

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461168

研究課題名(和文) 肺神経内分泌腫瘍の遺伝子変異・融合遺伝子の同定と新規治療標的バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Identification of the genomic landscape in pulmonary neuroendocrine tumor

研究代表者

宮永 晃彦 (MIYANAGA, AKIHIKO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00591281

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)：肺神経内分泌腫瘍の網羅的ゲノム遺伝子解析により新規治療標的分子を同定する事を目的とする。低悪性度肺神経内分泌腫瘍の手術患者の腫瘍組織および正常組織の新鮮凍結組織25例(定型カルチノイド21例、非定型カルチノイド4例)でIlluminaのHiSeq2000による全エクソーム解析およびRNAシーケンス解析を行った。術後再発例と比較して無再発例の遺伝子変異は、相対的に少なかった。TRIB2-PRKCEを含む8つの新規融合遺伝子が同定された。候補遺伝子変異としてムチン遺伝子変異が認められ、TRIB2-PRKCEやMUC4遺伝子変異はすべて術後再発例であり、術後再発との関連を示唆する遺伝子が同定された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify gene alterations can be linked to therapeutic target in pulmonary neuroendocrine tumor using next-generation sequencers. We performed the comprehensive whole exon and RNA sequencing of 25 fresh frozen tissue samples (21 typical carcinoid and 4 atypical carcinoid) using Illumina HiSeq 2000. We found 8 novel fusion transcripts including one derived from chromosomal translocation between the TRIB2 and PRKCE genes. In addition, we identified a total of 139 gene alterations. Interestingly, we also detected mutations in mucin genes (MUC2, MUC4 and MUC6). All the 8 fusion genes and MUC4 gene mutation were obtained from post-operative recurrence of PCs tumor.

研究分野：肺癌

キーワード：次世代シーケンサー 肺神経内分泌腫瘍 遺伝子変異 融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年の網羅的ゲノム遺伝子解析は、いくつかの癌腫において治療標的となりうる遺伝子異常を同定し、その遺伝子異常に対する阻害剤の開発により治療成績が向上している。

非小細胞肺癌においてはALK融合遺伝子やRET, ROS1 融合遺伝子が見つかり、その阻害薬が有効であることから、新たな addicted oncogene であることが示唆されている。特にRET 融合遺伝子は次世代シーケンサーを用いて肺腺癌の1-2%にRET 遺伝子とKIF5B 遺伝子の融合が生じていることが発見されている¹。したがってヒトの固形腫瘍で、他にもaddicted oncogene が存在する可能性がある。

これまで申請者らは、高悪性度肺神経内分泌腫瘍における新規の診断マーカー及び予後因子/再発予測となる分子を見出すことに成功している²。一方で、低悪性度肺神経内分泌腫瘍すなわち早期肺カルチノイドは、術後予後良好であるが、手術不能もしくは遠隔転移例では、化学療法や放射線治療などの集学的治療を要することから、肺カルチノイドにおいても原因となる新規バイオマーカーの確立が急務である。低悪性度肺神経内分泌腫瘍は希少癌でありこれまで網羅的解析の報告は少なく、臨床的意義は極めて高いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、次世代シーケンサーを用いて低悪性度肺神経内分泌腫瘍（肺カルチノイド）における遺伝子変異・融合遺伝子の存在を明らかにし、肺神経内分泌腫瘍に対する新規治療標的バイオマーカーとして臨床応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒトの固形腫瘍における次世代シーケンサーを用いた融合遺伝子・遺伝子変異同定法の確立

(2) 低悪性度肺神経内分泌腫瘍の手術患者の腫瘍組織および正常組織の新鮮凍結組織25例（定型カルチノイド21例、非定型カルチノイド4例）からDNAおよびRNAを抽出

(3) 網羅的ゲノム遺伝子変異解析を行い、特異的な候補遺伝子変異・融合遺伝子を探索

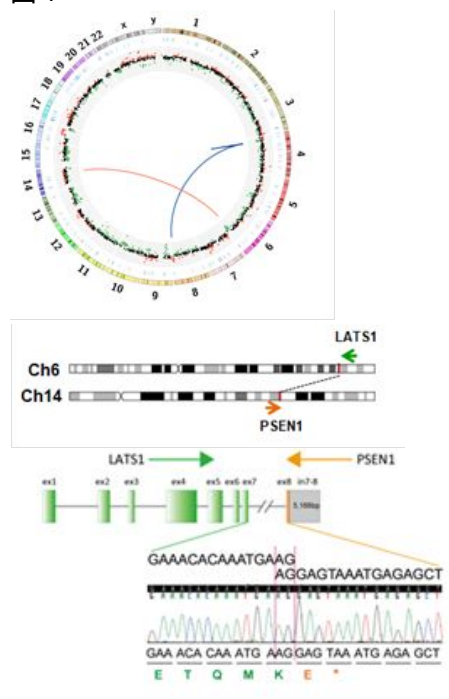
(4) 臨床情報(病期/予後/再発)と対比し、バイオマーカーとしての臨床的意義を評価

