

令和元年6月11日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15670

研究課題名(和文)「希少癌」骨軟部腫瘍のチロシンキナーゼ遺伝子転写変異体の探索

研究課題名(英文) Screening for alternative transcription initiation of tyrosine kinase genes in bone and soft tissue tumors

研究代表者

末原 義之 (Suehara, Yoshiyuki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70509405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、難治性かつ希少がんである骨軟部腫瘍の生命予後改善の要となる新規分子治療標的の開発を行った。Tyrosine Kinase (TK)遺伝子の融合遺伝子及び転写変異体について、骨軟部腫瘍の手術検体を用いてNanostringの手法に基づいたmRNA発現を5' - 3' -にて観察による全TK遺伝子に対してスクリーニング探索を進めた。それら同定TK遺伝子の融合遺伝子及び転写変異体候補については、その発現・変異検証と癌化機能及び治療標的としての阻害剤奏功性の検証を進めた。それらを包括的に検証確認を進め新規分子治療標的の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、難治性かつ「希少がん」である骨軟部腫瘍の生命予後改善の要となる新規分子治療標的の開発を行った。具体的には、他癌種において発見されているdriver-oncogeneである転写変異体について、骨軟部腫瘍の手術検体を用いて全TK遺伝子の探索を進めた。その方法として独自のNanostringの手法に基づいたTK遺伝子転写変異体・融合遺伝子探索システムを用い、それら同定TK遺伝子転写変異体・融合遺伝子については、骨軟部腫瘍における癌化機能の解明とそのターゲットとなるTK阻害剤奏功性の検証を進め、TK阻害剤の適応拡大を含めた新規分子治療標的の開発を行い、骨軟部腫瘍の予後改善へ貢献を目的とした。

研究成果の概要(英文)：Soft tissue sarcomas (STSs) are a heterogeneous group of rare malignant tumors. Systemic chemotherapy consisting cytotoxic anticancer agents for STS contributes on improving prognosis of STS treatment. However, advanced STSs have still poor prognosis and effective systemic therapies have not yet been established. Therefore, the identification of novel therapeutic targets and novel effective therapies are required. Receptor tyrosine kinases (RTKs) are being increasingly used as therapeutic targets for a variety of cancers, especially RTK fusion genes. A recent report found that the novel TK transcript initiates from a de novo alternative transcription initiation (ATI) site, especially in ALK. In addition, the TK-ATI has a novel mechanism of oncogene activation in cancer and TK inhibitors could suppress the kinase activity of TK-ATI. Based on these background, we conducted TK screening using NanoString to identify rational therapeutic TK targets including TK-fusions and TK-ATIs in STSs.

研究分野：整形外科

キーワード：骨軟部腫瘍 軟部肉腫 融合遺伝子 遺伝子転写変異体

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍の治療成績は、5年生存率が約50%以下と依然不良であり、これは「希少がん」であるが故のデータ量不足や消極的な創薬開発が影響している。対してメジャーながん、特に肺がんではEGFR変異などの発生・悪性度因子(driver-oncogene)を治療標的としたTyrosine kinase(TK)の阻害剤治療が盛んであり、治療成績は良好となっている。そのため全癌種・横断的に新規分子標的治療標的(特にTK治療標的)と成り得るdriver-oncogeneが探索することは、がん治療のbreakthroughと位置づけられている。

骨軟部腫瘍では、近年TK阻害剤であるPazopanibが悪性骨軟部腫瘍に適応拡大されたが、driver-oncogeneを治療標的とせず、多種組織型に一律に臨床応用された結果、奏効性や生存改善効果について疑問が生じている。更に、約半数の骨軟部腫瘍は組織特異的融合遺伝子を持ち(translocation-associated sarcomas: TAS(driver-oncogeneかは未だ不明な組織型も多い))、それらに対する新規遺伝子変異・融合遺伝子のdriver-oncogeneを探索することは非論理的だと考えられ、組織特異的融合遺伝子を持たない組織型群(complex karyotype sarcomas: CKS)に限定して、それら治療標的探索を行う風潮にあった。

