

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08669

研究課題名(和文)炎症性筋線維芽細胞腫瘍の新規融合遺伝子の同定と機能の解明

研究課題名(英文)Identification of novel fusion gene in inflammatory myofibroblastic tumor

研究代表者

山元 英崇 (YAMAMOTO, HIDETAKA)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：30404073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：中間悪性腫瘍である炎症性筋線維芽細胞腫瘍(IMT)においてALK, ROS1, NTRK3融合遺伝子を同定した。その頻度はそれぞれ約60%, 5%, 5%であった。ALK免疫染色においては稀に、ALK1モノクローナル抗体を用いた従来法で陰性であっても、5A4モノクローナル抗体を用いた高感度法では陽性となるALK偽陰性例が存在することが判明した。pan-Trk抗体を用いた免疫染色は腫瘍細胞の核+細胞質の特徴的な発現パターンを示し、ETV6-NTRK3融合遺伝子を有するIMTの同定において、診断的価値が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IMTは炎症性病変と病理組織像が類似しているため鑑別診断がしばしば困難である。ALK, ROS1, NTRK3融合遺伝子の検出は診断的価値が高く、IMTの確定診断の精度を高めることが期待される。またALK, ROS1, NTRK3 (pan-Trk)に対する免疫染色は、その融合遺伝子陽性例の簡便なスクリーニングとして有用であり、分子標的治療の対象となりうる患者の選択に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We discovered ALK, ROS1 and NTRK3 gene fusions in approximately 60, 5 and 5% of inflammatory myofibroblastic tumor (IMT), respectively. In rare cases, immunohistochemical staining (IHC) with ALK1 antibody was negative but IHC with 5A4 antibody was positive, suggesting that ALK1 can cause false negative result of ALK expression. IMT with ETV6-NTRK3 gene fusion showed nuclear and cytoplasmic immunoreactivity for pan-Trk, suggesting a diagnostic utility of this antibody.

研究分野：人体病理学

キーワード：炎症性筋線維芽細胞腫瘍 融合遺伝子 ALK ROS1 NTRK3 免疫組織化学染色

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 炎症性筋線維芽細胞腫瘍の概念と ALK, ROS1 融合遺伝子について  
線維芽細胞・筋線維芽細胞の増生と炎症細胞浸潤で構成され腫瘍を形成する病変は真の腫瘍か反応性/炎症性病変か鑑別が難しいことがあり、病理診断や臨床的扱いが問題になってきた。その中でも時に再発や転移を来しうる腫瘍性病変として、炎症性筋線維芽細胞腫瘍 (inflammatory myofibroblastic tumor; IMT) の概念が誕生し、中間悪性腫瘍に位置付けられている。IMT は小児や若年成人の腹部軟部組織や内臓器 (消化管、肺、膀胱、子宮など) に好発する。IMT の約 50% は ALK 融合遺伝子を有していることが知られている。ALK は受容体チロシンキナーゼの一種で融合遺伝子を形成することで、融合遺伝子産物が過剰発現し、かつ、キナーゼ活性が亢進するため、腫瘍発生の原因となると考えられている。ALK 蛋白発現や ALK 融合遺伝子 (遺伝子再構成) の証明は、病理診断や治療方針の決定に役立つ。ROS1 は ALK と構造的に類似した受容体チロシンキナーゼで、IMT の少数例で ROS1 融合遺伝子が報告され、IMT の約 10% (ALK 陰性 IMT の約 20%) に ROS1 融合遺伝子が存在すると推定されたが、詳細は明らかになっていなかった (Lovly, et al. Cancer Discov 2014)。なお肺癌でも ALK や ROS1 融合遺伝子が存在することが知られており、それらのキナーゼ阻害薬が治療に用いられている。

### (2) 新規融合遺伝子について

肺癌では ALK, ROS1 以外に RET, NTRK1 などチロシンキナーゼ融合遺伝子が次々に明らかになってきている。したがって、ALK, ROS1 融合遺伝子が存在しない、約 40% の IMT 症例においては、それら以外の融合遺伝子が存在することが推測された。そしてこれらは診断・治療の新たなバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

