平成２０年１０月１５日

科学技術振興機構（ＪＳＴ）
Tel：03-5214-8404（広報課）

東京大学　医学部附属病院
Tel：03-5800-9188（パブリック・リレーションセンター）

神経芽腫の原因遺伝子変異を発見
（難治性小児腫瘍に対する治療薬開発に手がかり）

ＪＳＴ基礎研究事業の一環として、東京大学医学部附属病院の小川 誠司 特任准教授（キャンサーボード）および同院　滝田 順子 講師（小児科・無菌治療部）らは、「ALK 遺伝子注１）」と呼ばれる細胞の増殖を司る酵素の遺伝子（チロシンキナーゼ注２）をコードする遺伝子）の異常が小児の難治性腫瘍、神経芽腫の原因の１つとなっていることを突き止めました。

神経芽腫は小児で最も頻度の高い固形腫瘍の１つですが、その多くを占める進行期神経芽腫は、さまざまな治療法に対して難治性です。骨髄移植を含む強力な治療を行っても、救命できるのは患児の４割にも達しません。仮に治癒したとしても、強力な抗がん剤による長期的な副作用は大きな問題です。一方、このような進行期神経芽腫の原因としては、従来 MYCN という遺伝子の増幅が神経芽腫の一部で認められていましたが、MYCN そのものには酵素活性がなく、この分子を標的とした阻害剤の開発は困難でした。他方、MYCN の発見以来、本疾患について有効な治療に結びつく可能性のある原因遺伝子の解明は進んでいませんでした。

本研究グループは、「SNP アレイ注３）」と呼ばれる解析装置を用いてがんゲノムの異常を高精度に検出する技術を開発し、この技術で２００例以上の神経芽腫のゲノム異常を詳細に解析しました。その結果、神経芽腫の約１０％の症例で、ALK 遺伝子に異常が生じていることを見いだしました。これらの神経芽腫では ALK の酵素の機能が過剰に働くことが細胞のがん化につながっていると考えられます。つまり今回の発見は、ALK の酵素活性を抑える薬剤が、難治性神経芽腫に対して有効で副作用の少ない特効薬となる可能性を持つことを示唆しています。また、こうしたゲノム解析の手法を用いた研究は、他のがんの原因遺伝子の解明にも有用であると思われます。

本研究成果は、群馬県立小児医療センター、千葉県立がんセンター、自治医科大学、埼玉県立小児医療センターの協力によって得られ、２００８年１０月１６日（英国時間）に英国科学雑誌「Nature」のオンライン速報版で公開されます。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。
戦略的創造研究推進事業 チーム型研究（ＣＲＥＳＴ）
研究領域：「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」
（研究総括：笹月 健彦　国立国際医療センター　名誉総長）
研究課題名：Whole Genome Association 解析による GVHD の原因遺伝子の探索
研究代表者：小川 誠司（東京大学 医学部附属病院　キャンサーボード／文部科学省特別教育研究推進経費（「がんの大規模ゲノミクスによるオーダーメイドがん診療技術の開発」）　特任准教授）
研究期間：平成１６年１０月～平成２２年３月
ＪＳＴはこの領域で、ゲノム情報を活用した創薬・個々人の体質に合った疾病の予防と治療―テーラーメイド医療―の実現を目指し、その基盤となる研究に取り組んでいます。上記研究課題では、疾

＜研究の背景と経緯＞

神経芽腫（神経芽細胞腫）は神経を作るもとになる細胞ががん化する病気です。子供の代表的ながんの１つで、日本でも年間約１０００人の子供たちが、このがんに罹患します。神経芽腫の一部は無治療のまま自然に退縮して消失することが知られていますが、症例の３割を占める進行期の神経芽腫は、種々の化学療法剤（抗がん剤）に抵抗性を示し、骨髄移植のような強力な治療を行っても最終的に救命できるのは患児の４割未満です。また、たとえ強力な抗がん剤による治療で治癒に至ったとしても、抗がん剤が発達途上にある子供たちに及ぼす長期的な副作用は大変深刻です。

