

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08185

研究課題名(和文) 胸腺癌における新規治療標的遺伝子異常の探索

研究課題名(英文) analysis of novel transcript variant of tyrosine kinase gene in thymic carcinoma

研究代表者

高橋 和久 (Takahashi, Kazuhisa)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80245711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺癌は全胸腺腫瘍の15%前後を占める極めて予後不良な胸部悪性疾患である。本研究は、胸腺癌患者の腫瘍組織を用いた網羅的なmRNAベース・スクリーニング解析による新規治療標的遺伝子異常の探索である。我々はNanoString社のnCounter解析を用いて、胸腺癌の臨床検体腫瘍組織における93個のチロシンキナーゼ(Tyrosine kinase; TK)遺伝子をスクリーニングし、RNA sequencingの解析と併せて、幾つかのTK遺伝子の転写変異体を同定した。これらの遺伝子異常は胸腺癌患者の新規治療標的となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行期胸腺癌では、プラチナ製剤併用、アンスラサイクリン系抗癌剤併用の治療レジメンが多く用いられてきたが、その奏効率は低く、予後は極めて不良である。現在、マルチキナーゼ阻害剤であるレンバチニブも既治療胸腺癌に対して適応拡大を受けている。しかし、胸腺癌治療については、その解析症例数の少なさや生存期間の短さから有望な治療標的遺伝子異常の同定や阻害剤の開発は十分に進んでいない現状である。本研究で同定された遺伝子転写変異体については胸腺癌において、まだ報告がなく、現在、極めて難治性疾患である胸腺癌患者の新規治療標的になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Thymic carcinoma accounts for 15% of all thymic neoplasms and is a highly lethal disease. Novel therapeutic strategies are urgently needed. In this study, we conducted comprehensive analyses by the NanoString nCounter for 93 tyrosine kinase (TK) genes using RNAs from the tumor tissues of thymic carcinoma patients (12 tumors from surgical specimens and 7 tumors from biopsy samples). We identified several novel transcript variants of TK genes by the NanoString nCounter analysis and RNA sequencing. These transcript variants of TK genes may be target for the treatment of thymic carcinoma, although further studies are necessary.

研究分野：肺癌

キーワード：胸腺癌 遺伝子異常 チロシンキナーゼ スクリーニング解析

1. 研究開始当初の背景

胸腺癌は全胸腺腫瘍の15%前後を占め、その悪性度の高さや解剖学的な位置関係から、多くは切除不能な進行期で発見される。進行期胸腺癌における抗癌剤としてはプラチナ製剤併用、アンソラサイクリン系抗癌剤併用の治療レジメンが多く用いられてきたが、その奏効率は低く、また症例数の少なさから多くが第II相試験での評価であり、標準治療は確立されていない。進行期胸腺癌患者の予後は、現在、極めて不良であり、希少疾患ではあるものの、その治療標的となる新規遺伝子異常の同定と有効な分子標的治療薬の開発は喫緊の課題である。

近年、非小細胞肺癌をはじめとした複数の癌腫において、ゲノム網羅的な遺伝子解析により治療標的となる遺伝子異常が同定されている。中でもチロシンキナーゼ(Tyrosine kinase; TK)遺伝子異常として *EGFR* 遺伝子変異や *ALK* 融合遺伝子、*ROS-1* 融合遺伝子などが同定され、これらを標的としたチロシンキナーゼ阻害剤(Tyrosine kinase inhibitor; TKI)は、非小細胞肺癌患者の臨床的な予後を飛躍的に改善させている。

