

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670183

研究課題名(和文) 転座型遺伝子変化の新規ユニバーサル検出法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel assay methods for translocation type gene alterations.

## 研究代表者

谷田部 恭 (Yatabe, Yasushi)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・研究員

研究者番号：90280809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺癌におけるEML4-ALK転座は、恒常的な発現のあるEML4のプロモーターによって転座したALKキナーゼが発現する。このためALK転座があれば5'末と3'末の転写物の間に乖離が生じ、この差を定量RT-PCRで検出することでスクリーニングが可能となる。臨床検体で解析した結果、明瞭に区別することができた。他の転座型変異であるROS1、RETについては正常組織での発現が観察されたが、うまくcut-off値を設けることによって検出することができた。更にこれらの結果を免疫染色も応用しようとし、ROS1の免疫染色によるスクリーニング法確立し、報告した。

研究成果の概要(英文)：EML4 is transcriptionally active, but not ALK in the normal lung, and EML4-ALK translocation in lung cancer leads to activate the transcription of ALK kinase by the EML4 promoter. Therefore, ALK transcription has different patterns between 5' and 3' ends when the tumor has the translocation, and the difference can be utilized for a screening tool for the translocation. We examined 15 and 40 of ALK rearranged and wild type tumors, respectively, and found this method could work well with quantitative RT-PCR. Similarly, we applied this method to ROS and RET translocations, but the gene was expressed in the normal lung tissues. So, we defined the appropriate cut-off values, and also found the method could be used as a screening. Furthermore, we established immunohistochemistry to detect ROS1-rearranged tumors, and reported the results (Clin Lung Cancer 2015).

研究分野：分子病理学

キーワード：遺伝子転座 検出法 がん組織

## 1. 研究開始当初の背景

現在の肺癌治療において、分子標的薬は著明な成果を上げている。これまでの殺細胞性抗癌剤の奏効率が 20-30% に対して、EGFR を標的とした EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKIs) は奏効率 70% 近くを示し、多くの肺癌患者に福音をもたらした。近年見出された ALK 融合遺伝子に対する ALK 阻害剤も同様の効果を示すことから、第 III 相試験を待たずして認可に至っている。このため、進行肺癌の治療には、これら効果が期待できる治療を選択するためこれら遺伝子変化の検討が必須となっている。一方で、肺癌患者の 2/3 は進行期として発症し、小さな生検組織もしくは細胞診で診断されている現状がある。そのため、EGFR 遺伝子変異、ALK 融合遺伝子の検出にはこれら検査が小生検組織・細胞診で施行可能である変異特異的 PCR 法、FISH 法がそれぞれ用いられている。

2012 年には肺癌で ROS1、RET の遺伝子変異が見出されたが、いずれも転座型遺伝子変化であった。また、2014 年には浸潤性粘液癌に特異に生じる NRG1 再構成を見出した。これら転座に対しては、すでに治験中の分子標的薬が存在し、症例報告レベルであるが著明な治療効果を示すことが報告されている。これら転座に対する分子標的治療を行うためにはこれら遺伝子変化を検出する必要があるが、2 つのハードルがある。1 つ目は、EGFR、ALK 変異検出と同様に、小さな生検組織もしくは細胞診検体で行う必要が有る。2 つ目は、これら変異は肺癌のおよそ 1% 以下の非常にまれな頻度であり、簡便で迅速なスクリーニングが要求される。このため、PCR 法を用いた方法が適しているが、転座パートナー遺伝子が複数ある上に転座パターンも数多く存在するため、キメラ型転写物を検出する方法には限界がある。

われわれはこれまで、変異特異的 DNA-RNA ハイブリッドプローブを用いた EGFR 遺伝子変異の検出方法を確立した。この検出方法は、微量のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本で施行することができる上に、野生型アリルを内部コ

ントロールとして変異を検出する点で、FFPE 標本に適した方法と言える。このため、この方法は大手検査会社を通じて広く実臨床に生かされている。これらの経験を生かしつつ、この研究では、生検 FFPE 標本もしくはセルブロック標本を用いて、簡便で迅速な遺伝子転座の検出系を確立することを目的とした。

