

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659674

研究課題名(和文) 新手法を用いた膜受容体関連遺伝子異常検索

研究課題名(英文) Investigation for tyrosine kinase mutations using novel methods

研究代表者

藤井 義敬 (Fujii, Yoshitaka)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40156831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌に対する新たな分子標的として2012年にRET遺伝子の転座を共同研究(次世代シーケンス)の中で見いだしFISHプローブの開発を行ってきた。RET融合遺伝子はゲノム上での切断点融合点の違いにより融合バリエーションが報告されており、我々もそのほとんどに応じた変異探索を行った(Yokota et al. Oncol Rep 2012;28: 1187-1192)。RET転座は検索したなかでは270例中3例であったがすべて女性、非喫煙者、腺癌であった。2013年には同様の手法でNTRK1転座を同定した。新たな肺癌分子標的としてBRAF遺伝子変異の免疫染色等での同定法についても検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Molecular targeted therapies such as crizotinib that target ALK fusion and erlotinib or gefitinib that target EGFR mutations have demonstrated superior single agent activity in selected patients as compared to standard chemotherapy regimes in lung cancer treatment. Recently, a series of new gene fusions have been described in patients with lung cancer associated with the kinase domain of the RET and NTRK1 gene using next generation sequencing. We have developed FISH method to detect RET fusions. In our cohort three RET fusion mutants were found, all were female, non-smoker and adenocarcinomas. Point mutation of the BRAF gene is a genetic event in a subset of lung cancer. In addition, BRAF V600E is a driver mutation that can be effectively targeted with selective BRAF and/or MEK inhibitors. To determine the BRAF mutation status in Japanese lung carcinoma, we investigated BRAF V600E mutations by real time-PCR (CAST-PCR) and immunohistochemical methods using mutation specific antibody.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：EGFR RET NTRK1 BRAF CAST-PCR Immunohistochemistry V600E

## 1. 研究開始当初の背景

2004年我々は Dana Farber Cancer Institute との共同研究により肺癌におけるチロシンキナーゼ遺伝子を網羅的に解析し EGFR 遺伝子変異をはじめ同定した(Paez et al. Scinece)。2007年には同研究所との共同研究から肺腺癌の網羅的 SNP 解析を行い、増幅している遺伝子群として EGFR, K-ras, erbB2, NTK-2などを同定した(Weir et al. Nature)。肺癌における EGFR 遺伝子変異は、2008年 IPASS 試験で EGFR 分子標的薬剤感受性因子としての役割がより明確になり以降国内の光富、前門戸らの報告で日本の強いエビデンスとなった。EGFR の下流遺伝子であら BRAF 変異を検索する新たな手法として変異特異的な免疫染色用抗体を用いた方法が注目された。我々も参加した肺癌で次世代シーケンスを用いたチロシンキナーゼ遺伝子群の変異解析の共同研究から、様々な遺伝子転座変異が同定されつつありその機能解析などのデータが望まれていた。

## 2. 研究の目的

非小細胞肺癌患者組織における EGFR(感受性因子)や新規転座である RET 転座、BRAF somatic mutation をシーケンスまたは新たに TaqMan Mutation Detection Assays で real-timePCR の系で confirm し検索し、これらが臨床病理学的因子や他の分子発現とどう結びついているかを検討する。BRAF 遺伝子変異は元来少量%しか存在しないと考えられことから、レーザーマイクロダイセクションを施行し BRAF 変異の定量を行い、検討を加えていく。特に 2013年の ASCO 報告から新たに分子標的治療の可能性が注目された BRAF V600E の点変異は最近確立された変異特異的に同定可能な抗体を用いて免疫染色を行い、関連性を検討する。我々が現在も参加中の肺癌次世代シーケンスプロジェクトから 2012年同定された RET 遺伝子の転座については、PCR や教室で確立した FISH 法により多くの症例を検討して臨床病理学的背景との関連を明らかにする。一方、肺癌(とくに腺癌)で最近同定されてきた NTRK1 遺伝子転座変異の検索は、細胞株を用いて新規抗癌剤感受性試験を行い、分子標的薬剤の使用の可能性について探求を進める。

