

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6032616号
(P6032616)

(45) 発行日 平成28年11月30日(2016.11.30)

(24) 登録日 平成28年11月4日(2016.11.4)

(51) Int.Cl.		F I			
C O 7 K 19/00	(2006.01)	C O 7 K 19/00			
C O 7 K 14/82	(2006.01)	C O 7 K 14/82	Z N A		
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68		A	
G O 1 N 33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53		M	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00		A	

請求項の数 4 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2013-526964 (P2013-526964)
 (86) (22) 出願日 平成24年8月3日(2012.8.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2012/069799
 (87) 国際公開番号 W02013/018882
 (87) 国際公開日 平成25年2月7日(2013.2.7)
 審査請求日 平成27年5月26日(2015.5.26)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-171256 (P2011-171256)
 (32) 優先日 平成23年8月4日(2011.8.4)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成23年度独立行政法人医薬基盤研究所基礎研究推進事業、産業技術力強化法第19条の適用を受けるもの)

(73) 特許権者 510097747
 国立研究開発法人国立がん研究センター
 東京都中央区築地五丁目1番1号
 (73) 特許権者 511031618
 L S I P ファンド運営合同会社
 東京都千代田区丸の内一丁目7番12号
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 K I F 5 B 遺伝子と R E T 遺伝子との融合遺伝子、並びに該融合遺伝子を標的としたがん治療の有効性を判定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

K I F 5 B タンパク質の N 末端部分と、 R E T タンパク質の C 末端部分とが融合している、以下の (i) 又は (i i) のポリペプチド:

(i) 配列番号: 8、10又は12に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は
 (i i) 配列番号: 8、10又は12に記載のアミノ酸配列と95%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ R E T チロシンキナーゼ活性を有するポリペプチド。

【請求項2】

請求項1に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項3】

R E T チロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性を判定する方法であって、患者から単離した試料における請求項2に記載のポリヌクレオチドの存在または非存在を検出する工程を含み、前記ポリヌクレオチドの存在が検出されれば、前記患者における前記 R E T チロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性が高いと判定される方法。

【請求項4】

請求項3に記載の方法により R E T チロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性を判定するための薬剤であって、少なくとも15塩基の鎖長を有する下記 (a) ~ (c) に記載のいずれかであるポリヌクレオチドを含む薬剤

(a) K I F 5 B タンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブ及び R E T タンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブか

らなる群から選択される少なくとも一つのプローブであるポリヌクレオチド

(b) K I F 5 B タンパク質をコードするポリヌクレオチドと R E T タンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点にハイブリダイズするプローブであるポリヌクレオチド
(c) K I F 5 B タンパク質をコードするポリヌクレオチドと R E T タンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点を挟み込むように設計された一对のプライマーであるポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、K I F 5 B 遺伝子と R E T 遺伝子との融合遺伝子に関する。また、この融合遺伝子を標的とした R E T タンパク質チロシンキナーゼに対する阻害剤によるがん治療の有効性を判定する方法に関する。さらに、本発明は、この有効性の判定を利用したがんの治療方法に関する。また、本発明は、これらの方法に用いるための分子にも関する。

10

【背景技術】

【0002】

がんは日本における死因の第一位を占める疾病であり、その治療法の改善が求められている。特に肺がんは、日本のみならず世界においてもがん死の筆頭要因であり、年間100万人以上の死をもたらす。肺がんは大きく小細胞肺がん¹と非小細胞肺がん²とに分けられ、さらに非小細胞肺がんは、肺腺がん (lung adenocarcinoma、LADC)、肺扁平上皮がん、大細胞がんの3種類に分けられる。そして、これらのうち、肺腺がんは非小細胞肺がんの約50%を占め、その頻度は上昇している(非特許文献1)。

20

【0003】

肺腺がんに関しては、かなりの部分が、がん遺伝子の活性化によって発生することが明らかになっている。そして、がん遺伝子の活性化においては、E G F R 遺伝子 (10~40%) や K R A S 遺伝子 (10~20%) の体細胞変異、A L K 遺伝子と E M L 4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) 遺伝子との融合や A L K 遺伝子と K I F 5 B 遺伝子との融合等 (5%) が相互排他的に生じていることも明らかとなっている(非特許文献2~6)。

【0004】

肺腺がんを含めヒトのがんにおいて、発生に関与する変異遺伝子(変異タンパク質)や融合遺伝子(融合タンパク質)などのがん遺伝子を同定することは、これら遺伝子を標的とした新規ながん治療方法やがん検査方法の開発に大きく寄与するため、強く望まれている。

30

【0005】

特に、進行した肺がんにおいては、薬剤による治療が主体となるが、個々の症例で薬剤に対する反応性が大きく異なるため、どのような薬剤が治療効果を有するかを予測する手段が求められている。そのため、前述の通り、変異遺伝子や融合遺伝子といった、その予測の指標となり得る分子の同定が進められており、例えば、E G F R や A L K タンパク質を標的としたチロシンキナーゼ阻害剤は E G F R 変異や A L K 融合を持つ肺腺がんの治療に特に有効であることが明らかになっている。さらに、肺がんの4~5%に存在する A L K チロシンキナーゼ遺伝子の融合を検出する手法が A L K タンパク質のチロシンキナーゼに対する阻害剤適応例の選出法として開発され、臨床試験が進行している。

40

【0006】

しかしながら、肺がんを含めたがんにおける融合遺伝子等の解明はいまだ十分とはいええず、薬剤による治療の有効性を予測する指標となりうる変異遺伝子や融合遺伝子の同定が望まれているのが現状である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Herbst, R. S.ら、The New England jou

50

rnal of medicine、2008年、359巻、1367～1380ページ

【非特許文献2】Paez, J. G.ら、Science、2004年、304巻、1497～1500ページ

【非特許文献3】Takeuchi, K.ら、Clin Cancer Res、2009年、15巻、3143～3149ページ

【非特許文献4】Soda, M.ら、Nature、2007年、448巻、561～566ページ

【非特許文献5】Janku, F.ら、Nat Rev Clin Oncol、2010年、7巻、401～414ページ

【非特許文献6】Lovly, C. M.ら、Nat Rev Clin Oncol、2011年、8巻、68～70ページ

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、前記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、肺がん等において薬剤による治療の有効性を予測する指標となりうる遺伝子を同定することにある。また、当該遺伝子を標的として薬剤による治療の有効性を予測する新規な方法を提供することにある。さらに、本発明は、当該遺伝子を標的とした薬剤による治療の有効性の予測に基づいて、肺がん等を治療する方法を提供することを目的とする。さらなる本発明の目的は、これら方法において当該遺伝子の検出に用いられる分子を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、前記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、30例の肺腺がんの全トランスクリプトームシーケンシングにより、キネシファミリーメンバー5B (KIF5B) 遺伝子とRET受容体型チロシンキナーゼがん遺伝子 (RET 遺伝子) とのインフレーション (In-flame) 融合転写産物を同定した。この融合遺伝子は第10染色体p11、q11領域間の逆位によって生じるものであった。このKIF5B-RET遺伝子融合は、日本人肺腺がんの6/319 (2%) に検出されたが、当該遺伝子融合が検出された6例はいずれもEGFR変異、KRAS変異、ALK融合といった公知のがん遺伝子活性化変異を示さなかった。さらに、この融合転写産物はアメリカ人由来の肺腺がんにおいても存在していた (1/80 (1%))。これら事実から、当該遺伝子融合は、広い人種において、がん化における責任変異 (ドライバー変異) であることが明らかになった。

