癌との闘いにシーケンスは強力な武器

最先端の科学を用いて癌患者の新たな治療標的を同定する間野博行教授をインタビュー

はじめに

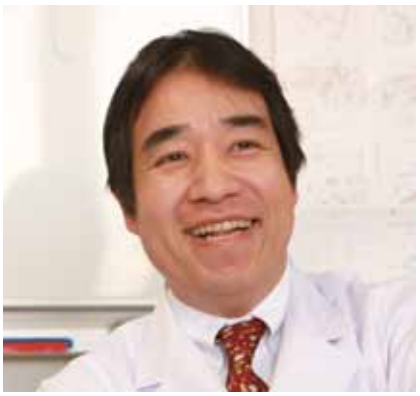
20年ほど前、間野博行先生が研修医として最初に担当した患者さんは、予後不良の急性骨髄性白血病の方でした。治療抵抗性が予測されたので、その患者さんには最初から大量の抗癌剤が投与されました。約6ヵ月間の強力な化学療法の後、患者さんは亡くなってしまいましたが、その理由は白血病そのものではなく抗癌剤の副作用によるものだったのです。最終的に患者さんを死に追いやったのは、薬剤に起因する免疫防御の低下により生じた真菌感染でした。この経験に衝撃を受けた間野先生は、発癌原因分子を標的とする、より論理的で有効な、そして洗練された方法があるはずだという強い信念を持ちました。この考え方がその後の間野先生の進路を決定づけ、癌患者により良い治療を提供するためのツールとして次世代シーケンサーを利用するに至ったのです。間野先生は発癌メカニズムの解明とそれを利用した新しい癌治療法開発をテーマとして癌研究を始めました。現在、東京大学特任教授・自治医科大学教授となった間野先生は、この領域で大きな成功を収め、肺癌発症に関与する重要な癌遺伝子を発見し、さらに新たな発癌原因の同定を目指した癌ゲノム変異のスクリーニングを進めています。

間野先生は白血病患者の治療経験から血液内科を専攻することになり、急性骨髄性白血病を研究対象に選びました。その研究をとおして、免疫系の発達に重要なTECチロシンキナーゼなど多くの遺伝子を発見することができました。しかし学術的にも高く評価され多数の論文を発表したものの、当初の研究目的であった「癌医療の役に立つ発見を目指す」ということはまだ達成されていないと感じていたのです。間野先生は「私のそれまでの発見は患者さんの治癒に役立っておらず、また、癌の早期発見をもたらすものでもありませんでした。そこで、私は教授になったとき、患者さんの生命に直接役立つ研究を新たに開始し、今後の研究対象をトランスレーショナル医療に専念しようと決めたのです」と振り返っています。

間野先生は熟考の後、より有効な癌治療を開発するためには、疾患の直接的原因となる増殖促進分子を同定することがなによりも重要であると考えるにいたりました。しかし当時は、増殖を促進する遺伝子変異を癌臨床検体から直接スクリーニングするための効果的な手法は存在していませんでした。そこで間野先生は、臨床癌検体から単離される微量のcDNAを基にレトロウイルス発現ライブラリーを構築する高感度な機能スクリーニングシステムを開発しました。本手法を、線維芽細胞を用いる形質転換アッセイと組み合わせることで、発癌原因cDNAを組み込んだウイルス粒子を同定することができるのです。原理的に、このシステムは癌種にかかわらず発癌変異のスクリーニングに利用可能です。

