

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07415

研究課題名(和文) 軟部肉腫におけるキナーゼ阻害剤に対する治療抵抗性の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for resistance to kinase inhibitors in soft tissue sarcomas

研究代表者

齋藤 剛 (Saito, Tsuyoshi)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：80439736

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)：RNAシーケンスを用いて骨軟部腫瘍において多くを占める腫瘍特異的融合遺伝子陰性群で、in-frameのTK融合遺伝子を約10%に同定し、これらは免疫染色による過剰発現によるスクリーニングが可能と判断され、他腫瘍における探索も進めた。進行大腸癌でNTRK融合遺伝子陽性例を7例、ALK融合遺伝子陽性例を3例、MET ex14 skipping(MET Ex14s)陽性例も9例に検出し、これらの臨床病理学的特徴を報告した。脳腫瘍では定量PCRによるNTRK1-3の遺伝子不均衡発現解析を行い、2例のNTRK融合遺伝子陽性例を検出し、いずれもhigh-grade glioblastomaであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

融合遺伝子の網羅的な検索にはNGS等を用いた解析が効率的であるが高価な点が難点である。本研究では骨軟部腫瘍を用いたRNAシーケンスの結果検出されたTK融合遺伝子の多くはTKを標的とした免疫染色を用いたスクリーニングが可能であろうことに着目し、臓器横断的な悪性腫瘍においてTK異常を有する腫瘍の探索を行った。TKを標的とした免疫染色あるいは定量PCRによるTK遺伝子不均衡発現解析により、TK異常を有する一群を検出することが出来た。TK異常を有する悪性腫瘍はTK阻害剤による治療奏効性が期待できるため、それらを検出できるような簡易システムを立ち上げていくことの学術的・社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Tyrosine kinase (TK) fusions were frequently identified in so-called specific fusion-negative bone and soft tissue sarcomas by RNA sequencing (10%). All of these fusions were considered to be possibly screened by immunohistochemical (IHC) overexpression of TK proteins, so pan-cancer screening for TK fusions was performed using tissue microarray (TMA)-based IHC targeted for TK such as NTRK, ALK, MET. Three NTRK fusion-positive colorectal carcinomas (CRCs) and three ALK fusion-positive CRCs, and nine CRCs with MET ex14 skipping (METex14s) alteration were identified from among approximately 970 CRCs. Another four NTRK fusion-positive CRCs were identified from another set of CRCs. Clinicopathologically, CRCs with either NTRK/ALK fusions occurred in right-side colon, while CRCs with MET ex14s occurred in left-side colon. CRCs with NTRK fusions histologically showed at least partially mucinous features. In addition, NTRK fusion were detected in high-grade glioblastomas as therapeutic target.

研究分野：骨軟部腫瘍病理、分子病理

キーワード：肉腫 骨軟部腫瘍 分子治療標的 チロシンキナーゼ受容体 融合遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

「肉腫における分子標的治療では、Tyrosine kinase inhibitor (TKI)はなぜ効かないのか？」ということ念頭において研究を計画した。軟部肉腫に対してもTKIである pazopanib の治療適応が開始されたが、文献的には散発性に奏功したという報告をみるに留まっており、GIST や肺癌等と異なりTKの変異・融合遺伝子の形成がほとんど認められないことが治療効果を示さない原因の一つであると考えられるが、奏功性に関連する因子も依然明らかではない。一方、軟部肉腫の一つである胃消化管間質腫瘍(GIST)は、約90%にReceptor tyrosine kinase (RTK)であるKITやPDGFRA変異に伴う恒常的な自己リン酸化が腫瘍化の原因で、症例毎に治療に対する反応性も異なるが、治療にImatinib, SunitinibなどのTyrosine kinase 阻害剤(TKI)が有効である。しかしながら、この場合も二次性のRTK変異獲得に代表されるTKI抵抗性が克服しなければならない大きな問題である。近年の次世代シーケンサーを用いた研究でも、いわゆるKIT/PDGFR $\alpha$  wild-type GISTにおけるdriver mutationは少数見つかってきているものの、これらの網羅的な手法によって新規治療標的の探索を含めたGIST患者の救済に繋がるような研究成果が出ているとは言い難い。

