor receptor (EGFR) チロシンキナーゼ阻害薬の gefitinib である。その後、2004年にEGFR遺伝子活性化変異が最大の効果予測因子として発見され、変異陽性患者に対するEGFRチロシンキナーゼ阻害薬の劇的な治療効果を目の当たりにして以降、ドライバー遺伝子異常の同定とそれに対する分子標的治療薬の開発が盛んとなっている。

ドライバー遺伝子異常によって細胞内シグナル伝達の活性化が生じると、癌細胞がこれらの遺伝子の活性化に依存した状態、つまり癌遺伝子中毒 (oncogene addiction) 状態となる。そのため、異常ドライバー遺伝子産物の活性を阻害する分子標的治療薬は従来の殺細胞性抗癌剤よりも高い治療効果を示す。治療選択においても、ドライバー遺伝子変異の有無を知ることが重要であり、患者検体の遺伝子検査を行い治療標的となりうるドライバー遺伝子異常があれば、それを標的とした分子標的治療薬が選択される。よって肺癌は、遺伝子情報に基づいた個別化治療が部分的に実現している癌である。

前述のEGFR遺伝子活性化変異のほかにもALK遺伝子融合、KRAS遺伝子活性化変異、BRAF遺伝子活性化変異、ROS1遺伝子融合、RET遺伝子融合などがドライバー遺伝子異常として同定されており、分子標的治療薬の開発が進んでいる(図1)。次世代シーケンサーを用

いた大規模な癌ゲノム解析は、治療標的となるドライバー遺伝子異常の同定の有力な手段である。肺癌の主な組織型について、全ゲノム、RNA、エクソンシーケンスや、キナーゼ遺伝子など特定の遺伝子だけに特化したターゲットシーケンスが進められ、いくつかの治療標的候補が見いだされてきている(表1)。

肺癌のゲノム解析

1. 肺腺癌

腺癌は肺癌のなかでも最も大きな割合を占める組織型である。その患者数の多さから肺癌のなかでゲノム解析が最も進んでおり、前述のように多くのドライバー遺伝子異常が見つかる。これらの遺伝子異常は相互排他的に生じて癌遺伝子中毒の状態をつくり出している。

著者らは、既知のドライバー遺伝子異常のない肺腺癌患者を対象として、次世代シーケンサーを用いた全RNA配列の解読を行い、RET遺伝子と他の遺伝子(KIF5B)との融合による活性化が肺腺癌の2%で生じていることを明らかにした¹⁾。特徴として、比較的若い非喫煙者に多く、病理組織学的にはEGFR陽性肺腺癌に類似点がみられた²⁾。また *in vitro* 試験で、融合陽性癌はRETキナーゼ阻害薬に感受性であることが示唆された(表1, 図2)。この結果から、我が国でRET遺伝子融合陽性肺癌患者を対象に、vandetanibの第II相臨床試験が開始されている。また、海外でも cabozantinib (XL184), lenvatinib (E7080) などの第II相臨床試験が行われている。

がん研有明病院のTakeuchiらは、FISH法を用いた染

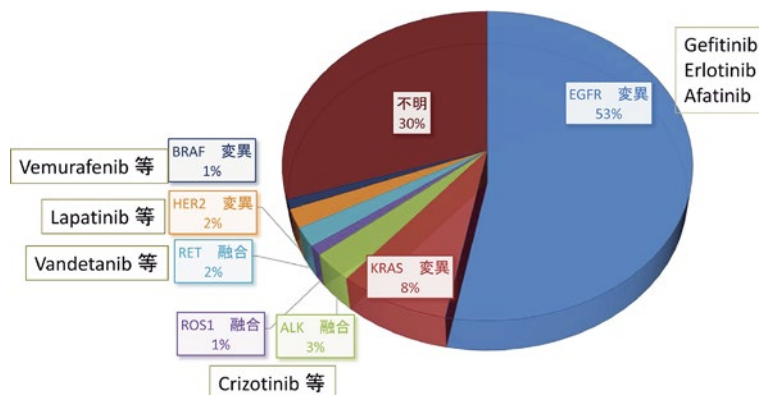
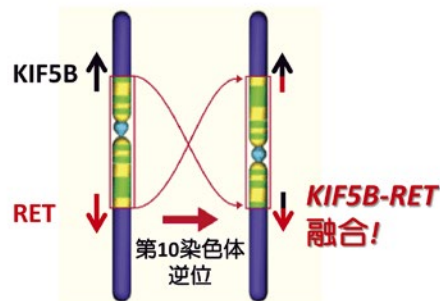


