

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590870

研究課題名（和文） 染色体転座スクリーニングによる非小細胞肺癌における新規標的分子の同定

研究課題名（英文） Screening of fusion genes in non-small cell lung cancer

研究代表者

副島 研造 (SOEJIMA KENZO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30236145

研究成果の概要（和文）：

100例の非小細胞肺癌手術検体におけるmRNA、microRNA、メチル化DNAの発現を網羅的に解析し発現プロファイリングを行った。これらの解析を通していくつかの新規標的となり得る分子を同定した。また扁平上皮癌を除く特定の非小細胞肺癌においてFGF9のmRNAの高発現が予後不良因子であることを見いだした。Exon arrayによる融合遺伝子のスクリーニングについては、キナーゼドメインを有する複数の候補遺伝子を抽出することができた。

研究成果の概要（英文）：

We performed profiling of mRNA, microRNA and DNA methylation in surgically resected 100 non-small lung cancer (NSCLC) specimens. We have identified several novel candidate molecules for the treatment of NSCLC. We also found that fibroblast growth factor-9 was associated with poor prognosis of resected NSCLC patients. We could extract a few candidate fusion genes through screening the kinase genes using exon array.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：非小細胞肺癌、網羅的解析、pathway signature 解析、fibroblast growth factor-9、microRNA、exon array、融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

癌の発生においては、さまざまな genetic および epigenetic な異常が重なる必要があるが、近年 oncogene addiction という概念が提唱されている。肺癌においては、活性化型変異により肺癌を引き起こすと考えられる EGFR 遺伝子 (Paez JG, Science, 1497-1500, 2004) が典型例であり、その他の oncogene addiction をもたらすような遺伝子は今後の有望な治療標的となりうると考え

られる。さらに染色体転座に伴う EML4-ALK 融合遺伝子の発見 (Soda M, Nature, 561-566, 2007) により、従来造血器腫瘍でのみその重要性が報告されていた染色体転座が肺癌の発症においても重要であることが明らかとなった。EGFR 変異については欧米人より東アジア人に高頻度であることが明らかとなったが、その他の既知の遺伝子変異に対する日本人における種特異的な変異頻度や、まだ未知の変異についての検討

ゲナルに着目して GeneChip による mRNA 発現と予後との相関を検討したところ、23 種の FGF および 4 種の FGFR のうち、FGF9 発現のみが有意に予後と相関していることが明らかとなった (図 4)。FGF9 の mRNA 発現は免疫染色による蛋白発現とも相関し、扁平上皮癌には 1 例もなく腺癌・大細胞癌にのみ発現しており、組織型、病期、年齢、EGFR 遺伝子変異などを含む多変量解析においても独立した予後不良因子であり、FGF9 あるいはその受容体は一部の肺癌における有望な標的分子と考えられた。

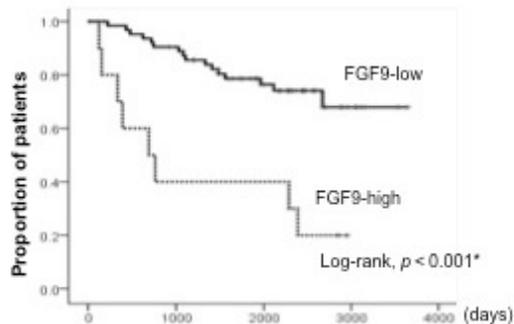


図4. FGF9発現が生存に及ぼす影響

(2) MicroRNA 発現プロファイリング

前述の肺癌手術検体に対して、Applied Biosystems: TaqMan Human MicroRNA Array v2.0 を用いて、377 の既知の microRNA 発現プロファイリングを行い、まず非小細胞肺癌のうち、扁平上皮癌と腺癌を弁別しうる 3 つの microRNA、すなわち miR-196b、miR-205 および miR-375 を同定した (図 5)。

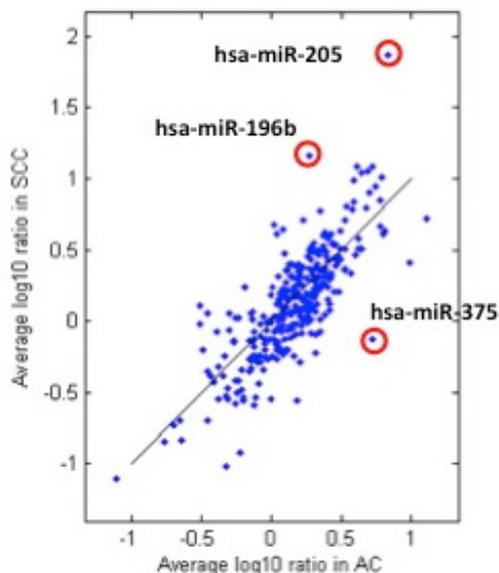


図5. 腺癌および扁平上皮癌における microRNA の発現パターン

これらについてそれぞれ cutoff 値を設定して ROC curve を書くと、いずれも AUC は 0.8 以上であり、単独でも中程度の弁別能を有していた。さらに判別分析を行うと、単独あるいは 2 つずつの miRNA の組合せと比較して、3 つすべての組合せにおいて最も正確に扁平上皮癌と腺癌を弁別できることが明らかとなった。