## 2. 研究の目的

上記の研究計画であったが、治療奏功性について深く追うことよりも、主にTK異常を有する悪性腫瘍の探索を行うこととなった。その大きな理由はまずはTK異常を有する悪性腫瘍が少なく、治療への反応を含めた臨床病理像がまとまっていないことが挙げられた。RNAシーケンシングを用いた解析で骨軟部腫瘍において多くを占める腫瘍特異的融合遺伝子陰性群で、in-frameのTK融合遺伝子を約10%に同定したが、同時にout-of-frameのTK融合遺伝子も高率(約15%)に検出された(Hasegawa N, Saito T, Clin Orthop Relat Res, 2024)。この研究で検出されたIn-frameのTK融合遺伝子は、NTRK3, EGFR, VEGFR2, METであり、これらはすべてプロモータースワッピングによるTK遺伝子・タンパク質の過剰発現に結びついておりIHCによる検出が有用なものであった(図1)。このことから免疫染色とRNAベースの発現解析を合わせた”オリジナル”の遺伝子/タンパク質不均衡発現解析を用いて、有効な治療標的となるTyrosine kinase(TK)融合遺伝子を有する悪性腫瘍を探索しており、融合遺伝子を有する可能性が高いことが示唆される症例に対し、RNAシーケンシングを行い、融合遺伝子およびその他のがん関連遺伝子の変異データを得て、TK融合遺伝子腫瘍の分子病理学的特徴を見出すことから、病理組織像からこれらTK異常を有する悪性腫瘍の推察が出来ることを目指す。

## 3. 研究の方法

NTRK, ALK, METを始めとして、その後同定されてきたEGFR, VEGFR2を含むTKを標的とした免疫染色とこれらをコードする遺伝子を含むRNAベースの発現解析を合わせた”オリジナル”の遺伝子/タンパク質不均衡発現解析を用いて、有効な治療標的となるTK融合遺伝子を有する悪性腫瘍を全体的に探索し、融合遺伝子を有する可能性が高いことが示唆される症例に対し、RNAシーケンシングを行う。免疫染色は臓器横断的に腫瘍毎に作成したtissue microarray(TMA)を用いて行った。また、遺伝子不均衡発現解析は、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)検体よりRNAを抽出し、多数のTK遺伝子プローブを載せたパネルをnCounterにより各遺伝子の5'-側および3'-側の遺伝子発現量を測定することで同一遺伝子内の発現不均衡を測定した。これらTK異常を有することが判明した腫瘍については、臨床病学的解析を行い、その特徴を見出した。

