

## 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（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591820

研究課題名（和文）ジェノタイピング法によるチロシンキナーゼ遺伝子変異検索

研究課題名（英文）Detection of tyrosine kinase gene mutation using genotyping assay

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：肺癌患者における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 発現を RT-PCR アッセイで確認し FISH 法を用いた KIF5B/RET 同定法を確立した。肺癌における Kras 遺伝子変異をジェノタイピングで検索し、コピー数の増加や Glut-1 蛋白発現、臨床病理学的背景との相関を検討した。

研究成果の概要（英文）：Novel KIF5B/RET translocation was found in lung cancer using a next-generation sequencing assay. We have developed fluorescence in situ hybridization (FISH) assay to detect KIF5B/RET translocation gene. We have investigated Kras gene mutation statuses using genotyping assay and compared with Kras copy number, Glut-1 expression and other clinico-pathological backgrounds of lung cancers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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、KIF5B/RET、FISH

## 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。ゲフィチニブ耐性因子としての Kras 遺伝子変異、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があるチロシンキナーゼ遺伝子変異が肺癌に

おいて同定されてきた。

## 2. 研究の目的

（1）肺癌における EGFR および Kras 遺伝子変異について簡便迅速な、probe を用いた genotyping assay（LightCycler 使用）により検討し、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。今後の分子標的治療を行う上での感受性因子の検査法確立を目指していく。

### 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（癌組織や連接する正常肺組織）を用いて、genomic DNA および RNA を抽出し、様々なチロシンキナーゼ遺伝子変異を調べ、年齢、性別、喫煙歴、臨床病期などの臨床病理学的因子との関連を検討する。

(1) EGFR 遺伝子変異検索については現在保険適応で行えるようになった。当科では主にパラフィン包埋切片からのダイレクトシーケンスを外注している。これに加えて、より簡便迅速な検出を目指して、EGFR および Kras 遺伝子変異について LightCycler を用いた genotyping assay により melting curve を描き、遺伝子変異状態を検索した。とくに、EGFR 遺伝子の変異は感受性に関わると報告されている、エクソン 19 の欠失およびエクソン 21 の点変異を、Kras 遺伝子変異は肺癌での頻度が高いと報告されているコドン 12 および 13 の点変異を検索した。EGFR および Kras 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、FISH による検討の両者を比較検討した。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 EGFR や Kras 等遺伝子の相対的コピー数を検討するものである。FISH 法は GSP 研究所の Kras probe を用いた。肺癌手術症例のパラフィン包埋切片（6 マイクロメートル）を数枚切り出し、HE 染色で腫瘍を確認後、FISH を施行した。日本遺伝子研究所（宮城）と協力して施行し、臨床情報とは独立した病理医が最終判定を行った。判定の基準は Cappuzzo らの基準に基づいた。すなわち 100 個の細胞の蛍光染色度合いを判定し、1 つの細胞内に 4 つの dot を認めるものが 40% 以上であれば high polysomy、10-40% であれば low polysomy、4 つを超えるような dot を 15% 以上認めれば amplification と判定した。Kras 遺伝子変異関連因子として Glut-1 発現は市販の抗体を用いて免疫組織学的検討を加えた。

(2) 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 転座変異は欧米人では 1 例 (0.8%)、日本韓国などのアジア人では 9 例 (2%) 数種類のバリエーションが同定された。この KIF5B/RET について、当科手術例の cDNA 検体を用いてダイレクトシーケンスを行い更に検討を加えた。LightCycler を使用し、リアルタイム PCR を用いた RET 遺伝子発現（キナーゼドメイン）を検討した。また、市販の RET C 末端特異的な抗体である、RET Oncoprotein clone 3F8（マウスモ

ノクローナル抗体、ready-to use) (Vector Laboratories 社) および、RET antibody (ラビットモノクローナル抗体、倍率は 1:250) (Epitomics 社) を用いた免疫組織学的検討、FISH 法による転座同定の確立を目指した。RNA は Isogen kit (Nippon gene, 東京) を用いて抽出し、First strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics GmbH, ドイツ) を用いて逆転写を行った。RET 遺伝子に対するプライマーは、フォワード、5-ACAGGGGATGCAGTATCTGG-3 (exon 14) およびリバース、5-CCTGGCTCCTCTTCACGTAG-3 (exon 16) であり、増幅された RET mRNA レベルは、 $\beta$ -actin primers kit で増幅された  $\beta$ -actin mRNA レベルで補正した。

### 4. 研究成果

(1) EGFR 遺伝子増幅と、肺癌そのものの予後の検討を行ったところ、EGFR 遺伝子増幅が予後と関連していることがわかった。Kras 遺伝子コピー数の増加（コピー数 3 以上を増加していると判定した）は、Kras 遺伝子変異に上乘せられることで予後が不良となった。また 40 例施行した FISH による Kras 遺伝子変化の解析により high polysomy または amplification をきたす症例は、1 例ずつを認めたのみであった。そこで、low polysomy 例を含めた、polysomy 例または amplification を遺伝子増幅陽性と判定すると、このような症例では disomy (増幅なし) 症例に比べて有意に予後が不良となることがわかった。Kras 遺伝子変異や増幅の検討を胸腺腫瘍や、他施設との共同研究（近畿中央胸部疾患センター）に応用した。肺癌における Glut-1 タンパク発現は Kras 遺伝子変異と関連することがわかった。

