

76. NanoString を用いた癌分子標的治療の開発

末原 義之

順天堂大学 医学部 整形外科学教室

Key words : NanoString, Tyrosine kinase 遺伝子変異

緒言

がんの治療成績は有効な化学療法等の導入及び分子標的治療の導入によって著明に生命予後などが改善されてきた。肺がんの分子標的治療としては、近年 EGFR 変異、ALK、ROS 融合遺伝子などを治療標的としたチロシンキナーゼ阻害剤治療が盛んになり、飛躍的な治療成績の改善を遂げてきた。それらの研究成果が功を奏し、肺がんでは3分の2に対しては何らかの腫瘍遺伝子変異が同定され、治療標的とされる状況になっているが、未だに残りの3分の1の部分の遺伝子変異（いわゆる driver oncogene negative = pan-negative）は未知である。そのために、その残りの「未知の3分の1」の解明と治療開発が世界的に進められており、そのような治療開発の傾向は、肺がんだけに留まらず全癌種において新規分子標的治療標的（チロシンキナーゼ治療標的）の探索が盛んな状況にある。それら研究は治療成績改善のために必要不可欠な研究であり、治療成績改善のための breakthrough と考える。また近年、欧米人と東洋人のがん遺伝子変異の違い、いわゆる“Ethnic Difference”が提唱されており、日本人（東洋人）には日本人ベースのがん遺伝子変異探索の必要性が示唆される現状にある。

本研究では全ての癌種において、治療成績向上の鍵となりうる新規チロシンキナーゼ治療標的の同定を目的とした。そのための方法として、NanoString システムの手法を用いた独自のスクリーニングシステムでチロシンキナーゼ遺伝子変異の探索をハイスループットに行い、その新規治療標的になりうる新規チロシンキナーゼ融合遺伝子・遺伝子変異体の同定を行った。特に本研究では胸部悪性腫瘍及び肉腫などを中心に、かつ遺伝子変異が多いとされている東洋人（日本人）を対象に Ethnic Difference に基づいた研究を行った。

現在までのそのシステムの成果として米国内において著者らは、肺癌における KIF5B-RET、TRIM33-RET 及び GOPC-ROS などの新規チロシンキナーゼ融合遺伝子の同定に成功している¹⁾。また著者らは、そのスクリーニングシステムで新規同定された肺癌 RET 融合遺伝子を持つ肺癌患者を対象とし、多標的チロシンキナーゼ阻害剤（Cabozantinib (XL-184)）を使用した Phase II 臨床試験を米国内で 2011 年より行い、既にその RET 融合遺伝子が肺癌の新規治療標的として有用であることの証明に 2013 年までに成功している²⁾。さらに脳腫瘍における研究においても成果を挙げている³⁾。

方法および結果

1. NanoString system によるチロシンキナーゼ遺伝子変異の探索

チロシンキナーゼ遺伝子変異探索のために我々が独自に開発した特異的プローブ約 200 個の設計・設置を行った。各種対象癌種 RNA を抽出し、NanoString システム nCounter Prep Station とその独自の特異的プローブを用いてハイブリダイゼーションと精製を行った。その後 nCounter Cartridge への固相化処理を行った。nCounter Cartridge の Digital Analyzer によるスキャンを行い、全 90 個のチロシンキナーゼ遺伝子内の各設置プローブに一致した mRNA 発現プロファイリングを獲得した（図 1）。その mRNA 発現プロファイリングは統計学的手法を用いて解析し、遺伝子インバランス特異的変化のある検体の同定を行った。