近年、がんの原因となっている分子に直接作用してその働きを抑える薬剤を投与することにより、劇的な治療効果が得られる場合があることが明らかになってきました。例えば、肺がんの一部では上皮成長因子受容体（EGF受容体）[注4)]の遺伝子に異常が生じ、その機能の異常な亢進が認められますが、EGF受容体の機能を抑さえるイレッサ[注5)]という薬剤がこれらの異常を有する肺がんに有効であることが示されています。また、慢性骨髄性白血病[(注6)]の特効薬ともいえるグリベックという薬剤は、この疾患の原因となっているBCR/ABLキナーゼという酵素の機能を抑えることを目的として開発されたものです。がんの原因となっている分子に直接働きかけることのできる薬剤は、分子標的治療薬と呼ばれ、その有効性は肺がんや慢性骨髄性白血病、乳がんで証明されています。神経芽腫についてはこれまで、このような分子標的治療薬を開発するために利用できる原因分子の同定がほとんど進んでおらず、神経芽腫の治療成績の改善を図るという観点から、そうした原因分子の同定が待たれていました。

＜研究の内容＞

本研究グループは、SNP アレイと呼ばれるマイクロアレイを用いて一試料あたり数十万個の SNP を同時に解析し、多数の試料について得られた膨大な SNP の情報を分析することにより、ヒトの疾患の原因となっている SNP を探索する研究を進めています。この研究を進める過程で、SNP アレイを用いてがん細胞のゲノムを詳細に解析することを可能にする技術・ソフトウェア「CNAG」（http://www.genome.umin.jp）を開発し、東京大学医学部附属病院が推進している「がんの大規模ゲノミクスによるオーダーメイドがん診療技術の開発」事業（武谷　雄二　病院長）、および同小児科（五十嵐　隆　教授・科長）と共同してさまざまながんゲノムの解析を進めています。

本共同研究チームは今回、この技術を用いて２３９例の神経芽腫のゲノムを解析し、２番染色体短腕に多くの神経芽腫で遺伝子数の増加を認める領域を発見しました（図１）。この領域には唯一 ALK キナーゼに対応する遺伝子があることから、神経芽腫では ALK キナーゼの遺伝子数が増加することにより、その機能が過剰になっていることが推定されました。

さらに、神経芽腫における ALK 遺伝子の塩基配列の解析から以下の①から⑥を実験的に示すことによって、突然変異によって生じた過剰な機能を有する ALK 遺伝子が神経芽腫の発症の原因の１つとなっていることを明らかにしました。

① 神経芽腫の約６％の症例では、ALK 遺伝子の塩基配列が突然変異により異常をきたしていること（図２）。
② これらの遺伝子変異のほとんどは、進行期の神経芽腫に認められること。

③ これらの異常は、ALK の酵素としての活性に重要と考えられる部位に集中的に生じていること（図３）。
④ この異常によって、ALK キナーゼの酵素の働きが過剰となること（図４）。
⑤ 正常な ALK 遺伝子を細胞に導入してマウスに接種しても腫瘍はできないが、異常をきたした ALK 遺伝子を導入した細胞をマウスに接種すると腫瘍を形成すること（図５）。
⑥ ALK 遺伝子に異常を持った神経芽腫の細胞で異常な ALK 遺伝子の発現を抑制することにより、神経芽腫の細胞の増殖が抑制されること（図６）。

＜今後の展開＞

今回の研究によって、ALK の遺伝子変異が進行期神経芽腫の原因遺伝子の重要な原因の１つであることが明らかになりました。EGF 受容体キナーゼ阻害剤や ABL キナーゼ阻害剤が、これらのキナーゼの過剰活性を持つ肺がんや白血病に対して著しい効果を示すことから、ALK 阻害剤が開発されれば、ALK 変異を有する進行性神経芽腫に対する有効な治療薬剤となる可能性があります。ALK 遺伝子を破壊したマウスは正常に成長することから、ALK 阻害剤はヒトに重篤な副作用を引き起こさないのではないかと思われます。また、今回用いたゲノムのスクリーニング系を他のがんに応用することで、別のがんでも新たながん遺伝子を発見することが期待されます。

＜付記＞

本研究は、群馬県立小児医療センターの林 泰秀 院長、千葉県がんセンターの中川原 章 研究局長、自治医科大学の間野 博行 教授、埼玉県立小児医療センター研究チームの協力を得て行われました。