## 2. 研究の目的

転座型遺伝子変化の多くは、その由来細胞で転写が促進されている遺伝子とがん遺伝子が転座する。すなわち転写が促進されている遺伝子のプロモーター下にごがん遺伝子が位置するようになるため、がん遺伝子の転写も促進され、それが腫瘍増殖に寄与すると考えられる。例えば、肺では EML4 転写物は通常レベルに検出されるが、ALK 遺伝子変異はほとんど検出されない。しかしながら、EML4-ALK 転座によって、EML4 の N 末蛋白と ALK の C 末キナーゼドメインとが転座を起こし、キメラ蛋白が生成される。その蛋白は EML4 の BASIC ドメインを使って恒常的にダイマーを形成し、ALK のキナーゼドメインを活性化させると考えられている。このため、ALK の 5' 末と 3' 末の転写物について定量的 RT-PCR を行うと、転座があれば両者の発現量に乖離が生じるはずである。また、現在はペプチドによる抗体作成が容易になったため、N 末と C 末のそれぞれに抗体を作成し、その両者の発現量の差を見ることで転座を推測することができることになる (図 1)。この原理を利用し、われわれは、対象となるがん遺伝子の 3' 末、5' 末、もしくは C 末、N 末の発現の差で転座型遺伝子変化を簡便に検出するアッセイ系を樹立する。この差分検出法はあらゆる転座型遺伝子変化にも応用可能であるとともに、既存の定量 PCR もしくは免疫染色法で行うため、多くの施設で施行可能である。

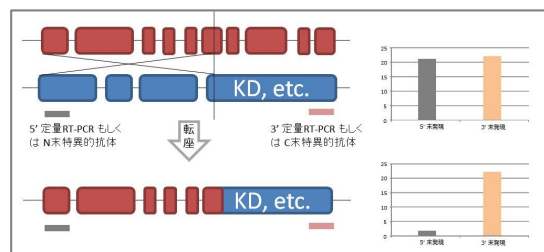


図 1. Terminal differential quantitation RT-PCR 法の原理。

表 1. 従来法と新規法の比較

RT-PCR 法	1. キメラ転写物の検出が主体となり、プローブとなるパートナー遺伝子の配列が必要となる。そのため、パートナーがわかっていないと検出できない。 2. 同一のパートナー遺伝子であっても転座パターンが異なることが多いため、単一の PCR ではカバーできないことが多い。 3. 通常ある程度の長いキメラ転写物を増幅することになるため、良質の RNA が必要となり、臨床サンプルでは困難なことが多い。	1. 転座対象の遺伝子配列のみが必要であり、パートナー遺伝子に依存しない。 2. 転座パターンに依存しないので、5'末、3'末の PCR で検出可能である。 3. 100-150bp の短い産物による PCR となるため、FFEP 検体でも応用可能である。
免疫染色法	1. 転座に伴い過剰発現が検出の対象であるため、正常細胞での発現との差が、適切な免疫染色の検出ダイナミクスレンジにあるときのみ検出が可能となる。 2. 発現が固定状況に大きく左右されるため、適切な固定状況であることが前提となる。	1. 差を検出するため、免疫染色のダイナミクスレンジのウィンドウを気にする必要がなく、低レベルの発現があっても検出可能となる。 2. 内因性コントロールをとれるため、固定状況を判断しつつ検出が可能となる。

これまでのそれぞれの方法における利点と欠点および本研究で樹立を目指す差分検出法との比較を表 1 にまとめた。普遍性、診断への応用などを目的として本研究を遂行した。

### 3. 研究の方法

#### 転写物を用いたアッセイ法について

転写物の抽出には Qiagen RNaeasy キットを用い、定量には、ABI StepOne Plus real time PCR system にて計測した。

アッセイ系の確立には細胞株として、ALK 転座を有する細胞株 H2228 (肺癌)、AMS3 (リンパ腫) および野生型細胞株を用い、転座点をまたぐ 3'末、5'末の転写物の発現を定量し、カットオフ値を設定した。

#### 免疫染色法

ROS1 免疫染色では、一時抗体 clone D4D6, (Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA)を用い、Benchmark XT® automated stainer (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ)で染色を行った。

### 4. 研究成果

#### A. 転写物を用いたアッセイ法の確立

まず、ALK 転座を有する細胞株 H2228 (肺癌)、AMS3 (リンパ腫) および野生型細胞株を用い、転座点をまたぐ 3'末、5'末の転写物の発現を定量し、カットオフ値を設定した。次に転座の有無がわかっている臨床検体 23 例を用い、このカットオフ値で ALK 転座が検出できるかを検討した。図 2 に示すごとく、転写物の差で ALK 転座を検出することができた。この結果をもとに、ROS1、RET についても転写物での検出を試み、それぞれのカットオフ値により検出可能であることが明らかとなった (表 2、3)。