肺癌研究の大きなブレイクスルー

この機能スクリーニングアッセイ法を用いて、間野先生は肺癌医療を大きく変える発見となった、EML4（echinoderm microtubule-associated protein-like 4）-ALK（anaplastic lymphoma kinase）という重要な融合型癌遺伝子を同定しました。ヒト2番染色体短腕内の小さな逆位により生じるEML4-ALKは、チロシンキナーゼをコードし、非小細胞肺癌の4～5%に認められます。EML4-ALKをトランスジェニックマウスの肺胞上皮細胞に発現させると、生後すぐに数百もの肺癌腫瘤が現れました。間野先生は「通常、癌遺伝子のトランスジェニックモデル系では生後3～6ヵ月で癌が認められますが、EML4-ALK癌遺伝子は非常に強力なので、出生時点で既に無数の肺癌腫瘤が認められたのです」と述べています。この結果から、EML4-ALK遺伝子が肺癌発症に必須の増殖促進分子であることが示唆されました。



間野博行教授
（東京大学特任教授・自治医科大学教授）

融合遺伝子は、染色体転座により、元は離れていた2つの遺伝子が互いに近接することで生じますが、生じた融合遺伝子が、もともとの2つの遺伝子のいずれとも大きく異なる活性をもつことがあります。融合遺型癌遺伝子は、造血器悪性腫瘍、肉腫、前立腺癌など、様々な癌の発症に関与されるといわれており、EML4-ALKの場合、遺伝子産物は恒常的に活性化されたチロシンキナーゼでした。

EML4-ALKによりコードされるキナーゼが治療標的となりうるかを評価するため、間野先生は作製したトランスジェニックマウスにALKキナーゼの特異的阻害薬を投与しました。すると、腫瘍が肺から急速に消失し、EML4-ALKが有望な治療標的であることが証明されたのです。多くの製薬会社がこのキナーゼ活性を標的とする化合物の開発を開始しており、現在、その一部はすでに臨床試験で優れた結果を示し、また米国では薬剤として認可を受けたもの（クリゾチニブ）もあります。

シーケンス解析による新規ALK変異の同定

さまざまなALK阻害剤の臨床試験で、EML4-ALK変異を有する癌患者において顕著な治療効果が確認されています。しかし残念ながら一部の症例は、腫瘍が治療に反応しなかったり、当初反応したが後に再発したりすることがあります。これらの薬剤耐性の原因機構をより詳細に解析するため、間野先生は次世代シーケンサーテクノロジーを利用しました。

AATGATAACAGTAACACACTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCATTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAGAGCTACCGTGCAACGACGAAAAGAATGATAACAGTAACACACTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAGAGCTACCGTGCAACGACGAAAAGAATGATAACAGTAACACACTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAGAGCTACCGTCTTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAGAGTCTGTTAACCTTAAGATTACTTGATCCACTGATTCAACGTACCGTAACGAACGTATCAATTGAGACTAAATATTAACGTACCATTAAGAGCTACCGTGCAACGAAAAGAATGATAACAG

間野先生らがNew England Journal of Medicineに発表した成果は、クリゾチニブ耐性となったEML4-ALK陽性肺癌患者を次世代シーケンサーによって解析した結果えられたものです。この患者さんはクリゾチニブ治療によって当初劇的な症状改善が得られましたが、5 ヵ月後、腫瘍が突然再増殖を始めました。間野先生は、腫瘍に生じた二次変異が薬剤耐性の原因ではないかと予想しました。そこでこの可能性について検討するため、イルミナの Genome Analyzer$_{IIx}$ を用いて治療前と再発後の腫瘍検体のcDNAをシーケンスしました。その結果、再発した腫瘍細胞にのみ2種類の付加変異がEML4-ALK遺伝子上に生じていることが判明しました。追加解析により、独立して生じたこれらの変異が実際にALK阻害剤に対して耐性をもたらしうることが証明されたのです。ALKキナーゼドメインの三次元モデリングにより、この変異が重要な構造変化を引き起こして阻害剤との結合能力を変化させると予想されました。こうして明らかになった薬剤耐性メカニズムを利用することで、耐性になりにくい新たな阻害剤開発が促進されると予想されます

