

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07430

研究課題名（和文）多段階がん仮説における融合遺伝子の役割

研究課題名（英文）The role of fusion genes in multistep progression of cancer

研究代表者

細田 和貴（Hosoda, Waki）

愛知県がんセンター（研究所）・がん情報・対策研究分野・研究員

研究者番号：00728412

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、膵癌のうちKRAS遺伝子変異陰性の膵管癌において、融合遺伝子を含めた遺伝子異常の関与について検索し、更にはこれらが膵癌発生において上皮内病変の段階から重要な役割を果たしている可能性について検討した。75例の症例集積後、詳細な臨床病理学的解析を行ったのち、KRAS遺伝子変異陰性の膵癌では融合遺伝子の関与、特にALKやFGFR2といった治療薬と紐づいた融合遺伝子がみられることを明らかにした。さらには前駆病変においても融合遺伝子の存在を見出すことができ、前駆病変の形成という早い段階から融合遺伝子異常が獲得されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵管癌のKRAS遺伝子変異の検討によるKRAS変異陰性型の膵管癌の抽出は、何らかの特徴的な分子異常を有し、特に治療に紐づく融合遺伝子を有する頻度が高いことが明らかとなった。KRAS変異陰性型膵癌に特徴的な臨床的特徴は見出せなかったが、病理学的には非通常型の組織型がみられるという特徴が明らかとなり、今後このような組織型の膵癌も遺伝子変異のみならず融合遺伝子も検索することで、より効率的に治療に紐づく分子異常を検出できる可能性があることが示唆された。病理学的にはこれら融合遺伝子が腫瘍発生の前駆病変の段階からみられることが明らかとなり、融合遺伝子が腫瘍発生の重要なドライバーとなりうることを示された。

研究成果の概要（英文）：We studied clinicopathological characteristics of seventy five pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) with wild-type KRAS and their genetic alterations including gene fusion as well as somatic mutation. Furthermore, we investigated precursor lesions of PDAC that were located adjacent to the PDAC and their molecular alterations to discuss the potential role of fusions in the formation of PDAC. Using next-generation sequencing, we showed that fusion genes were involved in KRAS wild-type PDAC, some of which (ALK, FGFR2) were known to be correlated with sensitivity to molecular targeted drugs in other types of cancer. Notably, we identified five PDAC cases that were associated with high-grade precursor lesions and showed that two precursor lesions were positive for fusions identical to those detected in invasive carcinomas. These results indicate, for the first time, that gene fusion plays an important role in the formation of PDAC with wild-type KRAS.

研究分野：Pancreatic cancer research

キーワード：Pancreatic cancer tumorigenesis KRAS mutation fusion gene

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は、正常の細胞を始まりとし、そこに何らかの内的、外的な誘因により遺伝子の変異、遺伝子コピー数異常、染色体異常、遺伝子再構成などのゲノム異常が少しずつ蓄積し、増殖が制御できなくなり、最終的に隣接する臓器に広がり、あるいは転移する能力を得て、全身に広がってゆく。その過程において、正常の細胞はまずは前駆病変といわれる上皮内でのがんを形成した後、周囲に広がりあるいは転移する能力を獲得していくと考えられている。この上皮内癌に代表される前駆病変から癌に転化するプロセスの解明は、がんの早期発見のバイオマーカーや制癌剤などの創薬の理想的なターゲットとなる。

膵臓癌は予後不良な癌の一つで、約 9 割の患者さんは周囲臓器に広く広がり、あるいは他臓器に転移のある状態で発見され、進行がん、転移性癌の患者の 5 年生存率は 10%と低いため、有効な治療法の開発が望まれる。一方、膵臓癌はその前駆病変がよく定義されており、前駆病変から浸潤癌形成のためのメカニズムを研究するには格好のモデル疾患である。これまで、前駆病変における遺伝子変異やコピー数異常の蓄積については複数の研究がなされてきたが、それ以外の分子異常についてはいまだ十分に解明されていない。

