

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293303

研究課題名(和文) FISH/CISHを用いたRET遺伝子関連異常検索

研究課題名(英文) Investigation of RET and other genes abnormalities using FISH/CISH

## 研究代表者

藤井 義敬 (Fujii, Yoshitaka)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：40156831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：様々なEGFRチロシンキナーゼ阻害剤やALKチロシンキナーゼ阻害剤が認可され肺腺癌の診断治療体系が一変した。肺腺癌に対する新たな分子標的としてRET遺伝子の転座を共同研究の中で見出し、我々はその後当教室での転座例を確認してFISHプローブの開発を行ってきた。2013年には新たな分子標的としてNTRK転座を見出し、細胞実験での検証を行った。2014年には新たな分子標的としてFGFR3転座を見出した。最近注目されているBRAF遺伝子V600E変異についてPCRや免疫染色等での同定法を検討し、2015年にFISHでの遺伝子増幅の確認を行った。

研究成果の概要(英文)：Molecular targeted therapies such as gefitinib/erlotinib/afatinib/osimertinib that target EGFR mutations and crizotinib/alectinib that target ALK fusion have demonstrated superior single agent activity in mutant selected patients as compared standard chemotherapy regimens in lung adenocarcinomas. Recently, a series of new gene fusions have been described in patients with lung adenocarcinomas using next generation. We have discovered RET translocation in lung adenocarcinomas. In our cohort, three RET fusion mutants were found. We have developed FISH probes to detect RET translocations. In 2013, we have discovered NTRK1 translocation. We performed cell based assay for the translocations. In 2014, FGFR3 translocations were found. In addition, BRAF V600E is a driver mutation that can be effectively targeted with selective BRAF inhibitors. We investigated BRAF V600E mutations by CAST-PCR and immunohistochemical methods, and confirmed gene amplification by FISH in 2015.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：RET EGFR BRAF FISH CASR-PCR 肺癌 増幅 転座

## 1. 研究開始当初の背景

2004年我々は Dana Farber Cancer Institute との共同研究により肺癌におけるチロシンキナーゼ遺伝子を網羅的に解析し EGFR 遺伝子のキナーゼドメイン内の体細胞変異をはじめ同定した (Paez et al. Science)。2007年には同研究所との共同研究から肺腺癌の網羅的 SNP 解析を行い、増幅している遺伝子群として EGFR, Kras, erbB2, NTK-2 などを同定した (Weir et al. Nature)。肺癌における EGFR 遺伝子変異は、2008年 IPASS 試験で EGFR 分子標的薬剤感受性因子としての役割がより明確になり以降国内の光富、前門戸らの報告で日本の強いエビデンスとなった。一方耐性遺伝子変異 T790M の存在が明らかになってきた。その後肺癌における日本発の ALK 転座の発見と転座を検索する手法として FISH や免疫染色用抗体を用いた手法が注目された。我々も参加した肺癌で次世代シーケンスを用いたチロシンキナーゼ遺伝子群の変異解析の共同研究から、RET や NTRK1 など様々な遺伝子転座が同定されその機能解析などのデータが望まれていた。

## 2. 研究の目的

非小細胞肺癌患者組織における EGFR(感受性因子/耐性因子 T790M)や新規転座である RET 転座、NTRK1 転座、BRAF somatic mutation をシーケンスまたは新たに TaqMan Mutation Detection Assays を用いた real-timePCR の系で confirm し検索し、これらが臨床病理学的因子や他の分子発現とどう結びついているかを検討する。BRAF 遺伝子変異量は腫瘍内の heterogeneity を検索すべく、レーザーマイクロダイセクションを施行し BRAF 変異の定量を行い、検討を加えていく。肺腺癌の様々なコンポーネントにおける BRAF、EGFR 遺伝子変異の割合も検索する。特に 2013 年の ASCO 報告から新たに分子標的治療の可能性が注目された BRAF V600E の点変異は最近確立された変異特異的に同定可能な抗体を用いて免疫染色を行い、関連性を検討するほか、BRAF 遺伝子増幅を FISH 法で検討する。肺癌次世代シーケンスプロジェクトから 2012 年同定された RET 遺伝子転座、2013 年同定された NTRK1 の転座については、PCR や教室で確立した FISH 法により多くの症例を検討して臨床病理学的背景との相関を明らかにする。NTRK 遺伝子転座変異の検索は、細胞株を用いて AZD7451 を用いた抗癌剤感受性試験を行い、分子標的薬剤使用の可能性について探索を進める。