しかし、我々グループの全がん的な新規分子標的治療標的(特にTK治療標的)探索研究の中で、遺伝子変異とは異なるdriver-oncogeneとなるshort form(転写変異体)の発見し、同時期に米国にて新規TK transcript initiates_a de novo alternative transcription initiation(ATI)(転写変異体)として発見され(Wiesner T et al. Nature 2015)、そのがん化能及びTK遺伝子をターゲットとした抗腫瘍効果のよりも注目されている。そのため、本転写変異体の発見により、TASなどが持つ遺伝子変異とは異なる新規治療標的となる転写変異体型driver-oncogeneの存在が骨軟部腫瘍においても存在する可能性もあり、TASやCKSに関わらずそれらを探索する本研究の理論的根拠となっている。

以上の発見を基に本研究では、骨軟部腫瘍患者において、他癌で成功を収めているTK遺伝子転写変異体・融合遺伝子の探索を独自の手法を進め、新規治療標的となりうるdriver-oncogeneとしての転写変異体・融合遺伝子を同定し、骨軟部腫瘍患者の早期救済に挑んだ。

2. 研究の目的

本研究は、難治性かつ「希少がん」である骨軟部腫瘍の生命予後改善の要となる新規分子治療標的の開発を行った。具体的には、他癌種において発見されているdriver-oncogeneであるshort form(転写変異体)について、骨軟部腫瘍の手術検体を用いて全TK遺伝子の探索を進めた。その方法として独自のNanostringの手法に基づいたTK遺伝子転写変異体・融合遺伝子探索システムを用い、それら同定TK遺伝子転写変異体・融合遺伝子については、骨軟部腫瘍における癌化機能の解明とそのターゲットとなるTK阻害剤奏功性の検証を進め、TK阻害剤の適応拡大を含めた新規分子治療標的の開発を行い、骨軟部腫瘍の予後改善へ貢献を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、順天堂大学、国立がん研究センター、東京大学が共同し、他がん種において発見している“driver-oncogene”の「転写変異体」について、希少がんである骨軟部腫瘍を対象に、独自に開発したTK遺伝子転写変異体・融合遺伝子探索システムを用い、2年の研究期間内に新規分子標的(TK標的)治療法の開発を行った。

具体的には、

- (1) 骨軟部腫瘍検体を用いたTK遺伝子転写変異体・融合遺伝子プロファイリング、
- (2) その同定されたTK遺伝子転写変異体・融合遺伝子の機能解析とその標的となるTKI薬剤奏功性検証、
- (3) その同定したTK治療標的の臨床試験の検討の基に、骨軟部腫瘍における新規分子標的(TK標的)治療法の開発を進めた。

メンバーは、順天堂大学の末原及び国立がん研究センターの高阪、小林、遠藤の共同研究として行い、また、米国Memorial Sloan-Kettering Cancer Center(MSKCC)のP.I.のDr.Ladanyiと順天堂大学の齋藤、林の研究協力も受けた。

検体や器機は順天堂大学と国立がん研究センターの骨軟部腫瘍バイオバンク(凍結手術検体・FFPE)を用いた。解析の中心となる器機については遺伝子変異解析には順天堂大学のNanoStringシステム、NGSに関しては順天堂大学、国立がんセンターの器機を使用した。

TK遺伝子転写変異体・融合遺伝子探索：

骨軟部腫瘍の全TK遺伝子転写変異体・融合遺伝子のプロファイリングを、独自のNanoStringを用いた探索システムにより行う。具体的には、3'-sideと5'-sideのRNA発現不均等(RNA-imbalance)のプロファイリング獲得のために、全90TK遺伝子の3'-sideと5'-side

にカスタムプローブデザインを行い、両 RNA 発現定量と TKD 活性化定量を同時解析で進めた。その同定された TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子の NGS による検証と、driver-oncogene としてのがん化機能解析を in vivo, in vitro で進め、骨軟部腫瘍における TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子の機能解明を行った。また、その driver-oncogene となる TK 遺伝子転写変異体を治療標的とする TKI を用いた薬剤奏効性検証を行い、奏効性を明らかにした上で、実際の TK 阻害剤臨床応用（適応拡大）を目指し、新規分子治療標的を開発した。

- ・ NanoString システムによる TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子探索： 解析対象は原発の骨軟部腫瘍とし、RNA は凍結手術検体及び手術検体 FFPE の腫瘍部より抽出した。全 TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子探索のために約 200 個のカスタムプローブデザインを行い、nCounter Prep Station を用いて Hybridize, Purify, Immobilize を行い、キット内カートリッジに蛍光色素プロファイリングを作成した。Digital Analyzer によりその蛍光色素プロファイリング（プローブ）に一致した mRNA 発現プロファイリングを獲得し、統計学的手法を用いて遺伝子変異特異的变化の同定を行った。

