

新潟大学における Translational Research の現状

Present Status of Translational Research at Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Science

第 718 回新潟医学会

日 時 平成 28 年 10 月 15 日 (土) 午後 1 時から
会 場 新潟大学医学部 有壬記念館

司 会 榎本隆之教授 (産科婦人科学)

演 者 吉原弘祐 (産科婦人科学), 清水逸平 (先進老化制御学), 斎藤亮彦 (機能分子医学)

1 婦人科癌における治療標的融合遺伝子の同定

吉原 弘祐

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学遺伝子制御講座 (産婦人科)

Identification of Therapeutically Targetable Fusion Genes in Gynecologic Cancers

Kosuke YOSHIHARA

Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

要 旨

子宮頸癌の原因としてヒトパピローマウイルス (HPV) 感染が特定されたにもかかわらず、本邦において HPV ワクチンの普及は進んでおらず、子宮頸癌制圧までの道のりは厳しい状況にある。また本邦において子宮頸癌検診の受診率は低く、子宮頸癌罹患率は 20 ~ 30 歳代で急激に増加し、死亡数も減少から増加に転じており、予後改善につながる新規治療戦略の構築は急務である。

ゲノム解析技術の進歩により、癌ゲノム異常を網羅的に探索することが可能となり、新しい治療標的の同定を目指して、様々な癌でゲノム・トランスクリプトーム・プロテオミクス解析が行われている。癌ゲノム異常のうち、融合遺伝子の同定は、癌化メカニズムの解明につながるると同時に、治療標的として重要な意義を持つ。非小細胞性肺癌の約 5% で同定される *EML4-ALK* 融合遺伝子は、代表的な治療標的融合遺伝子であり、その阻害剤はすでに臨床応用され、高い奏効率を示すことが知られている。しかし子宮頸癌領域では、これまで大規模網な網

羅的融合遺伝子の検索は行われておらず、治療標的融合遺伝子の同定には至っていない。

そこで筆者らは、子宮頸癌における新規治療標的融合遺伝子を同定することを目的とし、子宮頸癌に対するトランスクリプトーム解析を進めている。本シンポジウムでは、融合遺伝子について概説し、筆者らが行っている婦人科癌領域における融合遺伝子研究を紹介する。

キーワード：融合遺伝子, 分子標的薬

融合遺伝子の歴史

融合遺伝子は、近年癌研究において癌化メカニズムの一つであると同時に治療標的として注目されているゲノム異常である。1960年にNowellとHungerfordによって慢性骨髄性白血病症例でフィラデルフィア染色体が発見され、1973年Rowleyによりその本体が*BCR-ABL*融合遺伝子であることが同定されたことが契機となり、慢性骨髄性白血病発症において*BCR-ABL*融合遺伝子とその中心的役割を果たすことが明らかにされた。さらに*BCR-ABL*融合遺伝子産物を対象とした分子標的剤であるimatinibが開発され、臨床応用された結果、慢性骨髄性白血病の予後が劇的に改善したことから、さまざまな腫瘍で、“第2の*BCR-ABL*融合遺伝子”の同定が盛んに行われるようになった。パーキットリンパ腫における*IGH-MYC*融合遺伝子、急性骨髄性白血病における*PML-RARA*融合遺伝子、子宮内膜間質肉腫における*JAZF1-SUZ12*など、血液系や間葉系悪性疾患で融合遺伝子が同定される頻度が高いものの、固形癌では、融合遺伝子自体の同定頻度は低く、また有望な治療標的融合遺伝子が同定されることがなかった¹⁾。

そんな中、2007年に自治医科大学間野博之教授のグループにより、非小細胞性肺がんの6.7%に*EMLA-ALK*融合遺伝子が存在し、ALK阻害剤が著明な腫瘍抑制効果を示すことが報告され²⁾、一気にALK阻害剤の開発が進むこととなった。2010年にはALK阻害剤CrizotinibのPhase I/II試験の結果がNew England Journal of Medicine誌に報告され³⁾、その結果をもとに2011年8月アメリカ食品医薬品局はPhase IIIの結果を待たずにCrizotinibをALK陽性進行肺非小細胞癌に

