

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21606

研究課題名(和文) 婦人科腫瘍における新しいチロシンキナーゼ融合遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel tyrosine kinase fusion genes in gynecological tumors

研究代表者

坂田 征士(SAKATA, Seiji)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 分子標的病理プロジェクト・研究員

研究者番号：00617433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Fluorescence in situ hybridization (FISH)およびリアルタイムPCRによるスクリーニングを用いて、チロシンキナーゼ融合遺伝子を4例の婦人科腫瘍で同定した。子宮頸部腫瘍でチロシンキナーゼ遺伝子の点突然変異についても検索し、0.8% (2/240)に変異が認められた。

研究成果の概要(英文)：We discovered a tyrosine kinase fusion gene in 4 gynecological tumors by fluorescence in situ hybridization and real-time PCR. A point mutation of the tyrosine kinase was found in 0.8% of uterine cervical tumors.

研究分野：人体病理学

キーワード：チロシンキナーゼ 融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

婦人科腫瘍は、女性において罹患数の多い悪性腫瘍の一つである(子宮頸癌:世界第4位,子宮体癌:世界第5位,卵巣癌:世界第7位)¹⁾。子宮頸癌や卵巣癌においては,死亡数も多い(子宮頸癌:世界第4位,子宮体癌:世界第14位,卵巣癌:世界第8位)¹⁾。婦人科腫瘍の治療は,早期であれば手術療法が主であり,根治の可能性も高い。しかし,進行症例や再発症例など手術不可能な症例では,化学療法や放射線療法が主体となっている。近年では,子宮頸癌や卵巣癌に対して *VEGF* をターゲットとした分子標的治療が導入され,治療成績の改善がみられる。しかし,それらは癌化に必須な分子ではなく,劇的な効果を示すには至っていない。また,臨床応用されている分子標的薬は少ない。そのため,新しい治療ターゲットの発見が望まれている。

チロシンキナーゼの異常な活性化は,癌の発生や増殖に大きく関わっていると考えられている。チロシンキナーゼ融合遺伝子は,キナーゼの異常な活性をきたす要因の一つで,融合遺伝子を有する腫瘍ではそのチロシンキナーゼ阻害薬への高い感受性を示しうる。2007年に,Sodaらにより悪性リンパ腫において発見された *anaplastic lymphoma kinase (ALK)* 融合遺伝子が肺癌で発見された²⁾。その後,*ALK* 融合遺伝子陽性の肺癌に対する *ALK* 阻害剤の劇的な治療効果が示され,現在臨床応用されるまでに至っている。*ALK* 阻害剤の他,すでに数種のチロシンキナーゼ阻害剤が上皮性腫瘍においても臨床応用されており,チロシンキナーゼ融合遺伝子の発見は新しい治療標的となりうる。

婦人科腫瘍でのチロシンキナーゼ融合遺伝子は,*FNI-ALK*³⁾,*GOPC-ROSI*⁴⁾などが報告されているが,検索した症例数が69例,86例といずれも少ない。そのため,大規模かつ網羅的にチロシンキナーゼ融合遺伝子を調べる必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は,婦人科腫瘍において新しいチロシンキナーゼ融合遺伝子を同定すること,である。婦人科腫瘍は罹患数および死亡数の多い悪性腫瘍の一つであるが,癌化に必須な遺伝子をターゲットとした治療法は確立されていない。チロシンキナーゼである *ALK* の融合遺伝子が肺癌で発見され,融合遺伝子を有する肺癌に対し *ALK* 阻害薬が臨床応用されるまでに至っている。婦人科癌を含む肺癌以外の様々な上皮性腫瘍において,チロシンキナーゼ融合遺伝子が報告されており,本研究で婦人科腫瘍の新しい分子標的薬の導入に向けて,治療ターゲットとなる融合遺伝子を探索する。

3. 研究の方法

① 症例

1998年10月から2012年2月までの間に,がん研有明病院にて切除され,病理組織学的診断が行われた約1,700例(子宮頸部850例,子宮体部400例,卵巣450例)の婦人科腫瘍症例を対象とした。

② Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)によるスクリーニング

チロシンキナーゼ遺伝子数十種,および融合パートナーとして報告されている遺伝子数種に対する特異的なDNAプローブを用いて,split FISH assayによるスクリーニングを行った。FISHプローブは,Bacterial Artificial Chromosome (BAC) クローンおよびP1-derived Artificial Chromosome (PAC) を用いて作製した。多数の婦人科腫瘍をスクリーニングするために,tissue micro array (TMA) 使用した。TMAは,ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから腫瘍部分を径1mm大でくり抜き,それらを順に並べてパラフィン包埋し作製した。

FISHでの判定は,5'側あるいは3'側の隔離したシグナルが腫瘍細胞の50%以上に観察された場合をsplit陽性とした。また,シグナルサイズの増大した3'側のシグナルや5'側と3'側の融合シグナルが認められた症例についても,融合遺伝子陽性候補症例とした。

③ リアルタイムPCRによるスクリーニング

チロシンキナーゼ遺伝子Xの融合遺伝子に対しては,リアルタイムPCRでのスクリーニングを行った。凍結検体が利用可能な約700例(子宮頸部290例,子宮体部270例,卵巣140例)を対象とし,遺伝子Xの3'-UTRとextracellular domain, kinase domainでの発現量を比較した。

④ 融合遺伝子の同定

FISHあるいはリアルタイムPCRによるスクリーニングで得られた候補症例に対し,凍結検体もしくはパラフィン包埋検体を用いて,対象遺伝子に特異的なreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)や5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE),3'-RACEにより融合遺伝子を検索した。

上記により同定できない場合は,次世代シーケンサーでヒトキナーゼ遺伝子をターゲットとしたキャプチャーシーケンシングにより検索した。

⑤ 遺伝子Xの点突然変異解析

子宮頸部腫瘍症例を対象に,これまでに報告されている遺伝子Xの点突然変異をfragment解析により検索した。

4. 研究成果

① 遺伝子Xの融合遺伝子同定

FISH スクリーニングで、遺伝子 X のシグナルサイズが増大した症例を 1 例認めた (case 1). 同症例に対し、凍結検体を用いて遺伝子 X と遺伝子 Y に特異的な RT-PCR を行った結果、遺伝子 X と遺伝子 Y の融合遺伝子が同定された。

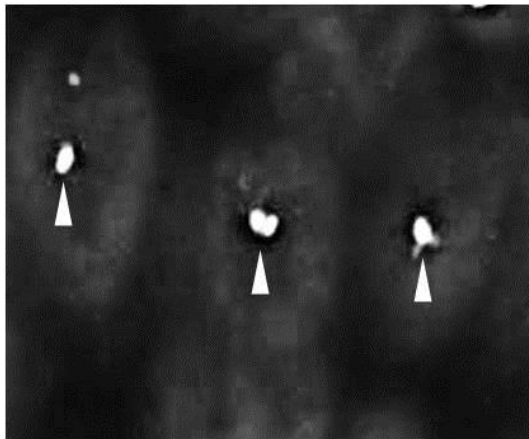


図 1. 遺伝子 X の FISH 所見
矢印は、サイズの増大した 3' 側シグナル

FISH によるスクリーニングでは、遺伝子 X の融合遺伝子候補例を検出することが難しいと考えられたため、リアルタイム PCR でスクリーニングを行った。遺伝子 X の 3' -UTR と extracellular domain, kinase domain の発現量の比較し、extracellular domain あるいは kinase domain の発現量が 3' -UTR の発現量よりも高かった症例の上位 15 症例を対象に、遺伝子 X と遺伝子 Y の specific RT-PCR および 3' -RACE を行った。その結果、新たに遺伝子 X と遺伝子 Y の融合遺伝子を有する婦人科腫瘍症例が 3 例同定された (case 2-4)。