- ・ NGS システムによる TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子の検証： NanoString スクリーニングにて同定された TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子候補は、NGS の解析により（illumina 社の HiSeq）遺伝子変化のプロファイリングを行った。TK 融合遺伝子が同定された場合には、がんクリニカルシーケンス検査（MSK-IMPACT）に基づいた cBioPortal、OncoKB により解析を進め、潜在的な新規治療標的群の選出を行った。

- ・ TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子同定と発現の検証： 同定された新規 TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子候補に対して更に RT-PCR 及び FISH にて遺伝子変異の発現確認を行った。また特異的抗体を用いて、そのタンパク質発現を確認した。

- ・ 新規遺伝子変異の機能解析： 新規遺伝子変異の Plasmid Construct を作成しその Plasmid Vector を作成した。各種腫瘍細胞株を用いて、その新規遺伝子変異 Plasmid Vector の遺伝子導入を行い、細胞増殖、TK 阻害薬奏効性の確認を行った。また実験動物を用いて細胞の in vivo 解析を行った。

- ・ TK 阻害剤を使用した臨床試験： その発現解析・機能解析の過程で有望であると判断された TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子については、臨床応用を目指した TK 阻害剤を用いた臨床試験を計画した。

4. 研究成果

本研究は、難治性かつ希少がんである骨軟部腫瘍の生命予後改善の要となる新規分子治療標的の開発を行った。具体的には Tyrosine Kinase (TK) 遺伝子の融合遺伝子及び転写変異体について、骨軟部腫瘍の手術検体を用いて全 TK 遺伝子に対してスクリーニング探索を進めた。その方法として Nanostring の手法に基づいた mRNA 発現を 5' -, 3' - にて観察を行い（検体より RNA を抽出し、全 TK 遺伝子 転写変異体探索のために、カスタムプローブデザインを行い、nCounter Prep Station を用いて、Hybridize, Purify, Immobilize を進め、Digital Analyzer によりプローブに一致した mRNA 発現プロファイリングを獲得し、統計学的手法を用いて同定を行った）TK 遺伝子の融合遺伝子及び転写変異体候補の選出を行った。それら同定 TK 遺伝子の融合遺伝子及び転写変異体候補については、その発現・変異検証と癌化機能及び治療標的としての阻害剤奏効性の検証を進めた。それらを包括的に検証確認を進め新規分子治療標的の開発を行った。

対象は骨軟部腫瘍において（紡錘型細胞肉腫、小児腫瘍、inflammatory myofibroblastic tumor (IMT) / Inflammatory pseudotumor (IPT)）に対して探索を進め、ALK（融合遺伝子または転写変異体）、ROS1（融合遺伝子または転写変異体）、NTRK（融合遺伝子または転写変異体）候補の同定に成功し、いずれも検証の結果融合遺伝子あった。具体的には平滑筋肉腫に ROS1 融合遺伝子を同定、小児腫瘍に NTRK 融合遺伝子を同定、また研究進行中の IMT/IPT に ALK、ROS1、NTRK 融合遺伝子同定候補を同定した。それぞれにおいてがん化能及び阻害剤奏効性も確認に成功し、NTRK1 融合遺伝子に関しては臨床試験も行った。

平滑筋肉腫の MAN1A1/ROS1 融合遺伝子の同定

軟部肉腫の遺伝子変化（特に治療に繋がる TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子同定）をプロファイリングするために凍結手術検体を用いて網羅的遺伝子変異解析を行った。特に組織学的融合遺伝子を持たない非融合遺伝子軟部腫瘍検体に焦点を当てて解析を行った。

(a) 紡錘型細胞肉腫の病理学的整理： 紡錘型細胞肉腫の病理組織整理を行い通常型平滑筋肉腫、多形型平滑筋肉腫、高悪性粘液繊維肉腫などの分類を行った。

(b) NanoString システムによる TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子同定プロファイリング： 上記組織型の内 30 例の平滑筋肉腫（通常型平滑筋肉腫、多形型平滑筋肉腫）の手術検体より RNA を抽出し、全 TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子探索を行った。その結果 ROS1 の TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子を疑う発現不均衡を同定した。

