

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 5 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871072

研究課題名(和文)大腸癌における新しいチロシンキナーゼ融合遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identification of novel tyrosine kinase fusion genes in colorectal cancer

研究代表者

坂田 征士(SAKATA, Seiji)

公益財団法人がん研究会・分子標的病理プロジェクト・研究員

研究者番号：00617433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：病理組織学手法を基盤とした融合遺伝子スクリーニング法を用いて、大腸癌において数種類の新しいチロシンキナーゼ融合遺伝子を同定した。融合遺伝子を有する大腸癌の臨床病理学検討や大腸癌によくみられる遺伝子変異についても解析した。現在、同定した融合遺伝子に対して、造腫瘍能や阻害剤による抑制効果を検証中である。

研究成果の概要(英文)：We found several novel tyrosine kinase fusion genes in colorectal cancer using a histopathology-based screening system. We analyzed clinicopathological data and other gene mutations in colorectal cancers with the identified fusion genes. We are investigating tumorigenicity and drug sensitivity of the identified fusion genes.

研究分野：人体病理学

キーワード：チロシンキナーゼ 融合遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、世界第3位と罹患数の多い悪性腫瘍の一つで、その死亡数も世界第4位と多い。大腸癌の治療は手術療法が主であり、早期に治療されれば根治の可能性も高い。しかし、進行大腸癌や再発症例など手術不可能な症例では、多剤併用療法が主体となっている。近年では、*VEGF* や *EGFR* をターゲットとした分子標的治療が導入され、治療成績の改善がみられるが、それらは大腸癌の癌化に必須な分子ではなく、劇的な効果を示すには至っていない。そのため、新しい治療ターゲットの発見が望まれている。

チロシンキナーゼの異常な活性化は、癌の発生や増殖に大きく関わっていると考えられている。チロシンキナーゼ融合遺伝子は、慢性骨髄性白血病にみられる *BCR-ABL* など、多くは血液系悪性腫瘍でみられる。しかし、当初、悪性リンパ腫において発見された anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) 融合遺伝子が、2007年に Soda らにより肺癌で発見された。*ALK* 融合遺伝子を有する肺癌では、*ALK* 阻害剤による劇的な効果がみられ、現在臨床応用されるまでに至っている。*ALK* 阻害剤の他、すでに数種のチロシンキナーゼ阻害剤が固形癌においても臨床応用されており、新しい治療標的となりうるチロシンキナーゼ融合遺伝子の発見が期待されている。申請者は共同研究者として、肺癌における *ROS1*、*RET* の融合遺伝子や腎癌の *ALK* 融合遺伝子を報告しており、これらは新しい治療ターゲットとして注目されている。

大腸癌において、チロシンキナーゼ融合遺伝子は現在までに5例報告されているが、いずれも検索した症例数が少ない。そのため、大規模かつ網羅的にチロシンキナーゼ融合遺伝子を調べる必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸癌において新しいチロシンキナーゼ融合遺伝子を同定すること、である。大腸癌は罹患数および死亡数の多い悪性腫瘍の一つであるが、大腸癌の癌化に必須な遺伝子をターゲットとした治療法は確立されていない。チロシンキナーゼである *ALK* の融合遺伝子が肺癌で発見され、その融合遺伝子を有する肺癌に対し *ALK* 阻害薬が臨床応用されるまでに至っている。大腸癌を含む肺癌以外の固形癌においても、チロシンキナーゼ融合遺伝子が報告されており、本研究で大腸癌の新しい分子標的薬の導入に向けて、治療ターゲットとなる融合遺伝子を探索する。

### 3. 研究の方法

<計画>

大多数の大腸癌症例をスクリーニングするために組織アレイを作成し、以下に述べた方法で大規模かつ網羅的にチロシンキナーゼ融合遺伝子探索する。組織アレイは、2001年から2011年までの間にがん研有明病院にて切除され、病理組織学的診断が行われた大腸癌症例約1,500例を対象としてホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから腫瘍部分を径1mm大でくり抜き、それらを順に並べてパラフィン包埋し作成。

<方法>

A 平成25年度

- 1) チロシンキナーゼ遺伝子(数十種)の split FISH によりスクリーニングを行う。FISH プローブを設計および作成するに当たり、bacterial artificial chromosome (BAC) クロームを用いる。

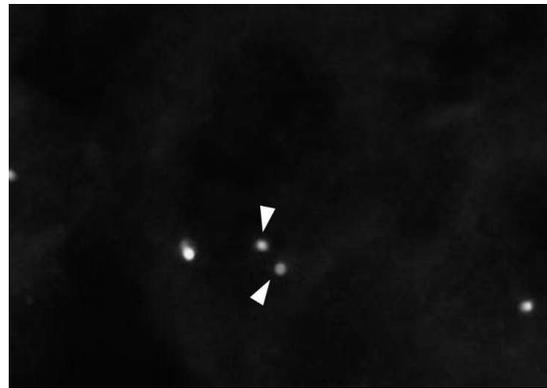


図1. RTK split FISH 陽性像 (矢印は陽性シグナル)

- 2) 1)で得られた候補症例に対し、凍結検体もしくはパラフィン包埋検体を用いた5'-RACE や inverse RT-PCR 法により融合遺伝子を同定する。上記により同定できない場合は、次世代シーケンサーでのディープシーケンスで同定する。
- 3) 同定された融合遺伝子の完全長 cDNA を取得し、focus formation assay やヌードマウス造腫瘍 assay などによる融合遺伝子の造腫瘍能の証明、キナーゼ阻害薬を用いた治療効果実験を行う。

B. 平成26年度

25年度中にほぼスクリーニングを終え、融合遺伝子の候補症例に対し、上記に記述した2-3)を引き続きを行う。融合遺伝子を有する大腸癌症例の集積後、それらについて臨床病理学的に検討する。*APC*、*KRAS*、*BRAF*、*TP53* などの大腸癌によくみられる変異をホットスポットを中心にシーケンズ解析する。

#### 4. 研究成果

大腸癌において、数種のチロシンキナーゼ融合遺伝子を新規同定した。



図2. 同定した融合遺伝子の模式図例

同定した融合遺伝子には focus formation assay やヌードマウス造腫瘍 assay により造腫瘍能が認められ、キナーゼ阻害剤による抑制効果が確認された。この結果は、今後我々が同定した融合遺伝子を有する大腸癌において、阻害薬の臨床応用に結びつくものとして有用な結果であった。

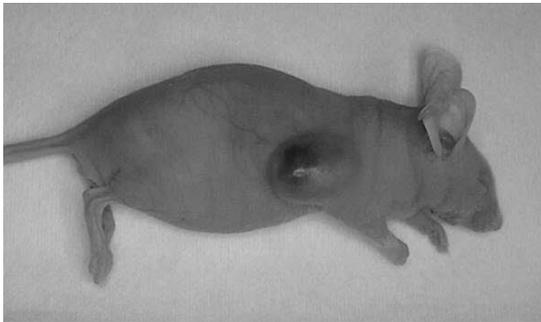


図3. 同定した融合遺伝子の in vivo による造腫瘍能の確認

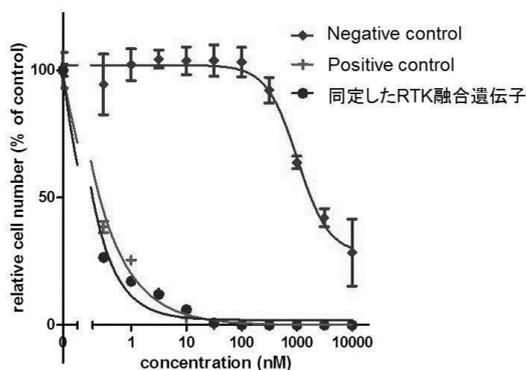


図4. 同定した融合遺伝子における阻害薬に対する感受性試験

融合遺伝子を有する大腸癌の臨床病理学検討や *APC*, *KRAS*, *BRAF*, *TP53* などの大腸癌によくみられる遺伝子変異、microsatellite instability についても解析した。

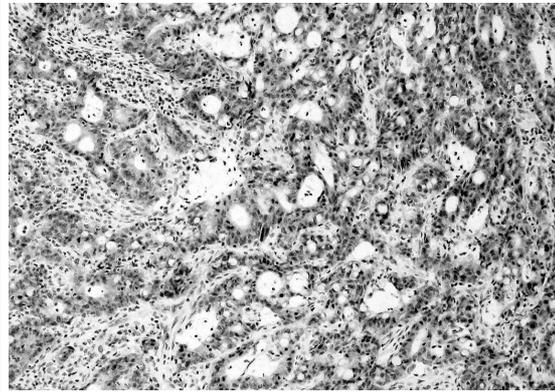


図5. 我々が発見した新規 RTK 融合遺伝子陽性大腸癌症例の組織像

現在、最終年度に同定した融合遺伝子に対して、造腫瘍能や阻害剤による抑制効果を検証中である。

#### 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 2 件)

坂田征士, 竹内賢吾 (共同執筆), 固形腫瘍と融合遺伝子: オーバービュー, 細胞, 2013;6:264-267. 査読なし

竹内賢吾, 坂田征士 (共同執筆), 上皮性腫瘍における融合遺伝子, 実験医学, 2014;32:1948-1954. 査読なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: NTRK3 融合体の検出法

発明者: 竹内賢吾、富樫由紀、坂田征士、馬場響子

権利者: がん研究会

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/069737

出願年月日: 2014.07.25

国内外の別: 国外

名称: 新規融合体及びその検出法(ALK)

発明者: 竹内賢吾、富樫由紀、坂田征士、藤田直也、片山量平

権利者: がん研究会

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/078728

出願年月日: 2014.10.29

国内外の別: 国外

名称: 新規融合体及びその検出法(NTRK1)

発明者: 竹内賢吾、朝賀礼美、坂田征士、藤田直也、片山量平

権利者: がん研究会

種類：特許  
番号：PCT/JP2014/078729  
出願年月日：2014.10.29  
国内外の別： 国外

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

坂田 征士 (SAKATA, Seiji)  
公益財団法人がん研究会・分子標的プロジェクト・研究員  
研究者番号：00617433