## 3. 研究の方法

Taq-Man PCR 法により遺伝子変異検索は、

一度に約 40 検体を約 2 時間で変異プローブ、野生型プローブと PCR 反応させて、引き続きプログラム解析を行うことができ、解析にかかる時間を短縮出来る (competitive allele specific PCR, CAST-PCR)。また本法は変異の割合がわずか 0.1% でも検出可能であるため、シーケンス不良検体でも解析可能となるという利点を有する。肺癌で報告されている BRAFV600E 遺伝子変異や EGFR G719X、T790M 変異にも応用可能である。変異および野生株双方に特異的なプローブを用い PCR 後の補正プログラム後検討を行う。この方法で変異率の定量、定性が同時に出来る。我々の教室では real time PCR 法を用いた遺伝子増幅の検出も可能で BRAF 遺伝子コピー数の同定を行い、FISH 法との比較検討を行う。BRAF V600E 点変異は国内でダコジャパン社と共同で確立した変異特異的に同定可能な抗体を用いた免疫染色法を行う。海外では BRAF V600E をターゲットとした薬剤はメラノーマで適応があり、肺癌に対する第 II 相の臨床試験の良好なデータが 2013 年のアメリカ癌治療学会 (ASCO) で報告された。現在国内でも肺癌の V600E を標的とした治験が行われている。この方法を利用すれば、大量かつ迅速に変異の有無が確認出来、変異の肉眼的定量定性が可能である。

RET 転座については変異特異的なプライマーをデザインして RT-PCR 法によって、いくつかの転座バリエーションの検出を試みる。当院で非小細胞肺癌のために手術を施行された症例から RNA を抽出し、逆転写後 PCR 施行、ダイレクトシーケンスでバリエーションタイプの確認を行う。

NTRK1 の遺伝子転座がすでに証明されている KM12 大腸癌細胞株および NTRK2 の過剰発現が示唆される神経内分泌型大細胞肺癌細胞株を用いて、感受性試験を施行し、NTRK の下流に存在するタンパクの発現の変化をウエスタンブロッティング法で確認する。

肺癌で新しい転座が存在しないかどうかは次世代シーケンスなどを用いて検討する。

## 4. 研究成果

RET 転座は当院で検索した中では肺癌 270 例中 3 例であったが、すべて女性、非喫煙者、腺癌であり、EGFR や ALK 遺伝子変異と排他的であった。GSP 研究所の FISH プローブを用いた FISH 法で 2 例の同定が可能であった。現在 1 例が RET 阻害剤の治験に参加している。

2013 年には新しい分子標的として肺癌における NTRK1 転座を見だし Nature Medicine 誌に報告した (Vaishnavi A et al. Nat Med 19(11): 1469-1472.)。当院での手術例では 1 例も検出されなかった。NTRK1 の恒常的活性化から癌細胞が増殖するため細胞実験での検証を進めた。KM12 細胞株および

H460細胞株ではAZD7451に対し感受性を示したが、H810細胞株では感受性を示さなかった。この感受性のメカニズムはKM12ではNTRK1高発現の抑制によるもの、H460株ではNTRK2発現抑制によるものの可能性が示唆された。海外からの続報では、肺癌、大腸癌において頻度は少ないがNTRK1転座が報告されている。

BRAF遺伝子変異の中で頻度が多いV600E遺伝子変異について、変異特異的抗体を用いた免疫組織学的検討を行った。肺癌組織からのダイレクトシーケンスで4例のBRAF V600E変異例を、2例のその他のタイプの変異例を同定した。このうちV600E変異例全例での免疫染色性を確認した。その他の変異例中1例で偽陽性となった。TaqManPCRでの腫瘍内のBRAF変異率は概ね25%以下であった。パラフィン包埋切片からレーザーマイクロダイセクションを行い、検体から4-8カ所をくり抜いてDNAを抽出し、CAST-PCRでBRAF V600E変異の頻度を確認したところ、intra tumor heterogeneityが様々な腺癌コンポーネント内で認められた。これら症例における増幅の検討はGSP研究所のBRAF FISHプローブを用いて解析を行った。V600E変異中2例でFISHの増幅を認め、コピー数の増加と関連していた。コピー数の増加はV600E変異と関連していた。今後CAST-PCR法をEGFRチロシンキナーゼ阻害剤耐性変異のT790M変異同定に応用する予定である。デジタルPCRでの確認も施行する予定である。

