

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 16 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871073

研究課題名(和文) 融合遺伝子同定法の最適化

研究課題名(英文) Optimization of fusion gene identification methods

研究代表者

富樫 由紀 (Togashi, Yuki)

公益財団法人がん研究会・分子標的病理プロジェクト・研究助手

研究者番号：00648016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：A) 肺癌融合遺伝子陽性症例，EGFR，KRAS変異陽性症例にこれらの異常が陰性である症例を加え，遺伝子発現プロファイルを取得し，ALK陽性例の一部とROS1陽性例の一部で高発現が見られる遺伝子を抽出した．B) 融合遺伝子同定法として，RNA capture sequenceを活用し，キナーゼ遺伝子と肺癌で頻出する遺伝子変異に焦点を絞った解析を行った．凍結保存検体のみならず，FFPE検体についても，RNA capture sequenceの実験系・解析系を確立した．

研究成果の概要(英文)：A) We compared lung tumors harboring fusion genes, EGFR or KRAS mutation, and those without the aberrations by global mRNA expression assay. Several highly-expressed genes were identified in ALK and ROS1 fusion-positive lung cancers. B) We developed an RNA capture sequencing system to detect the fusion genes and SNV/indels frequently observed in lung cancers. The system's performance was excellent on both fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded specimens.

研究分野：分子生物学

キーワード：バイオマーカー 融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

2007年に報告された *EML4-ALK* を皮切りに、さまざまな固形癌において治療標的となる新規融合遺伝子が次々と報告されている。申請者らは、*ALK* のほか、*RET*、*ROS1* といった受容体型チロシンキナーゼの融合遺伝子を見出すプロジェクトを進めてきた。*ALK* 融合遺伝子においては免疫染色法および FISH 法がすでに汎用されている一方で、*RET*、*ROS1* 融合遺伝子は、免疫染色や FISH 法による診断が困難であり、実用的な診断法の確立がなされていない。また、免疫染色や FISH 法などの病理組織学的なアプローチによりスクリーニングされた転座候補症例のうち、RACE 法や inverse-RT-PCR 法といった conventional な方法では融合遺伝子同定に至らないケースが多く実在し、「その症例の解析をいつ打ち切るか」の判断が、プロジェクトを進行する上でのボトルネックとなっていた。

2. 研究の目的

本研究では、A) 既知の融合遺伝子の実用的な診断法の開発ないしバイオマーカーの同定、B) 融合遺伝子探索システムにおける新規融合遺伝子同定効率の向上を目的とし、融合遺伝子検出法の最適化を試みる。

3. 研究の方法

A) *ALK*、*ROS1*、*RET* 融合遺伝子陽性である肺癌症例に、*EGFR* 変異陽性例、*KRAS* 変異陽性例とこれら5種の異常すべてが陰性である症例を加え、Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いて遺伝子発現プロファイルを取得し、発現解析を行う。

B) FISH スクリーニングにより同定された転座陽性候補症例について、キナーゼ遺伝子と肺癌で頻出する遺伝子変異に焦点を絞り、RNA capture sequence を行う。

4. 研究成果

A) *ALK* 陽性例 37 例、*ROS1* 陽性例 12 例、*RET* 陽性例 13 例、*EGFR* 陽性例 20 例、*KRAS* 陽性例 3 例、これらの異常がいずれも陰性である肺癌症例 12 例について発現マイクロアレイ解析を行った。

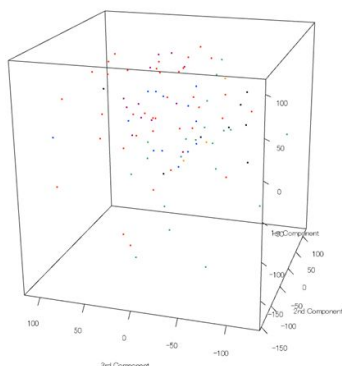


図 1. 主成分分析の結果

まず、すべての検体を対象として主成分分析を行ったところ、肺癌の各ドライバー遺伝子による集積は認めなかった (図 1)。

次に、*ALK*、*ROS1*、*RET* 融合遺伝子陽性である検体について、それぞれのキナーゼ遺伝子の発現を検討した。*ALK* 融合遺伝子陽性例とそれ以外では、*ALK* の発現に大きな差があり、*ALK* の 5' UTR 側に特化したプローブの発現量にて区別が可能であった (図 2)。

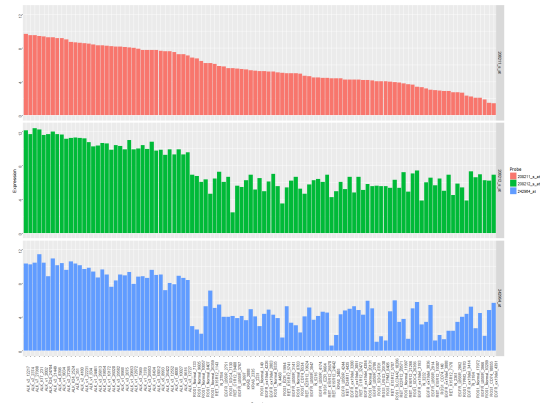


図 2. *ALK* 遺伝子の発現

ROS1 融合遺伝子陽性例とそれ以外では、*ROS1* 融合遺伝子陽性例で *ROS1* 遺伝子の発現が上昇する傾向はあるが、*ALK* 融合遺伝子陽性検体や *EGFR* 変異陽性検体でも上昇する検体があり、区別は困難であった (図 3)。これは、用いた発現マイクロアレイに 5' UTR に特化したプローブが設計されていなかったことによると考えられた。