＜参考図＞

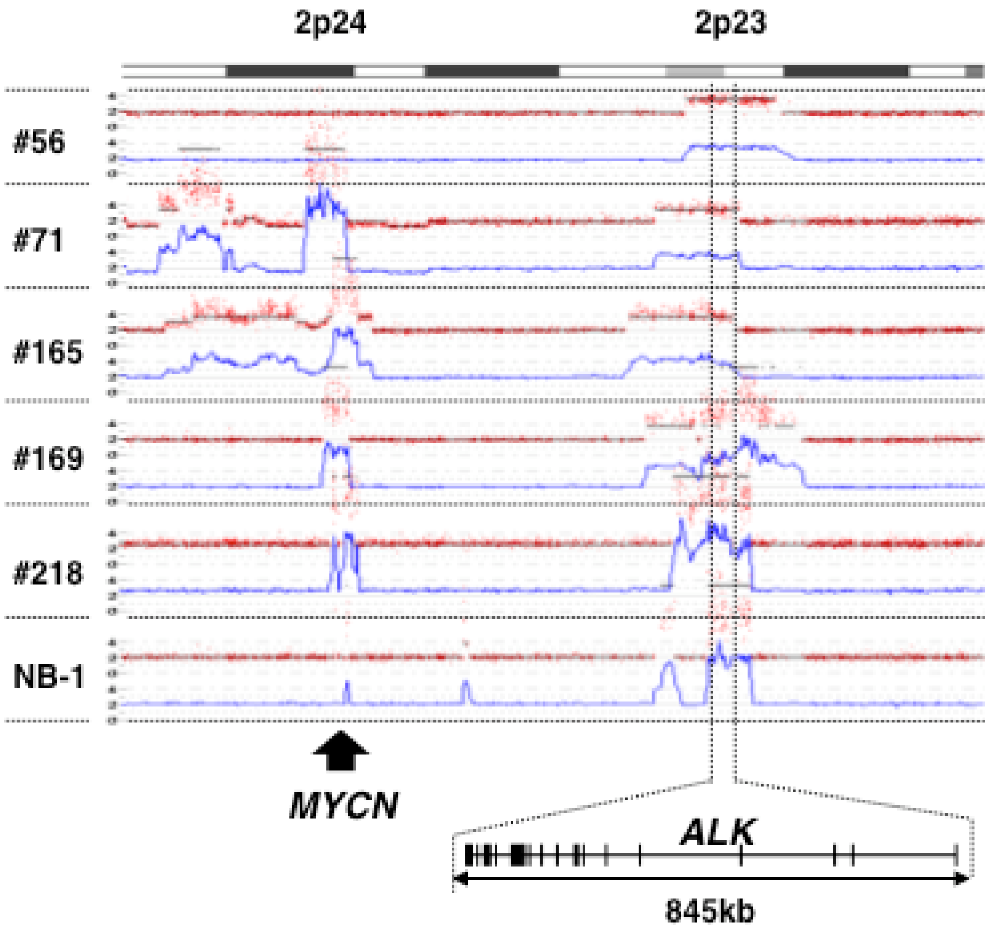

図１　ゲノム解析による ALK 遺伝子増幅の検出

神経芽腫のゲノムを、SNP アレイを用いて解析することにより、複数の神経芽腫で共通に遺伝子数の増加を認める８４万５０００塩基からなる領域を同定したところ、この領域に含まれる唯一の遺伝子として ALK キナーゼ遺伝子が見いだされました。このため、同遺伝子が神経芽腫の原因遺伝子である可能性が示唆されました。図で赤い点の一つひとつは SNP アレイによる遺伝子の数の計測値を表しますが、これらの点が高くなっている部分では遺伝子数が増加していることを示しています。ちなみに、ALK の左の方に認められるのは、以前から神経芽腫の原因遺伝子として知られていた MYCN と呼ばれる遺伝子の場所に相当する領域です。