対する治療薬として条件付きで承認することとなった。このALK阻害剤の承認は抗がん剤開発史上最短であり、ALK融合遺伝子の同定及びALK阻害剤の成功により、近年固形癌に対する治療標的融合遺伝子同定の気運が高まっている。

網羅的融合遺伝子の同定

次世代シーケンサーの登場により、網羅的融合遺伝子解析が可能になり、全ゲノムシーケンスやRNAシーケンスデータから融合遺伝子を網羅的に同定することが可能になった。しかし、抽出されてくる融合遺伝子に一定の割合で偽陽性が含まれており、結果の信頼性・再現性に問題があった。筆者は、The Cancer Genome Atlas (TCGA) Projectに参加し、TCGAに登録されている13種類の癌種（膀胱癌、乳癌、膠芽腫、頭頸部扁平上皮癌、腎淡明細胞癌、急性骨髄性白血病、低悪性度神経膠腫、肺腺癌、肺扁平上皮癌、卵巣漿液性癌、前立腺癌、皮膚悪性黒色腫、甲状腺癌）のpaired-end RNA sequencing data 4336症例に対してPipeline for RNA sequence Data Analysis (PRADA)⁴⁾を実行し、独自のフィルタリング法を開発し、偽陽性を排除し、信頼性・再現性の高い癌特異的融合遺伝子7,887個を同定している(表1)⁵⁾。次に同一症例のSNPアレイデータを用いて、GIS TIC v2.0アルゴリズムに基づく腫瘍DNAにおけるコピー数変化を検証し、融合遺伝子とコピー数変化の関連性を調査した。その結果、甲状腺癌、急性骨髄性白血病、腎淡明細胞癌を除くほとんどの悪性腫瘍で、1症例あたり少なくとも一つの融合遺伝子を有しており、その多くは、コピー数変化に伴う融合遺伝子であった。逆に甲状腺癌と急性骨髄性白血病では、1症例あたりの

融合遺伝子の頻度は少ないものの、同定される融合遺伝子の多くは、転座などによる融合遺伝子であり、コピー数変化を伴わず、染色体間での融合に頻度が多く、癌種により融合遺伝子の発生メカニズムに違いがあることが明らかにしている。

また融合遺伝子を構成する各遺伝子の機能に注目した場合、「キナーゼ融合遺伝子」、「染色体リモデリング関連融合遺伝子」、癌遺伝子や癌抑制遺伝子から構成される融合遺伝子など、治療標的と成り得る融合遺伝子が癌種を超えて共通することが明らかになった。治療標的融合遺伝子を有する症例について全エクソンシーケンスにより同定された遺伝子変異プロファイルを確認したところ、治療標的融合遺伝子を有する症例は、治療標的融合遺伝子を持たない症例に比し、遺伝子変異の頻度が少なく、治療標的と成り得る融合遺伝子と遺伝子変異が相互排他的な関係にあった。例え

ば、*EML4-ALK* 融合遺伝子は非小細胞性肺癌以外にも甲状腺癌で認めており、かつ *EML4-ALK* 融合遺伝子を有する症例は遺伝子変異（特にドライバー遺伝子変異）の頻度が低くなっており、癌種を超えた治療標的である可能性がある。しかし、これまでに固形癌で同定されている治療標的融合遺伝子の頻度は、EGFR などの治療標的遺伝子変異に比べ頻度が低い。肺癌や大腸癌など年間罹患患者数の多い疾患で数%の頻度で治療標的融合遺伝子が見つかれば、新規治療薬の開発も進む可能性があるが、症例数が限られる癌種において頻度の低い新規治療標的融合遺伝子が同定されたとしても新規治療薬の開発は厳しい可能性がある。打開策としては、癌を臓器別に分類するのではなく、分子生物学的特徴に基づいて再分類し、同じ分子標的を有する症例に対して、有効な分子標的薬を使うという形の臨床試験（“Basket Trial”）が重

