

主論文の要旨

**Anaplastic lymphoma kinase expression in
small-cell lung cancer**

〔 ALK 免疫染色陽性小細胞肺癌の臨床病理学的検討 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：橋本 直純 准教授)

近藤 千晶

【目的】

Anaplastic lymphoma kinase (ALK)は未分化大細胞リンパ腫において発見された分子であるが、肺癌においては Echinoderm microtubule-associated protein like-4 (EML4)-ALK 融合遺伝子として同定された。EML4-ALK 融合遺伝子は主に肺腺癌で検出されるドライバー遺伝子であり、ALK 阻害薬のターゲットとなることが明らかになった。EML4-ALK の検出法は、免疫染色(IHC)でスクリーニングした後、Fluorescence in situ hybridization (FISH)を施行して確認する方法が行われていた。非小細胞肺癌では IHC と FISH の一致率は高く不一致例も解析が進んだため、近年 IHC は FISH に並ぶ手段となり、確実な陽性例では IHC の結果のみで ALK 阻害剤の適応を判定することが可能となった。一方小細胞肺癌においては、ALK 蛋白が発現していることは知られていたが、その詳細については定説がない状態である。小細胞癌は組織の挫滅等で診断が困難であることが多く、ALK IHC のみで患者選択が可能となったことから、組織型が不明瞭であった場合、誤った ALK 阻害剤患者選択の可能性が生じることとなった。そこで本研究では、ALK IHC 陽性小細胞肺癌に関し、発現メカニズムや分子標的治療への応用について検討した。

【方法】

愛知県がんセンター中央病院で小細胞肺癌と診断された 142 例を対象とした。小細胞肺癌以外の神経内分泌腫瘍として、神経内分泌大細胞癌(LCNEC)41 例、カルチノイド腫瘍 11 例について検討した。ALK IHC は抗 5A4 抗体を用いた。ALK 蛋白の肺での発現メカニズムについては、融合遺伝子の他、コピー数増加・遺伝子増幅、遺伝子変異が知られており、FISH もしくは cycleave 法を施行し、増幅、変異の有無を検討した。ALK IHC 陽性小細胞肺癌株 SKLC2 細胞、EML4-ALK 陽性肺腺癌細胞株 H2228 細胞、肺腺癌細胞株 A549 細胞を用いて MTT assay を行い、ALK 阻害薬である Crizotinib の効果を検討し、ED50 を求めた。ALK の発現量を知るために行った比較定量 RT-PCR では Exon4-5 と Exon24-25 に対するプライマーを設計し TaqMan RT-PCR を行った。統計学的には Fisher 正確検定を行い $p < 0.05$ を有意とし、予後解析では Kaplan-Meier 法、ログランク検定を用いた。

【結果】

(1) ALK IHC 陽性小細胞肺癌の臨床病理学的特徴

142 例中 16 例(11.3%)で ALK IHC 陽性であった。性別、年齢、喫煙歴、組織型(小細胞癌 vs 混合型小細胞癌)に関して陽性例と陰性例の群間差はなかった。全例で細胞質に陽性であり陽性腫瘍細胞は部分的で、陽性細胞の染色強度は 1+もしくは 2+で腫瘍内不均一性がみられた(Figure1.3)。また 2 例の混合型小細胞癌では、どちらも小細胞癌成分のみで ALK IHC 陽性となり非小細胞肺癌成分は陰性であった(Figure2)。

(2) 神経内分泌腫瘍での ALK 発現

小細胞癌以外の神経内分泌腫瘍では、LCNEC、カルチノイド腫瘍は 52 例のうち全例で ALK IHC が陰性であった。

(3) ALK IHC 陽性小細胞肺癌における遺伝子変異解析

陽性例で FISH もしくは RT-PCR が施行可能であった 15 例中、ALK 融合遺伝子は全例で検出されなかった。FISH 実施 12 例中 4 例でコピー数の増加がみられた。神経芽細胞腫で多くみられる、F 1174、F 1245、R 1275 点突然変異も検出されなかった。

(4) ALK IHC 陽性小細胞肺癌細胞株における ALK 阻害薬 Crizotinib の効果

小細胞肺癌株 SKLC2 細胞は、RT-PCR で発現は認めるものの、EML4-ALK などの融合遺伝子を認めず、*in vivo* での ALK IHC 陽性肺癌と同等であることがわかった (Figure4)。SKLC2 を用いた Crizotinib の ED50 は 1.1 μ M であり、ALK 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株 H2228 細胞の 141 nM と対象的であった。到達可能有効血中濃度を考えると、ALK 発現小細胞癌では発現はあるものの、効果は期待できないと考えられた。

(5) 予後解析

ALK IHC 陽性群と陰性群において全生存期間の有意な群間差はなかった (Supplementary Figure1)。

【考察】

本研究は小細胞肺癌における ALK IHC 陽性例の臨床病理学的特徴について検討を行った、これまでで最大の cohorts である。野生型 ALK は胎生期の神経発生に関与しその後減退し、成人正常肺の上皮細胞ではその発現は観察されない。非小細胞肺癌の ALK 遺伝子変異陽性例では変異により、異なるプロモーター下に置かれることで発現する。これに対して小細胞癌では、これまで知られている発現メカニズムのどれも検出されず、3'側、5'側のいずれの転写産物も観察されたことから、野生型 ALK の内因性発現と考えられる。実際に 2 例の腺癌との混合型小細胞癌では、小細胞癌成分のみで ALK IHC 陽性となり、非小細胞癌成分では発現を認めなかった。この内因性の発現に対して ALK 阻害剤の効果 *in vitro* で検討したが、融合遺伝子を持たない ALK IHC 陽性小細胞肺癌細胞株での有効性は示されなかった。以上より、小細胞肺癌では非小細胞肺癌とは異なり ALK の発現はメカニズムが特定されない内因性発現で、治療には効果がないことが示唆された。

【結論】

小細胞肺癌の 11.3%が ALK IHC 陽性であった。小細胞肺癌では非小細胞肺癌の陽性例とは異なる機序により ALK は発現され、その発現に対して治療効果は期待できなかったことから、IHC のみでの ALK 阻害剤についての患者選択は組織型による。