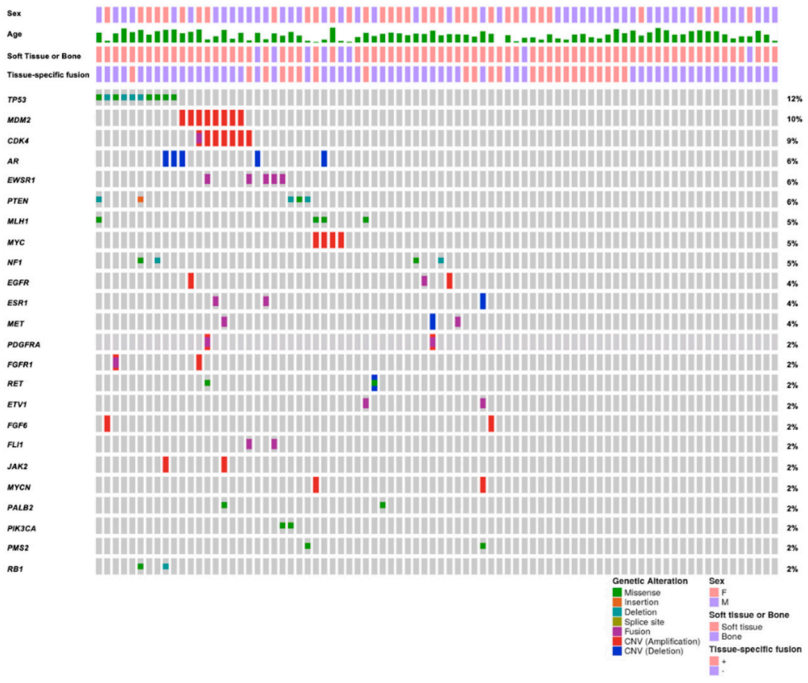
63　骨軟部腫瘍の相互排他性に基づいた治療標的探索	末原　義之

【目的】骨軟部肉腫の治療成績は依然極めて不良であり、「希少がん」であるが故に限られたデータ量や、それに伴う消極的取組みが影響し新規治療の開発が滞っている現状がある。軟部肉腫の研究は組織型特異的融合遺伝子（ユーイング肉腫_*EWS*／F*LI1*、滑膜肉腫_*SS18*／*SYT*、横紋筋肉腫_*PAX3*／*FOXO1* など）が発見され、各組織診断に有用なマーカーとなっている。また肺がんなどのメジャーキャンサーでは、近年次世代シークエンサー（NGS）の開発により EGFR 変異などの発生・悪性度因子を治療標的とした（Tyrosine Kinase）TK 阻害剤治療が盛んであり、その治療成績はめざましく改善している。またその開発に伴い、プレシジョンメディスン（がんクリニカルシークエンス（がん CS））が近年急速に欧米では進み、メジャーキャンサーでは多くの診断と治療の恩恵が高率的に進んでいるが、骨軟部腫瘍においては未だその約 60%には組織特異的遺伝子変化は不明であり（非組織型特異的融合遺伝子肉腫：complex karyotype sarcomas）、現在までにそのがん CS の恩恵は少ない。以上の背景より発生・発癌因子の解明とその理論に基づいた治療法開発が骨軟部腫瘍において急速に求められている。

【方法】近年がん CS の主流 DNA-seq パネルが TK 融合遺伝子同定に対して極めて低い精度である問題点が指摘されていることより、本研究では独自のトランスクリプトーム解析の手法に基づき、骨軟部肉腫の直接の治療標的と成り得る TK 融合遺伝子などの解明を骨軟部腫瘍にておいて進めた。

