

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461039

研究課題名(和文) KRAS変異陰性膵がんの治療標的となる遺伝子異常の同定

研究課題名(英文) Driver and druggable oncogene aberrations in KRAS mutation-negative pancreatic ductal adenocarcinoma

研究代表者

上野 秀樹 (Ueno, Hideki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号：10307522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：目的はKRAS変異陰性膵がんの治療標的となる遺伝子異常を同定することである。浸潤性膵管がん100例から同定されたKRAS陰性4例について、全エクソン/RNAシーケンス解析を行い、RRAS遺伝子活性化変異とDCTN1-ALK遺伝子融合を同定した。DCTN1-ALK融合は、ALKキナーゼ活性の恒常活性化、Ba/F3細胞のIL3非依存的増殖を起し、その活性化や細胞増殖は薬事承認薬crizotinibやalectinibで阻害された。以上より、KRAS変異陰性膵がんでは、ALK融合やRRAS変異がdriver変異となること、ALK融合に関しては既存承認薬の治療標的となることが見出された。

研究成果の概要(英文)：Oncogenic mutations in the KRAS gene are a well-known driver event, occurring in >95% of pancreatic cancers. The objective of this study was to identify driver oncogene aberrations in pancreatic cancers without the KRAS mutation. Whole exome and transcriptome sequencing was performed on four cases of KRAS mutation-negative pancreatic ductal adenocarcinoma, which were identified in a cohort of 100 cases. One case harbored an oncogenic DCTN1 (dynactin 1)-ALK fusion. The fusion gene enabled IL-3-independent growth of Ba/F3 cells and rendered them susceptible to the ALK tyrosine kinase inhibitors crizotinib and alectinib. Another case harbored an oncogenic RRAS mutation that activated the GTPase of the RRAS protein. The results suggest that rare oncogenic aberrations, such as the ALK fusion and RRAS mutation, drive pancreatic carcinogenesis independent of the KRAS mutation and can be a therapeutic target.

研究分野：がん遺伝学

キーワード：膵がん 遺伝子融合 治療標的 KRAS遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

膵がんは予後不良な難治がんである。日本では年間約3万人が膵がんのために亡くなっている。これは悪性腫瘍による死因の第5位を占めており、その数は増加傾向にある。膵がん患者全体の5年生存率は約5%と極めて不良であり、切除例であっても20%前後に過ぎない。早期発見が困難な上に、有効な薬物療法が限られていることが膵がんの予後を不良にしており、有効な新規治療の開発は急務である。

膵発がんでは、約90%に生じるKRASの活性化変異がdriver変異と考えられており、CDKN2A, TP53, SMAD4の異常がこれらに協調して進行すると考えられている。これらに関しては、KRAS経路を対象とした分子標的治療の研究が世界的に進行している。一方、KRAS変異陰性の膵がんに関しては、driver変異が何であるのか、もしくはKRAS遺伝子以外の既知変異が多数蓄積しているのかなど、情報が無い。これは、近年のアメリカ、オーストラリア、カナダの3カ国で実施されたABO collaboration studyでも明らかにされていない (Biankin AV, et al. Nature 491:399-405, 2012)。申請者はこれまでに、肝胆膵腫瘍の臨床試験に参画するとともに、治療標的となる遺伝子の解析を進めてきた。その中で、世界的にKRAS陰性膵がんに関する知見が乏しく少ないこと、また、本邦膵がん症例の遺伝子解析がほとんど行われていないことを鑑み、本研究の申請に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的はKRAS変異陰性膵がんにおける治療標的となりうる遺伝子異常を同定することである。そこで、KRAS変異陰性膵がんについて高速シーケンサーを用いたシーケンス解析により治療標的となりうる新規融合遺伝子、遺伝子変異、遺伝子増幅の同定を行い、同定された遺伝子異常について、頻度や診療情報との関連を明らかにする方針とした。また、異常遺伝子産物の機能解析を行い、臨床現場での治療標的としての可能性を検討するとともに、ゲノム解析や免疫染色等の診断法を開発する。