【0010】

この遺伝子融合は、RETチロシンキナーゼの恒常的な活性化をもたらすものと考えられ、このような活性化が生じている患者においては、RETチロシンキナーゼに対する阻害剤が治療において有効性を示すものと考えられる。このため、本発明者らは、肺がん等において、当該遺伝子融合を標的として薬剤による治療の有効性を予測することが可能であり、さらに、この予測において薬剤による治療が有効であると判定された患者に当該薬剤を投与すれば、効率的に治療を行うことが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

従って、本発明は、KIF5BとRETとの融合ポリペプチド、このポリペプチドの存在を指標としたRETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性を判定する方法、この有効性の判定を利用したがんの治療方法、並びに、これらの方法に用いるための分子に関し、より詳しくは、以下の発明を提供するものである。

(1) KIF5Bタンパク質のN末端部分と、RETタンパク質のC末端部分とが融合しているポリペプチド。

(2) (1)に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

(3) RETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性を判定する方法であって

10

20

30

40

50

、患者から単離した試料における(2)に記載のポリヌクレオチドの存在または非存在を検出する工程を含み、前記ポリヌクレオチドの存在が検出されれば、前記患者における前記RETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性が高いと判定される方法。

(4) (3)に記載の方法によりRETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性を判定するための薬剤であって、少なくとも15塩基の鎖長を有する下記(a)~(c)に記載のいずれかであるポリヌクレオチド、または、下記(d)に記載の抗体を含む薬剤

(a) KIF5Bタンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブ及びRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブからなる群から選択される少なくとも一つのプローブであるポリヌクレオチド

10

(b) KIF5Bタンパク質をコードするポリヌクレオチドとRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点にハイブリダイズするプローブであるポリヌクレオチド

(c) KIF5Bタンパク質をコードするポリヌクレオチドとRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点を挟み込むように設計された一对のプライマーであるポリヌクレオチド

(d) KIF5Bタンパク質とRETタンパク質とが融合しているポリペプチドに結合する抗体。

(5) がんを治療する方法であって、(3)に記載の方法によりRETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性が高いと判定された患者に、前記RETチロシンキナーゼ阻害剤を投与する工程を含む方法。

20

(6) RETチロシンキナーゼ阻害剤を有効成分とするがんの治療剤であって、(3)に記載の方法によりRETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性が高いと判定された患者に投与される治療剤。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、がんに対する治療の有効性を予測すること、特にRETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性を予測することが可能となる。これにより、薬剤を投与することが有効ではないと考えられるがん患者への薬剤の投与を回避することができるため、効率的ながん治療を実現することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

30

【0013】

【図1】野生型KIF5B及びRETタンパク質の構造(図1上部の「KIF5B」及び「RET」)、肺腺がん患者において同定した4つのKIF5B-RET融合バリエーション(図1下部の「1~4」)、及び各々のバリエーションにおける切断点(図1上部の「KIF5B」及び「RET」に付されている線(1、2、3、4、1-3))を示す概略図である。なお、図1中「TM」は膜貫通ドメインを示す。

【図2】肺腺がん患者(症例:BR0020)におけるKIF5B-RET融合転写産物を示す概略図である。なお、図2の上部はペアエンドリード解析の結果を示し、下部はジャンクションリード解析の結果を示す。また、各核酸(A、T、G、C)は各々図中に示した対応する色にて識別されている。

40

【図3】各肺腺がん患者におけるKIF5B-RET融合(図3の上部)、RETキナーゼドメイン(エクソン12-13、図3の中部)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH、内部標準、図3の下部)をRT-PCRにより検出した結果を示す電気泳動の写真である。なお図3中、「T」は各肺腺がん患者の肺腺がん組織の結果を示し、「N」は各肺腺がん患者の非がん肺組織の結果を示す(図5においても同様)。また、BR0019はKIF5B-RET融合陰性肺腺がんの症例であり、BR0020、BR1001、BR1002、BR0030、BR1003及びBR1004はKIF5B-RET融合陽性肺腺がんの症例である(図5においても同様)。さらに「NTC」は鋳型DNAなしの陰性対照の結果を示す。

【図4】KIF5B-RET融合転写産物のcDNAをサンガーシーケンシングにより

50

分析した結果を示す電気泳動図である。なお、K I F 5 B - R E T - F 1プライマー及びK I F 5 B - R E T - R 1プライマーを用いて増幅したR T - P C R産物を、K I F 5 B - R E T - F 1 (B R 0 0 2 0、B R 1 0 0 1、B R 1 0 0 2及びB R 0 0 3 0)プライマー並びにK I F 5 B - F - o r f 2 4 3 8 (B R 1 0 0 3及びB R 1 0 0 4)プライマーを用いて、ダイレクトシーケンシングした。

【図5】各肺腺がん患者におけるK I F 5 B - R E T融合をゲノムP C Rにより検出した結果を示す電気泳動の写真である。図5中、K I F 5 B遺伝子とR E T遺伝子との融合点(切断点結合部)を含むD N A断片の増幅に用いたプライマーの位置を写真の下に示す。また「i n t」はイントロンを示し、「e x」はエクソンを示す。さらに、B R 0 0 3 0及びB R 1 0 0 4の非がん肺組織に見られた非特異バンドをアスタリスクで示す。

10

【図6】K I F 5 B遺伝子とR E T遺伝子との融合点を含むゲノム断片をサンガーシーケンシングにより分析した結果を示す電気泳動図である。なお、P C R産物はダイレクトシーケンシングにより分析し、各々のサンプルの増幅及びシーケンシングには、下記プライマーを用いた。B R 0 0 2 0 : K I F 5 B - i n t 1 5 - F 1 / K I F 5 B - R E T - R 1及びR E T - i n t 1 1 - R 0 . 5、B R 1 0 0 1 : K I F 5 B - i n t 1 5 - F 1 / K I F 5 B - R E T - R 1及びR E T - i n t 1 1 - R 1、B R 1 0 0 2 : K I F 5 B - i n t 1 5 - F 2 / R E T - i n t 1 1 - R 3及びK I F 5 B - i n t 1 5 - F 3 . 5、B R 0 0 3 0 : K I F 5 B - e x 1 6 - F 1 / K I F 5 B - R E T - R 1及びK I F 5 B - e x 1 6 - F 1、B R 1 0 0 3 : K I F 5 B - e x 2 3 - F 1 / K I F 5 B - R E T - R 1及びK I F 5 B - e x 2 3 - F 1 また、融合点における重複ヌクレオチドはB R 1 0 0 2及びB R 0 0 3 0に付した囲みで示し、K I F 5 B遺伝子とR E T遺伝子との融合点における挿入(i n s e r t i o n)ヌクレオチドはB R 1 0 0 1及びB R 1 0 0 3に付した囲みで示す。

20

【図7】K I F 5 B - R E T融合点を含むゲノム断片をサンガーシーケンシングにより分析した結果(特にR E Tエクソン7 - R E Tイントロン7を含む3 4 9 b pのゲノム断片が切断点結合部に挿入されていること)を示す電気泳動図である。なお、K I F 5 B - e x 2 4 - F 1プライマー及びR E T - i n t 7 - R 1プライマーを用いて増幅したP C R産物を、R E T - i n t 7 - R 2プライマーを用いてダイレクトシーケンシングした。