【結果】骨軟部腫瘍手術検体 82 例に対して RNA-seq パネル及び NanoString を用いてハイブリッドトランスクリプトーム解析を行った。軟部腫瘍 74 例、骨腫瘍 8 例に対して解析を行った。特に今回注目している融合遺伝子に関しては、82 例中 27 例に融合遺伝子を認め、*NTRK*、*ALK*、*FGFR*、*EGFR*、*PDGFRA*、*PDGFB*、*MET*、KDR、CDK4 など治療標的になりうるキナーゼ融合遺伝子も多く認められた。その TK 融合遺伝子は骨軟部腫瘍の特徴である組織型特異的融合遺伝子を持たない非組織型特異的融合遺伝子群にほとんどが同定され、組織型特異的融合遺伝子を基軸とした相互排他性が存在することを示唆した。現在、検証コホートを用いてその相互排他性は解析中であり、同定されたキナーゼ融合遺伝子は機能解析を進めている。その検証実験と機能解析は骨軟部肉腫の悪性度解明や新規治療法開発に繋がると考えている。

骨軟部腫瘍 82 検体の高頻度遺伝子変化を示した OncoPrint



63. 骨軟部腫瘍の相互排他性に基づいた治療標的探索

末原　義之

順天堂大学 医学部 整形外科

Key words：RNA シークエンス，NanoString 解析，骨軟部腫瘍，融合遺伝子，チロシンキナーゼ

緒　言

骨軟部腫瘍（肉腫）の治療成績は依然極めて不良であり、これは「希少がん」であるが故に限られたデータ量や消極的取組みが影響し新規治療の開発が滞っている現状がある。肺がんを中心とするメジャーキャンサーでは *EGFR* 変異や *ALK*、*ROS1*、*RET* 融合遺伝子などの発生・悪性度因子“driver-oncogene”を治療標的とした極めて奏効性の高い tyrosine kinase（TK）阻害剤治療開発により治療成績はめざましく改善した。近年では次世代シークエンサー（NGS）を用いた検査がんクリニカルシークエンス（がん CS）に基づいたプレシジョンメディシンが欧米を中心に進み、癌種横断的な治療法選定（バスケットトライアル）により他癌種でも TK 阻害剤の恩恵を受けている［1，2］。2004 年以前は肺がんも治療標的となる TK driver-oncogene は不明であったが、積極的探求により現在では約 70%までその解明に至り、更には“driver-oncogene”の相互排他性の理論解明にも至っている［3］。骨軟部腫瘍も組織型特異的融合遺伝子腫瘍群（ユーイング肉腫_*EWS／FLI1* など）を約 35%に含み、現在までにそれら融合遺伝子が“driver- or passenger-oncogene”であると証明されつつも、迅速に治療標的となる TK 融合遺伝子とは異なりそれらを直接標的とした治療には未だ至っておらず、更には、非組織型特異的融合遺伝子腫瘍群（約 65%）は遺伝子的特徴が依然不明である［4］。がん CS におけるバスケットトライアルにおいて、癌種横断的に *NTRK* 融合遺伝子が driver-oncogene として同定され、その TK 阻害剤が軟部肉腫を含め著効し、骨軟部腫瘍の久しぶりの明るい話題となった［5］。しかし、がん CS による *NTRK* 融合遺伝子のヒット率は約 0.6%と極めて低く、骨軟部腫瘍において実際の治療奏効が期待できる遺伝子変化は約 2～3%の TK 融合遺伝子（*NTRK*、*ALK*、*ROS1*、*PDGFRA*、*FGFR* 等）に限られ driver-oncogene の多くは不明である［1，2］。更に極めて近年、がん CS の主流 DNA-seq パネルが TK 融合遺伝子同定に対して極めて低い精度である問題点が指摘されている［6］。

本研究では、我々のプレリミナリーデータと独自のトランスクリプトーム解析の手法に基づき、現在までに解析技術的に未知に陥っていた骨軟部肉腫の直接の治療標的と成り得る TK 融合遺伝子などの全面的解明を骨軟部腫瘍にておいて進め、特に非組織型特異的融合遺伝子腫瘍群に対しての遺伝子プロファイリングと骨軟部腫瘍の新規治療法開発と予後改善に挑む。