3. 研究の方法

以下に従い、高速シーケンサーを用いて、KRAS陰性膵がんの治療標的となりうる遺伝子異常を同定する。

浸潤性膵管がん切除例の凍結保存検体102例を対象に、既知の治療関連候補遺伝子を搭載したCancer Panelを用いてTarget Sequencingを行い、既知遺伝子異常を把握する(試料入手済、IRB申請通過済)。

全体の約5-10%に存在するKRAS変異陰性

の膵がん切除例検体および細胞株を対象に、次世代高速シーケンサーを用いた全トランスクリプトームシーケンス解析、全エクソームシーケンス解析を行い、融合遺伝子、変異遺伝子、増幅遺伝子をゲノム網羅的に検索、同定する。

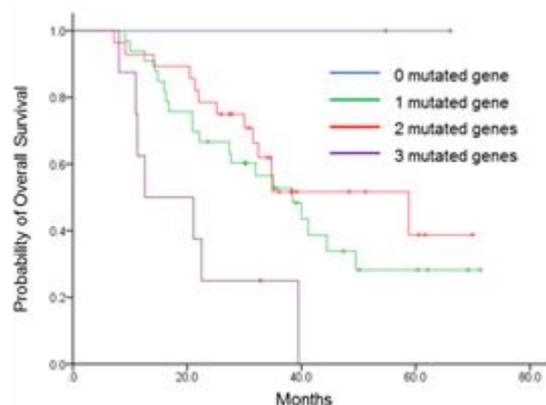
同定された新規遺伝子異常について診断法を確立するとともに、必要に応じて異常遺伝子産物の機能解析を行い、治療標的としての可能性を検討する。

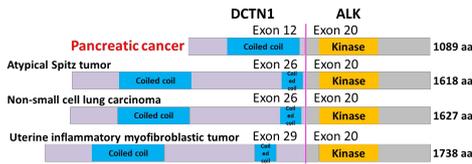
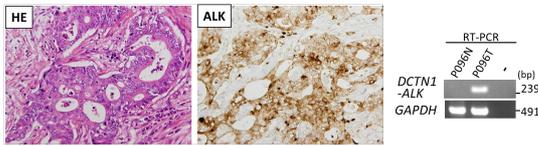
4. 研究成果

浸潤性膵管がんの凍結保存検体100例およびヒト膵がん細胞株19種類に関してcoverage depth mean 4,685x (607-12,359x)のTarget sequencingを行い、既知のがん関連遺伝子の異常の探索を行った。その結果、腫瘍検体の97% (97/100)で何らかの変異遺伝子が認められ、1検体当たり平均1.6つの変異遺伝子が認められた。KRAS変異は全体の96% (96/100)で同定され、腫瘍細胞含有率の推測値は平均31% (2-93%)であった。その他の主要な遺伝子変異としてTP53 (42%, 42/100), SMAD4 (13%, 13/100), CDKN2A (7%, 7/100)の変異が認められた。欧米の例と同様に、本邦の膵がんにおいても、KRAS, SMAD4, CDKN2A, TP53ドライバー遺伝子変異の積み重ねが生存予後を規定することを確認した。

