

博士課程用 (甲)

(様式4)

学位論文の内容の要旨

水上 達治 印

(学位論文のタイトル)

Molecular mechanisms underlying oncogenic *RET* fusion in lung adenocarcinoma

(肺腺がんにおけるRETがん遺伝子融合の分子機構)

(学位論文の要旨)

近年、肺腺がんの新規ドライバー遺伝子変異としてRET融合遺伝子が同定された。これは10番染色体の転座によってチロシンキナーゼ活性をもち、細胞増殖に関わる遺伝子である*RET*と、二量体形成に関わる*KIF5B*、また一部の症例では*CDC6*の遺伝子間で融合が起こるもので、発現の頻度は全肺腺がんの約2%であるが治療対象となりうる重要なドライバー遺伝子とみられている。またRET融合遺伝子は別のパートナーとの融合であるが、以前には甲状腺乳頭癌、特にチェルノブイリ原子力発電所事故後の放射線誘発小児甲状腺乳頭がんが多く報告されていた。

しかしながらRET融合遺伝子が形成される分子機構については不明である。今回、DNA鎖上の切断点の位置を特定し、DNA鎖末端の接続の様式を調べ、RETがん遺伝子融合の分子機構について解析を行った。

検体として1997年から2012年までに国立がん研究センター中央病院で治療を行った肺腺がん症例671症例の凍結検体から、RT-PCRによって14例、FISH法によって2例のRET融合遺伝子陽性例を検出し、それぞれゲノムPCR、次世代シーケンサーを用いたゲノムキャプチャーシーケンスを行い、ゲノムDNA上の切断点の同定を行った。これに先行論文で切断点の配列情報が記載されていた2症例を加え、全部で*KIF5B-RET*陽性症例15例、*CCDC6-RET*陽性症例3例について切断点の位置と構造を解析した。

RET遺伝子のDNA鎖上の切断点は全体の94%にあたる18例中17例がエクソン11からイントロン11の2.0 kbに集中していた。また*KIF5B*遺伝子上では15症例中10例でイントロン15に切断点を認めた。いずれの遺伝子上でも切断点が同一位置のものは認めず、最低でも4 bpの開きがあった。また4例喫煙者が含まれていたが、他の症例と明らかな差異は認めなかった。

さらに過去に報告されていた放射線誘発甲状腺乳頭がん38例、孤発性甲状腺乳頭がん6例についても同様にRET遺伝子上の切断点の位置を同定したところ、やはりエクソン11からイントロン11に切断点の集中を認め、また同一位置で切

断していたものも認めなかった。

以上より、切断点について *RET* 遺伝子の DNA 鎖は非特異的な部位で切断するが、数 kb 以内の限られた範囲で起きやすく、またそれは甲状腺乳頭がんの場合でも同様であることが明らかとなった。

次に DNA 鎖の接続について解析を行った。DNA 鎖の接続様式について調べるため、逆側の断端間での融合 (reciprocal、たとえば *KIF5B-RET* ではのこりの断端同士で *RET-KIF5B* が形成されているか) の確認を検体の確保ができた 18 症例中 17 症例でゲノム PCR を用いて行った。結果 10 例では reciprocal な融合の存在を確認できたが、7 例では検出できず、また残りの 1 例でも論文報告上 reciprocal な融合は検出されていなかった。

Loss of heterozygosity (LOH) の解析を行ったところ、検出できなかった 7 症例のうち 3 症例では切断点の N 末端側で LOH を認め、これらの症例では切断点より N 末端側の欠損したため、reciprocal な配列が形成されなかったと示唆された。

Reciprocal の配列が得られたものは DNA 鎖の接続の全貌が明らかとなったため、配列情報から DNA 鎖の接続機構について解析を行った。

10 症例中 6 症例については接続部で多くても数 bp の塩基の欠損や挿入を伴うことがある程度であり、DNA 鎖の接続機構としては末端同士に相同性を必要としない、非相同末端結合で説明可能であった。しかし 4 症例で 33-490 bp の塩基の重複 (*KIF5B-RET* にも *RET-KIF5B* にも同じ配列が含まれる) を認め、これらの接続は非相同末端結合では説明できず、他の DNA 鎖接続機構の関与が考えられた。

重複した部分について配列を詳しく確認すると、重複部分の配列と、パートナーの切断点の前後両側の配列に相同性を認めた。このことから接続方法として、DNA 鎖に 2 か所の単鎖切断が起き、2 重鎖が解離して 1 本鎖 DNA となり、それぞれが修復の過程で相同性を使って 2 重鎖切断を起こした相手側断端の配列が近い部分に潜り込んでいく break induced replication (BIR) の修復機構が関与している可能性が示唆された。

一方甲状腺乳頭がんにおける *RET* 融合遺伝子に関する過去の報告ではほぼ全例で reciprocal な融合が確認されており、また数十 bp を超えるような DNA 鎖の重複は認められておらず、全例で接続機構は非相同末端結合で説明が可能であった。

この違いは、チェルノブイリ原子力発電所事故後の放射線誘発甲状腺乳頭がんでは高線量の放射線被曝により DNA 2 重鎖切断が生じ、*RET* 融合遺伝子が形成されるのに対し、肺腺がんにおける *RET* がん遺伝子の融合ではさまざまな要因で発生する DNA 2 重鎖切断または 1 本鎖切断が契機となっているというがんの種類ごとの *RET* 遺伝子融合過程の差異によるものと考えられた。