4. 研究成果

(1) ヒトの固形腫瘍において、次世代シーケンサーによる融合遺伝子・遺伝子変異同定法の確立

次世代シーケンサーを使用して固形癌における融合遺伝子・遺伝子変異の同定法を確立するため、悪性胸膜中皮腫の細胞株からIlluminaのHiSeq2000シーケンサーを用いてmRNAの網羅的融合遺伝子探索とエクソーム塩基配列解析を行った。融合遺伝子の検出はdeFuseプログラムを用いた。悪性中皮腫細胞株MST0-211Hにおいて新規の融合遺伝子LATS1-PSENを同定した(図1)。

図1



(2) 肺カルチノイド手術患者の腫瘍組織および正常組織の新鮮凍結組織25例（定型カルチノイド21例、非定型カルチノイド4例）を解析した(図2)。新鮮凍結組織25例からDNAおよびRNAを抽出した。

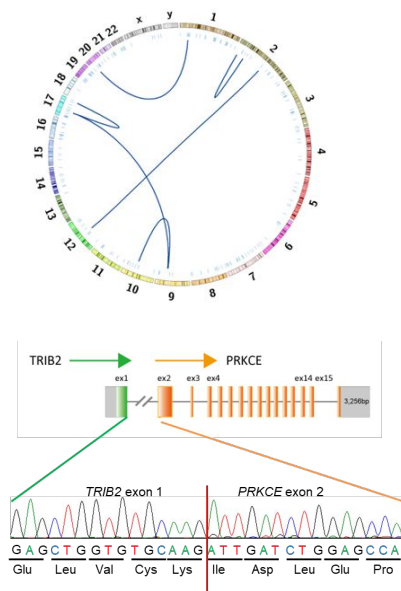
図2

		n=25
Gender (no.)	Male	15 (60%)
	Female	10 (40%)
Age	≥ 65	7 (28%)
	< 65	18 (72%)
Histologic subtype	Typical carcinoid	21 (84%)
	Atypical carcinoid	4 (16%)
Smoking Status	Never smoked	17 (68%)
	Current or former smoker	8 (32%)
Pathological stage	I, II	23 (92%)
	III, IV	2 (8%)
Lymph node metastasis	Absent	19 (76%)
	Present	6 (24%)
Distant metastasis	Absent	20 (80%)
	Present	5 (20%)
Recurrence	Absent	20 (80%)
	Present	5 (20%)

(3) 14例において、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析、6例において全トランスクリプトーム解析、25例においてエクソンアレイ解析を行い、網羅的に遺伝子異常を解析した。

MUC6、MUC4、MUC2 などのムチン遺伝子変異を 5 例(36%)で認め、特に MUC6 は 3 例(21%)に認められた。TRIB2-PRKCE を含む 8 つの新規融合遺伝子が同定された。(図 3)

図 3



(4) 術後再発例と比較して無再発例の遺伝子変異は、相対的に少なかった。TRIB2-PRKCE 融合遺伝子や MUC4 遺伝子変異はすべて術後再発例であり、術後再発との関連を示唆する遺伝子が同定された。

〔引用文献〕

- 1 . Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. Nat Med 2012;18:375-7.
- 2 . Miyanaga A, Honda K, Tsuta K et al. Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours. Ann Oncol. 2013 Jan;24(1):84-90.

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 1 件)

Hippo pathway gene mutations in malignant mesothelioma: revealed by RNA and targeted exon sequencing. Miyanaga A, Masuda M, Gemma A, Yamada T, et al. J Thorac Oncol. 10(5):844-51. 2015 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

宮永晃彦、増田万里、清家正博、弦間昭彦、山田哲司、悪性胸膜中皮腫における RNA およびターゲットエクソンシーケエ

ンスによるパスウェイ遺伝子変異
第 55 回日本肺癌学会学術集会、
2014 年 11 月 14 日、京都

Miyanaga A, Masuda M, Tsuta K, Asamura H, Gemma A and Yamada T. Novel pathway mutations in malignant pleural mesothelioma revealed by high-throughput DNA and RNA sequencing. 2014 AACR Annual Meeting, April 20, 2014, San diego.

〔図書〕(計 1 件)

Miyanaga A. Molecular Targeted Therapy of Lung Cancer, Chapter12 Minor-Driver mutant, Springer Nature, 199-212, 2017

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮永晃彦 (MIYANAGA Akihiko)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 00591281

(2) 研究分担者

清家正博 (SEIKE Masahiro)
日本医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 30366687

弦間昭彦 (GEMMA Akihiko)
日本医科大学・大学院医科学研究科・
大学院教授
研究者番号 : 20234651

(3)連携研究者

山田哲司 (YAMADA Tesshi)

国立がん研究センター

研究者番号：30221659

(4)研究協力者