一方、これらの miRNA の機能的な解析では、特に miR-375 に注目して行った。miR-375 を発現していない肺癌細胞株に miR-375 を強制発現させると浸潤能を促進すること、また逆に miR-375 を高発現している肺癌細胞株で miR-375 を KO すると浸潤能が減弱することを見いだした。さらに、その機序に関わる miR-375 の新たな標的遺伝子として Claudin-1 が関与していることを発見した。肺癌臨床症例において、miR-375 高発現群は低発現群に比して予後不良の傾向を認めており、Claudin-1 を含め、新たな標的分子になり得るものと考えている。

(3) メチル化 DNA プロファイリング

当初、MeDIP によるメチル化 DNA の抽出および次世代シーケンサーによるプロファイリングを行う予定であったが、シーケンス結果からは、正常検体と腫瘍検体におけるメチル化プロファイルの違いを同定できず、残念ながら断念せざるを得ない状況となった。そこで本プロジェクトとは別のプロジェクトではあるが、研究分担者である佐藤崇が国立がん研究センター研究所に Outreach し、肺腺癌および前癌病変における DNA メチル化プロファイルを、single-CpG resolution Infinium array により解析した。あくまでも国立がんセンター研究所・発がん機構研究グループ (金井弥栄副所長) における成果であるが、①予後を規定する DNA メチル化プロファイルは前がん段階ですでに形成されていること、②前がん段階で DNA メチル化亢進を示す再発関連遺伝子 *ADCY5*、*EVX1*、*GFR1*、*PDE9A*、*TBX20* 遺伝子は、肺の発がん過程において DNA メチル化亢進によって実際にサイレンシングを受けていること、③これらの遺伝子の発現低下は悪性度を示す臨床病理学的因子と有意に相関しており、前がん段階における DNA メチル化異常が、特定の遺伝子のサイレンシングを介して腫瘍の表現型を規定していることが明らかとなった。

(4) 染色体転座のスクリーニング

①図 6 に示すように、仮に普段発現していない強力な増殖因子である遺伝子 B が恒常的に発現している遺伝子 A と融合した場合、遺伝子 B に着目して exon array の発現をみると最下段の様に融合部位を breakpoint として

急激な発現上昇が認められるはずであり、この原理を利用して融合遺伝子のスクリーニングを行った。

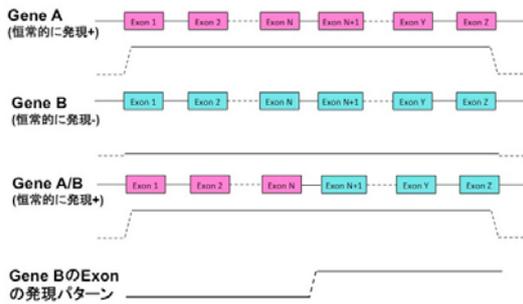


図6. Exon Arrayを用いた新規転産遺伝子のスクリーニング

②まず既知の融合遺伝子として、*EML4-ALK* 融合遺伝子がこの方法により検出可能であるかどうか検討した。図7左にあるように全検体の中で一部C末端側で発現上昇を認める検体が存在しており、その中から一定の基準を設けてN末端よりC末端で発現が上昇している5検体を抽出したところ(図7右上)、T110において明らかにC末端での発現が上昇していることが明らかとなり、multiplex-PCRを行った所 variant3の*EML4-ALK* 融合遺伝子であることが確認された(図7右下)。

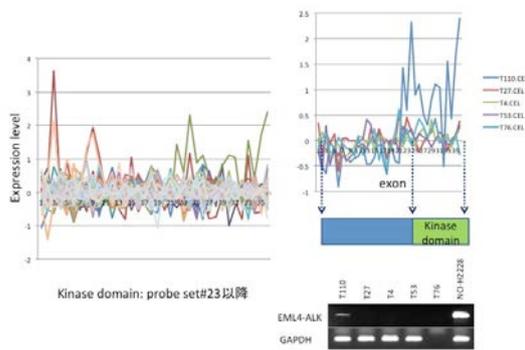


図7. ALK遺伝子に対するexon arrayの発現パターン

③そこで、tryosine kinase (TK) domainを有する90遺伝子に注目し、全検体での exon array の発現を検討した。その中で、図8に示すように遺伝子 X、遺伝子 Y においては明らかにC末端での発現が上昇している検体が存在し、かつ遺伝子 Y においては複数の検体で同様な傾向が認められた。