。

【図8】K I F 5 B遺伝子とR E T遺伝子とが融合している6症例のうちの2症例(B R 0 0 2 0及びB R 1 0 0 1)における、染色体10番のゲノムコピー数を調べた結果を示す概略図である。なお、コピー数はC N A Gプログラム分析により推定した(図9においても同じ)。また図中、リファレンスゲノム上のK I F 5 B遺伝子及びR E T遺伝子の位置及び方向は矢印によって示す(図9においても同じ)。

30

【図9】K I F 5 B遺伝子とR E T遺伝子とが融合している6症例のうちの2症例(B R 0 0 1 2及びB R 0 0 0 5)における、染色体10番のゲノムコピー数を調べた結果を示す概略図である。

【図10】K I F 5 B - R E T融合に関与する推定染色体再構成(バリエント1)を示す概略図である。

【図11】蛍光標識したD N Aプローブを用いて施行したi n s i t u ハイブリダイゼーションにより検出されたB R 0 0 2 0症例でのK I F 5 B - R E T融合を生じる染色体逆位を示す顕微鏡写真(観察倍率: 4 0 0倍)である。当該症例においては、R E T遺伝子のキナーゼドメインのコード領域よりも5'側の上流領域にハイブリダイズするプローブ(5' R E T、図中赤色の蛍光スポット)と、R E T遺伝子のキナーゼドメインのコード領域および該コード領域よりも3'側の下流領域にハイブリダイズするプローブ(3' R E T、図中緑色の蛍光スポット)とのシグナルの分離(s p l i t、図中矢印にて指し示されている箇所)が検出された。また、図11の下部に各プローブ群がハイブリダイズするゲノム上の位置を示す。

40

【図12】ヘマトキシリン - エオジン染色したK I F 5 B - R E T融合陽性肺腺がん(B R 1 0 0 4)における代表的な組織構造を示す顕微鏡写真(観察倍率: 5 0倍)である。

50

なお、この肺腺がん細胞において、クララ (Clara) 細胞又はII型肺上皮細胞分化が認められた。また、これらの腫瘍細胞は肥厚した肺胞隔壁に沿って、腫瘍辺縁部に伸長していた (左側のスライド)。さらに、その中央部において乳頭状の増殖も認められた (右側のスライド)。

【図13】甲状腺転写因子-1 (TTF-1) に対する免疫染色を行ったKIF5B-RET融合陽性肺腺がん (BR1004) における代表的な組織構造を示す顕微鏡写真 (観察倍率: 50倍) である。なお、この肺腺がん細胞において、TTF-1の核におけるびまん性の強い発現が観察された。

【図14】U133Aプラス2.0マイクロアレイ分析によって、肺腺がん (ADC) 及び非がん肺組織 (N) におけるRETの発現レベルを評価した結果を示すプロット図である。なお、RETの発現レベルは、211421_s_atプローブ (ret proto-oncogene (multiple endocrine neoplasia and medullary thyroid carcinoma 1, Hirschsprung disease)) を用いて評価した。また図14中、「+」はKIF5B-RET融合陽性肺腺がんを評価した結果を示し、「-」はKIF5B-RET融合陰性肺腺がんを評価した結果を示す。さらに、図14中のP値は、発現レベルの差をU検定によって評価して得られた値である。

【図15】KIF5B-RET融合陽性の肺腺がん腫瘍サンプル (BR1004) におけるRETタンパク質の免疫組織学的染色の結果を示す顕微鏡写真 (観察倍率: 50倍) である。なお、この肺腺がん腫瘍サンプルにおいて、RET蛋白質は腺がん細胞の細胞質に顆粒状に発現していることが認められた。

【図16】RET融合は認められないが、RET遺伝子の発現レベルが高い2症例における、染色体10番のゲノムコピー数を調べた結果を示す概略図である。なお、コピー数はCNA Gプログラム分析により推定した。また図中、KIF5B遺伝子及びRET遺伝子の位置及び方向は矢印によって示す。

【図17】肺腺がん及び非がん肺組織由来のシーケンスリードの分布をRET子転写産物 (NM_020975.4) に沿って示した結果を示す図である。なお、KIF5B-RET融合陽性サンプル BR0020由来のシーケンスリードは融合点の下流に殆ど位置していた。一方、融合は確認されていないが、RET遺伝子の発現が認められる6サンプル (図17中、アスタリスクによってマークしたサンプル) においては、RET転写産物全体にわたってシーケンスリードは分布しており、また変異は検出されなかった。なお図17中「RET発現」には、オリゴヌクレオチドマイクロアレイによって評価したRETの発現レベルを示す。

【図18】USAコホート由来の肺腺がん症例において、RT-PCRにより、KIF5B-RET融合転写産物 (バリエント1、図18の上部) 及びGAPDH (内部標準、図18の下部) を検出した結果を示す電気泳動の写真である。なお図18中、「T」は前記コホートの肺腺がん組織の結果を示し、「N」は前記コホートの非がん肺組織の結果を示す。「USA1580」はUSAコホート由来の肺腺がん症例を示す。

【図19】USAコホート由来の肺腺がん症例におけるKIF5B-RET融合転写産物 (バリエント1) のcDNAをサンガーシーケンシングにより分析した結果を示す電気泳動図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

< KIF5B-RET融合ポリペプチド及び該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド >

後述の実施例において示す通り、KIF5Bタンパク質とRETタンパク質との融合例が肺腺がんにおいて初めて明らかになった。したがって、本発明は、KIF5Bタンパク質のN末端部分と、RETタンパク質のC末端部分とが融合しているポリペプチド (以下、「KIF5B-RET融合ポリペプチド」とも称する) を提供する。また、本発明は、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド (以下、「KIF5B-RET融合ポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチド」とも称する)を提供する。

【0015】

本発明にかかる「KIF5B(キネシンファミリーメンバー5B、KINESIN FAMILY MEMBER 5B)タンパク質」は、KNS1(キネシン1、KINESIN1)タンパク質、UKHC(キネシン、重鎖、ユビキタス、KINESIN, HEAVY CHAIN, UBIQUITOUS)タンパク質又はKINHタンパク質とも称されるタンパク質であり、ヒトにおいては10p11.2に座乗している遺伝子にコードされているタンパク質である。本発明において、「KIF5Bタンパク質」は、ヒト由来のものであれば、典型的には配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質である。さらに、本発明において、「KIF5Bタンパク質のN末端部分」とは、典型的には、前記KIF5Bタンパク質のN末端側にあるモーター領域とコイルドコイルドメインの一部又は全部とを含むものである(図1 参照)。

10

【0016】

本発明にかかる「RET(トランスフェクション中の再構成、REARRANGED DURING TRANSFECTION)タンパク質」は、RETチロシンキナーゼタンパク質又はRET受容体型チロシンキナーゼタンパク質とも称され、ヒトにおいて10q11.2に座乗している遺伝子にコードされているタンパク質である。本発明において、「RETタンパク質」は、ヒト由来のものであれば、典型的には配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質である。さらに、本発明において、「RETタンパク質のC末端部分」とは、典型的には、前記RETタンパク質のC末端側にあるキナーゼドメインを含むものである(図1 参照)。

20

【0017】

また、本発明の「KIF5Bタンパク質のN末端部分と、RETタンパク質のC末端部分とが融合しているポリペプチド」としては、後述の実施例において示す通り、10p11.2と10q11.2との領域間の逆位により生じた融合遺伝子がコードするポリペプチドであればよいが、典型的には、前記KIF5Bタンパク質のN末端側にあるモーター領域とコイルドコイルドメインの一部又は全部とを含むポリペプチドと前記RETタンパク質のC末端側にあるキナーゼドメインを含むポリペプチドとが融合しているポリペプチドであり、例えば、配列番号：6、8、10又は12に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