図1 日本人におけるドライバー癌遺伝子の異常と治療薬 (候補含む)。

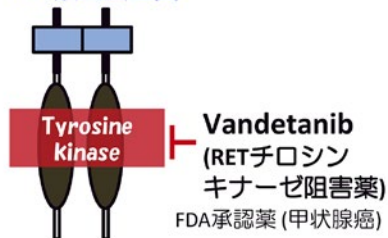
表1 主な肺癌ゲノム網羅的シーケンス解析

組織型	地域	検体数	シーケンシング手法	結果の概要	論文
腺癌	日本	30	全RNA	RET 融合遺伝子	Kohno, 2012
	北米	24	ターゲット	RET 融合遺伝子	Lipson, 2012
	韓国	200	全RNA	ARID1A, SMARCA4 遺伝子変異, ALK, RET, ROS1, FGFR2, AXL, PDGFRA 遺伝子融合	Seo, 2012
	北米	183	全ゲノム, 全エクソン	U2AF1, RBM10, ARID1A 遺伝子変異, EGFR, SIK2 遺伝子構造異常	Imielinski, 2012
	北米	36	ターゲット	NTRK1 融合遺伝子	Vaishnavi, 2013
	日本	97	全エクソン	EGFR, KRAS 遺伝子変異など	Suzuki, 2013
	ドイツ	102	全RNA	NRG1 融合遺伝子	Fernandez-Cuesta, 2014
	日本	32	全RNA	NRG1, ERBB4, BRAF, RET 融合遺伝子	Nakaoku, 2014
扁平上皮癌	北米	178	全ゲノム, 全エクソン	TP53, NFE2L2, KEAP1 経路やPI3K経路遺伝子変異	TCGA, 2012
	韓国	104	全エクソン	上記と同様な遺伝子変異 FGFR3-TACC3 融合遺伝子	Kim, 2014
小細胞癌	欧州	29	全ゲノム, 全エクソン, 全RNA	CREBBP, EP300, MLL 遺伝子変異, FGFR1 遺伝子の増幅	Peifer, 2012
	米国	53	全ゲノム, 全エクソン, 全RNA	変異 22 遺伝子, SOX2 遺伝子の増幅	Rudin, 2012
	日本	56	全RNA	KIAA1432 遺伝子増幅	Iwakawa, 2013

RET融合陽性肺癌 (1~2%)



RET融合蛋白質



ALK融合陽性肺癌 (3~4%)

ALK融合蛋白質



ROS1融合陽性肺癌 (1~2%)

ROS1融合蛋白質

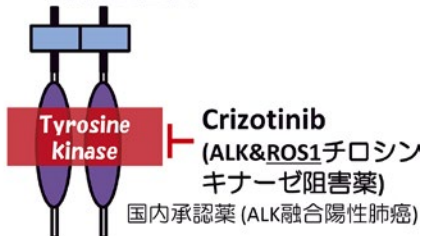


図2 遺伝子融合と各阻害薬を用いた治療.