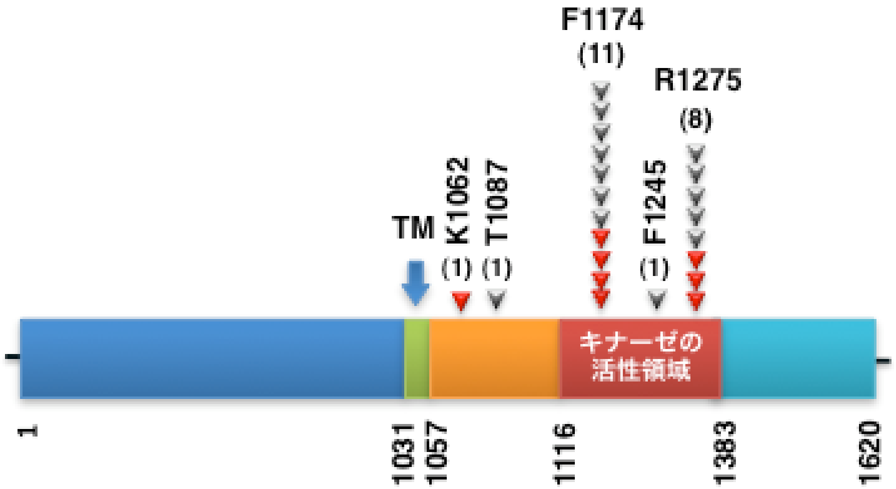

図２　ALK キナーゼの構造と神経芽腫で認められた変異部位の分布

ALK キナーゼは細胞膜にある受容体型チロシンキナーゼと呼ばれるたんぱく質の１つです。細胞膜に埋まっている TM(細胞膜貫通領域)で示した部分より右側の部分が細胞の内側にあって、キナーゼの活性領域にキナーゼの酵素としての作用を担う部分があります。神経芽腫で認められた変異一つひとつの場所を逆三角のマークで示していますが、変異はキナーゼの活性を担う部分のなかの２ヵ所に集中して起こっていることが分かりました。数字は ALK キナーゼの先頭のアミノ酸から数えた変異しているアミノ酸の場所を示しています。

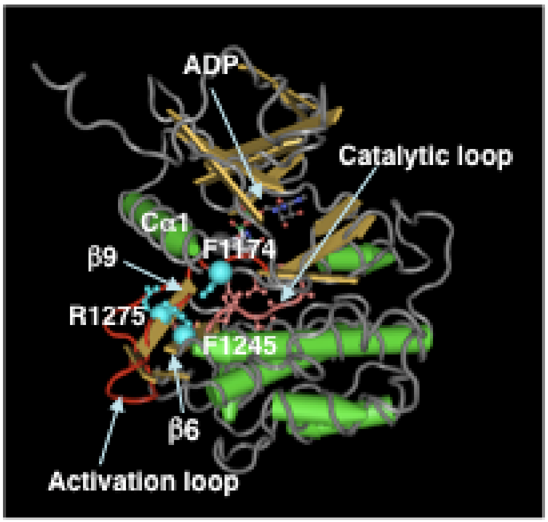

図３　ALK の立体構造予測と神経芽腫における変異したアミノ酸の位置

ALK キナーゼの立体構造の推定に基づくと、キナーゼの活性領域に集中して認められる変異（F1174、R1275）は、立体構造上は近接した位置を占めていますが、この部分はキナーゼの活性にとって重要な場所であるとことが知られています。

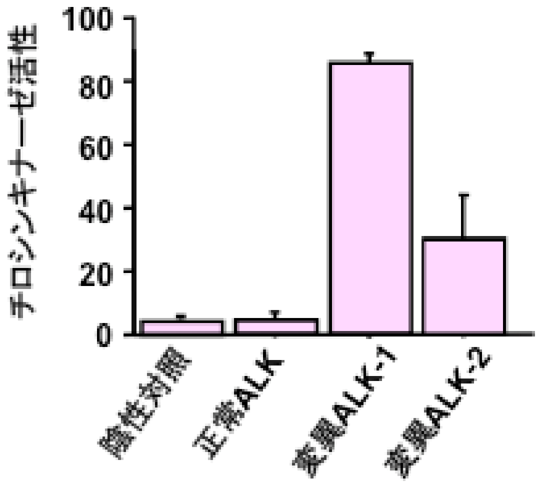

図４　変異 ALK キナーゼの酵素活性の上昇

このグラフは正常 ALK キナーゼと神経芽腫に認められた２種類の変異 ALK キナーゼを細胞に発現させた後に､そのキナーゼの酵素としての活性を測定した結果を示したものです。変異 ALK キナーゼでは、正常 ALK に比較して過剰なキナーゼの活性を認めることが分かりました。

図５　変異 ALK の導入による造腫瘍性の解析

正常 ALK キナーゼと神経芽腫に認められた２種類の変異 ALK キナーゼを NIH3T3 というマウス細胞に人工的に導入した後に、マウスの皮下に６ヵ所接種して腫瘍の形成が起こるかどうかを調べました。正常 ALK を導入した細胞を接種してもマウスに腫瘍は形成されませんが、異常 ALK を導入した細胞を接種した場合、いずれの変異 ALK においても、接種箇所全てにおいて腫瘍の形成が認められました。一方、正常の ALK を導入した細胞では１ヵ所も腫瘍の形成は認められませんでした。このことから、異常 ALK キナーゼは細胞をがん化する能力を持っていることが示唆されます。