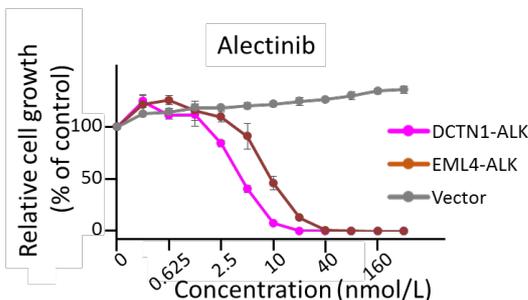
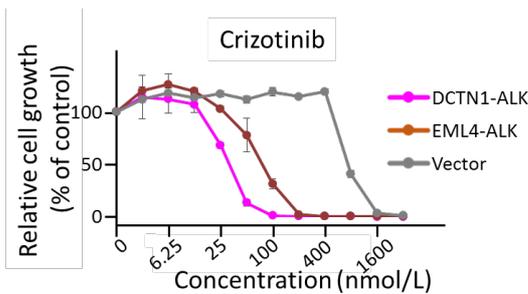
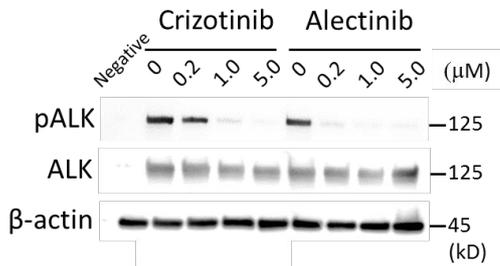
症例 (Hayashi et al. 2016)		n=100	
年齢中央値 (範囲)		67 (38-84)	
性別	男性	59	
	女性	41	
PS	0	85	
	1	16	
	2	1	
			1
c-Stage	IA	1	
	IB	0	
	IIA	25	
	IIB	64	
	III	0	
病理	IV	10	
	管状腺癌 (高分化)		6
		(中分化)	64
		(低分化)	28
腺癌扁平上皮癌	2		
部位	頭部	62	
	体尾部	38	

同定されたKRAS変異陰性膵がん4例のう





ち十分量のゲノム DNA が得られた 3 例(P013, P030, P096)について次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンス解析を行った。その結果、2 例(P030, P096)で体細胞変異が同定された。前者では、ドライバー変異と考える RRAS 遺伝子の活性化変異が同定された。また、KRAS 変異陰性 4 例を含めた 13 例について全 RNA シーケンス解析を行った。その結果、膵がんでは報告のない ALK 遺伝子融合(DCTN1-ALK)が見られた。



ゲノム解析の結果、融合は二つの遺伝子座に生じた DNA 二本鎖切断が非相同末端結合によって異常修復された痕跡が残されていた。この結果は、遺伝子融合が知られる肺腺がんと同様の分子機序で、膵がんでも ALK 遺伝子融合が生じることを示している。DCTN1-ALK 融合は、ALK キナーゼ活性を恒常活性化させることが示され、また、Ba/F3 細胞を IL3 非依存的に増殖させた。そして、その活性化や細胞増殖は肺がん治療薬として薬事承認さ

れている crizotinib や alectinib で阻害された。また、ALK 融合に関しては、肺がんと同様、ALK タンパク質に対する免疫染色法が診断法として有用であることが示された。

以上より、KRAS 変異陰性の膵がんでは、ALK 融合や RRAS 変異が driver 変異となること、そして ALK 融合に関しては既存承認薬の治療標的となることが見出された。

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)

1. Y. Shimada, T. Kohno*, H. Ueno, Y. Ino, Y. Hayashi, T. Nakaoku, Y. Sakamoto, S. Kondo, C. Morizane, Shimada K, Okusaka T, Hiraoka N. An oncogenic ALK fusion and a RRAS mutation in KRAS mutation-negative pancreatic ductal adenocarcinoma. **Oncologist**. 2017, 22(2):158-164. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0194.

2.H. Hayashi, T. Kohno*, H. Ueno, N. Hiraoka, S. (他 3 名) H. Ichikawa, M. Kato, T. Shibata, C. Morizane, Y. Sakamoto, K. Shimada, Y. Komatsu, N. Sakamoto, T. Okusaka. Utility of Assessing the Number of Mutated KRAS, CDKN2A, TP53, and SMAD4 Genes Using a Targeted Deep Sequencing Assay as a Prognostic Biomarker for Pancreatic Cancer. **Pancreas**. 2017, 46(3):335-340. doi: 10.1097/MPA.0000000000000760.

[学会発表](計 1 件)

奥坂拓志. すい臓がんの治療戦略
Sweden Life Science Summit 2016、2016 年 6 月 17 日、東京

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

上野 秀樹 (Ueno Hideki)

国立がん研究センター・中央病院・肝胆膵内科医長

研究者番号：10307522

(2)研究分担者

奥坂 拓志 (Okusaka Takushi)
国立がん研究センター・中央病院・科長
研究者番号：70501849

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし