

令和元年6月14日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07150

研究課題名(和文) エキソソームを用いたALK融合遺伝子検出

研究課題名(英文) Detection of ALK fusion genes in plasma exosomes

研究代表者

坂井 和子 (SAKAI, Kazuko)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：20580559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では血中からの融合遺伝子検出としてエキソソームを用いたALK融合遺伝子検出を試みた。ヒト由来肺癌細胞株をヌードマウス皮下移植したモデルを用い、次世代シーケンサーによる融合遺伝子検出の条件検討を行った。その後肺癌患者血漿からエキソソーム単離およびRNA抽出を行ない、PCR増幅によるEML4-ALK検出を試みたが検出が困難であった。そこで、遺伝子変異が既知である患者の血中循環無細胞DNA(cfDNA)を用いて検出可能性を検討した。6例のALK融合遺伝子陽性肺癌患者血漿からcfDNAを抽出し、キャプチャー法を用いて検出を試みた結果、1例でEML4-ALK融合遺伝子の検出が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌においては、ALK融合遺伝子をはじめとするドライバー変異に対する分子標的薬の開発が進み、分子標的薬への治療反応性をモニタリングするための持続採取が可能で侵襲性の低い血液検体を用いたバイオマーカー検査が求められている。血中での融合遺伝子検出には困難を伴うが、本研究により非小細胞肺癌の血液検体からALK融合遺伝子が検出された。同手法は、他のがん種における融合遺伝子検出にも応用可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We tried to detect EML4-ALK fusion gene in plasma-derived exosomal RNA derived from non-small cell lung cancer patients. We established a PCR-based assay to detect ALK fusion transcripts and tried to detect ALK fusion transcripts in exosomal RNA of the xenograft model bearing human lung cancer cell lines. However we failed to detect the fusion transcripts in exosomal RNA. Next, we tried to detect ALK fusion genes in circulating free DNA (cfDNA) obtained from plasma of non-small cell lung cancer patients. EML4-ALK fusion genes could be detected in one of 6 cases using CAPP-seq technology.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：エキソソーム 非小細胞肺癌 融合遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺がんにおいては、*EGFR* 遺伝子変異や *ALK* 融合遺伝子をはじめとするドライバー変異に対する分子標的薬の開発が進む中、リキッドバイオプシーによる遺伝子異常のモニタリングに関する研究が広く行われている。分子標的治療薬による、治療前および治療経過中に目的とする遺伝子の遺伝子変異を検出することは、モニタリング、治療方針の決定に重要であるが、末梢型肺がんにおける腫瘍採取は侵襲性が高く、特に治療経過中の re-biopsy は困難である。そこで、リキッドバイオプシーによる患者の病態により検体採取が左右されない「非侵襲的なバイオマーカー」検査での遺伝子異常検出の研究が精力的に行われている。リキッドバイオプシー検査では、血清・血漿中の循環無細胞 DNA (circulating free DNA, cfDNA) や、循環がん細胞 (circulating tumor cell, CTC) から治療効果に関わる体細胞変異を検出する手法が研究され、特に *EGFR* 遺伝子変異の検出に関わる研究が進んでいる。我々は、これまでに、血清・血漿中の cfDNA からデジタル PCR を用いた *EGFR* 遺伝子変異の高感度検出に取り組み、次世代シーケンスを用いた血清・血漿中の cfDNA からの遺伝子変異検出についても、高感度に検出する手法を開発し、*KRAS* 遺伝子変異や *EGFR* 遺伝子変異の検出に関わる研究を進めている。分子標的治療薬による、治療前および治療経過中に目的とする遺伝子異常を検出することは、モニタリング、治療方針の決定に重要であるが、末梢型肺がんにおける腫瘍採取は侵襲性が高く、特に治療経過中の再生検は困難である。*ALK* 融合遺伝子陽性肺がんにおいても、感受性因子である *ALK* 融合遺伝子ならびに耐性変異を血中でモニタリングすることは、*ALK* 阻害剤の治療戦略の決定への大きな寄与が期待できる。我々は、これまでの研究で血中 RNA を用いた *ALK* 融合遺伝子の検出を試みてきたが、血中 RNA の不安定性により検出が困難であった。そこで、*ALK* 融合遺伝子検出の為に、血中の遊離 RNA 以外的手段が必要であると考え、すべての細胞から排出され、血液中を循環している細胞外小胞であるエキソソームを用いた *ALK* 融合遺伝子検出の可能性を検証する研究を計画した。エキソソームは、すべての細胞から排出され、血液中を循環している細胞外小胞である。エキソソームの外側は、脂質二重膜で覆われており、内部に RNA やタンパク質を含んでいる。血中からのエキソソーム単離は、古くはショ糖密度勾配液による超遠心法を用いて行われてきたが、時間、コストのかかる手法である。現在では、免疫沈降法やポリマー沈殿法のような新しい手法も開発され、より簡便なエキソソームの単離が可能となっている。この中で、ポリマー沈殿法は、水分子を結合することで検体中の小胞体の水溶性を低下させ、短時間の低速遠心処理でエキソソームを回収することが可能な手法である。本研究では、ポリマー沈殿法を用いた非小細胞肺がん *ALK* 融合遺伝子陽性症例の血清検体からエキソソームを単離し、エキソソーム内の RNA を鋳型として *ALK* 融合遺伝子の検出を試み、その臨床的有用性についての検討を計画した。

