

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390394

研究課題名（和文）肺癌における化学療法感受性とチロシンキナーゼ遺伝子変異

研究課題名（英文）Tyrosine kinase gene mutation and chemotherapy sensitivity in lung cancers.

研究代表者

藤井 義敬 (FUJII YOSHITAKA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40156831

研究成果の概要（和文）：補助化学療法を施行された肺癌患者における化学療法感受性因子、ERCC1 の C8092A および codon118C/T 遺伝子多型を検討した。肺扁平上皮癌における NRF2 遺伝子変異を検索し、コピー数の増加や MRP3 (多薬剤耐性関連たんぱく) 蛋白発現、臨床病理学的背景との相関を検討した。新たなチロシンキナーゼ遺伝子変異の探索を次世代シーケンスにより網羅的に行った結果、KIF5B/RET 遺伝子転座を同定した。RET 阻害剤が転座例に有効である可能性が示唆され、FISH 法を用いた KIF5B/RET 同定法を確立した。

研究成果の概要（英文）：ERCC1 C8092A and codon118C/T gene polymorphism statuses were evaluated for lung cancer patients who received adjuvant chemotherapy. We have investigated NRF2 gene mutation statuses in lung squamous cell carcinomas and compared with copy number, MRP3 (multi-drug resistance-associated protein 3) expression and other clinico-pathological backgrounds. Novel KIF5B/RET translocation was found in lung cancer using a next-generation sequencing assay. KIF5B/RET transfected cells were sensitive to anti-RET drugs. We have developed fluorescence in situ hybridization (FISH) assay to detect KIF5B/RET translocation gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺癌、ERCC1、NRF2、KIF5B/RET、RET 阻害剤、FISH、MRP3

1. 研究開始当初の背景

2004 年に我々は Dana Farber Cancer Institute との共同研究により肺腺癌における EGFR 遺伝子変異を同定し Science 誌に報告した。この遺伝子変異は EGFR を分子標的とするゲフィチニブの感受性と相関することがわかったが、2008 年の IPASS 試験により未治療肺腺癌症例で、EGFR 遺伝子変異を有す

れば既存の化学療法よりもゲフィチニブが有意に無再発生存期間を延長することがわかった。一方肺癌術後に通常の化学療法剤を用いた補助化学療法施行時の感受性因子として ERCC1 や β -tubulin が注目されてきた。肺癌における新規転座遺伝子 (EML4-ALK) など次々と分子標的の可能性のあるチロシンキナーゼ遺伝子変異が肺腺癌において同定

されてきたが、扁平上皮癌に対する治療戦略は以前とほとんど変わっていない。

2. 研究の目的

(1) 肺癌における ERCC1 遺伝子多型 (codon 118, C8092A) について簡便な、PCR-RFLP assay 法により検討し、補助化学療法を施行された肺癌における臨床病理学的因子との相関を検討する。

(2) 肺扁平上皮癌における分子標的となりうる遺伝子変異の同定を目指し、その臨床病理学的因子との相関を明らかにする。特に抗癌剤耐性との相関を検討する。肺扁平上皮癌で増幅が示唆される NRF2、FGFR1 遺伝子について検討を加える。

(3) 肺腺癌における分子標的となりうる新規チロシンキナーゼ遺伝子変異の同定を目指し、その簡便な同定法を確立する。

3. 研究の方法

名古屋市立大学病院呼吸器外科で手術を施行された肺癌症例における患者検体を用いて、genomic DNA および RNA を抽出し、様々な遺伝子変異を調べ、臨床病理学的因子との相関を検討する。

(1) ERCC1 遺伝子多型検索については genomic DNA を用い、PCR-RELP 法で行なった。ERCC1 遺伝子の検索目的部位に相応するプライマーを用いて PCR を行った後、HpyCH4IV、MboII 等の制限酵素で処理後電気泳動を行った。バンドの位置により、遺伝子多型状態を検索した。肺癌手術後補助化学療法を行った 90 例と、補助化学療法施行しなかった 55 例において予後を検討した。過去に報告してきた ERCC1 に対する抗体を用いた免疫組織学的検索との比較検討も行った。

