

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460446

研究課題名(和文) KIF5B-RET転座陽性肺癌症例の臨床病理像の解析

研究課題名(英文) Clinicopathological analysis of Ret-rearranged lung carcinoma

研究代表者

蔦 幸治 (TSUTA, Koji)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：00392332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：RET転座肺癌の臨床病理像を明らかにする。FISH法/RT-PCR法でRET転座肺癌22例を見いだした。全て腺癌で、若年発症、非喫煙者に多い傾向が認められた。微小検体からRET転座を見つけるためにデジタルカウント法の有用性を確認した。各種遺伝子異常と殺細胞性抗癌剤の治療効果予測因子 III-tubulin、RRM1、Thymidylate SynthaseならびにPD-L1の発現の比較検討を行った。RET転座肺癌では III-tubulin、RRM1、TSいずれも野生型遺伝子と比較し差を認めなかったが、PD-L1が低発現を示していた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the clinicopathological factors of RET-rearranged lung carcinoma. We detected 22 (1.2%) of RET-rearranged lung carcinoma. All of them were adenocarcinoma histology and they tended to be younger age occurrence and no smoking history. To develop the diagnostic test for small sample, we evaluated the utility of digital mRNA count method. To evaluate the desirable combination therapy in RET-rearranged lung carcinoma, we analyzed the expression pattern for III-tubulin, ribonucleotide reductase subunit M1, thymidylate synthase, and programmed cell death 1 receptor expression. There were no differences in III-tubulin, ribonucleotide reductase subunit M1, and thymidylate synthase expression between RET-rearranged lung carcinoma and wild type adenocarcinoma. Whereas, PD-L1 low expression was observed in RET-rearranged lung carcinoma compared to wild type adenocarcinoma.

研究分野：病理

キーワード：病理 肺癌 RET

【1. 研究開始当初の背景】

肺癌、特に腺癌においては腫瘍化の原因と考えられる遺伝子異常が同定され、それらに対する分子標的治療が開始され、一部の腫瘍においては劇的な効果を上げている。肺腺癌の遺伝子異常は上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異が約 40%を占め次いで K-ras 変異が原因と考えられている。我々は国立がん研究センター研究所ゲノム生物学研究分野 分野長 河野隆志らとともに 30 例の肺腺癌の全トランスクリプトームシーケンシングにより、ALK 転座症例と同様の同一染色体上の遺伝子と受容体型チロシンキナーゼ癌遺伝子のインフレーション融合転写産物である KIF5B-RET 融合を同定した [1]。本融合は日本人肺腺癌の 6/319 (2%) に検出され、この 6 例はどれも EGFR, KRAS, ALK がん遺伝子と排他的で、新規チロシンキナーゼ融合遺伝子 cDNA を導入した細胞は足場非依存性増殖能を獲得したことから Driver と考えられた。また、キナーゼに対する阻害剤を培養上清に加えると当該増殖能が抑制されたことから、KIF5B-RET 融合遺伝子は有望な治療標的であると考えられた。RET 遺伝子異常に対するチロシンキナーゼ阻害剤は既に他癌腫に使用されており、早期の臨床応用が期待され RET 阻害剤による治療が開始されている。

【2. 研究の目的】

- (1) 本転座を有する症例の臨床病理像を明らかにする
- (2) FISH 法ならびに適切な検出手法を確立する
- (3) 微小検体などでも効率の良い診断手法の開発
- (4) 他の殺細胞性などの抗腫瘍薬との併用が可能かを検証する

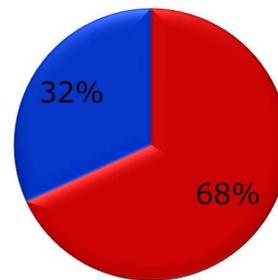
【3. 研究の方法】

- (1)(2) 手術検体から作成した肺癌の約 3,000 例の Tissue micro array (TMA) を用いて本転座により活性化される受容体蛋白質の免疫組織学的解析、FISH による確定を行い本転座症例の臨床病理像を明らかにする。
- (3) 微小検体から RET 転座を有用に見つける方法を開発するために nCounter によるデジタルカウント法を手術検体で 38 の融合遺伝子プローブならびに 24 の野生型の遺伝子に対する 5' ならびに 3' のインバランスアッセイのプローブの有用性を検討する
- (4) 殺細胞性抗腫瘍剤に対する治療効果予測因子 III-tubulin (ピンカアルカロイド系) Ribonucleotide reductase subunit M1 (ゲムシタピン)、Thymidylate Synthase (チミジル酸合成酵素阻害剤) ならびに免疫調整因子である PD-L1 のタンパク発現について免疫組織学的に検討を行い本遺伝子転座症例に併用が望ましい薬剤がないか検討を行う。

【4. 研究成果】

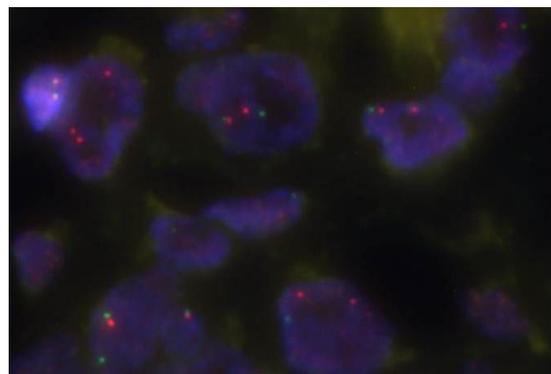
- (1) RET 遺伝子融合は肺腺癌の 0.7%に同定され全例組織型は腺癌であった。非喫煙者に多い傾向が若年発症傾向があるが性差は認めなかった。腫瘍の大きさやステージとは相関せず、予後因子ではなかった。既知のがん遺伝子変異である EGFR 変異、KRAS 変異、HER2 変異、ALK 遺伝子融合と相互排他的である。RET 融合陽性例は乳頭状増殖や肺胞上皮置換性増殖優位型に多い傾向がある。粘液産生細胞を認める例が多いが多くは小領域で生検等で有用な所見とは言えないと考えられた。
- (2) 転座により RET タンパクが活性化されることから免疫染色がスクリーニングに有用と考えられたが、RET 転座例の 71%のみに陽性とならなかったためにスクリーニングとしては ALK の様には使えないことが明らかとなった。

転座陽性22例における免疫染色陽性



■ 陽性 ■ 陰性

FISH 分離プローブは感度は良いが特異性が完全ではなく、転座パートナーである KIF5B や CCDC6 の分離プローブの 2 種類を併用するのが望ましいことが明らかとなった。現在、我々のデザインした FISH プローブを用いて前向き臨床試験が行われており結果が期待される。



- (3) nCounter によるデジタルカウント法を用いて手術検体を用いて検討したところ、RT-PCR データーとの相関が得られた。2 例の術前生検が存在する症例ならびに 18 例の鉗子洗浄液の存在するセットにおいても有用性が証明できた。関西医科大学にも nCounter system が導入されたので今後新たに前向き検討を行っていきたいと考えている。
- (4) 殺細胞性抗腫瘍剤の治療効果予測因子の免

疫組織学的な検討ではRET 転座を有する肺癌では III-tubulin, Ribonucleotide reductase subunit M1, Thymidylate Synthase いずれも野生型遺伝子と比較し差を認めなかったが、免疫調整薬のターゲットと考えられる PD-L1 が低発現を示していた。

参考文献

[1] Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T, KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma, Nat Med, 査読有り, Vol. 18, No.3, 2012, pp.375-377、

【 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 11 件)

Kamata T, Yoshida A, Shiraishi K, Furuta K, Kosuge T, Watanabe S, Asamura H, Tsuta K, Mucinous micropapillary pattern in lung adenocarcinomas: a unique histology with genetic correlates, Histopathology, 査読有り, Vol.68, No.3, 2016, pp.356-366、

Kamata T, Sunami K, Yoshida A, Shiraishi K, Furuta K, Shimada Y, Katai H, Watanabe S, Asamura H, Kohno T, Tsuta K, Frequent BRAF or EGFR Mutations in Ciliated Muconodular Papillary Tumors of the Lung, J Thorac Oncol, 査読有り, Vol. 11, No.2, 2016, pp.261-265、

Watanabe Y, Shiraishi K, Takahashi F, Yoshida A, Suzuki K, Asamura H, Takeuchi M, Furuta K, Tsuta K, Biomarker expression and druggable gene alterations for development of an appropriate therapeutic protocol for pulmonary adenosquamous carcinoma, Histopathology, 査読有り, Vol.66, No.7, 2015, pp.939-948、

Mimori T, Kobayashi S, Tanaka A, Sasada S, Yoshida A, Izumo T, Sasaki N, Tsuchida T, Tsuta K, Novel use for an EGFR mutation-specific antibody in discriminating lung adenocarcinoma from reactive pneumocyte hyperplasia, Histopathology, 査読有り, Vol.66, No.6, 2015, pp.816-823、

Kamata T, Yoshida A, Kosuge T, Watanabe S, Asamura H, Tsuta K, Ciliated muconodular

papillary tumors of the lung: a clinicopathologic analysis of 10 cases, Am J Surg Pathol, 査読有り, Vol.39, No.6, 2015, pp.753-760、

Katsuya Y, Yoshida A, Watanabe S, Tsuta K, Tumour-to-tumour metastasis from papillary thyroid carcinoma with BRAF mutation to lung adenocarcinoma with EGFR mutation: the utility of mutation-specific antibodies, Histopathology, 査読有り, Vol.67, No.2, 2015, pp.262-266、

Katsuya Y, Fujita Y, Horinouchi H, Ohe Y, Watanabe S, Tsuta K, Immunohistochemical status of PD-L1 in thymoma and thymic carcinoma, Lung Cancer, 査読有り, Vol.88, No.2, 2015, pp.154-159、

Suzuki M, Shiraishi K, Yoshida A, Shimada Y, Suzuki K, Asamura H, Furuta K, Kohno T, Tsuta K, HER2 gene mutations in non-small cell lung carcinomas: concurrence with Her2 gene amplification and Her2 protein expression and phosphorylation, Lung Cancer, 査読有り, Vol.87, No.1, 2015, pp.14-22、

Tsuta K, Kohno T, Yoshida A, Shimada Y, Asamura H, Furuta K, Kushima R, RET-rearranged non-small-cell lung carcinoma: a clinicopathological and molecular analysis, Br J Cancer, 査読有り, Vol.110, No.6, 2014, pp.1571-1578、

Toriyama A, Mori T, Sekine S, Yoshida A, Hino O, Tsuta K, Utility of PAX8 mouse monoclonal antibody in the diagnosis of thyroid, thymic, pleural and lung tumours: a comparison with polyclonal PAX8 antibody, Histopathology, 査読有り, Vol.65, No.4, 2014, pp.465-472、

Tsuta K, Kawago M, Yoshida A, Sekine S, Asamura H, Furuta K, Kushima R, Primary lung adenocarcinoma with morule-like components: a unique histologic hallmark of aggressive behavior and EGFR mutation, Lung Cancer, 査読有り, Vol.85, No.1, 2014, pp.12-18、

〔学会発表〕(計 1 件)

薦 幸治 肺腫瘍の癌化責任遺伝子と病理診断 (教育講演) 第 2 回 Kanagawa Bioforum on Thoracic Oncology 平成 26 年 10 月 30 日 横浜 横浜イーストスクエアビル

薦 幸治 固形腫瘍における融合遺伝子解析の新展開 組織像との接点:RET 転座を有する肺癌の臨床病理像(シンポジウム) 日本病理学会 平成 25 年 6 月 7 日 札幌 ロイトン札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

特許取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

特になし

【 6 . 研究組織】

(1)研究代表者

蔦 幸治（TSUTA, Koji）

関西医科大学 医学部 教授

研究者番号：00392332

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

（ ）

研究者番号：