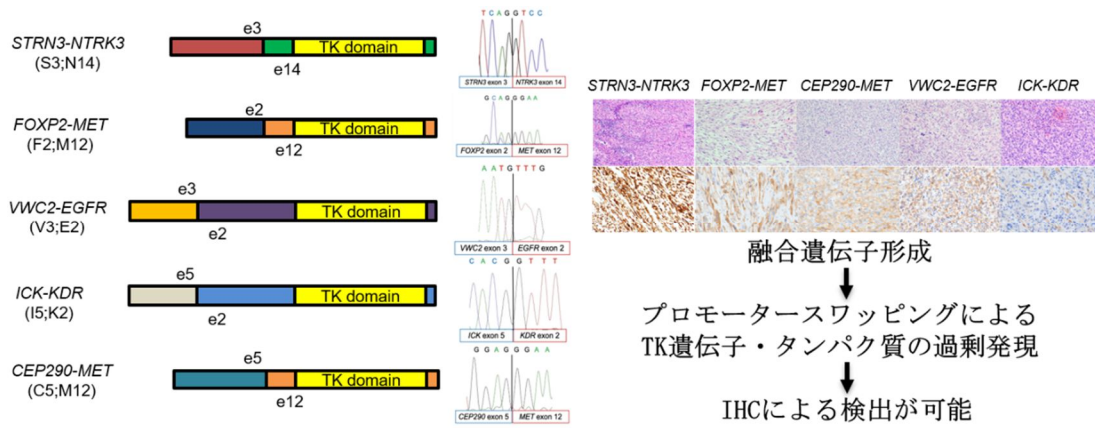
## 4. 研究成果

2021年度に進行大腸癌約1000例の解析から3例のNTRK融合遺伝子陽性大腸癌を検出し、その臨床病理学的特徴を報告した(Yamashiro Y, Saito T. Sci Rep, 2021)。また、同一シリーズを用いてALK融合遺伝子陽性腫瘍を3例、MET ex14 skipping(MET Ex14s)陽性症例も9例に検出し、これらの臨床病理学的な特徴を報告した(Okano S, Saito T. Histopathology, 2023)。その後さらに進行大腸癌700例程度から新たに4例のNTRK融合遺伝子陽性例を同定するとともにNTRK/ALK融合遺伝子陽性大腸癌の臨床病理学的特徴をまとめ、右側大腸に発生することが多く、その中でも特にNTRK融合遺伝子陽性大腸癌は部分的なものを含め粘液癌の像を呈することが多いことを見出した。一方、MET ex14s陽性大腸癌は左側結腸に多いという特徴があった。脳腫瘍では背景の脳組織にNTRK遺伝子・タンパク質のpan-trkの免疫染色によるスクリーニングが行えないため、定量PCRによるNTRK1-3の遺伝子不均衡発現解析を行い、2例のNTRK融合遺伝子陽性例を検出し、いずれもhigh-grade glioblastoma症例であり、分子治療標的の良い適応となる可能性が考えられた。

さらに、GISTにおいては、pan-trk免疫染色により陽性となる一群があることを見出し、面白いことにこれらはすべて十二指腸あるいは小腸発生のものであった。これらのFFPE検体よりRNAを抽出しNTRK1-3の遺伝子不均衡発現解析を行うと、いずれの症例もNTRK2の遺伝子発現が高かったものの、不均衡発現はみられず、NTRK2を含む融合遺伝子の形成はないと判断された。ま

た、これら *NTRK2* の遺伝子高発現を示すものは *KIT* 変異を有しており、この結果からもいわゆる wild-type GIST における相互排他的な遺伝子変化とは思われなかった。しかしながら、十二指腸・小腸発生の GIST の中ではこれら *NTRK2* 高発現群は低発現群と比べると無病生存率が悪い傾向にあり、生物学的なさらなる悪性度の獲得に寄与している可能性が示唆された。

図 1：骨軟部腫瘍において検出された TK 融合遺伝子陽性腫瘍。これらは免疫染色による TK 過剰発現を来しており、免疫染色によるスクリーニングが可能となる可能性が示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suehara Y, Kohsaka S, Hayashi T, Akaike K, Kurisaki-Arakawa A, Sato S, Kobayashi E, Mizuno S, Ueno T, Morii T, Okuma T, Kurihara T, Hasegawa N, Sano K, Sasa K, Okubo T, Kim Y, Mano H, Saito T.	4. 巻 479(4)
2. 論文標題 Identification of a Novel MAN1A1-ROS1 Fusion Gene Through mRNA-based Screening for Tyrosine Kinase Gene Aberrations in a Patient with Leiomyosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Orthop Relat Res	6. 最初と最後の頁 838-852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CORR.0000000000001548.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ura A, Saito T, Motoi T, Takagi T, Suehara Y, Kurihara T, Sano K, Sasa K, Hayashi T, Yao T.	4. 巻 479(2)
2. 論文標題 A case of primary distal-type epithelioid sarcoma of the lumbar vertebra with a review of literature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Arch.	6. 最初と最後の頁 393-400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-020-02955-w.	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 Kurihara Taisei, Suehara Yoshiyuki, Akaike Keisuke, Hayashi Takuo, Kohsaka Shinji, Ueno Toshihide, Hasegawa Nobuhiko, Takagi Tatsuya, Sasa Keita, Okubo Taketo, Kim Youngji, Mano Hiroyuki, Yao Takashi, Kaneko Kazuo, Saito Tsuyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Nanostring-based screening for tyrosine kinase fusions in inflammatory myofibroblastic tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75596-3	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 Nobuhiko, Kohsaka Shinji, Kurokawa Kana, Shinno Yuki, Takeda Nakamura Ikuko, Ueno Toshihide, Kojima Shinya, Kawazu Masahito, Suehara Yoshiyuki, Ishijima Muneaki, Goto Yasushi, Kojima Yuki, Yonemori Kan, Hayashi Takuo, Saito Tsuyoshi, Shukuya Takehito, Takahashi Fumiyuki, Takahashi Kazuhisa, Mano Hiroyuki	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 Science	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 -