(c) 遺伝子変異のシーケンスによる同定： 同定された新規 TK 遺伝子変異候補に対してシー

クエンス解析で検証を行った。その結果 MAN1A1/ROS1 融合遺伝子であることが明らかになった。(d)同定融合遺伝子の発現検証： 同定された遺伝子変異に対して RT-PCR 及び FISH にて遺伝子変異の発現確認を行った。また特異的抗体を用いて、そのタンパク質発現を確認した。(e) 新規遺伝子変異の機能解析： 全癌的に新規融合遺伝子 (ROS1 パートナー) がであった MAN1A1/ROS1 に対しては、その Plasmid Construct を作成しその Plasmid Vector を作成した。3T3 細胞株を用いて、その新規遺伝子変異 Plasmid Vector の遺伝子導入を行った。その結果、細胞増殖、ROS1 阻害薬 (crizotinib) 奏効性の確認に成功した。

上記成果は ([Suchara Y](#), Kohsaka S, Kurisaki A, Akaike K, Hayashi T, Mogushi K, Okubo T, Kim Y, Sato S, Kobayashi E, Kaneko K, Mano H, Saito T. Comprehensive mRNA-based screen for tyrosine kinase fusions and a de novo alternative transcription initiation site in soft tissue sarcomas. European Society For Medical Oncology – ASIA, Nov 23-25th 2018, Singapore, Singapore) にて発表を行い、引き続き骨軟部腫瘍について解析を進めている。

小児科低悪性腫瘍の LMNA/NTRK1 融合遺伝子の同定

軟部肉腫の遺伝子変化 (特に治療に繋がる TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子同定) をプロファイリングするために凍結手術検体を用いて網羅的遺伝子変異解析を行った。特に組織学的融合遺伝子を持たない低悪性軟部腫瘍検体に焦点を当てて解析を行った。

- 低悪性軟部腫瘍の病理学的整理： 低悪性軟部腫瘍の病理組織整理分類を行った。
- NanoString システムによる TK 融合遺伝子タンパク質プロファイリング： 低悪性軟部腫瘍 10 例の手術検体より RNA を抽出し、全 TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子探索を行った。その結果 NTRK1 の TK 遺伝子転写変異体・融合遺伝子を疑う発現不均衡を同定した。
- 遺伝子変異のシークエンスによる同定： 同定された新規 TK 遺伝子変異候補に対してシークエンス解析で検証を行った。その結果 LMNA/NTRK1 融合遺伝子であることが明らかになった。
- 同定融合遺伝子の発現検証： 同定された遺伝子変異に対して RT-PCR 及び FISH にて遺伝子変異の発現確認を行った。また特異的抗体を用いて、そのタンパク質発現を確認した。
- NTRK 阻害剤 (larotrectinib) を使用した臨床試験： 同定された NTRK1 融合遺伝子陽性腫瘍患者には病院内倫理審査及びクリアラボ基準検査を追加し、Single patient protocol にて larotrectinib の投与を行った。その結果 3 ヶ月で CR (完全奏効) となり大きな副作用ななかった。

上記成果は (Kohsaka S, Saito T, Akaike K, [Suchara Y](#), Hayashi T, Takagi T, Kaneko K, Ueno T, Kojima S, Kohashi K, Mano H, Oda Y, Yao T. Pediatric soft tissue tumor of the upper arm with LMNA-NTRK1 fusion (*Human Pathology* 2018 72:167–173)) にて発表を行い、引き続き骨軟部腫瘍について解析を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 25 件)