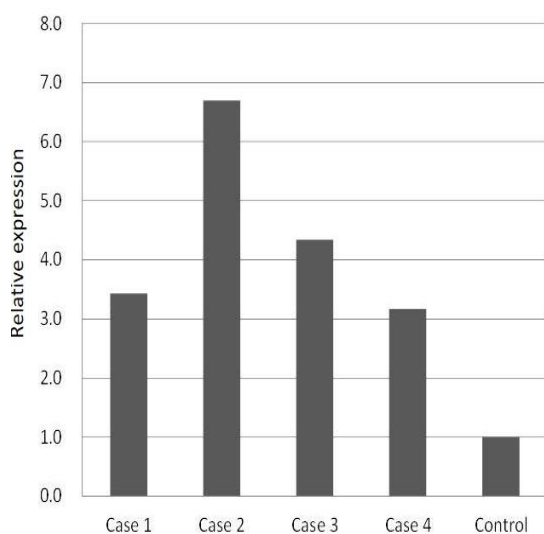


図 2. リアルタイム PCR
融合遺伝子陽性婦人科腫瘍 4 例は、正常組織 (control) に比べ、遺伝子 X の extracellular domain の発現量が 3' -UTR の発現量より特に

高かった。

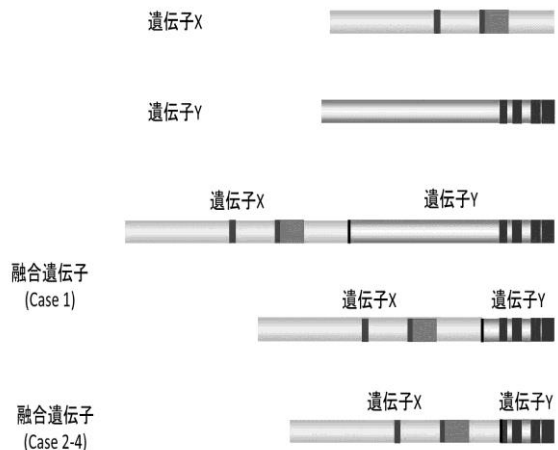


図 3. 同定した融合遺伝子の模式図
Case 1 では、異なる部位で融合した 2 種類の融合遺伝子転写物が認められた。

Extracellular domain の発現量が 3' -UTR の発現量よりも特に低かった 6 症例に対し、5' -RACE を行ったが、遺伝子 X の融合遺伝子は同定されなかった。

② 遺伝子 X 点突然変異解析

リアルタイム PCR をかけた症例のうち DNA 抽出が可能であった子宮頸部腫瘍 240 例を対象に、既知の遺伝子 X 点突然変異を fragment 解析により検索した。その結果、2 例 (0.8%) において既知の遺伝子 X 点突然変異が認められた。

③ 次世代シーケンサーでの検索

融合遺伝子が同定されていない FISH 陽性婦人科腫瘍 18 例に対し、次世代シーケンサーを用いて、ヒトキナーゼ遺伝子をターゲットとした キャプチャーシーケンスでの検索を行った。その結果、1 例の融合遺伝子陽性候補例を同定した。同融合遺伝子については、現在、他の方法で確認中である。

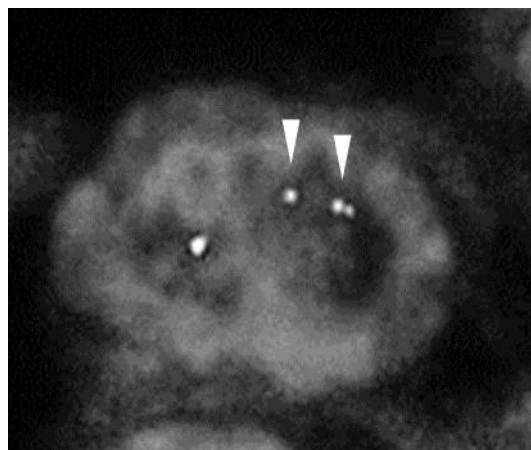


図 4. 次世代シーケンサーで同定された融合遺伝子候補の split FISH 所見
矢印は、split 陽性シグナル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

<引用文献>

1) International Agency for Research on Cancer. The Globocan Project: Globocan 2012. <http://globocan.iarc.fr/>

2) Soda M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. Nature. 2007;448:561-566.

3) Ren H, et al. Identification anaplastic lymphoma kinase as potential therapeutic target in ovarian cancer. Cancer Res. 2012;72:3312-3323.

4) Birth AH, et al. Chromosome 3 anomalies investigated by genome wide SNP analysis of benign, low malignant potential and low grade ovarian serous tumors. PLoSOne. 2011;6:e28250

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 征士 (SAKATA, Seiji)

公益財団法人がん研究会・分子標的プロジェクト・研究員

研究者番号 : 00617433