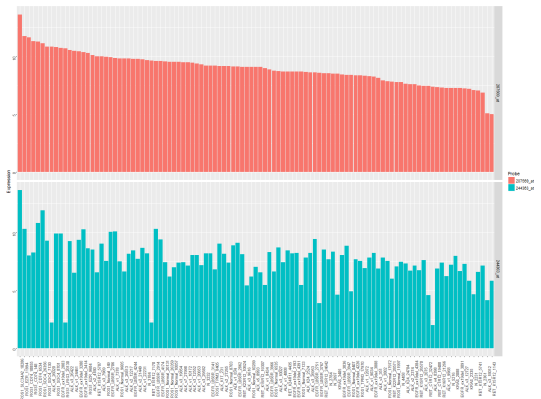


図 3. *ROS1* 遺伝子の発現

RET 融合遺伝子陽性例とそれ以外では、*RET* 融合遺伝子陽性例で *RET* 遺伝子の発現が上昇する傾向があるが、*ALK* 融合遺伝子陽性例 1 例で上昇が認められる検体があった。5' UTR 側に設計されたプローブで最も感度、特異度よく検出が可能であった (図 4, 5)。

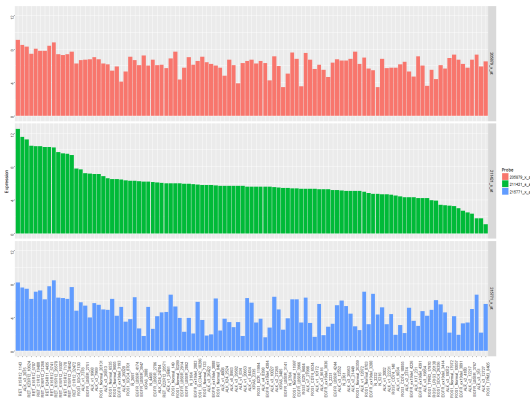


図 4. RET 遺伝子の発現

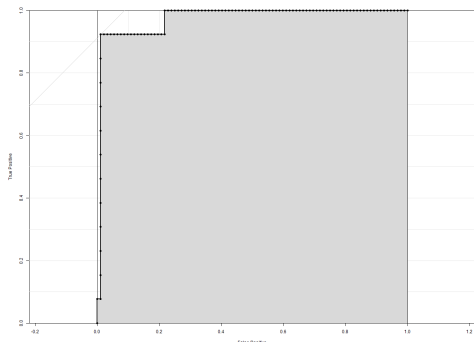


図 5. RET 肺癌診断 ROC analysis (AUC = 0.9222408)

続いて、各肺癌の特徴を抽出するため、各肺癌とそれ以外の肺癌を比較し、各肺癌に特徴的な遺伝子の抽出を行った。特に ALK 肺癌における特徴的な遺伝子プローブを示す (表 1)。

probe	gene	logFC	q_value
242964_at	downstream	5.16	1.55E-34
208212_s_at	ALK	4.83	7.43E-36
208211_s_at	ALK	3.91	1.55E-34
X_probe	X	2.04	0.001
209396_s_at	CHI3L1	2.00	0.03
Y_probe	Y	1.97	0.0003

表 1. ALK 肺癌に特徴的な遺伝子プローブ

このうち、遺伝子 X と Y に着目し、それらの発現の検索を行ったところ、ALK、ROS1 肺癌の一部で発現上昇が認められることがわかった (図 5)。

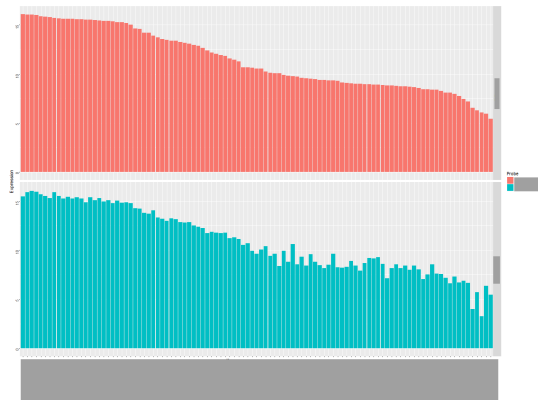


図 5. 遺伝子 X, Y の発現

現在、同様に各肺癌で抽出された遺伝子を用いて、診断に結びつく遺伝子プローブを複数のプローブを用いて抽出するアルゴリズムの検討を行っている。

B) 融合遺伝子を有する肺癌が多いと推測される若年性肺癌(50歳未満)に症例を絞り、SureSelect RNA Kinome キャプチャライブラリを用いて解析を行った。肺腺癌 62 例を解析し、陽性コントロールとして加えた EML4-ALK 8 例、EZR-ROS1 3 例、KIF5B-RET 1 例の合計 12 例の融合遺伝子の検出が可能であった (図 6)。