一方、胸腺癌においては、米国 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) より FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) 組織7例の遺伝子解析 (Clin Cancer Res 2009) また日本の国立がん研究センターより FFPE 組織17例の遺伝子解析 (Lung Cancer 2008) の結果が報告されており、*KIT*, *EGFR*, *K-Ras* などの遺伝子変異が検出されている。しかし実診療で胸腺癌における *KIT* 遺伝子変異の頻度は少なく、その阻害剤であるイマチニブは臨床試験でも奏効性を示さなかった (J Thoracic Oncol 2009)。ほかにも *VEGFR*, *PDGFR*, *KIT* などのマルチターゲット阻害剤であるスニチニブ (Lancet Oncol 2015) や mTOR 阻害剤であるエベロリムス (J Clin Oncol 2018) が臨床第2相試験で評価されているが、いずれも現在、推奨される治療とはなっていない。その中で、レンバチニブは *VEGFR*, *FGFR*, *PDGFR*, *KIT*, *RET* などを抑制するマルチキナーゼ阻害剤で、既治療胸腺癌に対する臨床第II相試験で奏効率、病勢制御率ともに有望な効果が示され、現在、適応拡大を受けている。しかし、胸腺癌治療については、解析症例数の少なさや生存期間の短さから有望な治療標的遺伝子の同定や阻害剤の開発は十分に進んでいない現状である。

NanoString 社の nCounter 解析は、遺伝子の5'側と3'側にそれぞれ対応する probe を設定して、その imbalance を検出することにより、融合遺伝子あるいは遺伝子転写変異体の網羅的な mRNA ベース・スクリーニング解析が可能なシステムである。Suehara らは MSKCC において、既知の遺伝子変異が検出されなかった非小細胞肺癌の69症例の腫瘍組織検体を用いて、NanoString の nCounter 解析による網羅的 TK 融合遺伝子のスクリーニング解析を行い、新規 TK 融合遺伝子として *KIF5B-RET* 及び *GOPC-ROS* の同定に成功している (Suehara Y et al. Clin Cancer Res 2012)。

近年、様々な癌腫の領域において、遺伝子変異や融合遺伝子異常だけでなく、遺伝子転写変異体も発癌促進および治療標的として注目されている。例えば、小細胞肺癌 (Small cell lung cancer; SCLC) は肺癌全体の約15%を占め、初回のプラチナ製剤併用の抗癌剤治療にはよく反応するものの、容易に多剤耐性を獲得し、ほとんどの症例において再発、そして増悪する悪性腫瘍である。未だに有効な分子標的治療薬の臨床応用には至っておらず、SCLC 患者の臨床的な予後は極めて不良であるが、*TP73* 遺伝子の転写変異体 (*TP73 Δ ex2/3*) も発癌促進型であることが報告されており、ゲノム解析の結果、約13%の SCLC 症例において *TP73* 遺伝子異常が認められている (George J et al. Nature 2015)。また悪性黒色腫においては、*ALK* の新規転写変異体が NanoString の nCounter 解析によりスクリーニング・同定され、報告されている (Wiesner T et al. Nature 2015)。この *ALK* 転写変異体は、非小細胞肺癌において認められる *EML4* のような融合遺伝子パートナーを持たず、*ALK* の Kinase ドメイン直前より転写が開始される新規アイソフォームであり、*EML4-ALK* 融合遺伝子と同様に 3T3 細胞への遺伝子導入による Focus formation assay で癌化能が確認されている。またこの遺伝子転写変異体を有する悪性黒色腫患者に対して *ALK* 阻害剤である Crizotinib が投与され、その抗腫瘍効果も臨床的に示されている (Wiesner T et al. Nature 2015)。

これらの研究報告は、現在、実臨床としてレンバチニブ以外に推奨される有効な分子標的治療薬のない、極めて難治性疾患である胸腺癌患者において TK 遺伝子の融合遺伝子異常だけでなく、遺伝子転写変異体も有効な治療標的になりうる事を示唆しており、それらを高精度かつハイスループットに探索できる解析システムは胸腺癌における新規治療標的遺伝子の発見探索に必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胸腺癌の腫瘍組織検体を用いて、網羅的な mRNA ベース・スクリーニング解析を行い、胸腺癌の新規治療標的となりうる遺伝子異常の同定および治療薬を開発することである。本研究では、特に治療標的および創薬の開発につながる可能性の高い93個の TK 遺伝子に焦点を絞り、その転写変異体を高精度かつハイスループットに探索できる nCounter 解析を行ない、胸腺癌における候補 TK 遺伝子の新規転写変異体を同定し、その TK ドメインを標的と

