

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701013

研究課題名(和文)血清検体を用いたEML4-ALK検出

研究課題名(英文)Detection of EML4-ALK in serum RNA from lung cancer patients

研究代表者

坂井 和子 (SAKAI, Kazuko)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20580559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺がんにおいてALK阻害剤が著効するEML4-ALK融合遺伝子の非侵襲的検出法の確立を目的として、血清検体におけるEML4-ALK検出を検討した。がん研有明病院の協力を得て、EML4-ALK融合遺伝子陽性の患者血清を採取、収集し、血清検体からのEML4-ALK融合遺伝子の検出を検討した。EML4-ALKの複数存在するバリエーションの同時検出および検出感度の向上をめざし、血清からの核酸抽出方法や測定条件、鋳型として用いる核酸の種類を検討を行い、検出方法の最適化を行った。この結果、EML4-ALK融合遺伝子陽性患者12例中2例の患者血清からEML4-ALK融合遺伝子の検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：The presence of the transforming fusion gene EML4-ALK in non-small cell lung cancer (NSCLC) is a predictive marker for the efficacy of ALK kinase inhibitors. Circulating RNA in serum is an emerging field for noninvasive molecular diagnosis. We designed EML4-ALK detection assay using PCR-based MassARRAY platform. We attempted a RNA extraction method, primer design, and reverse transcription reagents to optimize our detection system with serum samples. We evaluated whether EML4-ALK fusion RNA could be detected in serum obtained from 12 NSCLC patients with ALK rearrangements. The EML4-ALK RNA (variant 1 and 3) was detected in serum from 2 of 12 patients. The detection of EML4-ALK in serum RNA samples by MassARRAY assay is feasible. This noninvasive assay will be useful in patients with insufficient or unavailable tumor specimens. Additional experiments will reveal the sensitivity and specificity of this detection system.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：薬効評価と予測

1. 研究開始当初の背景

2007年に自治医科大学の間野教授らによって発見されたEML4-ALK融合遺伝子は、EML4 (echinoderm microtubule associated protein-like 4) 遺伝子とALK (anaplastic lymphoma kinase) 遺伝子の融合によって生じる新規ながん遺伝子であり、肺がんの約5%に存在し、ALK阻害剤の感受性規定因子となりうるがん遺伝子である。EML4-ALKのスクリーニングには、主として、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体を用いた免疫染色法、FISH法、PCR法が用いられている。この中で、FISH法は、本年、FDAにおいてALK阻害剤である crizotinib と共にALK融合遺伝子陽性肺がんに対する診断薬として承認されている。いずれの測定法にも利点と欠点が存在するが、FISH法においては、ALK遺伝子領域を挟んだプローブによりALK遺伝子の転座をスプリットシグナルとして検出するため、シグナルの評価に熟練した技術が必要である。また、FISH法ではALK遺伝子の転座相手の同定はできない。一方、PCR法は、一般に、最も高感度な測定法であると考えられており、ALK融合遺伝子のバリエーションの型が同定可能であり、血清等のFFPE検体以外の組織にも応用できる。肺がんでは、組織採取が困難な場合も多く、非侵襲的診断技術の確立が求められている。肺がん患者の血清中の遊離核酸を用いてのEML4-ALK診断技術の確立は、分子標的薬による肺がん個別化治療への大きな寄与が期待される。

我々は、新規なEML4-ALK測定法として、PCR法をベースとしたマトリクス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF Mass) による測定手法 (マスアレイ法) を用いて、EML4-ALK融合遺伝子の検出系を構築した。マスアレイは、高感度な遺伝子解析機能を有する機器であり、その長所として、劣化した核酸での測定が可能、スループット性が高い、マルチプレックス化による多検体処理が可能、蛍光色素等の試薬を用いないため測定コストが安価、が挙げられる。我々は、これまでに、EML4-ALK融合遺伝子のバリエーション1, 2, 3a, 3b, 4, 5a, 5b, 6, 7のコーディング領域を含むコントロールプラスミドを作成し、EML4-ALK融合遺伝子の検出系を構築した。同測定系では、1コピーのEML4-ALKプラスミドを検出可能であり、高感度であることが示唆されている。また、我々は、同測定系を用いてFFPE検体を用いた検出を検討し、臨床検体においても検出可能であることを確認した。我々は、標準法であるFISH法を行った結果、ALK遺伝子の転座がスプリットシグナルとして得られ、同検体におけるALK遺伝子異常が確認された。さらに、サブクローニングとダイレクトシーケンシングにより融合部位の配列を

確認した。続けて、我々は、本研究の主題である、血清中の遊離核酸を用いてのEML4-ALK検出の検討に着手した。ALK遺伝子異常の確認された患者血清からRNAを抽出し、マスアレイ法によりEML4-ALKバリエーション1を検出した。この結果から、血清中のEML4-ALK融合遺伝子検出における同測定系の有用性が示唆されたため、本研究計画を計画した。

2. 研究の目的

我々は、血清中の遊離核酸から抽出したRNAを用いて、EML4-ALK融合遺伝子の測定法の構築を行い、同測定法を用いて血清検体による測定を実施し、EML4-ALK融合遺伝子の血清中遊離核酸での検出可能性を評価する。また、血清での検出頻度を組織検体での発現頻度と比較検討し、その有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

これまでに構築したマスアレイ法によるシングルプレックスでのEML4-ALK測定系をマルチプレックス化し、測定系のさらなる迅速化および簡便化を図り、血清検体での測定条件の最適化を行う。血清検体からの遊離核酸の抽出、cDNA化の方法について最適化を行った後、臨床検体での測定を実施する。血清検体での測定結果を組織検体での測定結果と比較し、一致率、検出成功率について検討する。

