

## 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 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年～2012 年

課題番号：22591563

研究課題名（和文） ALK フュージョンの新規パートナー遺伝子の検索

研究課題名（英文） Detection of new fusion partner genes with ALK gene

研究代表者

園部 誠（ソノベマコト）  
京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：00432378

研究成果の概要（和文）：

原発性肺癌の原因となる新規の融合遺伝子 EML4-ALK およびその他の遺伝子と ALK との融合遺伝子の検索および効率的なスクリーニング法の開発を行った。ホルマリン固定標本でも適用可能な FISH 法を用い、赤色プローブと緑色プローブの配置を考慮することで、判定の容易な方法を開発した。ALK 変異を有する肺癌は頻度が低いため（5%以下）、スクリーニングのアルゴリズムを開発、EGFR 遺伝子変異が陰性で、喫煙歴が少なく、腺房細胞タイプの組織亜型を有する腺癌に限ると、ほぼ見落としが無く、かつ測定対象の約 25%に ALK 遺伝子変異を有するグループを同定できるに至った。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed fusion gene(s) between ALK gene and EML4 or other unknown genes using surgically resected lung cancer specimens. And easy and effective screening method for detecting these fusion genes related to ALK gene.

We have established a fluorescent immunohistochemistry (FISH) method detecting ALK fusion genes easily to place a red probe in the head of ALK gene and a green probe in the exon 20 of ALK gene, which become luminescent apart each other when the ALK fusion gene exists.

Because of low incidence of ALK fusion gene in lung cancer population

(under 5% of resected cases), we have established an algorithm for ALK fusion gene detection. In the algorithm, tumors those are acinar predominant adenocarcinoma, without epidermal growth factor receptor gene mutations, and of patients who are never or light smokers (20 pack-year or lower) are selected for candidates of ALK fusion gene detection. To apply the algorithm, pretest probability of positive ALK fusion genes increases up to approximately 25%.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
平成 22 年度	2, 100, 000	630, 000	2, 730, 000
平成 23 年度	700, 000	210, 000	910, 000
平成 24 年度	500, 000	150, 000	650, 000
年度			
年度			
総 計	3, 300, 000	990, 000	4, 290, 000

研究分野：外科

科研費の分科・細目：呼吸器外科学

キーワード：原発性肺癌、腺癌、ALK、融合遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

原発性肺癌の新たな原因遺伝子変異の1つとして、EML4-ALK 融合遺伝子が報告されている。この種の原発性肺癌に対しては、ALK チロシンキナーゼ阻害薬が EML4-ALK 陽性肺癌に対する有用な治療選択肢となる可能性が示唆されている。他がん腫では ALK 融合遺伝子や点突然変異による ALK チロシンキナーゼ活性亢進が、がん化に関連していることが知られ

ている。原発性肺癌でも同様に EML4 以外の別の遺伝子と ALK との融合遺伝子、あるいは ALK 活性亢進症例の存在が期待される。これらは ALK 阻害薬による治療の対象となりうるので、そのような肺癌の検出と詳細な解析が望まれる。

### 2. 研究の目的

非小細胞肺癌で新規の ALK 融合遺伝子や ALK キナーゼ活性亢進症例の

検出及び解析を行うことで、難治性の非小細胞肺癌に対する新たな治療の可能性を見出すことが目的である。

1) 原発性肺癌切除標本を用いて、これまでに報告された EML4 や KIF5B 以外の融合遺伝子の検索とその臨床病理学的背景の解析する。

2) 原発性肺癌切除標本で、融合遺伝子を有する症例以外の ALK キナーゼ活性が亢進している症例の解析。

3) 臨床に応用可能な ALK 融合・変異遺伝子陽性症例の簡便なスクリーニング法を確立する。

### 3. 研究の方法

【対象】京都大学病院呼吸器外科で切除手術を行った原発性肺癌症例のうち、解析可能な腫瘍サンプルがあり、2年以上の臨床経過が明らかになっている症例約 500 例。

#### 【方法】

1) ALK キナーゼドメイン活性亢進症例の検索

原発性肺癌切除例の新規サンプルにおいて、引き続き、腫瘍組織から total RNA を抽出し、cDNA を作製、ALK キナーゼドメインを構成する exon 20 部位の定量的 RT-PCR を行い、過剰発現群を検出した。

2) ALK kinase 活性亢進症例の遺伝子変異の検索

ALK kinase 過剰発現が確認された検体の exon20 内の遺伝子変異の解析

を、直接シーケンス法にて塩基配列解析を行なった。

遺伝子変異が確認出来なかった検体、あるいは新規融合遺伝子と思われる変異を有する検体が検出された場合、RACE 法を用いて既知配列の塩基配列部位より、上流もしくは下流に向かい標的となる mRNA から未知領域の塩基配列を逆転写、増幅させることで、その全長の塩基配列を作成、得られた全長の塩基配列を決定し、融合の相手となる遺伝子の同定を行った。

3) スクリーニング法の開発

新たに考案したプローブを使用した FISH 法の有効性、および至適スクリーニング法を、当科で独自に調査した臨床データを基とし、他の遺伝子変異 (EGFR、HER2、K-ras など) との関係や病理学的因子、患者背景について解析し、アルゴリズムを作成した。

### 4. 研究成果

1) 2) ALK キナーゼドメイン活性化例は当科切除例では全例 EML4-ALK 融合遺伝子であった。

3) スクリーニング方法については、肺癌、EGFR 遺伝子変異陰性、低喫煙者、病理学的に腺房細胞タイプの肺癌に ALK 融合遺伝子がほぼ限定して観察された。スクリーニング検査の検査前確率は 25%まで高めることができ、これらのみに ALK 融合遺伝子の検索スクリーニングを行うと全例をもれ

なくピックアップできることが判明した。

## 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 2 件)

1) Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, Yoshizawa A, Menju T, Nakayama E, Mino N, Iwakiri S, Sato K, Miyahara R, Okubo K, Manabe T, Date H.

Clinicopathologic features of non-small cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. Ann Surg Oncol 2010;17:889-897.

2) Kobayashi M, Sonobe M, Takahashi T, Yoshizawa A, Kikuchi R, Date H. Detection of ALK fusion in lung cancer using fluorescence in situ hybridization. Asian Cardiovasc Thorac Ann. 2012; 20: 426-31.

[学会発表] (計 1 件)

小林正嗣、園部誠、石川将史、菊地柳太郎、喜多村次郎、中山英、毛受暁史、高橋剛士、大久保憲一、伊達洋至：非小細胞肺癌における EML4-ALK 融合遺伝子の臨床病理学的検討。第 27 回日本呼吸器外科学会総会。2010 年 5 月 13 日、仙台。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記事項なし。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

園部 誠 (ソノベマコト)

研究者番号 : 00432378

(2) 研究分担者

伊達洋至 (ダテヒロシ)

研究者番号 : 60252962

研究分担者

高橋剛士 (タカハシツヨシ)

研究者番号 : 90527079

研究分担者

毛受暁史 (メンジュトシ)

研究者番号 : 30527081