### 2. 研究の目的

肺がんにおいては、*EGFR* 遺伝子変異や *ALK* 融合遺伝子をはじめとするドライバー変異に対する分子標的薬の開発が進む中、分子標的薬への治療反応性をモニタリングするためのリキッドバイオプシーの研究が盛んに行われている。*ALK* 融合遺伝子陽性肺がんにおいても、感受性因子である *ALK* 融合遺伝子ならびに二次的な耐性変異を血中でモニタリングすることは、*ALK* 阻害剤の治療戦略の決定するうえで重要な情報となる。しかし、これまでの研究で、血中におけるイントロン部分を含まない RNA を用いた融合遺伝子の検出を試みてきたが、血中での遊離 RNA の不安定性により検出は困難であった。本研究では、血中を循環するエキソソームを対象とし、エキソソーム内に安定的に存在すると考えられる RNA を用いた *ALK* 融合遺伝子検出法を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

血清、血漿検体からポリマー沈殿法によって単離したエキソソームから RNA を抽出し、これを鋳型として次世代シーケンサーを用いた融合遺伝子の測定系を構築する。エキソソーム由来の RNA からの融合遺伝子検出に際して、血清、血漿検体からのポリマー沈殿法によるエキソソームの単離条件、エキソソームからの RNA 抽出条件、次世代シーケンスでの融合遺伝子検出のためのライブラリー作成条件を検討し、次世代シーケンサーでの融合遺伝子検出が可能な実験条件の最適化を行う。構築した測定系を用いて、20 症例の *ALK* 融合遺伝子陽性肺がんの血清検体による検出率を検討する。

#### (1) 培養細胞株の上清を用いたエキソソームの単離と RNA 抽出条件の検討

*EML4-ALK* 融合遺伝子を発現するヒト由来肺がん細胞株 H2228, H3122 を用いて、培養上清中に分泌されるエキソソームの単離を行った。エキソソームの単離にはポリマー沈殿法を用い、単離したエキソソームからの RNA 抽出条件を検討した。抽出した RNA を用いて PCR 法により *EML4-ALK* を増幅し、バイオアナライザーによる PCR 産物の確認を行った。

#### (2) ノードマウス皮下移植モデルの血漿を用いたエキソソーム単離および *EML4-ALK* 検出の検討

肺がん細胞株 H2228 および H3122 のノードマウス皮下移植モデルを用いて、担がんマウスの血漿検体からエキソソームの単離を行った。エキソソームの単離にはポリマー沈殿法を用い、単離したエキソソームからの RNA 抽出条件を検討した。抽出した RNA を用いて PCR 法により

EML4-ALK 融合遺伝子を増幅し、バイオアナライザーによる PCR 産物の確認を行った。

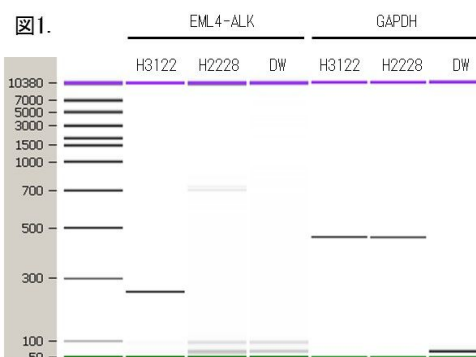
### (3) 血中循環無細胞 DNA を用いた EML4-ALK 検出の検討

非小細胞肺がんの血漿検体から血中循環無細胞 DNA(cfDNA)を抽出し、CAnce Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq)法による ALK 融合遺伝子の検出を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 培養上清を用いたエキソソーム単離および EML4-ALK 検出の検討