表1 癌種とサンプル数及び同定された融合遺伝子数

癌種	腫瘍 (症例数)	正常組織 (症例数)	融合遺伝子数
膀胱癌	121	16	359
乳癌	1019	110	3577
膠芽腫	158	-	245
頭頸部扁平上皮癌	300	37	382
腎明細胞癌	474	71	179
急性骨髄性白血病	171	-	79
低悪性度神経膠腫	266	-	291
肺腺癌	487	57	1193
肺扁平上皮癌	220	17	501
卵巣漿液性癌	400	-	335
前立腺癌	178	-	472
皮膚悪性黒色腫	78	-	163
甲状腺癌	494	56	111
合計	4366	364	7887

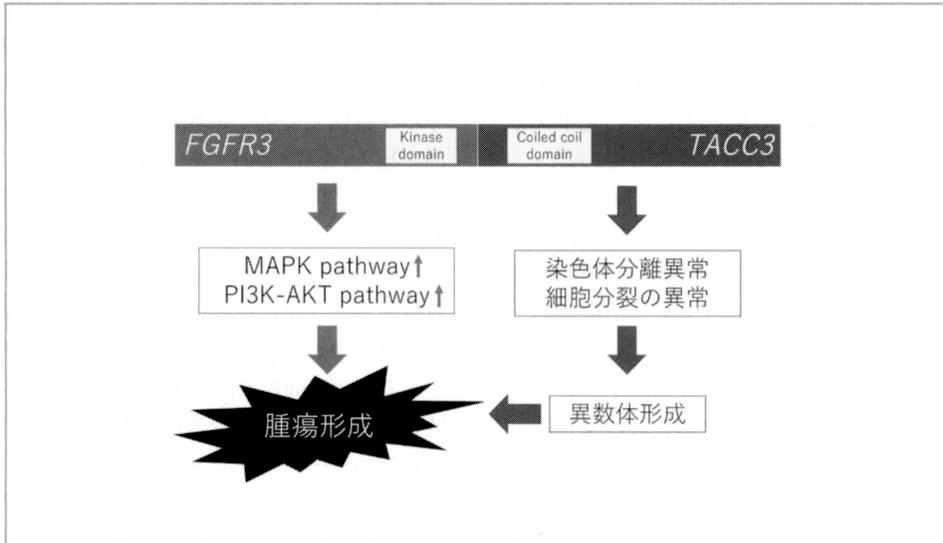


図1 *FGFR3-TACC3*融合遺伝子について

要になってくる⁶⁾。

婦人科癌における治療標的融合遺伝子の同定

婦人科癌領域では、*EML4-ALK*融合遺伝子のような臨床応用されている治療標的融合遺伝子はない。筆者は、TCGAに登録されている高悪性度漿液性卵巣癌400例について治療標的融合遺伝子の同定を試みたが、分子標的と成り得るような反復する融合遺伝子は抽出されなかった。高悪性度漿液性卵巣癌はほぼ全例で*TP53*遺伝子変異を認め、かつgenomic instabilityを伴うため、増幅・欠失などのコピー数変化がゲノム全体に起きていることが報告されており⁷⁾、融合遺伝子がドライバー変化として生じにくい可能性がある。最近、オーストラリアのグループから再発高悪性度漿液性卵巣癌症例において化学療法抵抗性への関与が示唆される*SLC25A40-ABC11*融合遺伝子が同定されている⁸⁾。これまで発癌あるいは治療標的として注目され、融合遺伝子のスクリーニングが行われてきたが、今後融合遺伝子が様々な癌種で抗がん剤感受性・抵抗性や進行・再発に関与する可能性があり、網羅的融合遺伝子解析に加え、個々の融合遺伝子の機能解析を行い、その臨床的

意義を明らかにしていくことが重要になっている。

そこで、筆者らは、新潟大学医歯学総合研究科分子生物学分野の小松雅明教授のグループと共同研究を行い、子宮頸癌における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トランスレーショナルリサーチを開始している。本邦での子宮頸癌に対するHPVワクチンの普及が進んでおらず、癌検診の受診率も低いため、子宮頸癌の制圧までの道のりは厳しい状況にあり、また進行例の5年生存率はstage IIIで56%、stage IVで25%と依然として予後不良のため、予後改善につながる新規治療薬の開発は急務である。まずTCGAに登録されている子宮頸癌のpaired-end RNA sequencing data 253症例についてPRADAを行い、358個の融合遺伝子を同定している。そのうち、反復している融合遺伝子は3種類のみで、キナーゼ融合遺伝子として*FGFR3-TACC3*融合遺伝子が2例(0.8%)で抽出された。筆者らは*FGFR3-TACC3*融合遺伝子に注目し(図1)、日本人子宮頸癌100症例でその頻度を検証したところ、2症例(2%)で存在し、子宮頸癌で同定されたすべての症例の組織型が扁平上皮癌であった。子宮頸癌における*FGFR3-TACC3*

融合遺伝子の治療標的としての可能性を評価するため、*FGFR3-TACC3* をクローニングし、不死化ケラチノサイト、4種類の子宮頸癌細胞株 (SiHa, ME180, HeLa, CaSki) に導入して表現型の変化を検証している。*FGFR3-TACC3* 融合遺伝子の導入により、不死化ケラチノサイトは足場非依存性細胞増殖を獲得し、子宮頸癌細胞株も明らかな細胞増殖の促進を認め、上記所見に一致して、Western Blotting により MAPK パスウェイの活性化を確認している。さらに *FGFR3* 特異的 siRNA あるいは *FGFR* 阻害剤により、*FGFR3-TACC3* 陽性細胞株は細胞増殖が抑制されることを確認し、治療標的の可能性を示唆している。

前述の通り、子宮頸癌に対する *FGFR3-TACC3* 融合遺伝子の頻度は高くないが、先行研究により *FGFR3-TACC3* 融合遺伝子はその他の癌種でも一定の割合で同定されていることから、今後 Basket Trial の対象として検討していく予定である。

参考文献

- 1) Mitelman F, Johansson B and Mertens F: The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat. Rev. Cancer* 7, 233 - 245, doi: 10.1038/nrc2091 (2007).
- 2) Soda M, *et al*: Identification of the transforming EML4 - ALK fusion gene in non - small - cell lung cancer. *Nature* 448, 561 - 566, doi: 10.1038/nature05945 (2007).
- 3) Kwak E L, *et al*: Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non - small - cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 363, 1693 - 1703, doi: 10.1056/NEJMoa1006448 (2010).
- 4) Torres - Garcia W, *et al*: PRADA: Pipeline for RNA sequencing Data Analysis. *Bioinformatics*, doi: 10.1093/bioinformatics/btu169 (2014).
- 5) Yoshihara K, *et al*: The landscape and therapeutic relevance of cancer - associated transcript fusions. *Oncogene* 34, 4845 - 4854, doi: 10.1038/onc.2014.406 (2015).
- 6) Sleijfer S, Bogaerts J and Siu L L: Designing transformative clinical trials in the cancer genome era. *J. Clin. Oncol.* 31, 1834 - 1841, doi: 10.1200/JCO.2012.45.3639 (2013).
- 7) Cancer Genome Atlas Research N, *et al*: The Cancer Genome Atlas Pan - Cancer analysis project. *Nat. Genet.* 45, 1113 - 1120, doi: 10.1038/ng.2764 (2013).
- 8) Patch A M, *et al*: Whole - genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature* 521, 489 - 494, doi: 10.1038/nature14410 (2015).

2 心不全、肥満研究における Translational research

清水 逸平^{1,2}・南野 徹¹

¹ 新潟大学大学院医歯学総合研究科 循環器内科学

² 新潟大学大学院医歯学総合研究科 先進老化制御学講座

Our Translational Research in the Field of Heart Failure and Obesity

Ippei SHIMIZU^{1,2} and Tohru MINAMINO¹

¹ Department of Cardiovascular Biology and Medicine

² Division of Molecular Aging and Cell Biology Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

はじめに

老化は一定の制御機構を伴う生命現象と考えら

れるが、老化は細胞レベルでも生じることがわかっている。テロメアの過度な短縮や酸化ストレス、炎症性サイトカインにより主に p53 シグナルを介