2018 年に、ドイツの研究チームから、膵臓癌の稀な一群 (KRAS 遺伝子変異陰性) に、NRG1 という遺伝子の融合遺伝子異常が検出された、更にその活動を抑制する分子標的薬剤が有効であったとの報告がなされた (PMID: 29802158)。膵臓癌では融合遺伝子の報告はまれであると考えられてきたこと、また肺がんに代表されるように融合遺伝子に対する薬剤が開発されており、また今後も新たな融合遺伝子に対する薬剤の開発がすすむことが予想されることから、膵臓癌における融合遺伝子の関与、およびそれが膵臓癌の発癌においてどの段階で獲得されるかという新たな問いが生じた。融合遺伝子の多段階発癌における役割についてはよく分かっていなかった (PMID 28373404)。

当院は 1998 年頃より、膵臓癌に対する超音波内視鏡下穿刺吸引とそれを用いた病理診断、遺伝子解析検査 (KRAS 遺伝子検査) をほぼ全症例に行っており、KRAS 遺伝子変異陰性の症例の大きな蓄積があった。この症例群を用いることで、頻度の少ない KRAS 遺伝子変異陰性の膵臓癌の特徴を解析することができるというアドバンテージがあった。

2. 研究の目的

KRAS 遺伝子変異陰性の膵臓癌の特徴、特に融合遺伝子の存在とそれが膵癌発生のどの段階で生じるかについて検討する。膵臓癌には Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) と Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) の二つの膵癌前駆病変があり、これらにおける融合遺伝子の有無を探索する。KRAS 遺伝子変異陰性の膵臓癌に対する臨床的特徴を明らかにし、またその分子異常を、次世代シーケンサーといわれる多数の遺伝子変異や融合遺伝子を一度に調べることができる方法で網羅的に検索する。特徴的な融合遺伝子や分子異常陽性の膵臓癌で、外科手術材料があるものに対しては、前駆病変を探索しそこにも同様の融合遺伝子があるかどうか検討する。

3. 研究の方法

愛知県がんセンター倫理審査委員会での研究審査と承認後、当院の遺伝子病理診断部で病理学的に膵管癌と診断され、なおかつ腫瘍組織で KRAS 遺伝子解析を行うことができた症例を対象とし、KRAS 遺伝子陰性の膵管癌の症例をスクリーニングする。得られた候補症例に対し、高感度な遺伝子解析方法 (real-time polymerase chain reaction (PCR)) で遺伝子変異陰性を確認後、腫瘍組織を使って遺伝子変異、融合遺伝子変異の有無を解析する。解析が可能な核酸が抽出できるかどうかの検定後、遺伝子変異解析には膵臓癌、IPMN で高頻度に変異をきたす遺伝子を含む 29 遺伝子をターゲットにしたカスタム遺伝子パネルを、融合遺伝子解析には 53 遺伝子をターゲットにした遺伝子パネルを使用する。対象となる症例の臨床病理学的特徴 (年齢、性別、癌の既往歴、家族性膵癌の有無、治療歴、転帰、病理組織型) を調査し、KRAS 遺伝子変異陰性膵癌の特徴について調査する。融合遺伝子や特筆すべき遺伝子変異が陽性であった腫瘍に対しては、外科切除材料を使用し、その前駆病変に対しても同様あるいは代替マーカーにより、同様の遺伝子変異があるかどうかを解析する。

4. 研究成果

(1) KRAS 遺伝子変異陰性膵癌の特徴

2006 年から 2021 年の間、愛知県がんセンター遺伝子病理診断部で病理診断され、なおかつ KRAS 遺伝子解析が可能であった 1614 症例より、KRAS 遺伝子陰性症例を抽出した。1539 例で遺伝子変