< GAPDH, ALK realtime RT-PCR amplification curve >

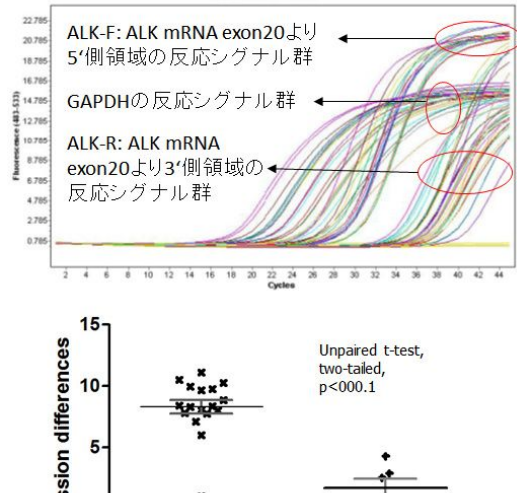


図 2. すでに転座の有無がわかっている 23 症例での発現定量比の検定を行った。2 つの間には明瞭な差が観察され、転座が検出可能であることを示している。

表 2. 5', 3'-発現量の違いからの ROS1 転座の検出

Sample Name	Genotype	ALK realtime RT-PCR			Ratio
		Cp			
		GAPDH	ALK-F 5'	ALK-R 3'	
cell line	ROS rearrangement+	22.478527	26.7225	21.853838	29.04061
cell line		22.543226	27.331541	22.346872	31.55945
		GAPDH	ALK-F 5'	ALK-R 3'	
L3472	WT	26.970226	32.495434	32.075401	1.337928
L3472		27.319546	32.420891	32.152889	1.197479
L3480	WT	25.49548	34.262882	31.533985	6.588728
L3480		25.304705	32.514114	32.254986	1.189207
L3483	WT	25.745859	28.33906	28.432934	0.939523
L3483		26.779531	21.349752	21.734694	0.768438
L3484	WT	24.614664	30.032181	29.496164	1.443929
L3484		24.732056	22.951468	23.459793	1.414214

表 3. EUS\_FNA 検体における 5', 3'-発現量の違いからの RET 転座の検出

Sample Name	Genotype	ALK realtime RT-PCR			Ratio
		Cp			
		GAPDH	ALK-F 5'	ALK-R 3'	
L2966	RET fusion+	24.42268	30.478626	27.298189	9.063071
L3002	RET fusion+	24.858515	30.157471	27.298189	7.260153
L2475	RET fusion+	31.220469	37.587547	30.032993	187.403
L1291	RET fusion+	27.458712	32.180126	27.938204	37.79177
		GAPDH	ALK-F 5'	ALK-R 3'	
L3472	WT	22.518309	30.593842	29.73855	1.808759
L3480	WT	24.404026	32.527348	30.493773	4.084049
L3483	WT	22.510868	34.327873	31.929768	5.241574
L3484	WT	21.509148	31.18108	29.897255	2.42839

### A. 微小検体を用いた検討

小生検組織もしくは細胞診サンプルであることから、生検組織やセルブロックのFFPE 検体、細胞診サンプルについてこれらのアッセイで検出可能かどうかを試みた。これまでFFPE 検体でのRNA 抽出は比較的困難とされてきた。その原因については諸説あるが、少なくとも適切に固定を行った標本では一定量の RNA が保たれることがわかった (図3)。そこで、固定条件を統一した FFPE 検体を作成し、上記で検討したアッセイ系を用いて検討を行った。ALK 陽性 6 例、陰性 2 例の EBUS-FNA 検体のセルブロック標本で検討を行った結果、表 4 のごとく明瞭に転座を検出することができた。

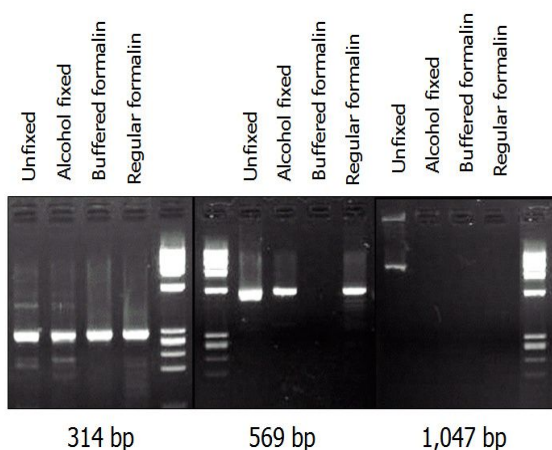


図 3 FFPE 標本からの RNA 断片化についての検討。保存が良いとされている未固定組織標本および固定方法 (アルコール固定、中性緩衝ホルマリン、中性ホルマリン) の比較。通常利用している中性ホルマリンで十分量の発現が検出できた。