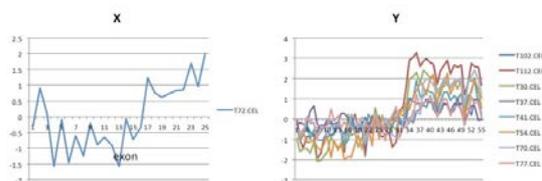


図8. Exon arrayによりスクリーニングされた新規候補融合遺伝子

その他にもいくつか候補遺伝子があったが、特にこの2つの遺伝子においては融合遺伝子を形成している可能性が高いと考えられたため、その遺伝子が抽出された検体の genomic DNA を用いて 5'-RACE 法による N 末端側の遺伝子の同定を試みた。しかし N 末端側の遺伝子同定を行うことが困難であったため、ビオチン標識したプローブを用いた増幅法などいくつかの工夫を重ねたが同様の結果であった。そこで抗体を用いた免疫沈降法などいくつかの工夫を試みたが、いずれの方法によっても同定が困難であり、現在ターゲットキャプチャー・ゲノムシーケンスによる同定を検討している。またその他の候補についても改めて検討を加え、さらに TK だけでなく、融合遺伝子の存在が多く報告されている転写因子についても、今後融合遺伝子のスクリーニングを行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Hamamoto J, Soejima K, Yoda S, et al. Identification of microRNAs differentially expressed between lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma. Mol Med Rep (in press). 査読有.
- ② Terai H, Soejima K, Yasuda H, et al. Activation of the FGF2-FGFR1 Autocrine Pathway: A Novel Mechanism of Acquired Resistance to Gefitinib in NSCLC Cells. Mol Cancer Res, March 27, 2013; doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0652. 査読有.
- ③ Sato T, Arai E, Kohno T, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T, Kanai Y. DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma. PLOS One. 2013;8(3):e59444. doi: 10.1371/journal.pone.0059444. 査読有.
- ④ Mochizuki S, Soejima K, Shimoda M, Abe H, Sasaki A, Okano HJ, Okano H, Okada Y. Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor. J Natl Cancer Inst 104(12): 906-22, 2012. 査読有.
- ⑤ Naoki K, Soejima K, Okamoto H, Hamamoto J, et al. The PCR-Invader method (structure-specific 5' nuclease based method), a sensitive method for detecting EGFR gene mutations in lung cancer specimens; comparison with direct sequencing. Int J Clin Oncol 16(4): 335-44, 2011. 査読有.
- ⑥ Yasuda H, Soejima K, Nakayama S, et al.

Bronchoscopic Microsampling Is a Useful Complementary Diagnostic Tool for Detecting Lung Cancer. *Lung Cancer* 72(1): 32-8, 2011. 査読有.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 扇野圭子, 副島研造, 黒田葵、他. FGF9 (fibroblast growth factor 9) 発現肺癌における臨床および遺伝子発現に関する検討. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会 2013 年 4 月 19-21 日. 東京
- ② K. Ishioka, K. Soejima, Hamamoto J, et al. FGF9 overexpression promotes tumorigenic potential of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells and is associated with poor prognosis in NSCLC. 103th AACR Annual Meeting, Washington, DC. 2013 Apr. 6-10.
- ③ H. Terai, K. Soejima, K. Naoki, et al. Activation of FGF2-FGFR1 pathway in EGFR-mutant lung cancer cell line with long-term gefitinib exposure. 103th AACR Annual Meeting, Washington, DC. 2013 Apr. 6-10.
- ④ K. Soejima. Fibroblast growth factor signaling in lung cancer. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 (International Symposium: Molecular targeted therapy in lung cancer) 2012 年 4 月 20-22 日. 神戸
- ⑤ Ohgino K, Soejima K, Hamamoto J, et al. Expression of fibroblast growth factor-9 is associated with poor prognosis of resected non-small cell lung cancer patients. 102th AACR Annual Meeting, Chicago. 2012 Mar. 31-Apr. 4.
- ⑥ H. Terai, K. Soejima, K. Naoki, et al. Analysis of aberrant DNA methylation and expression of corresponding mRNA in EGFR-TKI-sensitive lung cancer cell line with long-term gefitinib exposure. 第 70 回日本癌学会総会、2011 年 10 月 3-5 日、名古屋
- ⑦ 寺井秀樹, 副島研造, 渡辺真純, 他. 肺癌患者の気道上皮被覆液を用いたプロテオーム解析. 第 34 回日本呼吸器内視鏡学会総会、2011 年 6 月 16,17 日、浜松
- ⑧ 寺井秀樹、副島研造、渡辺真純、他. 肺癌患者における気道上皮被覆液のプロテオーム解析. 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会 2011 年 4 月 22-23 日. 東京
- ⑨ Hamamoto J, Yoda S, Soejima K, et al. Identification of microRNAs differentially expressed between lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma. 101th AACR Annual

Meeting, Orlando. 2011 Apr. 2-6.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

副島 研造 (Soejima Kenzo)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：30236145

(2) 研究分担者

浜本 純子 (Hamamoto Junko)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40570239

猶木 克彦 (Naoki Katsuhiko)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：40265806

寺井 秀樹 (Terai Hideki)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：50445293

佐藤 崇 (Sato Takashi)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20464836

川村 雅文 (Kawamura Masafumi)
慶應義塾大学・医学部・客員教授
研究者番号：70169770

(3) 連携研究者

なし