方法および結果

1．骨軟部肉腫の解析

順天堂大学で治療され検体を採取されている約 82 例の骨軟部肉腫ついて探索セットとして解析を行った。

2．解析手法

1）RNA-seq パネルによる解析

探索セット骨軟部肉腫 82 例（原発手術検体）の RNA-seq パネル（TruSight Tumor 170）を用いて NGS によるトランスクリプトームレベルのプロファイリングを行った。

2）NanoString による解析

探索セット骨軟部肉腫 82 例（原発手術検体）の NanoString によるトランスクリプトームレベルのプロファイリングを行った。本方法は、治療標的に成り易い全 TK 遺伝子の 5'-side と 3'-side の mRNA 発現に対して NanoString を用いて網羅的に発現不均衡を探索することで、網羅的 FISH 様の手法となっている 1）、2）の組み合わせスクリーニングを行い最終的な骨軟部肉腫のハイブリッドトランスクリプトーム解析とした。

3. 解析検体組織型

軟部腫瘍 74 例、骨腫瘍 8 例に対して解析を行った。組織型は平滑筋肉腫 15 例、粘液線維肉腫 11 例、脂肪肉腫 10 例、骨肉腫 6 例などなどであった（表 1）

1）ハイブリッドトランスクリプトーム解析

本遺伝子解析結果として OncoPrint 解析に添付図（図 1）のように遺伝子変化が同定された。特に今回注目している融合遺伝子に関しては、82 例中 27 例に融合遺伝子を認め、*NTRK*、*ALK*、*FGFR*、*EGFR*、*PDGFRA*、*PDGFB*、*MET*、*KDR*、*CDK4* などのキナーゼ融合遺伝子が認められた（表 1）。