1. 著者名 Yamashiro Yuya, Kurihara Taisei, Hayashi Takuo, Suehara Yoshiyuki, Yao Takashi, Kato Shunsuke, Saito Tsuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 NTRK fusion in Japanese colorectal adenocarcinomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85075-y	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 Suehara Yoshiyuki, Kohsaka Shinji, Hayashi Takuo, Akaike Keisuke, Kurisaki-Arakawa Aiko, Sato Shingo, Kobayashi Eisuke, Mizuno Sho, Ueno Toshihide, Morii Takeshi, Okuma Tomotake, Kurihara Taisei, Hasegawa Nobuhiko, Sano Kei, Sasa Keita, Okubo Taketo, Kim Youngji, Mano Hiroyuki, Saito Tsuyoshi	4. 巻 479
2. 論文標題 Identification of a Novel MAN1A1-ROS1 Fusion Gene Through mRNA-based Screening for Tyrosine Kinase Gene Aberrations in a Patient with Leiomyosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Orthopaedics & Related Research	6. 最初と最後の頁 838 ~ 852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CORR.0000000000001548	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 Yamashita Atsushi, Suehara Yoshiyuki, Hayashi Takuo, Takagi Tatsuya, Kubota Daisuke, Sasa Keita, Hasegawa Nobuhiko, Ishijima Muneaki, Yao Takashi, Saito Tsuyoshi	4. 巻 481
2. 論文標題 Molecular and clinicopathological analysis revealed an immuno-checkpoint inhibitor as a potential therapeutic target in a subset of high-grade myxofibrosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 1 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-022-03358-9	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 Sasa Keita, Saito Tsuyoshi, Kurihara Taisei, Hasegawa Nobuhiko, Sano Kei, Kubota Daisuke, Akaike Keisuke, Okubo Taketo, Hayashi Takuo, Takagi Tatsuya, Ishijima Muneaki, Suehara Yoshiyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Establishment of Rapid and Accurate Screening System for Molecular Target Therapy of Osteosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Technology in Cancer Research & Treatment	6. 最初と最後の頁 1533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/15330338221138217	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 8)Saito T, Kubota D, Sasa K, Hasegawa N, Hayashi T, Takagi T, Ishijima M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Microcystic/reticular schwannoma of the lower leg: Case report with review of literature.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Case Rep Images Pathol	6. 最初と最後の頁 1-5.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Okano Soh, Yamashiro Yuya, Onagi Hiroko, Sasa Keita, Hayashi Takuo, Takahashi Makoto, Sugimoto Kiiichi, Sakamoto Kazuhiro, Yao Takashi, Saito Tsuyoshi	4. 巻 83
2. 論文標題 Tyrosine kinase alterations in colorectal cancer with emphasis on the distinct clinicopathological characteristics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 733 ~ 742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.15015	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 Nobuhiko, Hayashi Takuo, Niizuma Hidetaka, Kikuta Kazutaka, Imanishi Jungo, Endo Makoto, Ikeuchi Hiroshi, Sasa Keita, Sano Kei, Hirabayashi Kaoru, Takagi Tatsuya, Ishijima Muneaki, Kato Shunsuke, Kohsaka Shinji, Saito Tsuyoshi, Suehara Yoshiyuki	4. 巻 482
2. 論文標題 Detection of Novel Tyrosine Kinase Fusion Genes as Potential Therapeutic Targets in Bone and Soft Tissue Sarcomas Using DNA/RNA-based Clinical Sequencing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Orthopaedics & Related Research	6. 最初と最後の頁 549 ~ 563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CORR.0000000000002901	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 Keita K, Son R, Oguchi A, Ashizawa K, Hasegawa N, Kubota D, Suehara Y, Takagi T, Okubo T, Akaike K, Sugimoto K, Takahashi M, Sakamoto K, Hashimoto T, Mine S, Fukunaga T, Ishijima M, Hayashi T, Yao T, Murakawa Y, Saito T.	4. 巻 14
2. 論文標題 NTRK2 expression in gastrointestinal stromal tumors with a special emphasis on the clinicopathological and prognostic impacts	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-51211-7	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	末原 義之  (Suehara Yoshiyuki)  (70509405)	順天堂大学・医学部・客員教授   (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
---------	---------