(2) 肺癌における NRF2 遺伝子変異検索については、高頻度に変異が報告されている DLG あるいは ETGE モチーフを含む N 末端のダイレクトシーケンス (RT-PCR assay; exon1-2) にて行なった。扁平上皮癌における NRF2 および FGFR1 遺伝子増幅についてはリアルタイム PCR を用いてコピー数の同定を検討した。リアルタイム PCR を用いた方法は、Line-1 遺伝子をコントロールとし NRF2 や FGFR1 等遺伝子の相対的コピー数を検討するものである。NRF2 遺伝子変異関連因子として MRP3

(multi-drug resistance-associated protein 3) 発現は LightCycler を用いた定量的 RT-PCR を行った。

(3) Dana Farber Cancer Institute との共同研究から次世代シーケンスを用いて肺腺癌における新規遺伝子変異検索を行った。この結果同定された KIF5B/RET 転座変異について、当科検体を用いて更に検討を加えた。FISH 法による転座同定の確立を目指した。

4. 研究成果

(1) ERCC1 遺伝子多型と、補助化学療法を施行された肺癌患者の予後の検討を行ったところ、ERCC1 遺伝子多型 (codon118) を有する場合予後良好 ($p=0.0307$)、C8092A については C/C タイプであれば予後良好 ($p=0.0154$) であることがわかった。しかしながら両遺伝子多型は肺癌術後補助化学療法を施行しなかった患者の予後には寄与しなかった。現在これらの手法を胸腺腫瘍にも応用している。

(2) 肺癌 291 例における NRF2 遺伝子変異検索を行い、16 例において遺伝子変異を認めた。全例男性、扁平上皮癌で 10 例の隣接正常組織に変異を認めず体細胞変異と思われた。組織亜型とは相関なく、NRF2 遺伝子変異例では有意に予後不良であることがわかった。多変量解析を行っても NRF2 遺伝子変異はステージについて独立した予後不良因子となった。NRF2 遺伝子のコピー数変化は遺伝子変異と相関は見られたが、頻度は少なかった。MRP3 遺伝子発現は NRF2 遺伝子変異例で有意高値であった ($p=0.0036$)。MRP 高発現群では有意に予後が不良であった。肺癌における FGFR1 遺伝子コピー数の検討も行ったところ、扁平上皮癌では比較的高頻度に増幅が見られることがわかった。

(3) 肺癌における新規転座遺伝子 KIF5B/RET 変異を同定した。当院における 371 例の検討の結果、3 例の変異を同定した。全例腺癌 (3/270, 1.1%)、変異は EGFR や Kras などの他遺伝子変異とは排他的であり、肺癌特異的であった。非喫煙者、女性に多かった。共同研究により以下のことが証明された (KIF5B/RET の全長をトランスフェクションした BaF3 細胞は IL3 非依存性の増殖を示す。これらの細胞は sunitinib, sorafinib, vandetanib などの抗 RET 阻害剤には sensitive であるが抗 EGFR 阻害剤である gefitinib には感受性がない)。現在 KIF5B/RET の検出法の確立のため、GSP 研究所の fusion および split プローブを用いて KIF5B、RET の FISH 法による検討を行い、KIF5B/RET 陽性三例中二例において良好なシグナルを検出した。現在 FISH 法の改良を行っている。

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 12 件)

1. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Sasaki H (24 番目) et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. Nat Med 18, 2012, 382-384 (査読有)