30

【0018】

本発明にかかる「KIF5Bタンパク質」、「RETタンパク質」、および「KIF5B-RET融合ポリペプチド」のアミノ酸配列は、自然界において(すなわち、非人工的に)変異しうる。また、人為的にアミノ酸に変異を導入することもできる。従って、このような変異体も本発明に含まれる。

【0019】

KIF5B-RET融合ポリペプチドの変異体としては、配列番号：6、8、10又は12に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および/または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。ここで「複数」とは、通常、50アミノ酸以内、好ましくは30アミノ酸以内、より好ましくは10アミノ酸以内、特に好ましくは数個のアミノ酸以内(例えば、5アミノ酸以内、3アミノ酸以内、2アミノ酸以内、1アミノ酸)である。

40

【0020】

また、KIF5B-RET融合ポリペプチドの変異体としては、配列番号：5、7、9又は11に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジেন্টな条件でハイブリダイズするDNAがコードするポリペプチドが挙げられる。高ストリンジエンシーなハイブリダイズの条件として、例えば、0.2xSSC、65 という条件が挙げられ、低ストリンジエンシーなハイブリダイズの条件として、例えば、2.0xSSC、50 という条件が挙げられる。

【0021】

50

さらに、K I F 5 B - R E T融合ポリペプチドの変異体としては、配列番号：6、8、10又は12に記載のアミノ酸配列と80%以上（例えば、85%、90%、95%、97%、99%以上）の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。配列の相同性は、B L A S T X又はB L A S T P（アミノ酸レベル）のプログラム（A l t s c h u l e t a l . J . M o l . B i o l . , 2 1 5 : 4 0 3 - 4 1 0 , 1 9 9 0）を利用して決定することができる。該プログラムは、K a r l i nおよびA l t s c h u lによるアルゴリズムB L A S T（P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 7 : 2 2 6 4 - 2 2 6 8 , 1 9 9 0 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 0 : 5 8 7 3 - 5 8 7 7 , 1 9 9 3）に基づいている。B L A S T X等によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは、例えばscore = 50、word length = 3とする。また、Gapped B L A S Tプログラムを用いて、アミノ酸配列を解析する場合は、A l t s c h u lら（N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 - 3 4 0 2 , 1 9 9 7）に記載されているように行うことができる。B L A S TとGapped B L A S Tプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

10

【0022】

本発明の「K I F 5 B - R E T融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」には、当該ポリペプチドをコードするmRNA、当該ポリペプチドをコードするcDNA、当該ポリペプチドをコードするゲノムDNA等が含まれる。本発明のK I F 5 B - R E TポリペプチドをコードするcDNAの典型例は、配列番号：5、7、9又は11に記載のDNA配列からなるポリヌクレオチドである。

20

【0023】

なお、本発明のポリヌクレオチドは、当業者であれば、K I F 5 B遺伝子とR E T遺伝子との融合遺伝子を保持する肺腺がん等から調製したcDNAのライブラリーライブラリーまたはゲノムDNAのライブラリーから公知のハイブリダイゼーション技術を利用して抽出することができる。また、前記肺腺がん等から調製したmRNA、cDNAまたはゲノムDNAを鋳型として公知の遺伝子増幅技術（PCR）を利用することにより増幅し、調製することもできる。さらに、天然型K I F 5 B遺伝子と天然型R E T遺伝子とのcDNAを材料とし、PCR、制限酵素処理、部位特異的変異誘発（site-directed mutagenesis）法（K r a m e r , W . & F r i t z , H J . , M e t h o d s E n z y m o l , 1 9 8 7 , 1 5 4 , 3 5 0 .）等の公知の遺伝子増幅技術や組換え技術を利用して調製することもできる。

30

【0024】

さらに、このようにして調製したポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを無細胞タンパク質合成系（例えば、網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液）に導入してインキュベーションすることにより、また該ベクターを適当な細胞（例えば、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞）に導入し、得られた形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドを調製することができる。

【0025】

< R E Tチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性を判定する方法 >

40

後述の実施例において示す通り、K I F 5 B遺伝子とR E T遺伝子との融合はがんにおける責任変異であり、該融合によってR E Tチロシンキナーゼタンパク質の発現の亢進、ひいてはR E Tチロシンキナーゼタンパク質の恒常活性化が生じ、がんの悪性化等に寄与していることが明らかになった。そのため、このような融合が検出されるがん患者においては、R E Tチロシンキナーゼ阻害剤による治療が有効である蓋然性が高い。

【0026】

従って、本発明は、R E Tチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性を判定する方法であって、患者から単離した試料におけるK I F 5 B - R E T融合ポリヌクレオチドの存在または非存在を検出する工程を含み、前記ポリヌクレオチドの存在が検出されれば、前記患者における前記R E Tチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性が高いと

50

判定される方法を提供する。

【0027】

本発明において「患者」とは、がん罹患しているヒトのみならず、がん罹患していると疑いのあるヒトであってもよい。本発明の方法を適用する対象となる「がん」としては、KIF5B遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子の発現が認められるがんであれば特に制限はない。好ましくは肺がんであり、さらに好ましくは非小細胞肺がんであり、特に好ましくは肺腺がんである。

【0028】

本発明において「試料」とは、生体試料（例えば、細胞、組織、臓器、体液（血液、リンパ液等）、消化液、喀痰、肺胞・気管支洗浄液、尿、便）のみならず、これらの生体試料から得られる核酸抽出物（ゲノムDNA抽出物、mRNA抽出物、mRNA抽出物から調製されたcDNA調製物やcRNA調製物等）やタンパク質抽出物も含む。また、前記試料は、ホルマリン固定処理、アルコール固定処理、凍結処理又はパラフィン包埋処理が施してあるものでよい。

10

【0029】

さらに、ゲノムDNA、mRNA、cDNA又はタンパク質は、当業者であれば、前記試料の種類及び状態等を考慮し、それに適した公知の手法を選択して調製することが可能である。

【0030】

本発明においてがん治療の有効性を評価する対象となる「RETチロシンキナーゼ阻害剤」としては、RETチロシンキナーゼの機能を直接的に又は間接的に抑制できる物質であれば特に制限はない。RETチロシンキナーゼを阻害しうる限り、他のチロシンキナーゼを阻害する物質であってもよい。本発明に適用し得る公知のRETチロシンキナーゼ阻害剤としては、例えば、4-(4-プロモ-2-フルオロアニリノ)-6-メトキシ-7-(1-メチルピペリジン-4-イルメトキシ)キナゾリン（一般名：バンデタニブ(Vandetanib)；VEGFR、EGFR及びRETを標的とする化合物)、4-[4-[3-[4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル]ウレイド]フェノキシ]-N-メチルピリジン-2-カルボアミド（一般名：ソラフェニブ(Sorafenib)；BRAE及びRET等を標的とする化合物)、N-[2-(ジエチルアミノ)エチル]-5-[(Z)-(5-フルオロ-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-3H-インドール-3-イリデン)メチル]-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボキシアミドモノ[(2S)-2-ヒドロキシサクシネート]（一般名：スニチニブ(Sunitinib)；PDGFR、VEGFR、RET等を標的とする化合物)、N-(3,3-ジメチルインドリン-6-イル)-2-(ピリジン-4-イルメチルアミノ)ニコチンアミド（一般名：モテサニブ(Motesanib)；PDGFR、VEGFR、RET等を標的とする化合物)、XL184/カボザチニブ(XL184/Cabozantinib)；VEGFR、MET、RET等を標的とする化合物)が挙げられる。