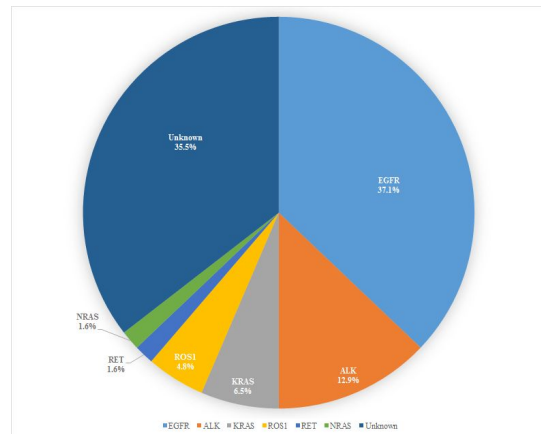


図 6. 若年性肺癌のドライバー変異

その他に、ドライバー遺伝子が不明である若年性肺癌から、4 例の新規融合遺伝子を検出した。現在、ドライバー遺伝子不明群について、さらなる検索を進めている。また、このキナーゼ遺伝子に特化した解析系を用いて、固形癌の FISH 陽性例の検索を行った。その結果、大腸癌の新規融合遺伝子を検出した。(投稿準備中)

一方で、肺癌で頻出する遺伝子変異に焦点を絞った RNA capture sequence も行った。陽性コントロール症例 16 例の肺癌についてシーケンスを行ったところ、ALK、ROS1、RET、EGFR、KRAS のいずれの変異も検出可能であった。したがって、この方法は FISH 陽性例に対する検討に有用であると考えられた。そこで、シーケンスの際には 32 万ベ

アリードの確保を最低条件として行い、さらにシーケンスリードを減らした場合のシミュレーションも行った。シーケンスリードを 16 万ペアリードとした場合、次世代シーケンサーの同じレーンでシーケンスを行った *ROS1* 変異が、*RET* 変異を有する検体で検出され区別が困難であるという問題が生じた。このため、解析系にて、同時にかかる検体の検体情報を参照する in house ソフトウェアを開発し、解析系に組み込み、区別を可能とした。

この解析系を用いて、様々な組織型の肺癌シーケンスを行い、新たな融合遺伝子を検出している。現在、検出された新規融合遺伝子について、多検体での検討を行っている。

また、イルミナ社のパネルを用いて、凍結検体だけでなく、ホルマリン固定パラフィン包埋検体 (FFPE) についてもプレップを行い、解析を進めている。

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 4 件)

Takeuchi K, Togashi Y, Kamihara Y, Fukuyama T, Yoshioka H, Inoue A, Katsuki H, Kiura K, Nakagawa K, Seto T, Maemondo M, Hida T, Harada M, Ohe Y, Nogami N, Yamamoto N, Nishio M, Tamura T. Prospective and clinical validation of ALK immunohistochemistry: results from the phase I/II study of alectinib for ALK-positive lung cancer (AF-001JP study). *Annals of Oncology*. 査読有, 27 巻, 2016, 185-192, DOI: 10.1093/annonc/mdv501.

Inoue M, Toki H, Matsui J, Togashi Y, Dobashi A, Fukumura R, Gondo Y, Minowa O, Tanaka N, Mori S, Takeuchi K, Noda T. Mouse models for *ROS1*-fusion-positive lung cancers and their application to the analysis of multikinase inhibitor efficiency. *Carcinogenesis*, 査読有, 37 巻, 2016, 452-460, DOI: 10.1093/carcin/bgw028.

Kusano H, Togashi Y, Akiba J, Moriya F, Baba K, Matsuzaki N, Yuba Y, Shiraishi Y, Kanamaru H, Kuroda N, Sakata S, Takeuchi K, Yano H. Two Cases of Renal Cell Carcinoma Harboring a Novel STRN-ALK Fusion Gene. *The American journal of surgical pathology*, 査読有, 40 巻, 2016, 761-769, DOI: 10.1097/PAS.0000000000000610.

Sakamoto K, Nakasone H, Togashi Y, Sakata S, Tsuyama N, Baba S, Dobashi A, Asaka R, Tsai CC, Chuang SS, Izutsu K, Kanda Y, Takeuchi K. ALK-positive large B-cell lymphoma: identification of

EML4-ALK and a review of the literature focusing on the ALK immunohistochemical staining pattern. *International journal of hematology*, 査読有, 103 巻, 2016, 399-408, DOI: 10.1007/s12185-016-1934-1.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

富樫 由紀 (Togashi Yuki)

公益財団法人がん研究会・がん研究所・分子標的病理プロジェクト・研究助手

研究者番号: 00648016