- (1) IMT における新規融合遺伝子を同定し、新たな診断、治療のマーカーとしての意義を明らかにする。
- (2) 融合遺伝子の surrogate marker としての免疫組織化学染色の有用性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) サンプル: 外科的に切除された IMT40 例のホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE)
- (2) 蛍光 in situ hybridization 法 (FISH): ALK, ROS1, RET, NTRK1, NTRK3, ETV6 遺伝子の分離プローブを用いた遺伝子再構成
- (3) 免疫組織化学染色 (免疫染色): ALK (ALK1, 5A4), ROS1, pan-Trk (TrkA+B+C)
- (4) RT-PCR: 融合遺伝子産物の検出

### 4. 研究成果

(1) ALK 融合遺伝子と高感度免疫染色の有用性  
36 例の IMT において、2 通りの ALK 免疫染色方法: 従来法 (ALK1 モノクローナル抗体) と高感度法 (5A4 モノクローナル抗体) を比較した。ALK1, 5A4 はそれぞれ 20 例 (55.6%) と 22 例 (61.1%) で陽性であった。従来法 (ALK1) で陰性で高感度法 (5A4) にて ALK 陽性となった 2 例は、FISH 法で ALK 遺伝子再構成が認められた。すなわち、従来法 (ALK1) で ALK 陰性の 16 例中 2 例 (12.5%) (IMT 全体の 5.6% 相当) は ALK 偽陰性であったということになる。この結果は ALK 融合遺伝子の surrogate marker としての 5A4 抗体の有用性を示唆するとともに、かつて ALK 陰性とされた症例の一部にも ALK 融合遺伝子が存在しうることへの注意を促すものである。

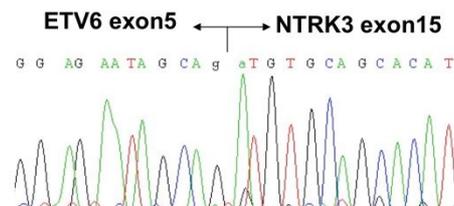
### (2) ROS1 融合遺伝子の頻度、陽性例の特徴

ROS1 免疫染色は 2/36 例 (5.6%) で陽性であった。2 例はいずれも小児の消化管に発生していた。うち 1 例において ROS1 発現パターンは細胞質びまん性 + ドット状であり、RT-PCR にて TFG-ROS1 遺伝子融合が確認された。もう 1 例では融合相手を同定することができなかった。上記の ALK 陽性 IMT は全て ROS1 免疫染色は陰性であり、高い特異性が示唆された。

### (3) NTRK3 融合遺伝子の頻度、陽性例の特徴

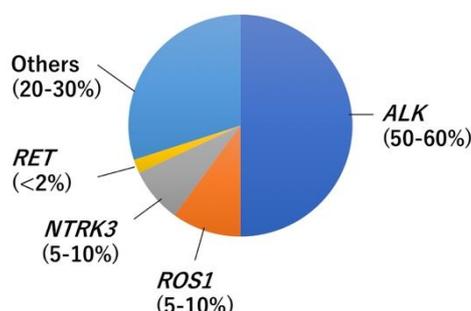
乳児線維肉腫でよく知られている ETV6-NTRK3 融合遺伝子に着目し、IMT においても検討を行ったところ、FISH 法や RT-PCR にて 2/36 例 (5.6%) で ETV6-NTRK3 遺伝子融合が存在することが判明した。2 例は若年成人や小児の肺に発生した例であった。  
なお、我々の検討では RET 遺伝子再構成は認められなかった

図 1. IMT における ETV6-NTRK3 融合遺伝子。  
(RT-PCR 法)



以上の知見と文献的報告を総合すると IMT において、*ALK*, *ROS1*, *NTRK3* 融合遺伝子はそれぞれ約 50-60%, 5-10%, 5-10% 存在すると推定された。*RET* 融合遺伝子は 2% 未満と非常に低い頻度であると考えられ、その実態は明らかではない。残りの約 20-30% においては融合遺伝子またはドライバー遺伝子変異は未だに不明である。