20

30

【0031】

本発明において「KIF5B-RET融合ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出」は、前記融合ポリペプチドをコードするゲノムDNAや前記ゲノムDNAからの転写産物を対象として直接的に行うことができるが、前記転写産物からの翻訳産物（前記融合ポリペプチド）を対象として間接的に行うこともできる。

40

【0032】

また、前記融合ポリペプチドをコードするゲノムDNAは、10p11.2と10q11.2との領域間の逆位によって形成されるものであるから、「KIF5B-RET融合ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出」においては、この逆位という現象を検出してもよい。かかる逆位の検出においては、例えば、RET遺伝子のキナーゼドメインのコード領域よりも5'側の上流領域と、RET遺伝子のキナーゼドメインのコード領域および該コード領域よりも3'側の下流領域との分離を検出してもよく、また、RET遺伝子のカドヘリンリピートのコード領域および該領域よりも5'側の上流領域と、RET遺伝

50

子の膜貫通ドメインのコード領域および該コード領域よりも3'側の下流領域との分離を検出してよく、さらに、KIF5B遺伝子のコイルドコイルドメインの一部または全部のコード領域および該コード領域よりも5'側のの上流領域と、KIF5B遺伝子のコイルドコイルドメインのコード領域よりも3'側の下流領域との分離を検出してよい。

【0033】

本発明における「KIF5B-RET融合ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出」には、公知の手法を用いることができる。「前記融合ポリペプチドをコードするゲノムDNA」を対象とする場合においては、例えば、蛍光等を用いた*in situ*ハイブリダイゼーション(ISH)、ゲノムPCR法、ダイレクトシーケンシング、サザンブロットティング、ゲノムマイクロアレイ解析を用いることができる。また、「前記ゲノムDNAからの転写産物」を対象とする場合においては、例えば、RT-PCR法、ダイレクトシーケンシング、ノーザンブロットティング、ドットブロット法、cDNAマイクロアレイ解析を用いることができる。

10

【0034】

治療又は診断の過程で得られる生体試料(生検サンプル等)は、ホルマリン固定されていることが多いが、この場合は、検出対象であるゲノムDNAがホルマリン固定下においても安定しており、検出感度が高いという観点から、*in situ*ハイブリダイゼーションを用いることが好適である。

【0035】

*in situ*ハイブリダイゼーションにおいては、前記生体試料に、少なくとも15塩基の鎖長を有する下記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドをハイブリダイズさせることにより、KIF5B-RET融合ポリペプチドをコードするゲノムDNAを検出することができる。

20

(a) KIF5Bタンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブ及びRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブからなる群から選択される少なくとも一つのプローブであるポリヌクレオチド

(b) KIF5Bタンパク質をコードするポリヌクレオチドとRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点にハイブリダイズするプローブであるポリヌクレオチド

【0036】

本発明にかかるKIF5Bタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、ヒト由来のものであれば、典型的にはGenbankアクセッション番号 NT_008705.16で特定されるゲノムの配列のうち32237938~32285371番目のDNA配列からなる遺伝子である。

30

【0037】

また、本発明にかかるRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、ヒト由来のものであれば、典型的にはGenbankアクセッション番号 NT_033985.7で特定されるゲノムの配列のうち1217582~1270862番目のDNA配列からなる遺伝子である。

【0038】

しかしながら、遺伝子のDNA配列は、その変異等により、自然界において(すなわち、非人工的に)変異しうる。従って、このような天然の変異体も本発明の対象になりうる(以下、同様)。

40

【0039】

本発明の(a)に記載のポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドの標的塩基配列である、KIF5Bタンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズすることにより、前記生体試料におけるKIF5B-RET融合ポリペプチドをコードするゲノムDNAの存在を検出できるものであればよいが、好ましくは、下記(a1)~(a4)に記載のポリヌクレオチドである。

(a1) KIF5B遺伝子のコイルドコイルドメインの一部または全部のコード領域お

50

よび該コード領域よりも5'側の下流領域にハイブリダイズするポリヌクレオチド(以下、「5'EIF5Bプロープ1」とも称する)と、RET遺伝子のキナーゼドメインのコード領域および該コード領域よりも3'側の下流領域にハイブリダイズするポリヌクレオチド(以下、「3'RETプロープ1」とも称する)との組み合わせ

(a2) RET遺伝子のキナーゼドメインのコード領域よりも5'側の下流領域にハイブリダイズするポリヌクレオチド(以下、「5'RETプロープ1」とも称する)と、RET遺伝子のキナーゼドメインのコード領域および該コード領域よりも3'側の下流領域にハイブリダイズするポリヌクレオチド(3'RETプロープ1)との組み合わせ

(a3) RET遺伝子のカドヘリンリピートのコード領域および該領域よりも5'側の下流領域にハイブリダイズするポリヌクレオチド(以下、「5'RETプロープ2」とも称する)と、RET遺伝子の膜貫通ドメインのコード領域および該コード領域よりも3'側の下流領域にハイブリダイズするポリヌクレオチド(以下、「3'RETプロープ2」とも称する)との組み合わせ

(a4) EIF5B遺伝子のコイルドコイルドメインの一部または全部のコード領域および該コード領域よりも5'側の下流領域にハイブリダイズするポリヌクレオチド(5'EIF5Bプロープ1)と、EIF5B遺伝子のコイルドコイルドメインのコード領域よりも3'側の下流領域にハイブリダイズするポリヌクレオチド(以下、「3'EIF5Bプロープ1」とも称する)との組み合わせ。

【0040】

本発明において、*in situ*ハイブリダイゼーションに用いられる前記(a1)に記載のポリヌクレオチドがハイブリダイズする領域(標的塩基配列)としては、標的塩基配列に対する特異性及び検出の感度の観点から、EIF5B遺伝子とRET遺伝子との融合点から100000塩基以内の領域であることが好ましく、また、*in situ*ハイブリダイゼーションに用いられる前記(a2)~(a4)に記載のポリヌクレオチドがハイブリダイズする領域としては、同観点から、EIF5B遺伝子またはRET遺伝子における切断点から100000塩基以内の領域であることが好ましい。

【0041】

また、本発明において、*in situ*ハイブリダイゼーションに用いられる前記(b)に記載のポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドの標的塩基配列である、EIF5Bタンパク質をコードするポリヌクレオチドとRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点にハイブリダイズすることにより、前記生体試料におけるEIF5B-RET融合ポリペプチドをコードするゲノムDNAの存在を検出できるものであればよいが、典型例としては、配列番号:5、7、9又は11に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドをコードするゲノムDNAにハイブリダイズするポリヌクレオチド、例えば、図6および7に記載のEIF5B遺伝子とRET遺伝子との融合点にハイブリダイズするポリヌクレオチドである。

【0042】

また、本発明において、*in situ*ハイブリダイゼーションに用いられる前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドは、標的塩基配列に対する特異性及び検出の感度の観点から、前記標的塩基配列全体をカバーすることのできる、複数種のポリヌクレオチドからなる集団であることが好ましい。かかる場合、該集団を構成するポリヌクレオチドの長さは少なくとも15塩基であるが、100~1000塩基であることが好ましい。