表 1. 骨軟部腫瘍 82 検体の内訳とハイブリッドトランスクリプトーム解析の同定結果

Case #	Histrogical Subtype	Tissue Orgin	Fusion detection	Case #	Histrogical Subtype	Tissue Orgin	Fusion detection
#1	Leimyosarcoma	Soft tissue	ND	#42	Periosteal osteosarcoma	Bone	ND
#2	Leimyosarcoma	Soft tissue	ND	#43	Malignant peripheral nerve sheath tumor	Soft tissue	*VWC2-EGFR*
#3	Leimyosarcoma	Soft tissue	ND	#44	Malignant peripheral nerve sheath tumor	Soft tissue	ND
#4	Leimyosarcoma	Soft tissue	ND	#45	Malignant peripheral nerve sheath tumor	Soft tissue	ND
#5	Leimyosarcoma	Soft tissue	ND	#46	Malignant peripheral nerve sheath tumor	Soft tissue	ND
#6	Leimyosarcoma	Soft tissue	ND	#47	Alveolar soft part sarcoma	Soft tissue	ND
#7	Leimyosarcoma	Soft tissue	ND	#48	Alveolar soft part sarcoma	Soft tissue	ND
#8	Leimyosarcoma	Soft tissue	ND	#49	Alveolar soft part sarcoma	Soft tissue	ND
#9	Leimyosarcoma	Bone	*EWSR1-RASL10A, FLI1-VAV2*	#50	Alveolar soft part sarcoma	Soft tissue	ND
#10	Leimyosarcoma	Bone	*STRN-NTRK3* *KMT2C-EWSR1, NOTCH2-SEC23B*	#51	Dermatofibrosarcoma protuberans	Soft tissue	*COL1A1-PDGFB*
#11	Pleomorphic leimyosarcoma	Soft tissue	ND	#52	Dermatofibrosarcoma protuberans	Soft tissue	*COL1A1-PDGFB*
#12	Pleomorphic leimyosarcoma	Soft tissue	ND	#53	Dermatofibrosarcoma protuberans	Soft tissue	*COL1A1-PDGFB*
#13	Pleomorphic leimyosarcoma	Soft tissue	ND	#54	Synovial sarcoma	Soft tissue	*SS18-SSX1*
#14	Pleomorphic leimyosarcoma	Soft tissue	ND	#55	Synovial sarcoma	Soft tissue	*SS18-SSX1*
#15	Pleomorphic leimyosarcoma	Soft tissue	ND	#56	Synovial sarcoma	Soft tissue	ND
#16	Myxofibrosarcoma	Soft tissue	ND	#57	Undifferentiated pleomorphic sarcoma	Soft tissue	*ICK-KDR*
#17	Myxofibrosarcoma	Soft tissue	ND	#58	Undifferentiated pleomorphic sarcoma	Soft tissue	ND
#18	Myxofibrosarcoma	Soft tissue	ND	#59	Undifferentiated pleomorphic sarcoma	Soft tissue	ND
#19	Myxofibrosarcoma	Soft tissue	ND	#60	Myxoid sarcoma	Soft tissue	*RAB3IP-PDGFRA*
#20	Myxofibrosarcoma	Soft tissue	ND	#61	High grade myxoid sarcoma	Soft tissue	*NOTCH3-HFM1*
#21	Myxofibrosarcoma	Soft tissue	ND	#62	Low grade myxoid sarcoma	Soft tissue	ND
#22	High grade myxofibrosarcoma	Soft tissue	*BRF2-FGFR1*	#63	Epithelioid sarcoma	Soft tissue	ND
#23	High grade myxofibrosarcoma	Soft tissue	*FOXP2-MET*	#64	Epithelioid sarcoma	Bone	ND
#24	High grade myxofibrosarcoma	Soft tissue	ND	#65	Epithelioid hemangioendothelioma	Soft tissue	*HFM1-ETV1*
#25	High grade myxofibrosarcoma	Soft tissue	ND	#66	Epithelioid hemangioendothelioma	Soft tissue	ND
#26	Low grade myxofibrosarcoma	Soft tissue	ND	#67	Inflammatory myofibroblastic tumor	Soft tissue	*CLTC-ALK*
#27	Myxoid liposarcoma	Soft tissue	*EWSR1-DDIT3*	#68	Ewing sarcoma	Soft tissue	*EWSR1-FLI1*
#28	Myxoid liposarcoma	Soft tissue	*EWSR1-DDIT3, AP1B1-ESR1*	#69	Rhabdomyosarcoma	Soft tissue	*PAX3-FOXO1*
#29	Myxoid liposarcoma	Soft tissue	*DLG2-FGFR2, FUS-DDIT3*	#70	Angiosarcoma	Soft tissue	ND
#30	Myxoid liposarcoma	Soft tissue	*FUS-DDIT3*	#71	Extraskeletal myxoid chondrosarcoma	Soft tissue	ND
#31	Myxoid liposarcoma	Soft tissue	*FUS-DDIT3*	#72	Chondrosarcoma	Bone	ND
#32	Myxoid liposarcoma	Soft tissue	ND	#73	Intimal Sarcoma	Soft tissue	ND
#33	Dedifferentiated liposarcoma	Soft tissue	*TACC1-CDK4*	#74	Malignant Triton Tumor	Soft tissue	ND
#34	Dedifferentiated liposarcoma	Soft tissue	ND	#75	Superficial CD34 positive fibroblastic tumor	Soft tissue	ND
#35	Dedifferentiated liposarcoma	Soft tissue	ND	#76	High grade spindle cell sarcoma	Soft tissue	ND
#36	Well differentiated liposarcoma	Soft tissue	*COL27A1-ESR1*	#77	Small round cell sarcoma	Soft tissue	*HFM1-ETV1*
#37	Osteosarcoma	Bone	ND	#78	High grade sarcoma	Soft tissue	*CEP290/MET, MLLT3/IFT74*
#38	Osteosarcoma	Bone	ND	#79	High grade sarcoma	Soft tissue	ND
#39	Osteosarcoma	Bone	ND	#80	High grade sarcoma	Soft tissue	ND
#40	Extraskeletal osteosarcoma	Soft tissue	ND	#81	High grade sarcoma	Soft tissue	ND
#41	Extraskeletal osteosarcoma	Soft tissue	ND	#82	Low grade sarcoma	Soft tissue	*LMNA-NTRK1*

ND: not detected, NA: not analyzed.