培養細胞株の培養上清を用いた検討として、EML4-ALK 融合遺伝子を発現するがん細胞株であるヒト由来肺がん細胞株 H2228 および H3122 を用いて検討を行なった。融合遺伝子を発現しないがん細胞株として、ヒト由来肺がん細胞株 A549 および PC-9 を用いた。これらの培養細胞株を単層培養し、培養上清からのエキソソーム単離と RNA 抽出を行なった。サブコンフルエントに培養した細胞株の培養上清を回収し、フィルターを通過した後、exoEasy Maxi Kit を用いて RNA 抽出を行なった。抽出した RNA は、cDNA に逆転写し、EML4-ALK および GAPDH の発現を確認した(図 1)。臨床検体を用いた検討では、血液検体の採取後に血清もしくは血漿を遠心分離し、凍結保存した検体を用いるため、培養上清をいったん凍結保存した状態からの RNA 抽出と EML4-ALK 融合遺伝子発現の確認も行なった。



### (2) ノードマウス皮下移植モデルの血漿を用いたエキソソーム単離および EML4-ALK 検出の検討

血漿を用いたエキソソーム抽出の検討として、肺がん細胞株 H2228 および H3122 のノードマウス皮下移植モデルを用いた検討を行なった。肺がん細胞をノードマウス皮下に移植し、腫瘍が増大したノードマウスの血漿を採取し、エキソソーム単離と RNA 抽出を行なった。抽出した RNA から、PCR 増幅による EML4-ALK 検出を試みたが、検出されなかった。この原因として、マウスから採取できる血漿量が少ないことや腫瘍増殖が不十分であることなどが考えられたため、血漿採取条件、腫瘍体積量の条件検討を行い EML4-ALK 検出を試みたが、検出されなかった。

### (3) 血中循環無細胞 DNA を用いた EML4-ALK 検出の検討

遺伝子変異検出の feasibility が担保されている血中循環無細胞 DNA (circulating cell-free DNA, cfDNA) での検出が可能か検討を行うこととした。我々のこれまでの検討から、ALK 融合遺伝子は、ALK とパートナー遺伝子がイントロン部分で融合し、その融合部分は一定ではないことがわかっている。そのため、DNA を鋳型に使う際には広範囲を調べる必要がある。今回、血漿検体からの ALK 融合遺伝子を検出するために、CAnce Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq)法を用いた検討を行った。同手法は、これまでの研究で血漿検体を用いた遺伝子変異の検出に用いてきたことから、近畿大学医学部で承認済みの研究計画で採取、収集された ALK 融合遺伝子陽性の 6 症例について検討を行った結果、1 例で EML4-ALK を検出した。2 例で ALK 遺伝子変異が検出された。これは ALK 阻害薬の治療後に獲得される耐性獲得メカニズムと考えられた。これまでに実施した 6 例の血漿 1 mL あたりの cfDNA 収量は、平均 19.5 ng (7.2 - 49.0 ng)であった。検出された遺伝子異常は、融合遺伝子として、EML4-ALK (1/6, 16.7%)、一塩基バリエーション(single nucleotide variant, SNV)として、ALK 遺伝子変異(2/6, 33.3%)、TP53 遺伝子変異(2/6, 33.3%)、APC 遺伝子変異(1/6, 16.7%)であった。cfDNA 収量と遺伝子異常検出との間に関連は認められなかった。ALK 融合遺伝子が検出された検体と二次的 ALK 遺伝子変異が検出された検体は異なるため、対応する腫瘍組織検体での検出を試みたが、腫瘍組織検体を得ることが叶わなかった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)すべて査読あり

1. Sakai K, Ohira T, Matsubayashi J, Yoneshige A, Ito A, Mitsudomi T, Nagao T, Iwamatsu E, Katayama J, Ikeda N, Nishio K. Performance of Oncomine Fusion Transcript kit for formalin-fixed, paraffin-embedded lung cancer specimens. Cancer Sci, 2019, [Epub ahead of print]
2. Vaughn CP, Costa JL, Feilotter HE, Petraroli R, Bagai V, Rachiglio AM, Marino FZ, Tops B, Kurth HM, Sakai K, Mafficini A, Bastien RRL, Reiman A, Le Corre D, Boag A, Crocker S, Bihl M, Hirschmann A, Scarpa A, Machado JC, Blons H, Sheils O, Bramlett K, Ligtenberg MJL, Cree IA, Normanno N, Nishio K, Laurent-Puig P. Simultaneous detection of lung fusions using a multiplex RT-PCR next generation sequencing-based approach: a multi-institutional research study. BMC Cancer. 2018, 18(1):828.

〔学会発表〕(計1件)

Sakai K., Nishio K. Clinical sequencing of circulating tumor DNA by CAPP-seq. The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. S19-3.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：西尾 和人

ローマ字氏名：(NISHIO, kazuto)

研究協力者氏名：西尾 誠人

ローマ字氏名：(NISHIO, makoto)