シーケンスベースの癌スクリーニングシステム

非小細胞肺癌におけるEML4-ALK発見で大きな成果を挙げた間野先生は、今度は次世代シーケンサーを用いて、癌の種類にかかわらず癌遺伝子を同定するためのより一般的な手法を構築したいと考えました。シーケンスベースのシステムの構築に当たっては、小さな研究室でも行えること、また点突然変異とindelに加え、自身の専門である融合遺伝子も検出できることを第一に考慮しました。通常のエクソンキャプチャー手法は遺伝子内の点突然変異とindelは十分に検出できますが、融合遺伝子のキャプチャーは不可能です。なぜならば、遺伝子融合の多くがイントロン同士の結合で生じており、ゲノムDNAのエクソンキャプチャー手法ではエクソンをターゲットとしているためイントロン情報は失われるからです。そこで間野先生は、点突然変異・indelだけでなく融合遺伝子も検出するべくcDNAキャプチャー法を開発しました。cDNAを基質としてカスタムRNAプローブでキャプチャーし、そこで得られた配列データを用いてRefSeqデータベースに対してリード配列の5’および3’末端をそれぞれ個別にマッピングさせることで、2つの異なる遺伝子にリード配列の両端がマップされる（融合遺伝子が生じたことを示すと考えられる）ものを突き止めることが可能です。進行中の研究について、間野先生は「他にいくつかの処理を行うことで、私たちは融合遺伝子を同定できるようになりました。現在は、このcDNAキャプチャーシーケンス手法を用いて、ヒトの様々な癌の大規模なスクリーニングを行っているところです」と述べています。

間野先生の次世代シーケンサーを用いた癌スクリーニングシステムでは、シーケンスのリード深度を非常に大きくすることも可能です。これは、腫瘍細胞集団内で低頻度に生じる変異を検出するためには重要なことです。間野先生は「従来のゲノムシーケンスは、検体中のほぼすべての細胞に変異が含まれるような場合は十分に変異を検出できます。しかし、乳癌や前立腺癌など正常細胞・炎症細胞が多く混ざっているような腫瘍では、検体中の癌細胞の割合はごく一部にすぎません」と説明しています。このように細胞集団内で低頻度に生じる変異を検出する場合、通常のシーケンス深度である30 ～ 40xでは不十分です。しかし、間野先生のcDNAキャプチャー法では、遺伝子の発現レベルに応じて10,000x、あるいはそれ以上にも及ぶリード深度が得られます。「発現が中程度の遺伝子であれば、一般的にはリード深度1,000xで、少数の細胞の遺伝子変異を検出するのに必要な感度が得られます」と間野先生は説明します。

「今の時代、イルミナの次世代シーケンサーはペンやパソコンのようなものです。それがなければ我々の仕事はやって行けません。次世代シーケンサーは私たちの研究に大いに役立っています。」

間野先生にとって、癌の進行を引き起こす遺伝子異常を解明するアプローチは、ディープシーケンスにより一変しました。間野先生はその体験を「今の時代、イルミナの次世代シーケンサーはペンやパソコンのようなものです。それがなければ我々の仕事はやって行けません。次世代シーケンサーは私たちの研究に大いに役立っています。大規模なシーケンスプロジェクトを、手頃な時間と予算で実行できるようになったのです」と語っています。分子標的療法のためのより良いアプローチを開発しようという終わりのない目的に向けて、間野先生は絶えず最先端の科学に適応し、癌患者の最も差し迫った必要性に応えようとしてきました。間野先生は次世代シーケンサーを用いることで強力な新しい手法の開発を進め、癌を引き起こす変異を同定し、患者を診断しそして最終的にはより良い治療へ向けた道を切り開こうとしています。

イルミナ株式会社

〒108-0014
東京都港区芝5-36-7　三田ベルジュビル22階
Tel (03)4578-2800　Fax (03)4578-2810
www.illuminakk.co.jp

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illumina*Dx*, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAIIx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は Illumina, Inc の商標または登録商標です。
その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。予告なしに仕様を変更する場合があります。

Pub. No. 070-2011-J013 28SEP11

illumina®