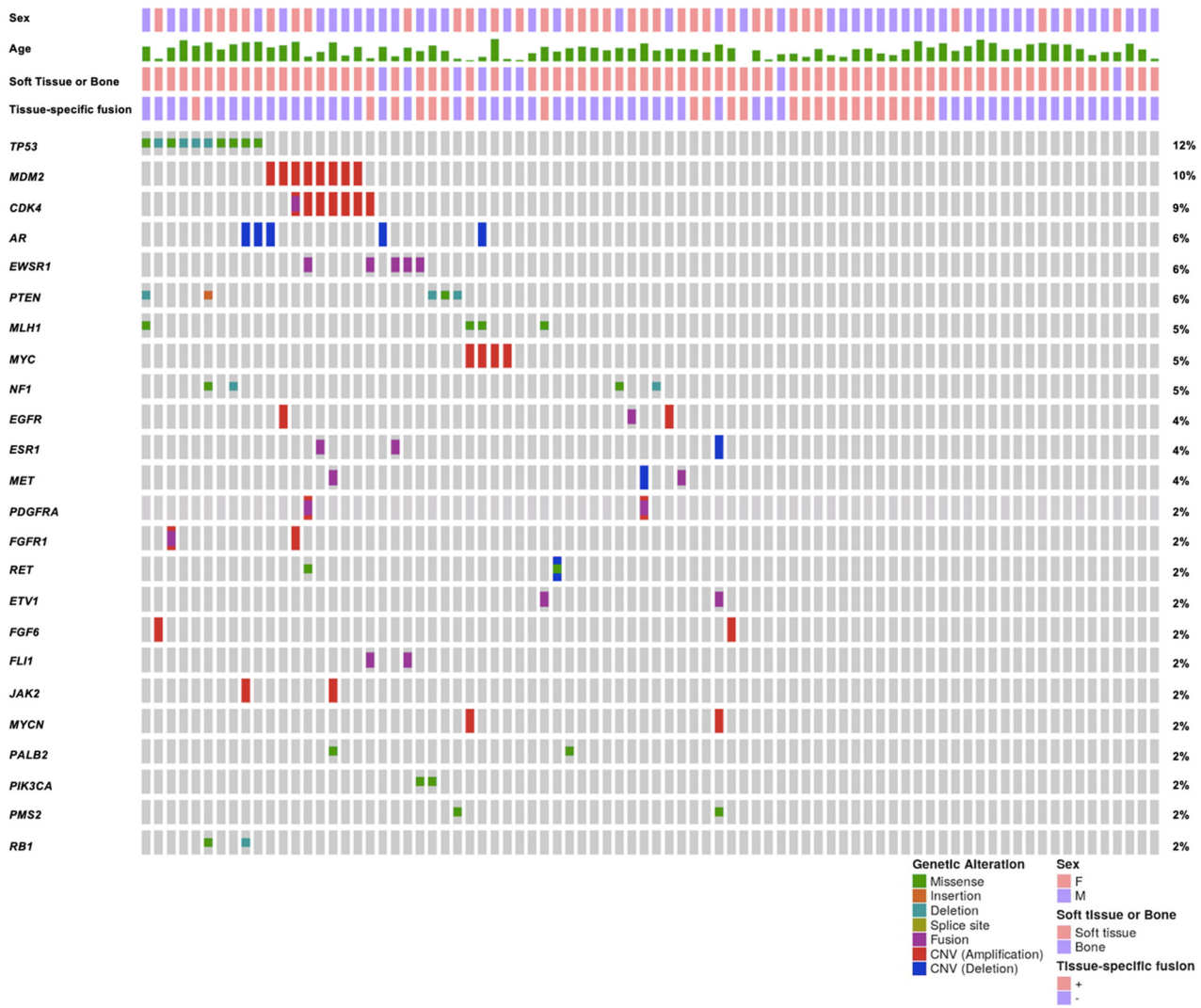


図 1. 骨軟部腫瘍 82 検体の高頻度遺伝子変化を示した OncoPrint
骨軟部腫瘍 82 検体の次世代シークエンサー解析。DNA-seq と RNA-seq 頻度の高い遺伝子変化を図として表示する。