した有効な阻害剤を開発することを目標とする。また、同時に胸腺癌患者の臨床検体の収集を継続し、新規転写変異体の臨床的頻度についても検証する。

3. 研究の方法

本研究においては、胸腺癌の新規治療標的遺伝子の同定および治療薬の開発のために、下記の検討を行う。

胸腺癌患者の腫瘍組織における新規 TK 遺伝子転写変異体の探索

胸腺癌患者の生検腫瘍組織や手術により切除された腫瘍組織サンプルより RNA を抽出する。そして NanoString 社の網羅的な mRNA ベース・スクリーニング法である nCounter Analysis System により、遺伝子転写変異体を高精度かつハイスループットに探索する。本アッセイは、手術により切除された凍結組織サンプルからの RNA のような十分量の RNA だけでなく、組織生検の FFPE サンプルから抽出した微量 RNA でも解析が可能であり、上記の生検腫瘍組織検体で得られた FFPE サンプルについても同様に nCounter 機器を用いて解析する。FFPE からの RNA 抽出には QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE Kit を用いる。

現在までに、我々は順天堂大学に NanoString 社の nCounter 機器を搬入・設置している (Figure 1 写真)。そして治療標的となる可能性のある 93 個の TK 遺伝子において 5'側と 3'側にそれぞれ対応する 100bp の probe を設定し、その全ての probe において Validation を行ない、精度について確認している。



Figure 1 nCounter 機器の設置

新規 TK 遺伝子転写変異体の次世代シーケンサー-NGS 解析

nCounter 解析により、胸腺癌・腫瘍組織検体において同定された新規の TK 遺伝子転写変異体候補については、次世代シーケンサー-NGS を用いた RNA sequencing 解析を行い、遺伝子配列を確認して、新規の転写変異体 (バリエーションアイソフォーム) であることを確認する。

胸腺癌患者における臨床的頻度と臨床的背景の解析

胸腺癌患者の生検腫瘍組織サンプルや手術切除症例の腫瘍組織サンプルの収集を継続し、新規 TK 遺伝子転写変異体の臨床的頻度や年齢、性別、合併症などの臨床的背景や治療奏功性、再発、予後などの臨床経過についても解析する。

The Cancer Genome Atlas (TCGA), Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) による解析

胸腺癌・腫瘍組織検体において同定された新規治療標的となる可能性のある遺伝子転写変異体については、TCGA の RNA sequencing のデータも解析する。また CCLE データを用いて、胸腺癌細胞株だけでなく、他の癌腫の細胞株でも同様の遺伝子転写変異体を認めるかどうかを検証する。そして新規転写変異体を認めた細胞株において、その TK ドメインを標的とした阻害剤による感受性・腫瘍増殖抑制効果を In vitro で確認する。

癌化能(Transfoming potential)の検証

同定された新規 TK 遺伝子候補については、NGS を用いたトランスクリプトーム解析を行い、全配列の cDNA をクローニングして、レンチウイルス・発現ベクターを作成する。そして、その癌化能(Transfoming potential)を検証するために、3T3 細胞に発現ベクターを用いて遺伝子導入を行い、In vitro でフォーカス形成能を観察する。さらに遺伝子導入した 3T3 細胞をヌードマウスにも皮下移植して、In vivo での腫瘍形成能も確認する。