(2) 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 (270 例の腺癌、101 例の扁平上皮癌) について RT-PCR とダイレクトシーケンスにて独自に検討した。また 60 例の乳癌、11 例の大腸癌、転移性肺腫瘍検体、1 例の甲状腺癌についても検討を行った。この結果、転座変異は肺腺癌 3 例で同定された。EGFR や Kras などの他遺伝子変異とは排他的であった。非喫煙者、女性に多かった。2 例は KIF5B の exon15 と RET の exon12 との融合で、病理学的には papillary dominant であり、1 例は KIF5B の exon22 と RET の exon12 との融合で、病理学的には solid dominant であった。KIF5B/RET 融合遺伝子陽性症例の隣接正常肺組織には、融合遺伝子は認められなかった。肺扁平上皮癌、乳癌、大腸癌の転移性肺腫瘍、甲状腺乳頭癌では、いずれも KIF5B/RET 融合遺伝子は認め

られなかった。Dako 社の linker kit を使用した感度増感法を併用して、市販の C 末端特異的な抗体を用いて免疫組織学的検討を行ったところ、Vector Laboratories 社の抗体を用いた結果は、転座例との有意な相関を認めなかった。一方、Epitomics 社の抗体を用いたところ、KIF5B/RET 遺伝子転座を認めた症例では、diffuse に 50%以上の陽性細胞を認めた。RET 遺伝子発現 (キナーゼドメイン) は転座例(161.763±123.488)では wild type 例に比べて有意に高値であった(5.9013±17.148, p=0.044)。GSP 研究所の独自の BAC クローンを組み合わせた fusion(KIF5B と RET)および split(RET)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。この FISH 法については現在特許を申請中である。

#### 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 10 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. Overexpression of GLUT1 correlates with Kras mutations in lung carcinomas. *Mol Med Report* 5, 2012, 599-602 (査読有)
3. Sasaki H, Hikosaka Y, Kawano O, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. Evaluation of Kras gene mutation and copy number gain in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6, 2011, 15-20 (査読有)
4. 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)
5. Kawaguchi T, Ando M, Kubo A, Takada M, Atagi S, Okishio K, Asami K, Matsumura A, Tsujino K, Ignatius OS, Sasaki H. Long exposure of environmental tobacco smoke associated with activating EGFR mutations in never-smokers with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 17, 2011, 39-45 (査読有)
6. Frullanti E, Berking C, Harbeck N, jezequel P, Haugen A, Mawrin C, Parise

O Jr, Sasaki H, Tsuchiya N, Dragani TA. Meta and pooled analyses of FGFR4 Gly388Arg polymorphism as a cancer prognostic factor. *Eur J Cancer Prev* 20, 2011, 340-347 (査読有)

7. Sasaki H, Hikosaka Y, Okuda K, Kawano O, Yukiue H, Yano M, Fujii Y. CHRNA5 gene D3998N polymorphism in Japanese lung adenocarcinoma. *J Surg Res* 162, 2010, 75-78 (査読有)
8. 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)
9. Sasaki H, Yano M, Fujii Y. Evaluation of Kras gene mutation and copy number in thymic carcinomas and thymomas. *J Thorac Oncol* 5, 2010, 1715-1716 (査読有)
10. Sasaki H, Shimizu S, Okuda K, Kawano O, Yukiue H, Yano M, Fujii Y. Epidermal growth factor receptor gene amplification in surgical resected Japanese lung cancer. *Lung Cancer* 64, 2009, 295-300 (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. 佐々木秀文、設楽将之、横田圭右、奥田勝裕、彦坂雄、森山悟、矢野智紀、藤井義敬 肺癌における Kras 遺伝子変異およびコピー数の増加に関する検討 第 52 回日本肺癌学会総会 2011 年 11 月 3-4 日 大阪
2. 佐々木秀文、設楽将之、横田圭右、奥田勝裕、彦坂雄、森山悟、矢野智紀、藤井義敬 肺癌における Kras 遺伝子変異および増幅に関する検討 第 64 回日本胸部外科学会定期学術集会 2011 年 10 月 9-12 日 名古屋
3. 佐々木秀文、奥田勝裕、彦坂雄、森山悟、矢野智紀、藤井義敬 非小細胞肺癌における Kras 遺伝子変異とコピー数増加に関する検討 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3-5 日 名古屋
4. Sasaki H, Okuda K, Hikosaka Y, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. Evaluation of Kras gene mutation and copy number in non-small cell lung cancer. 14<sup>th</sup> world conference on lung cancer. July 3-7<sup>th</sup>, 2011, Amsterdam.
5. 佐々木秀文、横田圭右、奥田勝裕、彦坂雄、森山悟、矢野智紀、藤井義敬 胸腺腫瘍における Kras 遺伝子変異および遺伝子コピー数に関する検討 第 111 回日本外科学会定期学術集会 2011 年 5 月 26-28 日 東京

6. Kawaguchi T, Ando M, Kubo A, Takada M, Atagi S, Okishio K, Asami K, Matsumura A, Tsujino K, Sasaki H. Association of gender and passive smoking with epidermal growth factor receptor mutations in never-smokers with non-small cell lung cancer: A prospective study based on detailed passive smoking questionnaire. 2010 ASCO annual meeting, central poster session, June 4-8<sup>th</sup>, 2010, Chicago.
7. Sasaki H, Okuda K, Hikosaka Y, Kawano O, Yano M, Fujii Y, Takada M, Kawaguchi T, Kawahara M. Epidermal growth factor receptor gene amplification in surgical resected Japanese lung cancer. 13<sup>th</sup> world conference on lung cancer. July 31<sup>th</sup> -August 4<sup>th</sup>, 2009, San Francisco.

〔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

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

##### (2) 研究分担者

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