【0043】

*in situ*ハイブリダイゼーションに用いられる前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドは、検出のため、蛍光色素等によって標識されていることが好ましい。かかる蛍光色素としては、例えば、DEAC、FITC、R6G、TexRed、Cy5が挙げられるが、これらに制限されない。また、蛍光色素以外にDAB等の色素(chromogen)や酵素的金属沈着に基づく銀等によって、前記ポリヌクレオチドを標識してもよい。

【0044】

10

20

30

40

50

*in situ*ハイブリダイゼーションにおいて、5' K I F 1 Bプローブ1と3' R E Tプローブ1とを用いる場合、5' R E Tプローブ1と3' R E Tプローブ1とを用いる場合、5' R E Tプローブ2と3' R E Tプローブ2とを用いる場合、5' K I F 1 Bプローブ1と3' K I F 1 Bプローブ1とを用いる場合、これらプローブは互いに異なる色素にて標識されていることが好ましい。そして、このように異なる色素にて標識したプローブの組み合わせを用いて*in situ*ハイブリダイゼーションを行った場合、5' K I F 1 Bプローブ1の標識が発するシグナル(例えば、蛍光)と3' R E Tプローブ1の標識が発するシグナルとの重なりが観察された際にK I F 5 B - R E T融合ポリペプチドをコードするゲノムDNAを検出できたと判定することができる。一方、5' R E Tプローブ1の標識が発するシグナルと3' R E Tプローブ1の標識が発するシグナルとの分離、5' R E Tプローブ2の標識が発するシグナルと3' R E Tプローブ2の標識が発するシグナルとの分離または5' K I F 1 Bプローブ1の標識が発するシグナルと3' K I F 1 Bプローブ1の標識が発するシグナルとの分離が観察された際にK I F 5 B - R E T融合ポリペプチドをコードするゲノムDNAを検出できたと判定することができる。

10

【0045】

なお、ポリヌクレオチドの標識は、公知の手法により行うことができる。例えば、ニックトランスレーション法やランダムプライム法により、蛍光色素等によって標識された基質塩基をポリヌクレオチドに取り込ませ、該ポリヌクレオチドを標識することができる。

【0046】

*in situ*ハイブリダイゼーションにおいて、前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドと前記生体試料とをハイブリダイズさせる際の条件は、当該ポリヌクレオチドの長さ等の諸要因により変動し得るが、高ストリンジェンシーなハイブリダイズの条件として、例えば、 $0.2 \times S S C$ 、65 という条件が挙げられ、低ストリンジェンシーなハイブリダイズの条件として、例えば、 $2.0 \times S S C$ 、50 という条件が挙げられる。なお、当業者であれば、塩濃度(S S Cの希釈率等)と温度の他、例えば、界面活性剤(N P - 40等)の濃度、ホルムアミドの濃度、p H等の諸条件を適宜選択することで、前記条件と同様のストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件を実現することができる。

20

【0047】

前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドを用いて、K I F 5 B - R E T融合ポリペプチドをコードするゲノムDNAを検出する方法としては、前記*in situ*ハイブリダイゼーション以外に、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング及びドットブロッティングが挙げられる。これら方法においては、前記生体試料から得られる核酸抽出物を転写したメンブレンに、前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドをハイブリダイズさせることにより、前記融合遺伝子を検出する。前記(a)のポリヌクレオチドを用いた場合、K I F 5 Bタンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドとR E Tタンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドとが、メンブレンにおいて展開された同一のバンドを認識した場合に、K I F 5 B - R E T融合ポリペプチドをコードするゲノムDNAを検出できたと判定することができる。

30

40

【0048】

前記(b)のポリヌクレオチドを用いてK I F 5 B - R E T融合ポリペプチドをコードするゲノムDNAを検出する方法としては、さらに、ゲノムマイクロアレイ解析やDNAマイクロアレイ解析が挙げられる。これら方法においては、前記(b)のポリヌクレオチドを基板に固定したアレイを作製し、当該アレイ上のポリヌクレオチドに前記生体試料を接触させることにより、当該ゲノムDNAを検出する。

【0049】

P C Rやシーケンシングにおいては、前記生体試料から調製したDNA(ゲノムDNA、c DNA)やRNAを鋳型としてK I F 5 B - R E T融合ポリヌクレオチドの一部又は全部を特異的に増幅するために、下記(c)のポリヌクレオチドを用いることができる

50

。(c) K I F 5 B タンパク質をコードするポリヌクレオチドと R E T タンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点を挟み込むように設計された一対のプライマーであるポリヌクレオチド

「一対のプライマーであるポリヌクレオチド」は、標的となる前記融合ポリヌクレオチド等の塩基配列において、片方のプライマーが K I F 5 B タンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズし、他方のプライマーが R E T タンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプライマーセットである。これらポリヌクレオチドの長さは、通常 15 ~ 100 塩基であり、好ましくは 17 ~ 30 塩基である。

【0050】

また、本発明の(c)に記載のポリヌクレオチドは、P C R 法による検出の精度や感度の観点から、K I F 5 B タンパク質をコードするポリヌクレオチドと R E T タンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点から 5000 塩基内の前記融合ポリヌクレオチドの塩基配列と相補的な配列であることが好ましい。

【0051】

「一対のプライマーであるポリヌクレオチド」は、標的となる K I F 5 B - R E T 融合ポリヌクレオチド等の塩基配列に基づき、公知の手法により適宜設計することができる。公知の手法としては、例えば、Primer Express ソフトウェア(登録商標、ABI社製)を利用する方法が挙げられる。

【0052】

「一対のプライマーであるポリヌクレオチド」の好適な例としては、K I F 5 B - R E T - F 1、K I F 5 B - i n t 15 - F 1、K I F 5 B - i n t 15 - F 2、K I F 5 B - e x 16 - F 1、K I F 5 B - e x 23 - F 1、K I F 5 B - e x 24 - F 1、K I F 5 B - F - o r f 2438 及び K I F 5 B - i n t 15 - F 3 . 5 からなる群から選択される1のプライマーと、K I F 5 B - R E T - R 1、R E T - i n t 11 - R 3、R E T - i n t 7 - R 1、R E T - i n t 11 - R 0 . 5、R E T - i n t 11 - R 1、R E T - i n t 7 - R 2 及び R E T - R - o r f 2364 からなる群から選択される1のプライマーとからなるプライマーセットが挙げられ、より好ましくは、K I F 5 B - R E T - F 1 及び K I F 5 B - R E T - R 1、K I F 5 B - i n t 15 - F 1 及び K I F 5 B - R E T - R 1、K I F 5 B - i n t 15 - F 2 及び R E T - i n t 11 - R 3、K I F 5 B - e x 16 - F 1 及び K I F 5 B - R E T - R 1、K I F 5 B - e x 23 - F 1 及び K I F 5 B - R E T - R 1、K I F 5 B - e x 24 - F 1 プライマー及び R E T - i n t 7 - R 1 プライマーが挙げられる。なお、これらのプライマーの配列並びにハイブリダイズする遺伝子の位置については、後述の表1及び配列表を参照のこと。