- Ishii M, [Suchara Y](#)*†, [Kohsaka S](#), Tanabe Y, Hayashi T, Kazuno S, Tanabe Y, Akaike K, Mukaihara K, Kim Y, Okubo T, Takamochi K, Takahashi F, Kaneko K, Saito T. Proteomic signatures corresponding to the SS18/SSX fusion gene. (*Oncotarget* 9:37509-37519 2018)
*corresponding author †equal first
- [Suchara Y](#), Akaike K, Mukaihara K, Kurisaki-Arakawa A, Kubota D, Okubo T, Mitomi H, Mitani K, Takahashi M, Toda-Ishii M, Taguchi T, Takagi T, Kaneko K, Yao T, Saito T. KCTD12 may be negatively regulated by KIT in gastrointestinal stromal tumors. (*Oncotarget* 9:27016-27026, 2018)
- [Kohsaka S](#), Saito T, Akaike K, [Suchara Y](#), Hayashi T, Takagi T, Kaneko K, Ueno T, Kojima S, Kohashi K, Mano H, Oda Y, Yao T. Pediatric soft tissue tumor of the upper arm with LMNA-NTRK1 fusion (*Human Pathology* 2018 72:167–173)
- [Kohsaka S](#), Nagano K, Ueno T, [Suchara Y](#), Hayashi T, Shimada N, Takahashi K, Suzuki K, Takamochi K, Takahashi F, Mano H. High-throughput functional evaluation of variants of unknown significance in EGFR (*Science Translational Medicine* 2017 9, (416): ean6566)
- Mukaihara K, Tanabe Y, Kubota D, Akaike K, Hayashi T, Mogushi K, Hosoya M, Sato S, [Kobayashi E](#), Okubo T, Kim Y, [Kohsaka S](#), Saito T, Kaneko K, [Suchara Y](#)*. Cabozantinib and dastinib exert anti-tumor activity in alveolar soft part sarcoma. (*PLOS ONE* 2017 12(9): e0185321.) *corresponding author

[学会発表] (計 20 件)

- [Suchara Y](#), [Kohsaka S](#), Kurisaki A, Akaike K, Hayashi T, Mogushi K, Okubo T, Kim Y, Sato S, [Kobayashi E](#), Kaneko K, Mano H, Saito T. Comprehensive mRNA-based screen for tyrosine kinase fusions and a de novo alternative transcription initiation site in soft tissue sarcomas.

- European Society For Medical Oncology – ASIA, Nov 23-25th 2018, Singapore, Singapore
2. **Suehara Y**, Trahair T, Kirby M, Saito S, Capra M, Ghosh T, Henry D, Ku NC, Cox MC, Kato S, Ziegler DS. Expanded access of larotrectenib to manage pediatric TRK fusion sarcomas. 50th Congress of International Society of Paediatric Oncology, Nov 16-19 2018 Kyoto, Japan
 3. **Suehara Y**, Tanabe Y, Akaike K, Mogushi K, Hayashi T, Kurihara T, Kaneko K, Saito T. Anti-tumor activity of tyrosine kinase inhibitors in alveolar soft part sarcoma. European Society For Medical Oncology – ASIA, Nov 17-19th 2017, Singapore, Singapore
 4. **Suehara Y**, **Kohsaka S**, Yamaguchi S, Akaike K, Hayashi T, Tanabe Y, Ueno T, Kojima S, Takeda I, Hayashi R, Saito T, Mano H, Kato S. A complete responder to pazopanib in high-grade soft tissue sarcomas. Connective Tissue Oncology Society, 22th Annual Meeting, November 8 - 11, 2017, Hawaii, USA
 5. Kim Y, **Suehara Y**, Kaneko K. Diagnostic strategy for skeletal metastasis of unknown primary origin at the initial visit/ Up-to-date treatment of skeletal metastasis 27th Korean-Japanese Combined Orthopedic Symposium May 25-26 2017, Incheon, Korea

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：高阪 真路

ローマ字氏名： KOHSAKA, Shinji

所属研究機関名：国立がん研究センター

部局名：研究所

職名：主任研究員

研究者番号（8桁）：627119

研究分担者氏名：小林 英介

ローマ字氏名： KOBAYASHI, Eisuke

所属研究機関名：国立がん研究センター

部局名：中央病院

職名：医長

研究者番号（8桁）：40365292

(2)研究協力者

研究分協力者氏名：遠藤 誠

ローマ字氏名： ENDO, Makoto

研究分協力者氏名：齋藤 剛

ローマ字氏名： SAITO, Tsuyoshi

研究協力者氏名：林 大久生

ローマ字氏名： HAYASHI, Takuo

研究協力者氏名：窪田 大介

ローマ字氏名： KUBOTA, Daisuke

研究協力者氏名：向井原 健太

ローマ字氏名： MUKAIHARA, Kenta

研究協力者氏名：赤池 慶祐

ローマ字氏名： AKAIKE, Keisuke

研究協力者氏名：田邊 雄

ローマ字氏名： TANABE, Yu

研究協力者氏名：石井 翠
ローマ字氏名：ISHII, Midori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。