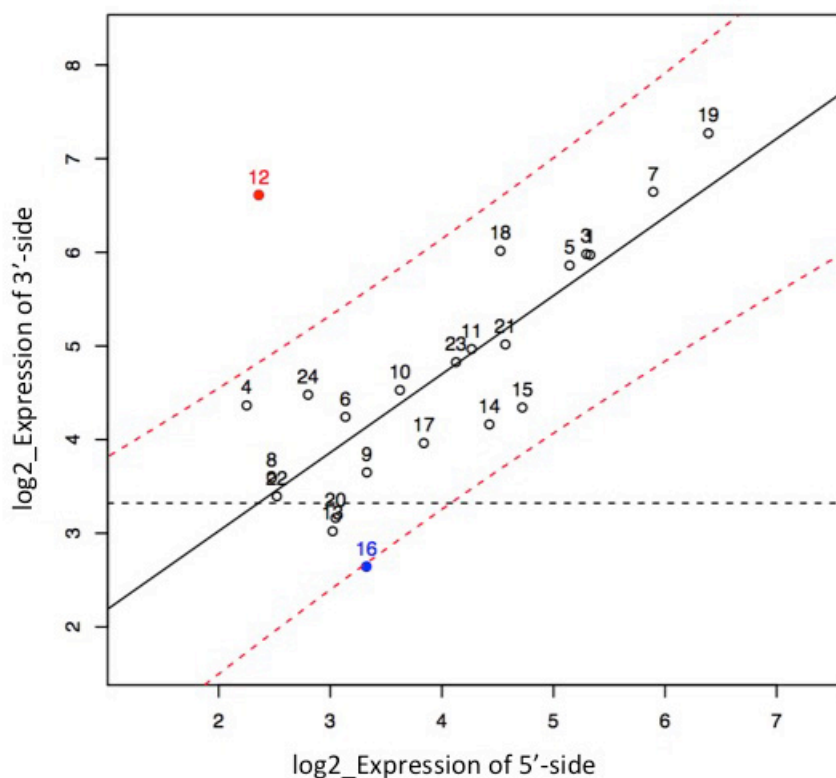


図1. 本解析によりデータより同定された候補遺伝子

2. 新規チロシンキナーゼ遺伝子変異のシーケンス検証と発現検証

1. で同定された新規チロシンキナーゼ遺伝子変異候補に対しては rapid amplification of cDNA ends (RACE) 及び次世代シーケンサー (NGS) を行い、遺伝子変異の同定を行った。NGS 及び RACE にて同定された遺伝子変異に対して、reverse transcriptase PCR (RT-PCR) とその検体に一致した腫瘍検体 FFPE に対して、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) にてその遺伝子変異の発現を確認した。またその検体に一致した腫瘍検体 FFPE に対して特異的抗体を用いて、その遺伝子変異によるタンパク質発現を確認した。

3. 新規チロシンキナーゼ遺伝子変異の同定成果：

胸部悪性腫瘍として非喫煙肺腺がん 120 例、胸腺がん 20 例、肺小細胞がん 20 例、肉腫として骨軟部腫瘍 20 例、後腹膜肉腫 20 例に対して解析を行った。非喫煙肺腺がんにおいては既知の ALK、RET、ROS 融合遺伝子 14 例を同定し、シーケンス検証と発現検証においてそれらが融合遺伝子あることを確認した。また、非喫煙肺腺がんにおいて新規チロシンキナーゼ融合遺伝子及び遺伝子変異体候補として A gene、B gene、C gene を同定し、胸腺がんにおいて新規チロシンキナーゼ融合遺伝子及び遺伝子変異体候補として D gene を同定し、後腹膜肉腫において新規チロシンキナーゼ融合遺伝子及び遺伝子変異体候補として E gene を同定した。現在も検証実験と機能解析の実験を進めている。

考 察

本研究では NanoString の手法に基づいた独自に開発したチロシンキナーゼ遺伝子変異解析システムを使用して、胸部悪性腫瘍及び肉腫に対して解析を行い、各組織型において新規チロシンキナーゼ融合遺伝子及び遺伝子変異体候補の同定を行った。

共同研究者

本研究に共同研究者として研究にご尽力を頂きました順天堂大学呼吸器外科高持一矢先生、順天堂大学呼吸器内科高橋史行先生、順天堂大学人体病理病態齋藤剛先生及びご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Suehara Y, Arcila M, Wang L, Hasanovic A, Ang D, Ito T, Kimura Y, Drilon A, Guha U, Rusch V, Kris MG, Zakowski MF, Rizvi N, Khanin R, Ladanyi M. Identification of KIF5B-RET and GOPC-ROS1 fusions in lung adenocarcinomas through a comprehensive mRNA-based screen for tyrosine kinase fusions. *Clin Cancer Res.* 2012 Dec 15;18(24):6599-608. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0838. Epub 2012 Oct 10. PMID: 23052255.
- 2) Drilon A, Wang L, Hasanovic A, Suehara Y, Lipson D, Stephens P, Ross J, Miller V, Ginsberg M, Zakowski MF, Kris MG, Ladanyi M, Rizvi N. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov.* 2013 Jun;3(6):630-5. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0035. Epub 2013 Mar 26. PMID: 23533264.
- 3) Kasthuber ER, Huse JT, Berman SH, Pedraza A, Zhang J, Suehara Y, Viale A, Cavatore M, Heguy A, Szerlip N, Ladanyi M, Brennan CW. Quantitative assessment of intragenic receptor tyrosine kinase deletions in primary glioblastomas: their prevalence and molecular correlates. *Acta Neuropathol.* 2014 May; 127(5):747-59. doi: 10.1007/s00401-013-1217-3. Epub 2013 Nov 29. PMID: 24292886.