

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 田村 亮  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第732号  
学位授与の日付 平成29年3月23日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Novel kinase fusion transcripts found in endometrial cancer.  
(子宮体癌における新規キナーゼ融合遺伝子の同定)

論文審査委員 主査 教授 藤井 雅寛  
副査 教授 味岡 洋一  
副査 教授 榎本 隆之

### 博士論文の要旨

#### 背景

近年シーケンス技術の進歩により、複数の癌腫で融合遺伝子が同定されている。キナーゼ遺伝子(*ALK*, *ROS1*, *RET*, *FGFR* など)を含む融合遺伝子は、治療標的候補として注目されており、中でも *EML4-ALK* 融合遺伝子は非小細胞肺がんの約5%で同定されるが、*EML4-ALK* 融合遺伝子に対する *ALK* 阻害薬は、その高い奏効率から、現在 *ALK* 陽性肺がんの標準治療薬になっている。

一方、子宮体癌は女性がんの中で4番目に多いがんであり、本邦においてその罹患数は増加傾向にある。早期例は予後良好であるが、進行例や一部の早期例では、化学療法や放射線療法に治療に難治性であり、予後不良である。近年、The Cancer Genome Atlas (TCGA) を始めとする大規模な網羅的遺伝子解析により、子宮体癌におけるゲノム異常が解明されつつあるが、子宮体癌に対して有効な分子標的薬の開発には至っていない。

#### 目的

子宮体癌における融合遺伝子プロファイリングを行い、治療標的融合遺伝子を同定し、その治療標的としての評価を行うことを目的とした。

#### 方法

CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia) のデータベースに登録された子宮体癌細胞株25例のRNAシーケンスデータを用いて、PRADA (Pipeline for RNA sequencing Data Analysis) を実行し、融合遺伝子を同定した。同定した融合遺伝子に対する特異的プライマーを作成し、Reverse Transcription PCR (RT-PCR) およびサンガーシーケンス法により、融合遺伝子の存在を確認した。また、SNP6 アレイデータを用いて融合遺伝子を構成する各遺伝子のコピー数変化を推定し、融合遺伝子発生メカニズムを検証した。

次に、同定された融合遺伝子の中から、キナーゼ融合遺伝子に注目し、臨床検体での頻度を検討した。臨床検体でも確認されるキナーゼ融合遺伝子について、治療標的としての評価として、融合遺伝子陽性細胞株に対する siRNA を用いた遺伝子ノックダウン実験を行い、発現変化を Realtime RT-PCR 法及び Western blot 法、細胞増殖変化を Cell Titer Glo アッセイを用いて検証した。

## 結果

### 融合遺伝子の同定と治療標的キナーゼ融合遺伝子の抽出

25 例の子宮体癌細胞株を用いて 124 個の融合遺伝子を同定した。14 例(56%)の細胞株で1つ以上の in-frame な融合遺伝子を認めた。また、細胞株のコピー数変化の増加と同定される融合遺伝子の数に正の相関を認め、さらに同定された 69%の融合遺伝子で融合遺伝子構成遺伝子の増幅を伴っていた。

治療候補キナーゼ融合遺伝子として in-frame であること、発現量が一定以上なもの、キナーゼドメインが保たれていることを条件とし、*CPQ-PRKDC*、*CAPZA2-MET*、*VGLL4-PRKG1* の3つを抽出した。いずれの融合遺伝子も、キナーゼ遺伝子の発現亢進とコピー数増加を伴っていた。

次に、上記3つの融合遺伝子について子宮体癌臨床検体 122 例での頻度を調査し、*CPQ-PRKDC* 融合遺伝子を 3/122 (2.5%) で同定した。*CAPZA2-MET*、*VGLL4-PRKG1* 融合遺伝子陽性症例は認めなかった。

### *CPQ-PRKDC* 融合遺伝子の治療標的としての評価

*CPQ-PRKDC* 融合遺伝子の治療標的としての評価をするために、融合遺伝子特異的 siRNA、野生型 *PRKDC* 特異的 siRNA を用いて、融合遺伝子陽性株である JHUEM3 に対して遺伝子ノックダウン実験を行ったところ、野生型 *PRKDC* のノックダウンでは細胞増殖抑制を認めるのに対して、融合遺伝子特異的なノックダウンでは、細胞増殖抑制を認めなかった。また、Western blot 法で野生型 *PRKDC* 蛋白質が検出可能であるのに対し、*CPQ-PRKDC* 融合タンパク質が検出不可能な発現レベルであった。

### 治療標的融合遺伝子陽性症例と子宮体癌細胞株の Transcript Allele Fraction の相違

子宮体癌細胞株で同定した融合遺伝子と、治療標的融合遺伝子との違いを検討するため、申請者らが過去に解析した、TCGA の 4,366 症例より同定した 82 個の治療標的キナーゼ融合遺伝子との比較を行った。RNA シーケンスデータより、融合遺伝子と野生型キナーゼ遺伝子の発現を加えた全体の発現量、に対する融合遺伝子の発現比 (TAF; Transcript Allele Fraction) を算出したところ、治療標的キナーゼ融合遺伝子で、TAF が高値に集中しているのに対し、本研究で同定した融合遺伝子の TAF は低値であった。

## 考察

子宮体癌 25 症例の RNA シーケンスデータを用いて 124 個の融合遺伝子を同定したが、本研究では治療標的となる融合遺伝子は同定されなかった。その理由として、子宮体癌細胞株が必ずしも臨床検体の融合遺伝子プロファイルを反映していない可能性がある。

また治療標的融合遺伝子の同定のためには、TAF が有用である可能性が示唆された。

## 審査結果の要旨

子宮体癌は、女性で 4 番目に多いがんである。進行例や一部の早期例は、予後不良である。申請者は、子宮体癌細胞株 25 例の RNA シーケンスデータを用いて、PRADA (Pipeline for RNA sequencing Data Analysis) を実行し、124 個の融合遺伝子を同定した。治療候補キナーゼ融合遺伝子として、in-frame であること、発現量が一定以上なもの、キナーゼドメインが保たれていることを条件として、*CPQ-PRKDC*、*CAPZA2-MET*、*VGLL4-PRKG1* の3つを抽出した。子宮体癌臨床検体 122 例での頻度を調査し、*CPQ-PRKDC* 融合遺伝子を 3/122 (2.5%) 例で同定した。*CAPZA2-MET*、*VGLL4-PRKG1* 融合遺伝子陽性症例は認めなかった。融合遺伝子陽性株である JHUEM3 に対して遺伝子ノックダウン実験を行ったところ、野生型 *PRKDC* のノックダウンでは細胞増殖抑制を認めるのに対して、融合遺伝子特異的なノックダウンでは、細胞増殖抑制を認めなかった。また、野生型 *PRKDC* 蛋白質は検出できたが、*CPQ-PRKDC* 融合蛋白質は検出できなかった。以上より、

CPQ-PRKDC 融合遺伝子はがん細胞の増殖には関与していないと結論した。

子宮体癌細胞株を用いて、融合遺伝子の同定法を確立したこと、および同定した融合遺伝子の臨床検体における発現頻度を明らかにした点に、本論文の学位論文としての価値を認めた。