## 3. 研究の方法

Taq-Man PCR 法により遺伝子変異検索は、一度に約 40 検体を約 2 時間で変異プローブ、野生型プローブと PCR 反応させて、引き続きプログラム解析を行うことができ、解析にかかる時間を短縮できる(competitive allele specific PCR; CAST-PCR)。また本法は変異の割合がわずか 0.1%でも検出可能であるため、シーケンス不良検体でも解析可能となるという利点を有する。肺癌で報告されている BRAFV600E 遺伝子にも応用可能である。変異および野生型双方に特異的な、プローブを作成し、PCR 後の補正プログラミング後検討を行う。この方法で変異率の定量と定性が同時に出来る。現在我々の教室では、ABI 社の real timePCR 法を用いた、遺伝子変異増幅の検出に取り組んでおり、EGFR や BRAF などの遺伝子変異や、変異率、コピー数の同定を行い、薬剤感受性などとの関連をみていく。BRAF の分子標的治療の感受性に関わっているとされる BRAF V600E の点変異は新たに最近国内で確立された変異特異的に同定可能な抗体を用いた免疫染色法を行うが、日本での臨床的バックグラウンドとの関連を網羅的にみた報告は少ない。試験としてダコエンビジョンシステムを採用する。海外では BRAF V600E をターゲットとする薬剤はメラノーマで適応があり、肺癌に対する第 II 相の臨床試験の良好なデータが 2013年のアメリカ癌治療学会(ASCO)で報告された。この方法を利用すれば、大量かつ迅速に変異の有無を確認でき、変異率の肉眼的定量定性が可能である。

RET 転座については変異特異的なプライマーをデザインして RT-PCR 法によって、いくつかの転座バリエーションの検出を試みる。当院で非小細胞肺癌のために手術を施行された症例から RNA を抽出し、逆転写後 PCR 施行、ダイレクトシーケンスでバリエーションタイプの確認を行う。

NTRK1 の遺伝子転座がすでに証明されている KM12 癌細胞株および NTRK2 の過剰発現が示唆される神経内分泌型大細胞肺癌細胞株を用いて、新規 NTRK 阻害剤である AZD7451 を用いて、薬剤感受性試験を施行し、NTRK の下流に存在するタンパクの発現の変化をウエスタンブロットング法で確認する。

## 4. 研究成果

RET 転座は検索したなかでは肺癌 270 例中 3 例であったが、すべて女性、非喫煙者、腺癌であり、EGFR や ALK 遺伝子変異と排他的であった。GSP 研究所の新規 FISH プロ

ープを用いた FISH 法で 2 例の同定が可能であった。

2013 年には新しい分子標的として肺癌における NTRK1 転座を見だし Nature Medicine 誌に報告した(Vaishnavi A et al. Nat Med 19(11): 1469-1472.)。この転座は肺癌の 1%程度と推測される比較的まれな転座であり、当院での手術例の肺癌検体を用いて再解析を施行したが、追加では一例も検出されなかった。しかしながら NTRK の恒常的活性化から癌細胞が増殖するため、細胞実験での検証を進めた。KM12 株および H460 細胞株では AZD7451 に対し感受性を示したが、H810 細胞株では感受性を示さなかった。この感受性のメカニズムは KM12 では NTRK1 高発現の抑制によるもの、H460 株では NTRK2 発現抑制によるものの可能性が示唆された。