異が検出され、これらを除いた 75 例（全体の 5%）が研究の対象となった。これら KRAS 変異陰性の膵管癌の臨床病理学的特徴を調べたところ、年齢の中央値は 64 歳、男女比は男 1.9 : 女 1、部位は膵臓の頭部:体尾部 1.3 : 1。糖尿病を有する症例は 23%、IPMN を随伴する症例は 9%であった。家族性膵癌の症例は 1 例であった。診断時のステージは、全体の 65%が IV 期であり、その生存中央値は 13 か月であった（図 1 生存曲線）。これらの結果は、既に報告されている膵臓癌全般の統計（膵臓癌の 90%以上が KRAS 変異陽性であり、これらの統計は KRAS 変異陽性膵癌を近似していると考えられる）と概ね変わりがなかった（膵癌の罹患統計: 男性 36.3 例、女性 33.3 例、ステージ IV の生存中央値 12.7 か月（国立がんセンターがん情報サービス 膵癌、膵癌取り扱い規約第 8 版）。組織型は、通常型管状腺癌以外の特殊な組織型の腫瘍が 19%にみられた。

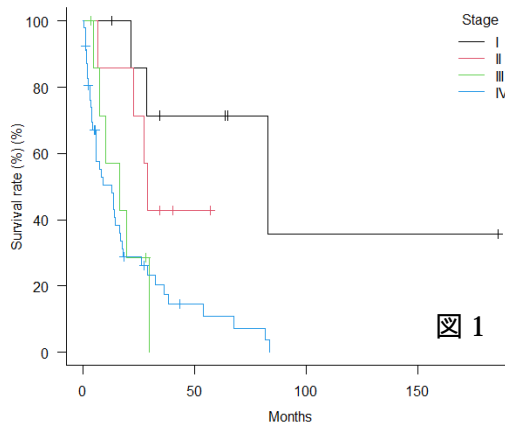


図 1

(2) 分子異常

75 例のうち、状態のよい腫瘍組織が残っており分子異常の解析が可能であった症例は 41 例であった。3 症例以上で変異のみられた遺伝子として: TP53 (n=14), ARID1A (n=10), BRAF (n=6), RNF43 (n=5), GNAS (n=4), PTEN (n=3), SMAD4 (n=3), TGFBR2 (n=3)であった。このうち、BRAF 遺伝子変異で薬剤が開発されている BRAF V600E 遺伝子変異であるが、全体の 5%の症例にこれを有するものがあることが明らかとなった。融合遺伝子は、合計で 3 つの遺伝子に融合遺伝子があることが明らかとなった (FGFR2, ALK, BRAF 遺伝子)。特に、FGFR2 遺伝子、ALK 遺伝子の二つについては、他の癌で既に分子標的薬が開発され臨床使用されているものであった。

(3) KRAS 変異陰性の膵臓癌の前駆病変における分子異常

5 例の KRAS 変異陰性膵癌症例で、浸潤癌およびそれに随伴する前駆病変の分子異常を解析することができた。全ての症例において、浸潤癌と前駆病変との間には共通した分子異常が検出された。特に、ALK 融合遺伝子、BRAF 融合遺伝子陽性の腫瘍においてはいずれも前駆病変に同様の遺伝子異常が検出された（下記図 2 に示す）。

(4) その他：核酸の品質に関する付随的な研究

今回の研究を進めるにあたり、解析に使用した次世代シーケンサーによる解析の成功のために必要なサンプルの品質の検定方法についても追及し、その過程で新しい評価方法を見出すことに成功した (Peak/base ratio)。これは、広く病理検査室で普及し、また組織の保存に利用されているホルマリン固定パラフィン包埋組織では、DNA の品質が低下することが広く言われているが、それを電気泳動法という核酸品質評価法の一つで簡便かつ高精度に評価できる方法である。この研究内容の詳細は既に発表した論文を参照されたい (PMID: 37167067)。

(5) 研究の成果とインパクト、今後の展望

KRAS 変異陰性膵癌症例を 75 例集積し、詳細な臨床病理学的解析を行った。KRAS 変異陰性膵癌の臨床病理学的解析を行った研究はこれまでに殆どなく、また行われた検討でもその症例数は限られており、本研究は最大規模の症例数の研究である。その特徴として、臨床像の特徴は他の通常型膵癌とほぼ変わりがなく、病理学的に非通常型の組織型の症例が多い (19%) ことが明らかとなった。