2. Sasaki H, Shitara M, Yokota K, Hikosaka Y, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. Increased FGFR1 copy number in lung squamous cell carcinomas. Mol Med Report 5, 2012, 725-728 (査読有)
 3. Sakata R, Fujii Y, Kuwano H (Committee for Scientific Affairs). Thoracic and cardiovascular surgery in Japan during 2009: Annual report by The Japanese Association for Thoracic Surgery. Gen Thorac Cardiovasc Surg 59, 2011, 636-667. (査読無)
 4. Yano M, Sasaki H, Moriyama S, Kawano O, Hikosaka Y, Fujii Y. Prognostic factors of pathologic stage 1B non-small cell lung cancer. Ann Thorac Cardiovasc Surg 17, 2011, 58-62 (査読有)
 5. Okuda K, Sasaki H, Hikosaka Y, Kawano O, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. LKB1 gene alterations in surgically resectable adenocarcinoma of the lung. Surg Today 41, 2011, 107-110 (査読有)
 6. Okuda K, Sasaki H, Hikosaka Y, Kawano O, Yukiue H, Yano M, Fujii Y. Excision repair cross complementation group 1 polymorphisms predict overall survival after platinum-based chemotherapy for completely resected non-small cell lung cancer. J Surg Res 168, 2011, 206-212 (査読有)
 7. Sakata R, Fujii Y, Kuwano H (Committee for Scientific Affairs). Thoracic and cardiovascular surgery in Japan during 2008: Annual report by The Japanese Association for Thoracic Surgery. Gen Thorac Cardiovasc Surg 58, 2010, 356-383 (査読無)
 8. Sasaki H, Hikosaka Y, Okuda K, Kawano O, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. NFE2L2 gene mutation in male Japanese squamous cell carcinoma of the lung. J Thorac Oncol 5, 2010, 786-789 (査読有)
 9. Sasaki H, Hikosaka Y, Kawano O, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. MEK1 and AKT2 mutations in Japanese lung cancer. J Thorac Oncol 5, 2010, 597-600 (査読有)
 10. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Sasaki H (33 番目) et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. Nature 463, 2010, 899-905 (査読有)
 11. Ueda Y, Fujii Y, Kuwano H (Committee for scientific affairs). Thoracic and cardiovascular surgery in Japan during 2007. Gen Thorac Cardiovasc Surg 57, 2009, 488-513 (査読無)
 12. Sasaki H, Shimizu S, Okuda K, Kawano O, Yukiue H, Yano M, Fujii Y. Epidermal growth factor receptor gene amplification in surgically resected Japanese lung cancer. Lung Cancer 64, 2009, 295-300 (査読有)
- [学会発表] (計 8 件)
1. 奥田勝裕、横田圭右、矢野智紀、佐々木秀文、森山悟、彦坂雄、設楽将之、藤井義敬 <ワークショップ> : 胸腺上皮性腫瘍の治療 up to data 胸腺癌における TS, OPRT, ERCC1, Class III β -tubulin タンパク発現の検討 第 52 回日本肺癌学会総会 2011 年 11 月 3-4 日 大阪
 2. Okuda K, Sasaki H, Yano M, Moriyama S, Hikosaka Y, Fujii Y. ERCC1 polymorphisms predict overall survival after platinum-based chemotherapy for complemently resected NSCLC. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3-5 日 名古屋
 3. 佐々木秀文、彦坂雄、森山悟、矢野智紀、藤井義敬 日本人肺扁平上皮癌における NRF2 遺伝子変異は予後と関連する 第 63 回日本胸部外科学会定期学術集会 2010 年 10 月 24-27 日 大阪
 4. 佐々木秀文、奥田勝裕、彦坂雄、森山悟、矢野智紀、藤井義敬 肺癌における NRF2 遺伝子変異は男性扁平上皮癌に多く予後と関連する 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22-24 日 大阪
 5. 藤井義敬 本邦における肺癌登録の現状と展望-肺癌登録合同委員会について 第 25 回日本肺癌学会ワークショップ 2010 年 7 月 3 日 東京
 6. Sasaki H, Hikosaka Y, Kawano O, Okuda K, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. NFE2L2 gene mutation in Japanese lung cancer patients. AACR 101th annual meeting. April 17-21th, 2010, Washington DC.
 7. 佐々木秀文、奥田勝裕、雪上晴弘、矢野智紀、藤井義敬 日本人肺腺癌における MEK1 および AKT2 遺伝子変異の検討 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 日 横浜
 8. 藤井義敬 呼吸器外科手術の診療ガイドライン : 縦隔腫瘍取り扱い規約とガイドライン 第 26 回日本呼吸器外科学会総会 2009 年 5 月 14-15 日 北九州
- [図書] (計 1 件)
- 正岡昭、藤井義敬、矢野智紀、佐々木秀文、原真咲、羽田園城、平手博之、祖父江和哉、

河野匡、伊達洋至、岡部和倫、植村貞繁、丹羽宏。正岡昭 監修、藤井義敬 編集 「呼吸器外科学」改訂第4版、pp1-566、南山堂、東京、2009

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：KIF5B 遺伝子と RET 遺伝子との間の転座を検出する FISH アッセイ

発明者：佐々木秀文

権利者：名古屋市立大学、ダコ・ジャパン株式会社、株式会社 GSP 研究所

種類：特許 特願

番号：2012-015939

出願年月日：平成24年1月27日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 義敬 (FUJII YOSHITAKA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40156831

(2) 研究分担者

佐々木 秀文 (SASAKI HIDEFUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00336695

矢野 智紀 (YANO MOTOKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40315883