BRAF 遺伝子変異の中で頻度が多い V600E 遺伝子変異については変異特異的抗体を用いた免疫組織学的検討も行った。まずは肺癌組織からのダイレクトシーケンスで 4 例の BRAF V600E 変異例を、2 例のその他のタイプの変異例を同定した。このうち V600E 変異例での免疫染色性を確認した。TaqManPCR での腫瘍内の BRAF 変異率は概ね 25%以下であったため、さらに intratumor heterogeneity についての検討を行うべく、パラフィン包埋切片からレーザーマイクロダイセクションを行い、検体から 4-8 カ所をくりぬいて DNA を抽出し、CAST-PCR で BRAF V600E 変異の頻度を確認した。現在結果を解析中である。これらの症例においての BRAF 遺伝子増幅の有無を検討するために、GSP 研究所の BRAF FISH プローブを用いて、FISH による解析を進めているところである。いまのところ FISH での増幅例は 2 例認めしたが、いずれも V600E 変異陽性であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, Mahale S, Davis KD, Aisner DL, Pilling AB, Berge EM, Kim J, Sasaki H, Park S, Haas J, Andrews SW, Lipson D, Stephens PJ, Miller VA, Varella-Garcia M, Janne PA, Doebele RC. Oncogenic and drug sensitive NTRK1 arrangements in lung cancer. Nat Med; 19: 1469-1472, 2013. Doi:10.1038/nm.3352. 査読有り。  
Sasaki H, Shimizu S, Tani Y, Shitara M, Okuda K, Hikosaka Y, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. Usefulness of immunohistochemistry for the detection of the BRAF V600E

mutation in Japanese lung adenocarcinoma. Lung Cancer. ; 82(1): 51-54, 2013. doi: 10.1016/j.lungcan. 2013.06.014. 査読有り。

Sasaki H, Shimizu S, Tani Y, Maekawa M, Okuda K, Yokota K, Shitara M, Hikosaka Y, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. RET expression and detection of KIF5B/RET gene rearrangements in Japanese lung cancer. Cancer Med. ; 1(1):68-75, 2012. Doi:10.1002/cam4.13. 査読有り。

Sasaki H, Shitara M, Yokota K, Okuda K, Hikosaka Y, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. Braf and erbB2 mutations correlate with smoking status in lung cancer patients. Exp Ther Med. ; 3(5):771-775, 2012. 査読有り。

Yokota K, Sasaki H, Okuda K, Shimizu S, Shitara M, Hikosaka Y, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. KIF5B/RET fusion gene in surgically-treated adenocarcinoma of the lung. Oncol Rep. ; 28(4):1187-1192, 2012. Doi.10.3892/or.2012.1908. 査読有り。

Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, Curran JA, Balasubramanian S, Bloom T, Brennan KW, Donahue A, Downing SR, Frampton GM, Garcia L, Juhn F, Mitchell KC, White E, White J, Zwirko Z, Peretz T, Nechushtan H, Soussan-Gutman L, Kim J, Sasaki H, Kim HR, Park SI, Ercan D, Sheehan CE, Ross JS, Cronin MT, Janne PA, Stephens PJ. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. Nat Med. ; 18(3):382-384, 2012. doi: 10.1038/nm.2673. 査読有り。

〔学会発表〕(計 3 件)

Sasaki H, Shimizu S, Tani Y, Okuda K, Hikosaka Y, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. KIF5B/RET fusion gene in surgically-treated Japanese adenocarcinoma of the lung. 15th World Conference on Lung Cancer October 27-31st, 2013. (Sydney, Australia).

佐々木秀文, 奥田勝裕, 森山 悟, 矢野智紀, 藤井義敬. 肺癌における新規 599T 挿入変異とダコエンビジョンフレックス系を用いた V600E 抗体による免疫組織学的検索. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3-5 日(横浜).

佐々木秀文, 設楽将之, 奥田勝裕, 彦坂雄, 森山 悟, 矢野智紀, 藤井義敬. Dako Envision FLEX と BRAFV600E 特異的抗体を用いた肺癌における BRAF 遺伝子変異免疫組織学的検索. 第66回日本胸部外科学会定期学術集会, 2013年10月16-19日(仙台).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: KIF5B 遺伝子と RET 遺伝子との間の転座を検出する FISH アッセイ

発明者: 佐々木秀文

権利者: 名古屋市立大学、ダコジャパン株式会社、株式会社 GSP 研究所

種類: 特許

番号: 2012-015939

出願年月日: 2012年1月27日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井 義敬 (FUJII YOSHITAKA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科  
・教授

研究者番号: 40156831

### (2) 研究分担者

佐々木 秀文 (SASAKI HIDEFUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科  
・准教授

研究者番号: 00336695

矢野 智紀 (YANO MOTOKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科  
・准教授

研究者番号: 40315833