KRAS 遺伝子変異陰性の膵癌では融合遺伝子の関与、特に ALK や FGFR2 といった治療薬と紐づいた融合遺伝子がみられる頻度が高かった。

前駆病変における融合遺伝子の存在が証明された。この結果は、前駆病変が形成される段階から融合遺伝子異常が獲得されることを示唆している。これは国内外で初の研究報告であり、発癌機序における融合遺伝子の時期を示す、特筆すべき成果と考えている。

以上、膵管癌の KRAS 遺伝子変異の検討による KRAS 変異陰性型の膵管癌の抽出は、融合遺伝子や BRAF V600E 変異など特徴的な分子異常を有し、特に治療に紐づく融合遺伝子を有する頻度が高いことが明らかとなった。KRAS 変異陰性型膵癌に特徴的な臨床的特徴は見出せなかったが、病理学的には非通常型の組織型がみられるという特徴が明らかとなり、今後このような組織型の膵癌には遺伝子変異のみならず融合遺伝子も検索することで、より効率的に治療に紐づく分子異常を検出できる可能性があることが示唆される。腫瘍病理学の観点からは、融合遺伝子が腫瘍発生の前駆病変の段階からみられることが明らかとなり、融合遺伝子は、遺伝子変異と同じく、腫瘍発生の重要なドライバーとなりうるということが示された。今後、他施設共同研究により非通常型膵癌の症例を集積し、融合遺伝子の分布と頻度についての検討等により、予後不良な膵癌治療開

発の一端となることが期待できる。

図 2

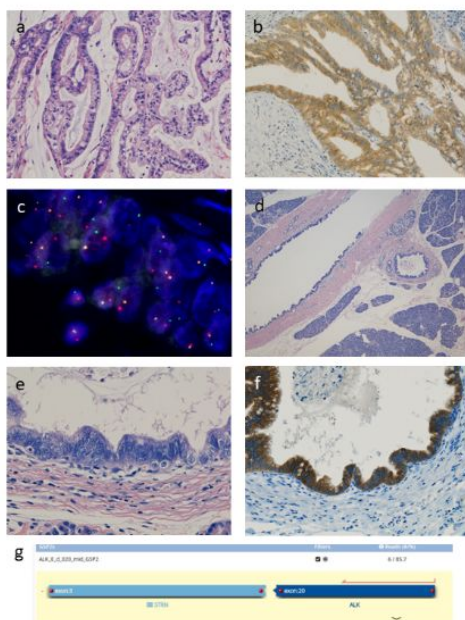


図 2 の説明：

ALK 融合遺伝子陽性膵癌の一例。

(a)はその組織像、(b)は免疫染色法により ALK タンパク質が高発現していたことを示す。ALK タンパク質高発現の腫瘍には ALK 遺伝子の融合遺伝子が存在することが肺がんなどで知られている。

(c)は FISH 法と呼ばれる、融合遺伝子(再構成ともいわれる)をみる解析方法。シグナルの分裂がみられ、遺伝子再構成が陽性と判定される。

(d,e)は近傍にあった膵癌の上皮内癌成分で、(f)に示すように ALK タンパク質の高発現を認めた。

(g,h)は ALK 融合遺伝子解析の RNA シーケンス結果で、STRN 遺伝子との融合遺伝子を検出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kaho Hiramatsu, BSMT1), Chiaki Matsuda, BSMT1), Katsuhiro Masago, MD, PhD1), Kazuhiro Toriyama, MD1), Eiichi Sasaki, MD, PhD 1), Yasuko Fujita, MD, PhD 1), Masataka Haneda, MD, PhD 1), Hiromichi Ebi, MD, PhD 2), Noriko Shibata, BSMT1), and Waki Hosoda, MD, PhD 1)	4. 巻 160
2. 論文標題 Diagnostic utility of DNA integrity number (DIN) as an indicator for sufficient DNA quality in next-generation sequencing-based genomic profiling tests	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 261-267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ajcp/aqad046	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0件

〔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	谷田部 恭 (Yatabe Yasushi) (90280809)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・科長 (82606)	

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