図 2. IMT における融合遺伝子の頻度

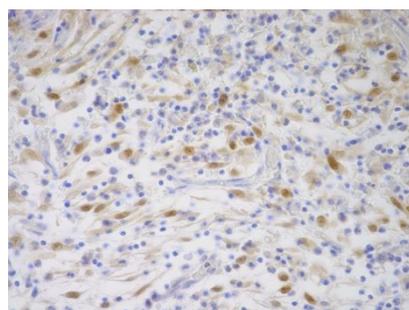


#### (4) pan-Trk 免疫染色の有用性に関する検討

神経成長因子受容体遺伝子 NTRK ファミリーは *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* からなり、それぞれ TrkA, TrkB, TrkC タンパクをコードする。近年、次世代シーケンサーの普及とともに *NTRK1, 2, 3* のいずれかが関与する融合遺伝子が種々のがんで報告されている。*NTRK3* に関しては、IMT 以外にも、甲状腺乳頭癌、唾液腺や乳腺の分泌癌、乳児線維肉腫などで融合遺伝子を形成していることが報されている。最近 *NTRK* 融合遺伝子を有する腫瘍に対して、TrkA, B, C に対するチロシンキナーゼ阻害薬の有用性が示され、治療戦略として期待されている。

我々は最近利用可能になった TrkA, B, C に反応する pan-Trk 抗体を用いて、免疫染色の有用性について検証した。IMT ならびに対照として、乳児線維肉腫と唾液腺分泌癌において、rabbit monoclonal pan-Trk 抗体を用いて免疫染色を行った。IMT 40 例の genotype は *ALK* (n=29), *ROS1* (n=2), *NTRK3* (n=2), *RET* (n=0) といずれにも属さない “quadruple-negative” (n=7) に分類された。*ETV6-NTRK3* 陽性 IMT 2 例において、紡錘形腫瘍細胞の大半が pan-Trk の核+細胞質染色パターンを示した。*ALK* または *ROS1* 陽性 IMT では pan-Trk の核発現は認められなかったが、約 1/3 の症例では部分的に弱い細胞質染色を示した。*ETV6-NTRK3* 陽性の乳児線維肉腫 (n=3) と唾液腺分泌癌 (n=23) は pan-Trk の核+細胞質染色を示した。以上より、pan-Trk の核+細胞質染色パターンは *ETV6-NTRK3* 陽性 IMT の同定に有用であり、Trk に対する分子標的治療の対象となりうる患者の選択に役立つ可能性が示唆された (論文準備中)

図 3. *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子 IMT における pan-Trk 免疫染色。紡錘形腫瘍細胞の核と細胞質に陽性である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. [Yamamoto H](#), [Yoshida A](#), [Taguchi K](#), [Kohashi K](#), [Hatanaka Y](#), [Yamashita A](#), [Mori D](#), [Oda Y](#). *ALK, ROS1 and NTRK3 gene rearrangements in inflammatory myofibroblastic tumors*. *Histopathology*. 69:72-83, 2016. doi: 10.1111/his.12910. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. [Yamamoto H](#), [Nozaki Y](#), [Kohashi K](#), [Oda Y](#). Diagnostic utility of pan-TRK immunohistochemistry in inflammatory myofibroblastic tumor, The 108th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology, March 17- 23, 2019, National Harbor, MD, USA

2. [畑中優衣](#), [山元英崇](#), [岩崎健](#), [佐藤方宣](#), [次郎丸梨那](#), [小田義直](#).

甲状腺乳頭癌における ROS1 発現と ROS1 遺伝子再構成の頻度及び臨床病理学的解析  
第 107 回日本病理学会総会, 2018.6.21-23, 札幌

3. 山元英崇、吉田朗彦、田口健一、孝橋賢一、畑中優衣、山下篤、森大輔、小田義直.  
炎症性筋線維芽細胞腫瘍における ALK、ROS1、NTRK3 遺伝子再構成  
第 105 回日本病理学会総会, 2016.5.12-14, 仙台

〔図書〕(計 1 件)

1. Yamamoto H. Histology. Kurokawa Y, Komatsu Y, eds; Gastrointestinal Stromal Tumor:  
Research and Practice. pp11-30, Springer, Singapore, 2019

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

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)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：野崎 優衣

ローマ字氏名：Nosaki Yui

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。