4. 研究成果

まず我々は当院での胸腺癌患者の手術組織 (凍結組織サンプル 12 症例) および生検組織 (FFPE

サンプル7症例)からRNAを抽出した。そして、それらのRNAサンプルを用いてNanoString社のnCounter機器を用いて、93個のTK遺伝子の網羅的なmRNAベース・スクリーニング解析を行った。遺伝子転写変異体の候補は、nCounter解析により5'側と3'側の転写のimbalanceとして検出・スクリーニングされるが、Total 17症例中、Figure 2のようにCase 1, 2, 3, 4の4症例において、それぞれGene A, Gene B, Gene C, Gene Dの5'側と3'側の転写のimbalanceが検出され、胸腺癌におけるTK遺伝子の転写変異体候補と考えられた。

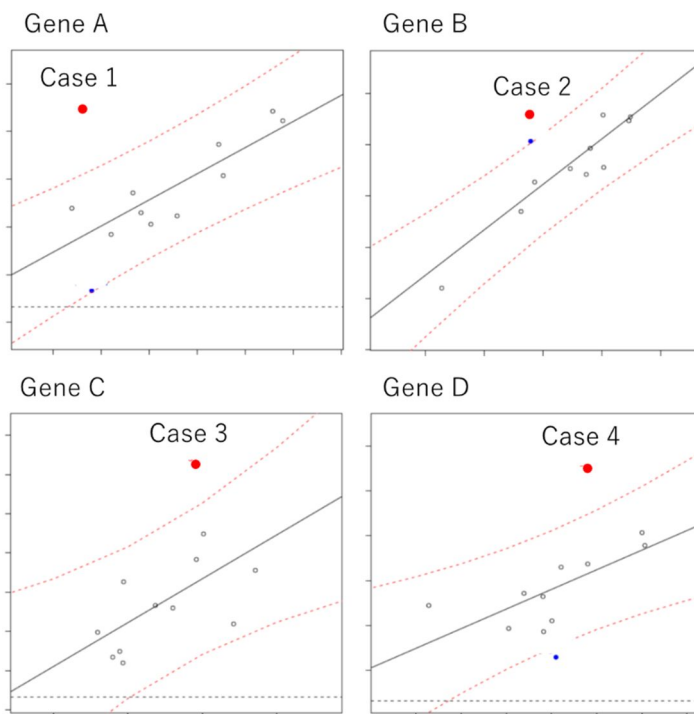


Figure 2 nCounter 解析

そして、次に次世代シーケンサーNGSを用いたRNA sequencingによる解析を行った。Case 1におけるGene AはRNA sequencingによる解析の結果、exon Xから転写が開始されるTK遺伝子転写変異体(アイソフォーム)であることが確認された(Figure 3参照)。またCase 2, 3, 4におけるGene B, Gene C, Gene Dについても、同様にRNA sequencingによる解析を行い、TK遺伝子の転写変異体であることを確認した。