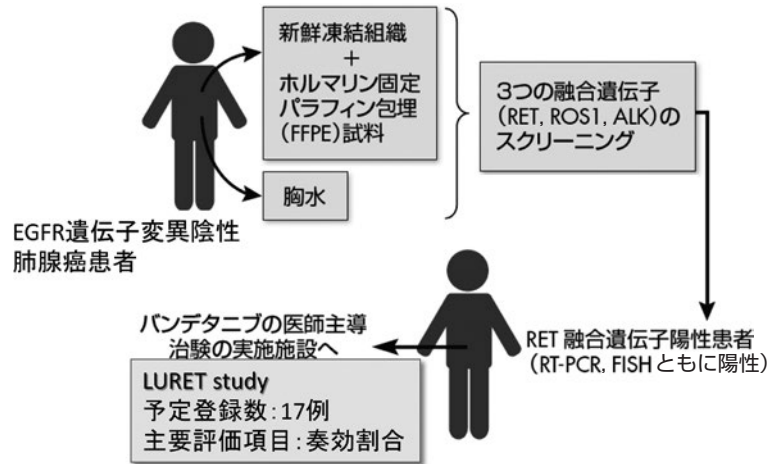


図3 RET遺伝子融合陽性肺癌患者スクリーニングと多施設共同第II相医師主導試験。

染色体異常の解析を起点として、上記 RET 遺伝子融合に加えて、ROS1 癌遺伝子の融合による活性化が非喫煙者女性を中心に肺腺癌の2%で生じていることを見いだした³⁾。ROS1 蛋白質のキナーゼドメインの構造は ALK 蛋白質と似ていることから、ALK蛋白質キナーゼ阻害薬である crizotinib が阻害効果をもつ (図2)⁴⁾。この結果等を受け、ROS1 遺伝子融合陽性肺癌患者に対する crizotinib の第 II 相試験が進められている。

その他のドライバー遺伝子異常としては、米国から NTRK1 癌遺伝子融合が発表されている⁵⁾。既知のドライバー遺伝子異常のない肺腺癌患者の3%にこの遺伝子融合が認められたとの報告であるが、米国の他のグループや日本を含めアジアのグループでの検討では検出されていないことから、頻度については3%よりも低い可能性が考えられる。

また、著者らやドイツのグループによって、高悪性度の肺腺癌である浸潤性粘液腺癌 (invasive mucinous adenocarcinoma: IMA) では、NRG1 遺伝子など複数の癌遺伝子の融合が生じていることが明らかになった⁶⁾⁷⁾。NRG1 遺伝子融合陽性の癌では、NRG1 融合蛋白質が HER2/ERBB2-HER3 蛋白質ダイマーを介した細胞内シグナル伝達を活性化していることから、HER2/ERBB2 阻害薬が効果を示す可能性があり、今後の臨床への応用が期待される。

2. 扁平上皮癌

扁平上皮癌は腺癌と比べてドライバー遺伝子異常の解明が進んでおらず、現在我が国で承認されている分子標

的治療薬のうち肺腺癌ほど有効なものはない。しかし2010年に FGFR1 遺伝子の増幅が扁平上皮癌の5~20%にみられ、*in vitro* で FGFR 阻害薬に感受性を示すことが報告されて以降、治療標的として FGFR 遺伝子群が注目されている⁸⁾。FGFR2 および FGFR3 遺伝子活性化変異や FGFR3 遺伝子融合が相次いで報告されており⁹⁾¹⁰⁾、頻度はいずれも3%程度と低いが FGFR 阻害薬での治療効果が期待される (表1)。現在、各国で FGFR 阻害薬の臨床試験が行われており、結果が待たれる。

3. 小細胞癌

小細胞肺癌に対してもゲノム解析は行われているが、TP53, RB1 といった癌抑制遺伝子の失活変異、MYC 癌遺伝子群の増幅が主体であり、治療標的となりやすいキナーゼ遺伝子の活性化異常は少ない (表1)。MYC 遺伝子増幅に対しては *in vitro* で Aurora B キナーゼ阻害薬が効果を示したという報告があり、今後の治療への応用が期待される¹¹⁾。また、ヒストンアセチル化酵素 CREBBP/CBP や E300 の機能失活変異も認められており、これらを標的とした治療開発も待たれる¹²⁾。

治療標的となる遺伝子異常の診断

治療選択のために、患者検体を用いて治療標的となりうる遺伝子異常を診断する臨床的シークエンスが国内外で開始されている。特に次世代シークエンサーは、同時に複数のドライバー遺伝子異常を高感度に診断する

表2 EGFR, ALK 分子標的治療薬に対する獲得耐性機序

耐性の原因	治療標的遺伝子				論文
	EGFR	頻度 (%)	ALK	頻度 (%)	
標的遺伝子の変化	2次変異 (T790M, L747S, T854A, L747S)	50~60	2次変異 (L1196M, L1152R, C1156Y, G1202R, S1206Y, G1269A, 1151Tins)	22~36	Pao, 2005; Balak, 2006; Bean, 2008; Choi, 2010; Sasaki, 2011
	増幅	8	増幅	7~18	Sequist, 2008; Doebele, 2012
他遺伝子の変化	BRAF 変異 (G469A, V600E)	1	EGFR 活性化	44	Ohashi, 2012; Sasaki, 2011; Katayama, 2012
	CRKL, HER2, HER3, MET 増幅	20~30	KIT 増幅	15	Cheug, 2012; Takezawa, 2012; Zhou, 2006; Engelman, 2007; Katayama, 2012
	IKB, HGF 過剰発現	50~60			Bivona, 2011; Yano, 2008
その他の変化	上皮間葉転移	3~14			Thomson, 2005
	小細胞肺癌への形質転換	2~14			Zakowski, 2006

ことを可能にすることから、期待度が高い。いくつかの機関や Foundation Medicine 社などの検査企業でクリニカルシーケンスが開始され稼働中であり、患者検体を用いた遺伝子の変異・融合・増幅などの検出が行われ、治験薬や承認薬の投与の参考にされている¹³⁾。

ここでは国立がん研究センターが共同研究として（以下1）もしくは施設内（2）で実施している2つの取り組みについて紹介する。

1. LC-SCRUM-Japan (Lung Cancer Genome Screening Project for Individualized Medicine in Japan)

RET 遺伝子融合や ALK 遺伝子融合、ROS1 遺伝子融合、BRAF 遺伝子活性化変異といった、頻度が1~3%と低いドライバー遺伝子異常を効率的に見つけるために構築された遺伝子検査システムである（図3）。全国150以上の参加施設から、EGFR 遺伝子変異陰性の肺腺癌患者を対象として検体を収集しクリニカルシーケンスを施行している。

解析方法として RT-PCR 検査を行うため、組織検体は凍結保存、胸水などの液状検体は4℃で保存され、検査企業に提供される。検体からRNAを抽出し、RT-PCR検査を行い、陽性例については同時に提供されるホルマリン固定パラフィン包埋切片（胸水ではセルブロックを作製）を用いて FISH による確定検査が行われる。

RET 遺伝子融合陽性が確定した症例は適格条件を満たせば vandetanib の第II相試験への登録を行っている。この試験は医師主導治験という形で行われており、LURET 試験（Lung Cancer with RET rearrangement study）と

名づけられている。Vandetanib は、RET 遺伝子の点変異が高率に生じる甲状腺癌の治療薬として米国 FDA で承認を受けており、RET 遺伝子融合陽性肺癌患者に対しても治療効果が期待されている。RET 遺伝子融合以外にも、次世代シーケンサーで BRAF 遺伝子変異等の解析も行っており、BRAF 阻害薬の治験へと試みは拡大している¹⁴⁾¹⁵⁾。

2. NCC オンコパネル解析

LC-SCRUM は国内初の大規模なクリニカルシーケンスであるが、凍結検体を必要とする点など今後広く臨床に応用していくにあたっては検討を要する部分もある。凍結検体は良質な RNA を得るため必要であるが、日常診療では検体の保存はホルマリン固定パラフィン包埋で行われている。国立がん研究センターでは、ホルマリン固定パラフィン包埋標本から抽出したゲノム DNA を用いて、約100個の癌関連遺伝子の変異・融合・増幅の検出を進めている。

進行・再発固形腫瘍患者のホルマリン固定パラフィン包埋検体から DNA を抽出し、100個の癌関連遺伝子のゲノム領域をゲノムキャプチャー法で濃縮し、次世代シーケンサーでシーケンスデータを得ている。シーケンスの結果、治療効果と関連するような遺伝子異常を認めた場合は、承認薬があれば対応する分子標的治療薬を、ない場合はより効果が期待できる治験への参加など、数多くの治療標的遺伝子異常に対する個別化治療をより幅広く進めることを目指している。

分子標的治療薬の耐性の研究

遺伝子異常を標的とした分子標的治療薬による治療についてこれまで述べてきたが、分子標的薬に対して最初は奏効しても、奏効期間には差があるもののいずれは必ず耐性を獲得してしまう。この耐性の克服は分子標的治療の最大の課題である。

これまで、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬や ALK キナーゼ阻害薬について、数々の耐性機序が報告されてきている (表 2)¹⁶⁾¹⁷⁾ が、未解明の部分も残る。