【0053】

本発明において、K I F 5 B - R E T 融合ポリヌクレオチドの翻訳産物を検出する方法としては、例えば、免疫染色法、ウェスタンブロッティング法、E L I S A 法、フローサイトメトリー法、免疫沈降法、抗体アレイ解析が挙げられる。これら方法においては、K I F 5 B - R E T 融合ポリペプチドに結合する抗体が用いられる。かかる抗体としては、例えば、K I F 5 B タンパク質と R E T タンパク質との融合点を含むポリペプチドに特異的な抗体(以下、「融合点特異的抗体」とも称する)、R E T タンパク質の前記融合点より C 末端側の領域からなるポリペプチドに結合する抗体(以下、「R E T - C 末抗体」とも称する)、K I F 5 B タンパク質の前記融合点より N 末端側の領域からなるポリペプチドに結合する抗体(以下、「K I F 5 B - N 末抗体」とも称する)が挙げられる。ここで、「融合点特異的抗体」とは、前記融合点を含むポリペプチドに特異的に結合するが、野生型(正常型) K I F 5 B タンパク質及び野生型(正常型) R E T タンパク質のいずれにも結合しない抗体を意味する。

【0054】

K I F 5 B - R E T 融合ポリペプチドは、前記融合点特異的抗体により、また、前記 R E T - C 末抗体と前記 K I F 5 B - N 末抗体との組み合わせにより検出することができる

10

20

30

40

50

。ただし、例えば、正常肺細胞ではRETタンパク質の発現は殆ど検出されないため、免疫染色法において、RET-C末抗体を単独で用いた場合でも、肺腺がん組織におけるKIF5B-RET融合ポリペプチドの存在を検出することができる。

【0055】

「KIF5B-RET融合ポリペプチドに結合する抗体」は、当業者であれば適宜公知の手法を選択して調製することができる。かかる公知の手法としては、前記RETタンパク質のC末端部分からなるポリペプチド、KIF5B-RET融合ポリペプチド、前記KIF5Bタンパク質のN末端部分からなるポリペプチド等を免疫動物に接種し、該動物の免疫系を活性化させた後、該動物の血清（ポリクローナル抗体）を回収する方法や、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法等のモノクローナル抗体の作製方法が挙げられる。標識物質を結合させた抗体を用いれば、当該標識を検出することにより、標的蛋白質を直接検出することが可能である。標識物質としては、抗体に結合することができ、検出可能なものであれば特に制限されることはなく、例えば、ペルオキシダーゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミンイソチオシアネート（RITC）、アルカリホスファターゼ、ビオチン、及び放射性物質などが挙げられる。さらに、標識物質を結合させた抗体を用いて標的蛋白質を直接検出する方法以外に、標識物質を結合させた二次抗体、プロテインGまたはプロテインA等を用いて標的蛋白質を間接的に検出する方法を利用することもできる。

【0056】

上記の方法により、患者から単離した試料において、KIF5B-RET融合ポリヌクレオチドの存在が検出された場合、当該患者は、RETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性が高いと判定され、一方、KIF5B-RET融合ポリヌクレオチドの存在が検出されなかった場合は、当該患者は、RETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性が低いと判定される。

【0057】

<RETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性を判定するための薬剤>

上記の通り、少なくとも15塩基の鎖長を有する、下記(a)~(c)に記載のいずれかであるポリヌクレオチドは、KIF5B-RET融合ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出に好適に用いることができる。

(a) KIF5Bタンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブ及びRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブからなる群から選択される少なくとも一つのプローブであるポリヌクレオチド

(b) KIF5Bタンパク質をコードするポリヌクレオチドとRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点にハイブリダイズするプローブであるポリヌクレオチド

(c) KIF5Bタンパク質をコードするポリヌクレオチドとRETタンパク質をコードするポリヌクレオチドとの融合点を挟み込むように設計された一对のプライマーであるポリヌクレオチド。

【0058】

従って、本発明は、これらポリヌクレオチドを含む、RETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性を判定するための薬剤をも提供するものである。

【0059】

これらポリヌクレオチドは、標的遺伝子の特定の塩基配列に相補的な塩基配列を有する。ここで「相補的」とは、ハイブリダイズする限り、完全に相補的でなくともよい。これらポリヌクレオチドは、該特定の塩基配列に対して、通常、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは100%の相同性を有する。

【0060】

なお、(a)~(c)のポリヌクレオチドは、DNAであってもRNAであってもよく、またその一部又は全部において、PNA（polyamide nucleic acid、ペプチド核酸）、LNA（登録商標、locked nucleic acid、

10

20

30

40

50

Bridged Nucleic Acid、架橋化核酸)、ENA(登録商標、2'-O,4'-C-Ethylene-bridged nucleic acids)、GNA(Glycerol nucleic acid、グリセロール核酸)、TNA(Threose nucleic acid、トレオス核酸)等の人工核酸によって、ヌクレオチドが置換されているものであってもよい。

【0061】

また、上記の通り、KIF5B-RET融合ポリペプチドに結合する抗体は、KIF5B-RET融合ポリヌクレオチドの翻訳産物の検出に好適に用いることができる。従って、本発明は、当該抗体を含む、RETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性を判定するための薬剤をも提供するものである。

10

【0062】

本発明の薬剤においては、有効成分としての前記物質(ポリヌクレオチド、抗体)に加え、薬理学上許容される他の成分を含むことができる。このような他の成分としては、例えば、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、安定剤、防腐剤、生理食塩などが挙げられる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としてはアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。懸濁剤としてはモノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、ジエチリン亜硫酸塩、アスコルビン酸等を用いることができる。防腐剤としてはアジ化ナトリウム、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。

20

【0063】

また、ポリヌクレオチドや抗体を含む標品に加えて、ポリヌクレオチドや抗体に付加した標識の検出に必要な基質、陽性対照(例えば、KIF5B-RET融合ポリヌクレオチド、KIF5B-RET融合ポリペプチド、またはこれらを保持する細胞等)や陰性対照、*in situ*ハイブリダイゼーション等において用いられる対比染色用試薬(DAPI等)、抗体の検出に必要な分子(例えば、二次抗体、プロテインG、プロテインA)、試料の希釈や洗浄に用いる緩衝液等の標品を組み合わせ、本発明の方法に用いるためのキットとすることもできる。当該キットには、当該キットの使用説明書を含めることができる。本発明は、上記本発明の方法に用いるためのキットをも提供するものである。

30

【0064】

<がんを治療する方法、がんの治療剤>

上記の通り、本発明の方法によりKIF5B-RET融合ポリヌクレオチドの存在を検出された患者は、RETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性が高いと考えられる。このため、がん患者のうち、KIF5B遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子を保持する患者に選択的に、RETチロシンキナーゼ阻害剤を投与することにより、効率的にがんの治療を行うことが可能である。従って、本発明は、がんを治療する方法であって、上記本発明の方法によりRETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性が高いと判定された患者に、前記RETチロシンキナーゼ阻害剤を投与する工程を含む方法を提供するものである。

40

【0065】

また、本発明は、RETチロシンキナーゼ阻害剤を有効成分とするがんの治療剤であって、上記本発明の方法によりRETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性が高いと判定された患者に投与される治療剤を提供するものである。

【0066】

「RETチロシンキナーゼ阻害剤」としては、上記の通り、RETチロシンキナーゼの機能を直接的に又は間接的に抑制できる物質であれば特に制限はない。RETチロシンキナーゼを阻害しうる限り、他のチロシンキナーゼを阻害する物質であってもよい。本発明に適用し得る公知のRETチロシンキナーゼ阻害剤としては、例えば、4-(4-プロモ-2-フルオロアニリン)-6-メトキシ-7-(1-メチルピペリジン-4-イルメト