2）同定された遺伝子変異（融合遺伝子）と発現の検証

1）で同定された遺伝子変異（融合遺伝子）と発現の検証として、NGS 解析によるパートナー再同定、RT-PCR、FISH、特異的抗体を用い、その発現確認を行った。最終的には 24 例に融合遺伝子が認められ、同様に 13 例に *NTRK*、*ALK*、*FGFR*、*EGFR*、*PDGFRA*、*PDGFB*、*MET*、*KDR*、*CDK4* などのキナーゼ融合遺伝子を認めた。非組織型特異的融合遺伝子群 58 例においては、11 例に融合遺伝子を認め、9 例に *NTRK*、*FGFR*、*EGFR*、*PDGFRA*、*MET*、*KDR*、*CDK4* などのキナーゼ融合遺伝子を認め、その同定率は約 15～20%に及んだ（図 2）。

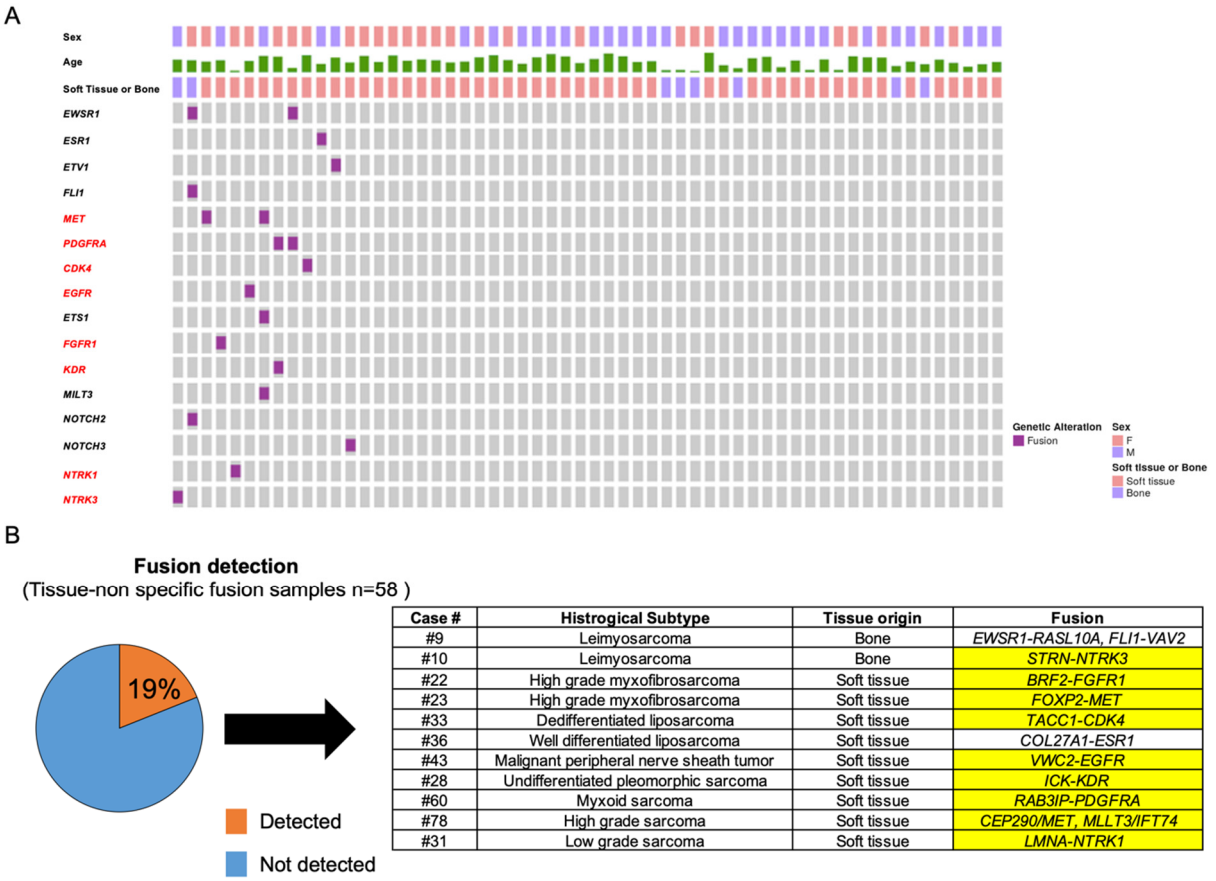
3）新規遺伝子変異の機能解析

細胞株を用い、新規遺伝子変異 plasmid vector 遺伝子導入を進めがん化能の確認を進めた。本機能解析では、*NTRK1* 融合遺伝子及び *EGFR* 融合遺伝子にてがん化能確認を進め、両 *NTRK1* 融合遺伝子及び *EGFR* 融合遺伝子でがん化能を確認した。

4）阻害剤奏効性の解析と癌種横断的検証

3）で新規遺伝子変異 plasmid vector 遺伝子導入がなされた細胞株を用い、阻害剤の奏功性の検証を進めた。本機能解析では、*NTRK1* 融合遺伝子がん化能確認を進め、*NTRK1* においてはその阻害剤である larotectinb の著明な阻害効果を確認した。

以上本結果を踏まえて骨軟部腫瘍 120 例（非組織型融合遺伝子腫瘍）に対して、NanoString 解析を中心とした検証解析を進めている。



Case #	Histrogical Subtype	Tissue origin	Fusion
#9	Leimyosarcoma	Bone	*EWSR1-RASL10A, FLI1-VAV2*
#10	Leimyosarcoma	Bone	*STRN-NTRK3*
#22	High grade myxofibrosarcoma	Soft tissue	*BRF2-FGFR1*
#23	High grade myxofibrosarcoma	Soft tissue	*FOXP2-MET*
#33	Dedifferentiated liposarcoma	Soft tissue	*TACC1-CDK4*
#36	Well differentiated liposarcoma	Soft tissue	*COL27A1-ESR1*
#43	Malignant peripheral nerve sheath tumor	Soft tissue	*VWC2-EGFR*
#28	Undifferentiated pleomorphic sarcoma	Soft tissue	*ICK-KDR*
#60	Myxoid sarcoma	Soft tissue	*RAB3IP-PDGFRA*
#78	High grade sarcoma	Soft tissue	*CEP290/MET, MLLT3/IFT74*
#31	Low grade sarcoma	Soft tissue	*LMNA-NTRK1*

図 2. 骨軟部腫瘍 82 検体の融合遺伝子同定を示した図表

A）骨軟部腫瘍 82 検体の同定融合遺伝子を OncoPrint で表示。

B）非組織特異的融合遺伝子腫瘍 58 例中のキナーゼ融合遺伝子の同定率。

考　察

本研究では、難治性の骨軟部腫瘍に対して、相互排他性に基づいたコホートと DNA-seq 問題点解決のためのトランスクリプトームレベルのハイブリッドトランスクリプトーム解析を基軸に効率的データ構築、癌化能及び阻害剤奏効の機能解析を進めた。DNA-seq の TK 融合遺伝子の多くは見落す理由として、臨床有用な治療標的となる融合遺伝子のイントロンの一部は非常に大きいため探索が難しい（*NTRK3* や *NRG1* は>90 Kb）ことや、ゲノム全体に繰り返し配列が多数存在するため、NGS を介して評価するのが非常に難しく、特に既知 *ROS1* 融合遺伝子は 28%にこの難配列を含むことが知られている［6］。ハイブリッドトランスクリプトーム解析の融合遺伝子同定精度については、その *ROS1* 融合遺伝子の同定は上記のように非常に難易度が高いが、我々は開発したハイブリッドトランスクリプトーム解析で新規 *ROS1* 融合遺伝子（*MAN1A1-ROS1*）同定に成功し、その精度は極めて高いことが評価されている［7］。本研究では、骨軟部腫瘍に TK 融合遺伝子は 2%程度の頻度とされているが、探索セットにて約 15%の TK 融合遺伝子を骨軟部腫瘍に高率に同定することに成功した［1, 2, 7］。