4. 研究成果

肺がんにおいてALK阻害剤が著効するEML4-ALK融合遺伝子の非侵襲的検出法の確立を目的として、血清検体におけるEML4-ALK検出を検討した。平成24年度には、EML4-ALK融合遺伝子は複数のバリエーションが存在することから、マルチプレックスによる検出系の検討を行った。また、血清検体でのEML4-ALK融合遺伝子の測定条件の最適化を目指し、RNA抽出法、Reverse Transcriptionの手法について測定条件の検討を行った。(図1)

図1

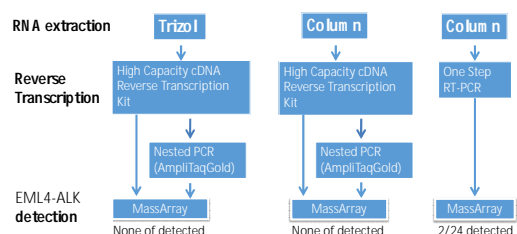
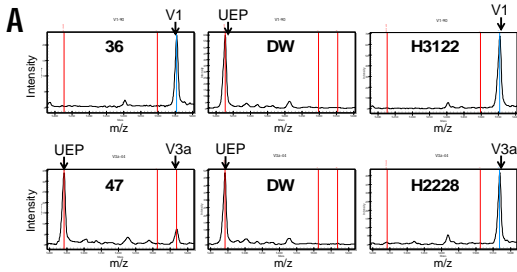


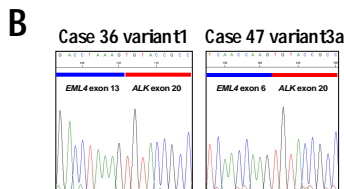
図2



その結果、EML4-ALK陽性患者2名の血清から、EML4-ALKのバリエント1およびバリエント3aの検出に成功した。(図2A) 肺がん細胞株H3122およびH2228をコントロールとして用いた。

これらの2検体における検出結果は、PCR産物のサブクローニングを行い、ダイレクトシーケンスにより融合遺伝子の存在を確認した。(図2B)

図2



一方で、EML4-ALK陽性患者の血清から検出可能であったEML4-ALK融合遺伝子の検出成功率は、12例中2例と低いものであったことから、平成25年度には、血清からのRNA抽出手法の改善を試みた。これまでに用いてきた、カラム法によるRNA抽出法に加えて、磁性ビーズを用いた抽出およびフェノール・クロロホルムによる抽出を行い、カラム法との比較を行った。RNA収量はフェノール・クロロホルムによる抽出法においてもっとも高収量が認められたが、EML4-ALK融合遺伝子の検出成功率に改善は認められなかった。この一因として、血清中に遊離しているRNAが微量でかつ不安定であることが考えられ、RNAよりも安定なDNAを用いた検討を行った。まず、DNA上でのALKの融合部位を検討した結果、EML4遺伝子との融合はALKのイントロン19の約2,000bpの間でランダムに起こっていることが明らかとなった。約2,000bpのイントロン19の領域をすべて増幅できるプライマーのデザインを行い、最適化の検討を行うことで、DNAを鋳型としたEML4-ALK融合遺伝子の検出が可能と考えられる。本研究を通じて、血清中のRNAを鋳型として、低効率ではあ

るもののEML4-ALK融合遺伝子の検出が可能であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)すべて査読あり

1. Sakai, K., Horiike, A., Darryl, I., Keita, K., Fujita, Y., Tanimoto, A., Sakatani, T., Saito, R., Kaburaki, K., Noriko, Y., Ohyanagi, F., Nishio, M., Nishio, K. Detection of EGFR T790M mutation in plasma DNA from patients refractory to EGFR tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Sci*, 2013, 104(9):1198-204.
2. Takeda, M., Okamoto, I., Sakai, K., Kawakami, H., Nishio, K., Nakagawa, K. Clinical outcome for EML4-ALK-positive patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with first-line platinum-based chemotherapy. *Ann Oncol*, 2012, 23(11): 2931-6.
3. Sakai, K., Okamoto, I., Takezawa, K., Hirashima, T., Kaneda, H., Takeda, M., Matsumoto, K., Kimura, H., Fujita, Y., Nakagawa, K., Arai, T., Nishio, K. A novel mass spectrometry-based assay for diagnosis of EML4-ALK-positive non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(5): 913-8.

[学会発表](計3件)

1. Sakai, K., Horiike, A., Darryl, I., Keita, K., Fujita, Y., Tanimoto, A., Sakatani, T., Saito, R., Kaburaki, K., Noriko, Y., Ohyanagi, F., Nishio, M., Nishio, K. Detection of EGFR T790M mutation in plasma DNA from patients refractory to EGFR tyrosine kinase inhibitor. The 11th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology, 2013, 8.29-31. Abst; 10672, Sendai, JAPAN.
2. Sakai, K., Okamoto, I., Takezawa, K., Hirashima, T., Kaneda, H., Takeda, M., Matsumoto, K., Kimura, H., Fujita, Y., Nakagawa, K., Arai, T., Nishio, K. A novel mass spectrometry-based assay for diagnosis of EML4-ALK-positive non-small cell lung cancer. The 10th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology, 2012.7.26-28. Abst; 01-029, Osaka, JAPAN.
3. Kudo, K., Nishio, M., Sakai, K., Tanimoto, A., Sakatani, T., Saito, R., Kaburaki, K., Yanagitani, N., Horiike, A., Ohyanagi, F., Nishio, K. Detection of EML4-ALK in serum RNA from lung cancer patients using MassARRAY platform. 2012.6.1-5. ASCO annual Meeting. Abst;

10569, Chicago, USA.

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂井 和子 (SAKAI, Kazuko)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20580559

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし