

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293200

研究課題名(和文)肺発がんドライバー変異であるがん遺伝子融合の発生機構の解明

研究課題名(英文)Study on molecular procedures developing oncogene fusion-positive lung cancer

研究代表者

河野 隆志 (Takashi, Kohno)

国立研究開発法人国立がん研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：80280783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺発がんドライバー変異であるがん遺伝子融合やそれを有する肺腺がんの発生機構を明らかにすることを目的とした。ALK, RET, ROS1融合陽性肺腺がんでは、Cancer-census遺伝子の異常が少なく、遺伝子融合を主体として発がんに至ることを見出した。この結果は、融合陽性例では、融合遺伝子産物を標的とした分子標的治療が選択されることをサポートする結果である。ALK, RET, ROS1遺伝子座には、数-Kbの切断ホットスポットが存在し、非相同末端結合とsynthesis-dependent end-joiningによる切断断端の誤った再結合が遺伝子融合の発生機序であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate molecular procedures for oncogene fusion and carcinogenic pathways developing oncogene fusion positive lung cancer. The driver fusion cases showed a distinct profile with smaller numbers of non-synonymous mutations in cancer-related genes, indicating that lung adenocarcinomas (LADCs) with ALK, RET, and ROS1 fusions develop exclusively via their dependence on these oncogene fusions. The presence of such few alterations beyond the fusions supports the use of monotherapy with tyrosine kinase inhibitors targeting the fusion products in fusion-positive LADCs. Structural analysis of breakpoint junctions of ALK, RET, and ROS1 fusions demonstrated that oncogene fusion is produced by illegitimate repair of DSBs at unspecified sites in genomic regions of a few kb through DNA synthesis-dependent or -independent end-joining pathways.

研究分野：がん遺伝学

キーワード：遺伝子融合 肺がん 非相同末端結合 RET 分子標的治療 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、がん細胞における体細胞変化、肺がん患者が有する遺伝要因(遺伝子多型)という両観点のゲノム解析を行ってきた。その結果、前者では、肺腺がん30例の全RNAシーケンシングを行い、新規ドライバー遺伝子変化としてRETがん遺伝子融合の同定に至った(Kohno et al, Nat Med, 2012)。RET融合は全肺腺がんの2%にみられ、第10染色体の逆位により生じる。また、特徴として、このゲノム異常は、非喫煙者・軽度喫煙者、そして、若年者に多い(検出された、陽性例のうち、最若年者は28才非喫煙者)。現在、融合陽性例に対してRET阻害剤であるバンデタニブの医師主導治験が開始され、申請者は遺伝子検査主任として監督する立場にある。すでに陽性例における治療効果が見られていることから、肺がんでは、これまでに非喫煙者・軽度喫煙者にみられるALK遺伝子融合(全肺腺がんの3-5%)、ROS1遺伝子融合(2%)とならんで、染色体転座や逆位によるがん遺伝子の融合が、がん化の原因であり、治療標的ともなる重要な変化であることがわかる。また、これらの遺伝子異常(特にRET融合、ROS1融合)は、アジア人に多い傾向が見られている(Kohno et al, reviewed in Cancer Science, 2013)。好発要因の解明は、がん死因のトップを占める肺がん罹患の減少に大きな力となる。しかしながら、肺発がんリスクの少ない非喫煙者・軽度喫煙者や若年者に、なぜこのような遺伝子融合をもたらすようなゲノム変化が生じ、がん化に至らせるのかは全く不明であった。

一方、申請者は、肺腺がん患者6,000例の血液DNAを用いた全ゲノム100万多型の関連解析(GWAS)を行うことにより、肺腺がん罹患への感受性要因として、既知のTERT、TP63に加えて、BPTF、BTNL2の遺伝子多型を同定した(Shiraishi et al, Nat Genet,

2012)。これらの遺伝子座は、アジア人に関連が強く、非喫煙者の罹患リスクに影響が深いという知見を得ている(Lan et al., Nat Genet, 2013)。しかしながら、これらの感受性遺伝子多型と遺伝子融合陽性肺腺がんの発症との関わりは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、肺腺がんの体細胞変化と胚細胞変化(遺伝子多型)の情報を組み合わせることにより、いまだ解明されていない肺腺発がんドライバー変異であるがん遺伝子融合やそれを有する肺腺がんの発生機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、RET, ALK, ROS1 遺伝子融合と感受性多型危険アレル保持状態との関連、他のCancer Census 遺伝子群の体細胞変異との関連、遺伝子融合のゲノム切断点・結合部位の特徴からのゲノム不安定化機序の理解を通じて、発生機序の解明を行うものである。

3. 研究の方法

目的の項 - の解析を行う。

RET, ALK, ROS1 遺伝子融合と感受性多型危険アレル保持状態との関連解析：Taqman PCR 法等を用い、遺伝子融合肺腺がん、また、比較対象としてEGFR変異がん等で調べ、年齢、性別、喫煙を考慮しながら関与を推定する。

融合陽性・陰性がんにおけるCancer Census 遺伝子群体細胞変異の比較解析：全エクソンシーケンスデータを比較することにより、p53, p16のようながん抑制遺伝子、PIK3CA等のがん遺伝子、クロマチンリモデリング遺伝子群などの変異、あるいは総変異数を比較し、融合陽性例に蓄積しているドライバー遺伝子変化に加わる遺伝子異常の蓄積の特徴を明らかにする。

ゲノム切断点・結合部位の構造解析による遺伝子融合の機序の推定：融合がん遺伝子の全エクソン・イントロンゲノム DNA をゲノムキャプチャー法で捕捉し、高速シーケンサー解析を行うことにより切断点の分布の解析を行う。遺伝子融合ゲノム切断点で人工的な DNA 切断を生じさせ、ヒト細胞内での融合を発生させる実験系の構築を行い検証する。