米国のグループは EGFR チロシンキナーゼ阻害薬感受性細胞株と耐性細胞株を、全ゲノムシーケンスまたは全エクソームシーケンスすることで、複数の領域で各耐性株に共通するコピー数変化があることを報告しており¹⁸⁾、今後、次世代シーケンサーを用いたさらなる網羅的解析によって新たな耐性機序が明らかにされるかもしれない。

おわりに

本稿では肺癌のゲノム解析による個別化治療の現状と今後の展望について紹介した。治療標的となる遺伝子異常について、頻度の低いものでも効率的に検出して治療に結びつけられる体制づくりが個別化治療の拡大に必須であると思われる。また、ドライバー遺伝子異常陰性の肺腺癌や扁平上皮癌に関しては、BRG1/SMARCA4 遺伝子の欠損がみられ、これらの癌を特異的に殺傷するような合成致死治療法の提案が、著者らを含め相次いで報告されている。今後は、活性化癌遺伝子の阻害だけでなく、より広い観点での治療法の開発が行われていくことを期待したい¹⁹⁾²⁰⁾。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：河野 隆志；研究費・助成金 (第一三共製薬)。他は本論文発表内容に関して特に申告なし。

引用文献

- 1) Kohno T, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2012; 18: 375-7.
- 2) Tsuta K, et al. RET-rearranged non-small-cell lung carcinoma: a clinicopathological and molecular analysis. *Br J Cancer* 2014; 110: 1571-8.
- 3) Takeuchi K, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012; 18: 378-81.
- 4) Awad MM, et al. Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. *N Engl J Med* 2013; 368: 2395-401.
- 5) Vaishnavi A, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med* 2013; 19: 1469-72.
- 6) Fernandez-Cuesta L, et al. CD74-NRG1 fusions in lung adenocarcinoma. *Cancer Discov* 2014; 4: 415-22.
- 7) Nakaoku T, et al. Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 3087-93.
- 8) Weiss J, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med* 2010; 2: 62ra93.
- 9) Liao RG, et al. Inhibitor-sensitive FGFR2 and FGFR3 mutations in lung squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2013; 73: 5195-205.
- 10) Kim Y, et al. Integrative and comparative genomic analysis of lung squamous cell carcinomas in East Asian patients. *J Clin Oncol* 2014; 32: 121-8.
- 11) Peifer M, et al. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat Genet* 2012; 44: 1104-10.
- 12) Sos ML, et al. A framework for identification of actionable cancer genome dependencies in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 17034-9.
- 13) Frampton GM, et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat Biotech* 2014; 31: 1023-31.
- 14) Kohno T, et al. RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy. *Cancer Sci* 2013; 104: 1396-400.
- 15) Kohno T, et al. RET and other genes: therapeutic targets in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer Manage* 2014; 3: 219-26.
- 16) Curtis R Chong et al. The quest to overcome resis-

- tance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat Med* 2013; 19: 1389–400.
- 17) Justin F, et al. Emerging Paradigms in the Development to Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3987–96.
- 18) Peilin J, et al. Next-generation sequencing of paired tyrosine kinase inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutant lung cancer cell lines identifies spectrum of DNA changes associated with drug resistance. *Genome Res* 2013; 23: 1434–45.
- 19) Oike T, et al. A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. *Cancer Res* 2013; 73: 5508–18.
- 20) Hoffman GR, et al. Functional epigenetics approach identifies BRM/SMARCA2 as a critical synthetic lethal target in BRG1-deficient cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 3128–33.

Abstract

Next-generation sequencer-based lung cancer genomics and its translation to precision medicine

Kuniko Sunami^{ab} and Takashi Kohno^a

^aDivision of Genome Biology, National Cancer Center Research Institute

^bDepartment of Thoracic Oncology, National Cancer Center Hospital

Identification of druggable oncogene aberrations driving lung carcinogenesis has facilitated personalized therapy of lung cancer. The identification has been achieved by recent progress of large-scale genome analysis technologies. Notably, oncogenic RET, NRTK1, and NRG1 fusions were identified as novel therapeutic targets in lung adenocarcinoma by next-generation sequencer-based genome/transcriptome analyses. A nationwide genomic screening system was established in Japan for developing personalized therapy of advanced non-small cell lung cancer with RET fusion. In this chapter, we describe the current challenge in developing personalized therapy of lung cancer.