表 4. EUS\_FNA 検体における 5'-, 3'-発現量の違いから  
の ALK 転座の検出

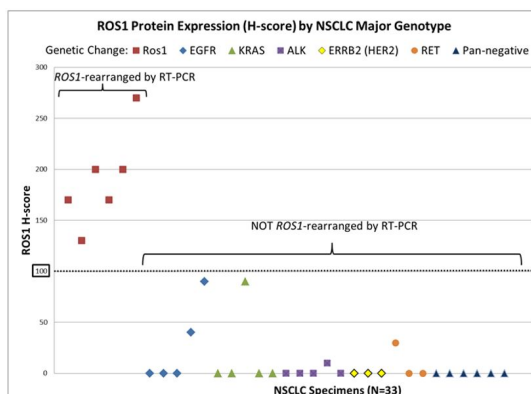
Sample name	N	Genotype	ALK realtime RT-PCR			
			Cp			ALK-F-R Ratio
			GAPDH	ALK-F 5'	ALK-R 3'	
L3576		Variant 2	21.57983	31.793	27.62303	1.150959906
L3576		Variant 2	21.57983	34.3006	27.95933	1.22680336
L3610		Variant 3a/b	22.298945	42.15981	27.98488	1.506521021
L3610		Variant 3a/b	22.298945	38.83662	27.8513	1.394427549
L3695		Variant	22.298945	33.89627	25.44705	1.332031414
L3695		Variant	22.298945	33.53079	25.62305	1.308618217
L4001		WT	23.29736	Undetermined	Undetermined	Undetermined
L4001		WT	23.29736	Undetermined	Undetermined	Undetermined

### B. 免疫染色法による転座遺伝子の検出法

ALK 転座に対する免疫染色にすでに確立され、数々の報告があることから、ROS1 についての免疫染色法を確立することとした。ROS1 特異的抗体を用いて、すでに遺伝子変異がわかっている 7 つの genotypes について、ROS1 免疫染色を

施行した。陽性所見については種々の評価方法が存在するが、H-score 法を用いたところ、図 4 に示すように、6 例の ROS1 再構成肺癌を分別よく検出することができた。

図 4. ROS1 免疫染色結果



### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- Boyle TA, Masago K, Ellison KE, Yatabe Y, Hirsch FR. ROS1 Immunohistochemistry Among Major Genotypes of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 査読有. 16 巻. 2015. 106-11. DOI: 10.1016/j.cllc.2014.10.003
- Wynes MW, Sholl LM, Dietel M, Schuurings E, Tsao MS, Yatabe Y, Tubbs RR, Hirsch FR. An International Interpretation Study Using the ALK IHC Antibody D5f3 and a Sensitive Detection Kit Demonstrates High Concordance between ALK IHC and ALK Fish and between Evaluators. *J Thorac Oncol*. 査読有. 9 巻. 2014. 631-8. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000115
- Tomizawa K, Ito S, Suda K, Fukui T, Usami N, Hatooka S, Kuwano H, Yatabe Y, Mitsudomi T. Solitary Pulmonary Metastasis from Lung Cancer Harboring Eml4-ALK after a 15-Year Disease-Free Interval. *Lung Cancer*. 査読有. 80 巻. 2013. 99-101. DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.12.011
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y,

Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Nakatani Y, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M. Diagnosis of Lung Cancer in Small Biopsies and Cytology: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. Arch Pathol Lab Med. 査読有. 137 巻. 2013. 668-84.  
DOI:10.5858/arpa.2012-0263-RA

[学会発表] (計 3 件)

1. Yasushi Yatabe. IHC proposal to IASLC path panel. IASLC pathology Committee. 2015.03.20. Hynes Convention Center, Boston USA.
2. Yasushi Yatabe. Molecular testing for EGFR/ALK. 8th Asia Pacific IAP Congress (招待講演). 2013.9.5-9.6. Pusan Korea.
3. Yasushi Yatabe. Molecular Testing. Pulmonary Pathology Society (招待講演). 2013.06.25-6.30. Grenoble France.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

谷田部 恭 (YATABE, Yasushi)  
愛知県がんセンター(研究所)  
分子腫瘍学部・研究員  
研究者番号 : 90280909