4 . 研究成果

RET, ALK, ROS1 遺伝子融合と感受性多型危険アレル保持状態との関連

ALK, RET, ROS1 融合陽性例、陰性例、非がん対照群について、血液等非がん組織 DNA から抽出した DNA を用いて、肺腺がん感受性遺伝子座の多型アレル分布を比較し、危険アレル数の蓄積が融合陽性がんのリスクとなるかを全ゲノムレベルで比較を行った。しかしながら、既知の肺がん感受性遺伝子座や TP53 など DNA 切断修復やチェックポイントに関わる遺伝子座の関連が融合陽性例で特異的に強いという傾向は見られなかった。よって、遺伝要因の関与は低いと考えられた。

他の Cancer Census 遺伝子群の体細胞変異との関連

ALK, RET, ROS1 融合陽性肺腺がんでは、Cancer-census 遺伝子の異常が少なく、遺伝子融合を主体として発がんに至る結果を得た。これに合致して、融合陽性例特異的な遺伝子異常は見られないという結論を得た。この結果は、遺伝子融合陽性例では、融合遺伝子産物を標的とした分子標的治療が選択されることをサポートする結果である。

ゲノム切断点・結合部位の構造解析による遺伝子融合の機序の推定

ALK, RET, ROS1 の遺伝子座には、数-Kb の切断ホットスポットが存在すること、また、遺伝子融合をもたらす切断 DNA の再結合には、非相同末端結合と synthesis-dependent end-joining (部分的には、非相同末端結合の行程が含まれる) という二つの切断 DNA 修復機構が関与していることを見出した。

CRISPR 法を用いて、実際のがん試料で特定された遺伝子融合ゲノム切断点で人工的な DNA 切断を生じさせ、ヒト細胞内での融合を発生させる実験系を構築した。その切断点には、非相同末端結合の痕跡が見られた。よって、融合の発生を分子レベルで証明できたといえる。

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 7 件)

1. Saito M, Shiraishi K, Kunitoh H, Takenoshita S, Yokota J, Kohno T*. Gene aberrations for precision medicine against lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2016 Jun;107(6):713-20. doi: 10.1111/cas.12941.

2. Sunami K, Furuta K, Tsuta K, Sasada S, Izumo T, Nakaoku T, Shimada Y, Saito M, Nokihara H, Watanabe S, Ohe Y, Kohno T*. Multiplex Diagnosis of Oncogenic Fusion and MET Exon Skipping by Molecular Counting Using Formalin-Fixed Paraffin Embedded Lung Adenocarcinoma Tissues. *J Thorac Oncol.* 2016 Feb;11(2):203-12. doi: 10.1016/j.jtho.2015.10.005

3. Seki Y, Mizukami T, Kohno T*. Molecular Process Producing Oncogene Fusion in Lung Cancer Cells by Illegitimate Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Biomolecules.* 2015 Sep 30;5(4):2464-76. doi: 10.3390/biom5042464.

4. Saito M, Shimada Y, Shiraishi K, Sakamoto H, Tsuta K, Totsuka H, Chiku S, Ichikawa H, Kato M, Watanabe S, Yoshida

T, Yokota J, Kohno T*. Development of lung adenocarcinomas with exclusive dependence on oncogene fusions. Cancer Res. 2015 Jun 1;75(11):2264-71. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3282

5. Kohno T*, Nakaoku T, Tsuta K, Tsuchihara K, Matsumoto S, Yoh K, Goto K. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. Transl Lung Cancer Res. 2015 Apr;4(2):156-64. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2014.11.11

6. Saito M, Ishigame T, Tsuta K, Kumamoto K, Imai T, Kohno T*. A mouse model of KIF5B-RET fusion-dependent lung tumorigenesis. Carcinogenesis. 2014 Nov;35(11):2452-6. doi: 10.1093/carcin/bgu158

7. Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, Shiraishi K, Sakamoto H, Enari M, Furuta K, Shimada Y, Ogiwara H, Watanabe S, Nokihara H, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Ishigame T, Schetter AJ, Okayama H, Harris CC, Kim YH, Mishima M, Yokota J, Yoshida T, Kohno T*. Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2014 Jun 15;20(12):3087-93. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0107

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 河野隆志. 喫煙者・非喫煙者肺がんにおけるドライバー遺伝子異常の差異と発生機序. 第56回日本肺癌学会学術集会(招待講演). 2015.11.25-26. 横浜

2. Ogiwara H, Kohno T. Personalized medicine of lung cancer using RET oncogene fusion and SWI/SNF chromatin remodeling deficiency. 第5回日米修復会議. 2014年10月28日~2014年10月31日. 徳島

3. Kohno T. Personalized medicine of lung cancer using RET oncogene fusion and SWI/SNF chromatin remodeling deficiency. 第73回日本癌学会学術総会. 2014年09月25日~2014年09月27日. 横浜

4. Saito M, Kohno T. Genetic aberration profile of lung adenocarcinoma with oncogenic ALK, RET, and ROS1 fusions. 第73回日本癌学会学術総会. 2014年09月25日~2014年09月27日. 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 1 件)

名称: KIF5B 遺伝子と RET 遺伝子との融合遺伝子、並びに該融合遺伝子を標的としたがん治療の有効性を判定する方法

発明者: 河野隆志、薦幸治

権利者: 国立がん研究センター

種類: 特許

番号: 特許第 6032616 号

取得年月日: 2016年11月4日

国内外の別: 国内

番号: 9216172

取得年月日: 2015年12月22日

国内外の別: 国外(米国)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.nccri.ncc.go.jp/s010/010/010/20151209215834.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

河野 隆志 (KOHNO, Takashi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・

研究所・分野長

研究者番号: 80280783