肺腺癌におけるFGFR3遺伝子転座を共同研究野中から新たに見だし報告した。以前より肺扁平上皮癌において報告されているものと似たタイプであった。

#### 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7件)

Tatematsu T, Sasaki H, Shimizu S, Hikosaka Y, Okuda K, Haneda H, Moriyama S, Yano M, Fuji Y. Intra-tumor heterogeneity of BRAF V600E mutation in lung adenocarcinomas. *Exp Ther Med*; 9: 1719-1722, 2015. Doi : 10. 3892/etm. 2015.2298. 査読有り。

Sasaki H, Maekawa M, Tatematsu T, Okuda K, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. Increased BRAF copy number in lung adenocarcinoma. *Oncol Lett*; 9: 709-712, 2015. Doi: 10. 3892/ol. 2014.2714 査読有り。

Capelletti M, Dodge ME, Ercan D, Hammerman PS, Park SI, Kim J, Sasaki H, Jablons DM, Lipson D, Young L, Stephens PJ, Miller VA, Lindeman NI, Murir KJ, Richards

WG, Janne PA. Identification of recurrent FGFR3-TACC3 fusion oncogenes from lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*; 20: 6551-6558, 2014. Doi: 10.1158/1078-0432. CCR-14-1337. 査読有り。

Sasaki H, Tatematsu T, Okuda K, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. PD-1 gene promoter polymorphisms correlate with a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Mol Clin Oncol*; 2: 1035-1042, 2014. Doi: 10. 3892/mco. 2014. 358. 査読有り。

Tatematsu T, Sasaki H, Shimizu S, Okuda K, Shitara M, Hikosaka Y, Moriyama S, Yano M, Brown J, Fujii Y. Investigation of neurotrophic tyrosine kinase receptor 1 fusions and neurotrophic tyrosine kinase receptor family expression in non-small-cell lung cancer and sensitivity to AZD7571 in vitro. *Mol Clin Oncol* 2: 725-730, 2014. Doi : 10. 3892/mco. 2014. 318. 査読有り。

Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kato S, Butaney M, Ercan D, Mahale S, Davis KD, Aisner DI, Pilling AB, Berge EM, Kim J, Sasaki H, Park S, Haas J, Andrews SW, Lipson D, Stephens PJ, Miller VA, Varella-garcia M, Janne PA, Doebele RC. Oncogenic and drug sensitive NTRK1 arrangements in lung cancer. *Nat Med*; 19: 1469-1472 2013. Doi : 10. 1038/nm.3352. 査読有り。

Sasaki H, Shimizu S, Tani Y, Shitara M, Okuda K, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. Usefulness of immunohistochemistry for the detection of the BRAF V600E mutation in Japanese lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*.; 82: 51-54, 2013. Doi : 10. 1016/j. lungcan. 2013.06.014. 査読有り。

[学会発表](計5件)

佐々木秀文、奥田勝裕、森山悟、矢野智紀、藤井義敬。肺腺癌におけるBRAFコピー数の増加。第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8-10日(愛知県名古屋)名古屋国際会議場。

② 立松勉、佐々木秀文、奥田勝裕、羽田裕司、森山悟、矢野智紀、藤井義敬、清水重喜。肺癌におけるBRAF V600E遺伝子変異のintra-tumor heterogeneityに関する検討。第55回日本肺癌学会学術集会、2014年11月14-16日(京都府京都市)国立京都国際会館。

③ Sasaki H, Shimizu S, Tani Y, Okuda

K, Hikosaka Y, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. KIF5B/RET fusion gene in surgically-treated Japanese adenocarcinoma of the lung. 15<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer. October 27-31th, 2013. (Sydney, Australia) Sydney Convention & Exhibition Centre.

- ④ 佐々木秀文、設楽将之、奥田勝裕、彦坂雄、森山悟、矢野智紀、藤井義敬。 Dako Envision FLEX と BRAFV600E 特異的抗体を用いた肺癌における BRAF 遺伝子変異免疫組織学的検索。第 66 回日本胸部外科学会定期学術集会、2013 年 10 月 16-19 日 (宮城県仙台市) 仙台国際センター。
- ⑤ 佐々木秀文、奥田勝裕、森山悟、矢野智紀、藤井義敬。 肺癌における新規 599T 挿入変異とダコエンビジョンフレックス系を用いた V600E 抗体による免疫組織学的検索。第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日 (神奈川県横浜市) パシフィコ横浜。

〔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〕

ホームページ等 なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井 義敬 (FUJII YOSHITAKA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科

・名誉教授

研究者番号：40156831

### (2) 研究分担者

佐々木 秀文 (SASAKI HIDEFUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科

・研究員

研究者番号：00336695

矢野 智紀 (YANO MOTOKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科

・准教授

研究者番号：40315883

奥田 勝裕 (OKUDA KATSUHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科

・助教

研究者番号：50529170