

## 審査の結果の要旨

氏名 川上 正敬

本研究はヒト非小細胞肺癌において発癌に寄与する新規癌遺伝子を同定するため、バイオインフォマティクス的手法と実験的手法を組み合わせることで網羅的に検索したものであり、下記の結果を得ている。

1. 既に非小細胞肺癌において、EML4 遺伝子などとの融合遺伝子を形成し強い発癌性が示されている ALK 遺伝子のチロシンキナーゼ (TK) ドメインと相同性の高い遺伝子を tblastn アルゴリズムを用いて抽出し、その上位 36 遺伝子を新規癌遺伝子の候補として、非小細胞肺癌 30 症例で正常肺組織と比べた過剰発現の有無を TK ドメインでの定量的 RT-PCR により検討したところ、いくつかの遺伝子が肺癌症例で発現増大していた。なお、この上位 36 遺伝子は全て TK ファミリーの遺伝子であった。
2. 融合遺伝子を形成し、5'側が別の遺伝子に置き換わっているとすると、TK ドメインは過剰発現していても 5'側は発現せず、これら 2つの領域では発現量に解離を認めることが予想されたため、1. で TK ドメインが肺癌症例において過剰発現していた遺伝子について 5'側に新たにプライマーを設計し定量的 RT-PCR により TK ドメインの発現量との解離の有無を検討したところ、FER 遺伝子を含む 8 遺伝子で解離を認めた。
3. TK ドメインと 5'側とで発現量に解離を認めた遺伝子について、その 5'側の配列を同定する rapid amplification of cDNA ends (RACE)を施行したところ、FER 遺伝子について RACE を施行した 2 症例のうち 1 症例で 5'側が PJA2 遺伝子に置き換わり、PJA2 遺伝子のエクソン 1 が FER のエクソン 14 以下の 3'側に融合した PJA2-FER 融合遺伝子が同定された。
4. PJA2 側から下向きにフォワードプライマーを、FER 側から上向きにリバースプライマーを設計し、PCR を行うことで PJA2-FER 融合遺伝子のさらなる検索を施行した

ところ、最初に同定されたパターンの他にもいくつかの融合パターンが検出された。この中には、PJA2 のエクソン 1 が FER のエクソン 3 以下に融合したタンパクとしてはインタクトな FER タンパクそのものが翻訳されるであろう融合パターンもあった。肺癌細胞株でも検索したところ、NCI-H661 細胞において、臨床症例と同様に PJA2-FER 融合遺伝子が同定され FER が他の肺癌細胞株と比べ過剰発現していた。

5. 定量的 RT-PCR による発現量の解析では、PJA2 の発現量は、検討した肺や肝臓、横紋筋などを含む 20 の正常組織の全てで FER の 10 倍かそれ以上であることが確認された。このことから FER は PJA2 と融合し活性の強い PJA2 プロモーターを利用することにより過剰発現することが考えられた。

6. 今回同定された融合遺伝子について発現ベクターを作成し NIH-3T3 細胞に導入したところ、インタクトな全長 FER タンパクが翻訳されるパターンの融合遺伝子の発現ベクターを導入した細胞では contact inhibition の消失を示唆する focus formation が多数観察され、FER 遺伝子の癌化能が確認された。続いて、H661 細胞の FER ノックダウンによる変化を調べた。H661 細胞は PJA2-FER 融合遺伝子を有し FER の過剰発現を認めるため、FER 過剰発現肺癌症例のモデルとして捉えることができる。FER siRNA ベクターにより H661 細胞の FER をノックダウンしたところアポトーシスが誘導されたが、コントロールのスクランブルベクターでは変化はなかった。対照実験として、FER の過剰発現のない A549 細胞に FER siRNA ベクターを導入したが、細胞増殖に変化はなかった。これらのことから、FER を過剰発現している癌細胞では FER ノックダウンにより細胞死が誘導されることが示された。

7. 肺癌症例の tissue microarray を FER 抗体で免疫染色し FER 過剰発現のある肺癌症例の頻度を調べたところ、肺腺癌症例の 45.3% (107/236 例)、肺扁平上皮癌の 23.6% (30/127 例) で FER 免疫染色陽性、即ち FER の過剰発現を認めた。FER 免疫染色で陽性であったこれらの症例について PJA2-FER 融合遺伝子を検出するプライマーによる PCR

法で検索したところ、肺腺癌のうち 53% (18/34 例), 肺扁平上皮癌のうち 67% (6/9 例)で融合遺伝子が検出された。免疫染色陽性であったにも関わらず PJA2-FER 融合遺伝子が検出されなかった残りの症例では、PJA2-FER 融合遺伝子以外の機序で FER が過剰発現していると予想された。

以上、本論文は肺癌における新たな癌遺伝子の同定を目指し肺癌症例を網羅的に検索することにより、一部の症例で TK ファミリーの一つである FER 遺伝子が融合遺伝子を形成し過剰発現していることを明らかにした。また、同様の遺伝子再構成を認める肺癌細胞株も同定し、これをモデルとした機能解析から、FER 過剰発現を認める肺癌に対する治療として FER を阻害することの有効性を示した。本研究は FER が肺癌分子標的治療の新たな有力な標的となりうることを示し、肺癌治療の発展に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。