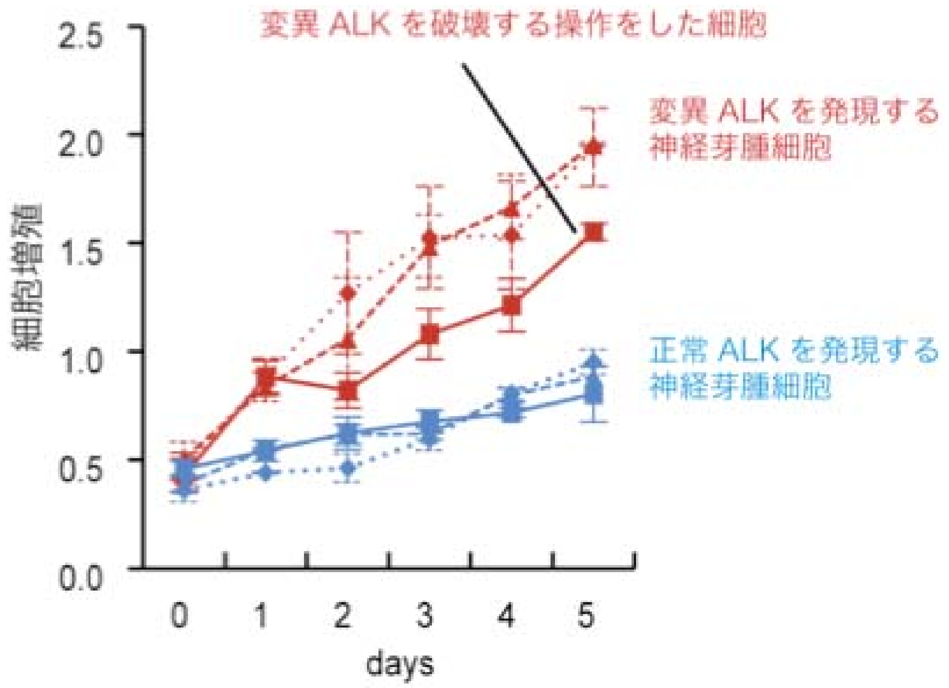

図６　変異 ALK キナーゼの破壊による神経芽腫細胞の増殖の抑制

変異ALK遺伝子を持った神経芽腫の細胞に、ALK遺伝子特異的なsiRNAを導入することによって変異ALK遺伝子の発現を抑制した状態で、神経芽腫細胞の増殖を検討しました。未処理の細胞や非特異的なsiRNAを導入した細胞では、変異ALKの発現は変化しないと考えられますが、これらの細胞と比較して、ALK遺伝子特異的なsiRNAを導入して変異ALKの発現を抑制した細胞では、明らかに細胞の増殖が抑制されました。このことから、この神経芽腫の細胞の増殖が変異ALKキナーゼの発現に依存していることが分かりました。

＜用語解説＞

注１）ALK遺伝子

ALK遺伝子は当初、anaplastic large cell lymphomaと呼ばれる悪性リンパ腫の一種において、NPM遺伝子と融合してNPM-ALKがん遺伝子を作る遺伝子として発見されました。ALKたんぱくはEGFRと同様に、細胞膜貫通ドメインを１つだけ持ち、細胞内領域にはチロシンキナーゼドメインがあります。細胞外ドメインで何らかの成長因子と結合すると予想されていますが、生理的な結合因子はまだ不明です。ALKはNPM-ALK以外にもある種の肺がんに見られるEML4-ALK融合遺伝子をはじめとして、悪性リンパ腫や一部の稀な腫瘍で、細胞内キナーゼドメインが他のパートナーと融合して活性型がん遺伝子となることが報告されています。

注２）チロシンキナーゼ

たんぱく質はいくつかのアミノ酸が結合してできていますが、このうちチロシンと呼ばれるアミノ酸をリン酸化・修飾する酵素です。キナーゼにはその他、基質たんぱく質のセリン、トレオニン残基などをリン酸化するものが知られています。たんぱく質リン酸化の特徴は、生体中でのリン酸の付加と脱離が比較的容易に行える点であり、この点を活かして生理機能などの調節が行われます。また、しばしば複数のキナーゼが順に働き、シグナルを伝達することがあります。なお、脱リン酸化反応を司る酵素として、たんぱく質フォスファターゼが知られています。