特筆することとして、本研究においては非組織型特異的融合遺伝子群に TK 融合遺伝子を高率に含む（*ALK*、*RET*、*NTRK*など）ことで知られる inflammatory myofibroblastic tumor（IMT）は含めずに組織型特異的融合遺伝子群として扱い解析しており、その IMT を含むコホートとし解析した場合は、更に高率な TK 融合遺伝子の同定率となる［8］。また、悪性骨腫瘍に対するハイブリッドトランスクリプトーム解析では世界で 2 例目となる骨腫瘍の *NTRK* 融合遺伝子同定に成功している［9］。本同定は骨腫瘍特有の骨病理検体の脱灰という核酸に対して不利（劣化）な状況においても高度解析が可能であることを示したと推測できる。更に特筆することとして、探索セット 82 例において同定された TK 融合遺伝子が組織型特異的融合遺伝子を持たない非組織型特異的融合遺伝子群に同定されていた。本結果は組織型特異的融合遺伝子を基軸とした driver-oncogene の骨軟部腫瘍の相互排他性が存在していることを示唆していると考える。本研究では引き続き非組織型特異的融合遺伝子群に限定した解析を進めている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、順天堂大学人体病理教室准教授の林大久生先生、准教授の齋藤剛先生、栃木県立がんセンター骨軟部腫瘍科部長の菊田一貴先生、帝京大学整形外科准教授の今西淳吾先生、九州大学整形外科講師の遠藤誠先生、東北大学小児科講師の新妻秀剛先生、順天堂大学整形外科教室助教の長谷川延彦先生、栗原大聖先生、佐野圭先生、佐々慶太先生、国立がん研究センター研究所細胞情報学分野分野長の高阪真路先生である。

文　献

1） Zehir A, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. Nat Med. 2017 Jun;23(6):703-713. PMID: 28481359
2） Kato S, et al. Multicenter experience with large panel next-generation sequencing in patients with advanced solid cancers in Japan. Jpn J Clin Oncol. 2019 Feb 1;49(2):174-182. PMID: 30541038
3） Suehara Y, et al. 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. PMID: 23052255
4） Fletcher CD, Hogendoorn P, Mertens F, Bridge J. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2013.
5） Drilon A, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. N Engl J Med. 2018 Feb 22;378(8):731-739. PMID: 29466156
6） Benayed R, et al. High Yield of RNA Sequencing for Targetable Kinase Fusions in Lung Adenocarcinomas with No Mitogenic Driver Alteration Detected by DNA Sequencing and Low Tumor Mutation Burden. Clin Cancer Res. 2019 Aug 1;25(15):4712-4722. PMID: 31028088
7） Suehara Y, et al. Identification of a Novel MAN1A1-ROS1 Fusion Gene Through mRNA-based Screening for Tyrosine Kinase Gene Aberrations in a Patient with Leiomyosarcoma. Clin Orthop Relat Res. 2021 Apr 1;479(4):838-852. PMID: 33196586
8） Antonescu CR, et al. Molecular characterization of inflammatory myofibroblastic tumors with frequent ALK and ROS1 gene fusions and rare novel RET rearrangement. Am J Surg Pathol. 2015 Jul;39(7):957-67. PMID: 25723109
9） Yamazaki F, et al. Novel NTRK3 Fusions in Fibrosarcomas of Adults Affiliations　expand. Am J Surg Pathol. 2015 Jul;39(7):957-67. PMID: 30520818