

論文の内容の要旨

論文題目

肺がんにおけるチロシンキナーゼの網羅的解析
—RET-proto oncogeneの過剰発現とその生理的機序—

春原 光宏

ヒトのチロシンキナーゼは 90 遺伝子が知られており、成長因子の受容体などの役割を有している。そして、その異常は発がんに関与することが広く知られている。チロシンキナーゼの発がんの機序としては、慢性骨髄性白血病の BCR-ABL に代表される転座、MYC にみられる遺伝子の増幅のほか、点突然変異、過剰発現などが知られている。Bcr-abl に対する imatinib や上皮成長因子受容体 (EGFR) に対する gefitinib など種々の低分子チロシンキナーゼ阻害剤が既に臨床応用されている。2007 年には曾田らにより肺がんの 5% の原因を占める EML4-ALK の微小転座が発見された。その後 ALK を阻害する crizotinib が肺がんにおける ALK 転座の発見から 4 年という異例の速さで治験を終えアメリカの Food and Drug Administration (FDA) で承認された。また 2011 年には KIF5b-RET の微小転座も報告されており、これに対する発がん機序の解明、阻害薬の検討などが進められている。世界保健機構(WHO)の推計では、肺がんによる死者は全世界で毎年 140 万人にのぼり、たとえ数%を占める変異であっても、その変異を発見することで数万人単位の患者の利益に資することができる。特にチロシンキナーゼは低分子阻害薬の開発が進んでおり、チロシンキナーゼの新規変異を発見することは、発がんに関わる基礎研究にとどまらず、短期間で治療薬として患者に還元できる極めて有意義で重要な研究である。

今回われわれは、Natural Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) の中で、アミノ酸配列で相同性の高い遺伝子を抽出するアルゴリズムである t-blast-n を用いて、ALK のチロシンキナーゼ部位と相同性の高いチロシンキナーゼ 36 遺伝子を抽出した。次に肺がんの既知の driver gene として多くを占める EGFR 変異と KRAS 変異を有さない肺がんの臨床検体 30 例を用いて、これらのチロシンキナーゼの発現をキナーゼドメイン内の定量的 real time PCR により網羅的に探索した。その結果、チロシンキナーゼの発現パターンとして、ほぼ全ての症例で過剰発現がみられ

る遺伝子，一部の症例でのみ過剰発現がみられる遺伝子，ほぼ全ての症例で発現が低い遺伝子の3パターンに大別された。ALKは一部症例でのみ過剰発現が見られる遺伝子群に属し，事実，我々の解析でも過剰発現の見られた1症例からEML4-ALKの微小転座が検出された。この一部症例でのみ過剰発現が認められた遺伝子群の中で，過剰発現がみられた遺伝子-症例ペア18組を候補とした。チロシンキナーゼのキナーゼドメインは3'端の近傍でコードされるため，上流の転座や変異を確認するため，定量的real time PCRにて5'端近傍の発現がキナーゼ部分の発現と比べ低下している遺伝子-症例ペアを抽出した。遺伝子はRET, NTRK2, EPHA5, FGFR3, FER, INSRRの5種であった。今回，RET, NTRK2, EPHA5の3遺伝子，5組の遺伝子-症例ペアに対して5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE)法を用いて，変異を検索した。RACE法とは，既知の一部配列からcDNA全長を得る手法である。

その結果，多発性内分泌腫瘍症(MEN) II型の変異遺伝子であるRET proto-oncogene (RET)に，exon 1, 2, 3から exon 8に飛ぶ，また exon 4から exon 7に飛ぶ splicing variantが存在することを発見した。これら splicing variantはいずれも frame shiftを起こさないものであった。開始コドンである first ATGや細胞外移行シグナルは exon 1に含まれており，膜貫通ドメインは exon 10に存在しており，いずれも翻訳産物には残存していると考えられた。そのため，これら splicing variantsの翻訳産物は，正常のRET同様に膜タンパクとして局在し，細胞外ドメインの一部を欠くものの，キナーゼドメインを含む細胞内の配列は正常のRETと同じであるため，がん遺伝子として働きうると考えられた。一方NTRK2, EPHA5については，他遺伝子との fusionや意味のある splicing variantは認められなかった。

新たな splicing variant に対して発現解析を行う際には，RACE法により得られた遺伝子の両端部分を接続し，cDNA全長を得る必要があった。従来は制限酵素を用いて ligationを行っていたが，今回DNA polymeraseを用いる方法を見だし，これについて条件検討を詳しく行った。具体的にはオーバーラップ領域を有する2種類のDNAを混ぜ，プライマーを加えずに，polymeraseが埋めるのに必要な距離(長いほうのDNAの長さからオーバーラップの長さを引いたもの)に相当する伸長時間をとることが重要であることがわかった。

得られた splicing variant のcDNA全長を発現ベクターpcDNA3.1®-Hygro(+)を用いて，HEK 293t細胞株に lipofection で導入した。抗RETリン酸化抗体を用いたWestern blot法により，splicing variant もリン酸化能を有することが確認された。また，今回発見された splicing variant は膜貫通ドメインから細胞内ドメインが，正常のRETと同じであるためRETの低分子阻害薬である vandetanibにより阻害されると考えられた。そこでHEK 293t細胞株を vandetanib を4 μ M含む培地で培養した後抽出したタンパクをWestern blot

法で解析したところ、いずれの variant においてもリン酸化が阻害されることが確認された。

この vandetanib は、RET 以外にも上皮由来成長因子受容体(EGFR)、血管内皮細胞由来成長因子受容体(VEGFR)を阻害する低分子マルチキナーゼインヒビターであり、甲状腺髄様がんに対しては既に上梓されている。Vandetanib は非小細胞肺癌患者に対して第 III 層試験が行われているが、化学療法不応性の非小細胞肺癌患者全体を対象としたため、無増悪期間 (PFS)にて有意差が出たものの差がわずかであることや、全生存期間 (OS) への寄与が評価されていないことから、依然 FDA への申請が取り下げられたままとなっており、効果の現れる患者群の特定とその患者群に対する治験ないし層別化が求められている。

2005 年 6 月から 2007 年 8 月に連続して得られた肺癌臨床検体のうち良質な cDNA を得られた 81 症例に対して追加検討を行ったところ、RET の過剰発現が 32 %にみられることが確認された。この RET の過剰発現は EGFR 変異陽性患者に多くみられた。また EGFR 変異陽性群において RET の過剰発現を有する群において有意に予後(overall survival)が悪いことが示された。

今回の研究から、RET には splicing variant がみられ、これも通常の RET 同様リン酸化をきたし、また vandetanib で阻害されることが確認された。また、RET 過剰発現が EGFR 変異陽性患者において、予後予測因子となることが確認された。今後、splicing variant 及び、EGFR 変異陽性肺癌における RET 過剰発現の肺癌における病因的・臨床的意義について、更なる検討が求められる。