注３）SNP アレイ

SNPは一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism)を略したものです。個人によって異なるヒトゲノムの配列は多型と呼ばれますが､SNPはヒトゲノムの多型の中で最も普通に認められる多型です｡SNPはある程度共通に認められるものに限っても１０００万個以上あることが知られていますが、こうしたSNPを解析することによって、個々人における病気のかかりやすさなどを予測することができるようになります。国際HapMap計画は、このSNPのカタログを作ることによって､SNPの研究基盤を構築する一大プロジェクトです。近年のゲノム解析の技術の格段の進歩によって、マイクロアレイと呼ばれる微小なチップを用いて１回の解析で百万個以上のSNPを解析することができるようになりました。こうしたチップはSNPアレイと呼ばれますが、その測定原理からSNPだけではなく、がんのゲノムに生じているゲノムのコピー数を解析することができます。正常のゲノムではどの遺伝子も通常２コピーですが、がんのゲノムでは、しばしばコピー数に変化が生じます。これががんの重要な原因となっていることから、ゲノムのどの部分が変化を起こしているかを調べることによって、がんの原因となっている遺伝子を見いだすことができます。私たちは、CRESTの一連の研究を通じて､がんゲノムのSNPアレイ解析から得られるデータを用いてがんゲノムにおけるコピー数の変化を高精度に解析することを可能にするソフトウェアを開発しました。これは現在世界的にも汎用されているプログラムの一つですが、今回の研究はこの解析技術を用いて神経芽細胞腫のゲノムを解析することによって得られた研究成果です。

注４）上皮成長因子受容体（EGF受容体）

皮膚など上皮系の細胞に働いて細胞増殖を促すたんぱくを上皮成長因子と言いますが、

その細胞側の受容体がEGFRです。EGFRたんぱくは細胞内領域にチロシンキナーゼ酵素活性（基質たんぱくのチロシン残基をリン酸化する）を有しており、上皮成長因子が結合するとそのキナーゼ活性が誘導されます。一部の肺がん症例において、EGFRの遺伝子異常が見つかりました。これら異常はEGFRたんぱくのキナーゼ活性を亢進させ、上皮成長因子が結合していない状態でもEGFR酵素活性を上昇させて肺がん発症を誘導するとされています。

注５）イレッサ

　一般名はgefitinib。EGFR選択的にそのチロシンキナーゼ活性を阻害する薬剤として開発され、市販されています（アストラゼネカ株式会社）。EGFR変異を有する肺がんに有効ですが、不用意に用いると重篤な間質性肺炎を生じることが知られています。

注６）慢性骨髄性白血病

　染色体転座の結果、BCR という遺伝子と ABL という遺伝子が融合した BCR-ABL がん遺伝子が作られた結果生じる白血病の一種です。ABL たんぱくはチロシンキナーゼですが、BCR と融合することで活性化されがん遺伝子となります。

＜論文名＞

“Novel oncogenic mutation of ALk kinase in advanced neuroblastoma”

（進行神経芽腫における ALK キナーゼの新規遺伝子変異）

＜お問い合わせ先＞

＜研究に関すること＞

小川 誠司（オガワ セイシ）

東京大学医学部附属病院　キャンサーボード／文部科学省特別教育研究推進経費(｢がんの大規模ゲノミクスによるオーダーメイドがん診療技術の開発｣)　特任准教授

※取材申し込みなどにつきましては、下記＜報道担当＞の東京大学医学部附属病院　パブリック・リレーションセンターまでお願いします。

＜ＪＳＴの事業に関すること＞

瀬谷 元秀（セヤ モトヒデ）

科学技術振興機構　戦略的創造事業本部 研究領域総合運営部

〒102-0075 東京都千代田区三番町５ 三番町ビル

Tel: 03-3512-3524　Fax: 03-3222-2064

E-mail：crest@jst.go.jp

＜報道担当＞

科学技術振興機構　広報・ポータル部 広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町５番地３

Tel：03-5214-8404　Fax：03-5214-8432

E-mail：jstkoho@jst.go.jp

東京大学医学部附属病院　パブリック・リレーションセンター

Tel：03-5800-9188　Fax:03-5800-9193

E-mail：pr@adm.h.u-tokyo.ac.jp