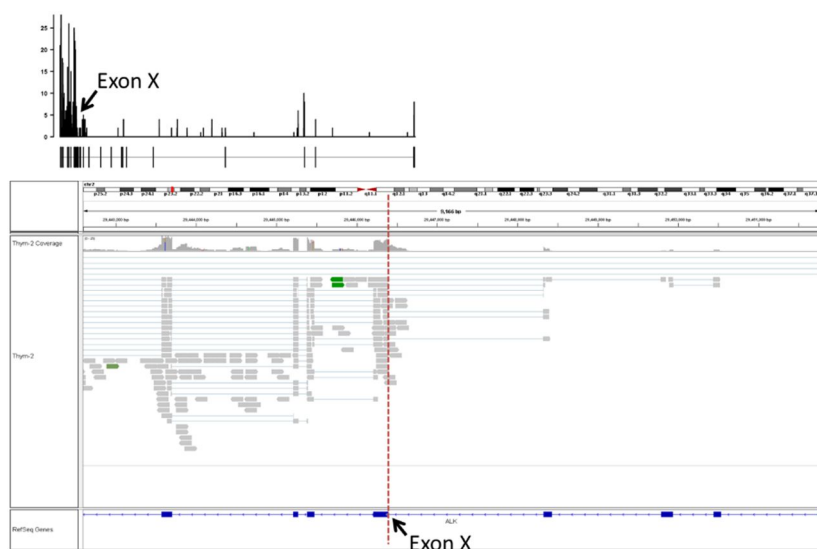


Figure 3 Case 1におけるGene AのRNA seq 解析

現在までに、我々は上記のように胸腺癌患者の腫瘍組織として、組織生検検体7症例と手術により切除された12症例からの腫瘍組織サンプルを収集し、RNAサンプルを用いたnCounter解析を行ない、4つのTK遺伝子の転写変異体を同定しているが、これらの臨床的頻度や治療奏功

性、再発、予後などのバイオマーカーになりうるかを検討するには、更なる胸腺癌症例の蓄積が必要である。

また現在、胸腺由来の細胞株である ThyL-6 や Ty-82 を用いた実験を行っているが、CCLE のデータを用いて、ThyL-6 や Ty-82 以外の様々な癌腫の細胞株においても、これらの TK 遺伝子転写変異体を認めるかどうか解析・検証中である。そして Gene A, Gene B, Gene C, Gene D の転写変異体を有する細胞株を同定して、その TK ドメインを標的とした阻害剤による感受性・腫瘍増殖抑制効果を In vitro で確認する予定である。また Gene A だけでなく、Gene B, Gene C, Gene D の 4 遺伝子の cDNA クローニングとレンチウイルス・ベクターの作成、および 3T3 細胞への遺伝子導入とフォーカス形成能の確認も予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hayakawa D, Takahashi F, Mitsuishi Y, Tajima K, Hidayat M, Winardi W, Ihara H, Kanamori K, Matsumoto N, Asao T, Ko R, Shukuya T, Takamochi K, Hayashi T, Suehara Y, Takeda Nakamura I, Ueno T, Kohsaka S, Mano H, Takahashi K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Activation of insulin-like growth factor-1 receptor confers acquired resistance to osimertinib in non-small cell lung cancer with EGFR T790M mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 140-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.13255.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kohsaka S, Hayashi T, Nagano M, Ueno T, Kojima S, Kawazu M, Shiraishi Y, Suehara Y, Takahashi F, Takahashi K, Suzuki K, Takamochi K, Mano H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Identification of novel CD74-NRG2 fusion from comprehensive profiling of lung adenocarcinoma in Japanese never or light smokers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Thorac Oncol	6. 最初と最後の頁 948-961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtho.2020.01.021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kohsaka S, Tatsuno K, Ueno T, Nagano M, Shinozaki-Ushiku A, Ushiku T, Takai D, Ikegami M, Kobayashi H, Kage H, Ando M, Hata K, Ueda H, Yamamoto S, Kojima S, Oseto K, Akaike K, Suehara Y, Hayashi T, Saito T, Takahashi F, Takahashi K, Mano H, et al.	4. 巻 110
2. 論文標題 Comprehensive assay for the molecular profiling of cancer by target enrichment from formalin-fixed paraffin-embedded specimens.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1464-1479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13968.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ko R, Shukuya T, Okuma Y, Tateishi K, Imai H, Iwasawa S, Miyauchi E, Fujiwara A, Sugiyama T, Azuma K, Muraki K, Yamasaki M, Tanaka H, Takashima Y, Soda S, Ishimoto O, Koyama N, Morita S, Kobayashi K, Nukiwa T, Takahashi K; North East Japan Study Group.	4. 巻 23
2. 論文標題 Prognostic Factors and Efficacy of First-Line Chemotherapy in Patients with Advanced Thymic Carcinoma: A Retrospective Analysis of 286 Patients from NEJ023 Study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncologist	6. 最初と最後の頁 1210-1217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1634/theoncologist.2017-0586.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wirawan A, Tajima K, Takahashi F, Mitsuishi Y, Hidayat M, Winardi W, Hayakawa D, Matsumoto N, Izumi K, Asao T, Ko R, Shimada N, Takamochi K, Suzuki K, Abe M, Hino O, Sekido Y, Takahashi K.	4. 巻 20
2. 論文標題 A novel therapeutic strategy targeting the mesenchymal phenotype of malignant pleural mesothelioma by suppressing LSD1.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Cancer Res	6. 最初と最後の頁 127-138.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-21-0230.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nurwydia F, Takahashi F, Winardi W, Tajima K, Mitsuishi Y, Murakami A, Kobayashi I, Nara T, Hashimoto M, Kato M, Hidayat M, Wirawan A, Baskoro H, Suina K, Hayakawa D, Asao T, Ko R, Shukuya T, Yae T, Shimada N, Takahashi K.	4. 巻 12
2. 論文標題 ZEB1 plays a crucial role in maintenance of lung cancer stem cells resistant to gefitinib.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 1536-1548.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.13937.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Nakamura I, Kohsaka S, Ikegami M, Ueno T, Li K, Beyett T, Koyama T, Shimizu T, Yamamoto N, Takahashi F, Takahashi K, Eck M, Mano H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Comprehensive functional evaluation of variants of fibroblast growth factor receptor genes in cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ Precision Oncology	6. 最初と最後の頁 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41698-021-00204-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa N, Kohsaka S, Kurokawa K, Shinno Y, Takeda Nakamura I, Ueno T, Kojima S, Kawazu M, Suehara Y, Ishijima M, Goto Y, Kojima Y, Yonemori K, Hayashi T, Saito T, Shukuya T, Takahashi F, Takahashi K, Mano H.	4. 巻 112
2. 論文標題 Highly sensitive fusion detection using plasma cell-free RNA in non-small-cell lung cancers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 4393-4403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15084.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 早川乃介、高橋史行、光石陽一郎、田島健、中村育子、松本直久、金森幸一郎、高遼、朝尾哲彦、宿谷威仁、嶋村尚子、和泉研太、Wira Winardi、白井由紀奈、虎澤匡洋、三浦啓太、藤岡雅大、高橋和久
2. 発表標題 インスリン様成長因子1受容体の活性化はT790M遺伝子変異陽性NSCLCにおけるオシメルチニブ耐性に寄与する
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嶋村尚子、宿谷威仁、藤岡雅大、朝尾哲彦、白井由紀奈、三浦啓太、和泉研太、早川乃介、高遼、光石陽一郎、田島健、柴山里奈、嶋田奈緒子、高橋史行、高橋和久
2. 発表標題 進行EGFR遺伝子変異/ALK融合遺伝子陽性NSCLCにおける、治療開始後5年以降の経過の検討
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hayakawa D, Takahashi F, Tajima K, Mitsuishi Y, Takeda Nakamura I, Takahashi K. et al.
2. 発表標題 Activation of insulin-like growth factor-1 receptor confers acquired resistance to osimertinib in EGFR-mutant NSCLC with T790M mutation.
3. 学会等名 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wirawan A, Tajima K, Winardi W, Izumi K, Mitsuishi Y, Takahashi F, Takahashi K. et al.
2. 発表標題 Targeting EMT by suppression of LSD1 in malignant pleural mesothelioma.
3. 学会等名 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kurokawa K, Mitsuishi Y, Shimada N, Asao T, Shukuya T, Takahashi K. et al.
2. 発表標題 Clinical characteristics of adrenal insufficiency induced by pembrolizumab in non-small cell lung cancer
3. 学会等名 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (APSR)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 史行 (Takahashi Fumiyuki) (70327823)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
研究分担者	田島 健 (Tajima Ken) (50384102)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
研究分担者	茂櫛 薫 (Mogushi Kaoru) (60569292)	順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤講師 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------