50

キシ)キナゾリン(一般名:バンデタニブ(Vandetanib); VEGFR、EGFR及びRETを標的とする化合物)、4-[4-[3-[4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル]ウレイド]フェノキシ]-N-メチルピリジン-2-カルボアミド(一般名:ソラフェニブ(Sorafenib); BRAF及びRET等を標的とする化合物)、N-[2-(ジエチルアミノ)エチル]-5-[(Z)-(5-フルオロ-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-3H-インドール-3-イリデン)メチル]-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボキシアミドモノ[(2S)-2-ヒドロキシサクシネート](一般名:スニチニブ(Sunitinib); PDGFR、VEGFR、RET等を標的とする化合物)、N-(3,3-ジメチルインドリン-6-イル)-2-(ピリジン-4-イルメチルアミノ)ニコチンアミド(一般名:モテサニブ(Motesanib); PDGFR、VEGFR、RET等を標的とする化合物)、XL184/カボザンチニブ(XL184/Cabozantinib; VEGFR、MET、RET等を標的とする化合物)が挙げられる。

10

【0067】

患者へのRETチロシンキナーゼ阻害剤の投与方法は、当該阻害剤の種類やがんの種類などに応じて適宜選択されるが、例えば、経口、静脈内、腹腔内、経皮、筋肉内、気管内(エアゾール)、直腸内、膈内等の投与形態を採用することができる。

【実施例】

【0068】

以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

20

【0069】

<サンプル>

日本人コホートは1997年から2008年に国立がん研究センター中央病院で外科的切除を受けた319例の肺腺がん患者からなる。USA(UMD)コホートは1987年から2009年にボルチモア大都市圏(Metropolitan Baltimore)地区の病院でリクルートされた。また、全ての腫瘍は悪性腫瘍のTNM分類に従い病理学的に診断された。

【0070】

トータルRNAは、大まかに切り分けて凍結した組織サンプルから製造者のインストラクションに従いトリゾール試薬を用いて抽出し、モデル2100 バイオアナライザー(model 2100 bioanalyzer、アジレント・テクノロジー社製)を用いて質の検定を行った。結果、全てのサンプルが6を超えるRIN(RNA integrity number)値を示した。また、組織サンプルからは、QIAamp DNAミニキット(登録商標、キアゲン社製)を用いてゲノムDNAも抽出した。なお、この研究は、本研究に係る組織の倫理審査委員会の承認を得て進められた。

30

【0071】

<RNAシーケンシング>

RNAシーケンシングのためのcDNAライブラリーは製造者の標準プロトコールに従い、mRNA-Seqサンプル調製キット(イルミナ社製)を用いて調製した。簡潔に説明すると、2µgのトータルRNAからpoly-A(+)RNAを精製し、フラグメンテーション緩衝液で94、5分加熱することで断片化した後、2本鎖cDNA合成に用いた。得られた2本鎖cDNAをPEアダプターDNAにライゲーションした後、250~300bp(挿入DNAサイズ:150~200bp)のフラクションをゲル精製し、15サイクルのPCRで増幅した。そして、このように生成したライブラリーをゲノムアナライザーIIXシーケンサー(GAIIIX、イルミナ社製)を用いた50-bpペアエンドシーケンスに供した。

40

【0072】

<融合転写産物の検出>

融合転写産物の検出は、Totoki Yら、Nat Genet.、2011年5月

50

、43巻、5号、464～469ページに記載の方法を改変して行った。簡潔に説明すると、まず最初に、同じ塩基配列のペアエンドリードを、これらはPCR増幅過程で生成したものと考えられることから除去した。次いで、BOWTIEプログラム(バージョン0.12.5)を用いて、ペアエンドリードをRefSeqデータベース(File: human.rna.fna from ftp://ftp.ncbi.nih.gov/refseq, Date: Sep 20, 2010)に登録されているヒトRNA配列に対して2塩基以下のミスマッチを許す条件でマップした。そして、適正な間隔と向きで同一RNA配列にマップされる“適正な”リードペアを除去した。次いで、複数のゲノム座位にヒットするリードを除去した後に、リードの“クラスター”を構築した。

【0073】

次に、融合転写産物を示唆する“ペアクラスター”を以下の解析条件により選出した。(I)最大の挿入配列長に該当する距離内に整列されるリードからなる“クラスター”を順方向、逆方向それぞれのアライメントから構築する(二つのリードはその終点が最大の挿入配列長に該当する距離より離れていなければ同一のクラスターに位置させる)。

(II)最も左又は右に位置するリード間の距離が挿入配列長よりも大きければ捨てる。

(III)片方の配列が“順方向クラスター”、もう片方の配列が“逆方向クラスター”に位置するならば、そのペアエンドリードを選出する(この“順方向クラスター”と“逆方向クラスター”とを合わせて“ペアクラスター”と呼ぶ)。

(IV)少なくとも一方のペアエンドリードが基準ヒトRNA配列に完全一致するペアクラスターを選出する。

(V)塩基の多様性によって誤って選ばれた遺伝子ペアを除去する。この目的のため、BLASTNプログラムを用いて、ペアクラスターに含まれるペアエンドリードをヒト基準RNA配列に対して整列した。次に、一方の端の配列がペアクラスターに整列され、もう片方が適正な距離と向きで同一のRNA配列に整列された場合、その遺伝子ペアを除外した。カットオフ値として、予測値1000を用いた。

【0074】

そして、一つの肺腺がんサンプルにおいて20を超えるペアエンドリードが得られ、3例の非がん肺組織のいずれにも表れなかった遺伝子ペアをピックアップした。一つの遺伝子領域内、もしくは隣接した遺伝子領域にマップされたペアクラスターはそれらがRefSeqデータベースに未登録の選択的スプライシング・リードスル・転写産物の可能性があるため、更なる解析から外した。融合境界点をまたぐジャンクションリードをMapSplice(バージョン1.14.1)ソフトウェアを用いて探索した。この際、それぞれの遺伝子に対するリードクラスター領域と隣接する300bpの領域からなるゲノムDNA配列二つをつなぎ合わせて一つのDNA配列を作り、このDNAに対してMapSpliceソフトウェアを用いてジャンクションリードを探索した。

【0075】

<RT-PCR、ゲノムPCR、サンガーシーケンシング>

トータルRNA(500ng)をスーパースクリプトIII逆転写酵素(登録商標、インビトロジェン社製)を用いて逆転写した。そして、得られたcDNA(10ngのトータルRNAに相当)もしくは10ngのゲノムDNAをKAPA Taq DNAポリメラーゼ(KAPAバイオシステム社製)を用いたPCR増幅に供した。反応は次の条件のもとサーマルサイクラー内で行った: 95 30秒、60 30秒、72 2分を40サイクル、その後72 10分最終伸長反応。また、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)をコードする遺伝子をcDNA合成の効率の評価のため増幅した。さらに、PCR産物はBigDyeターミネーターキットとABI 3130x1 DNAシーケンサー(アプライドバイオシステム社製)とを用いて、両方向に塩基配列を直接決定した。なお、本研究で用いたプライマーを表1に示す。

【0076】

10

20

30

40

【表 1】

No.	プライマー名	位置	配列	配列番号	用途
KIF5B-RET 融合					
1	KIF5B-RET-F1	KIF5B エクソン 15	AGGAAATGACCAACCACCAG	13	RT-PCR及びシーケエンシング
2	KIF5B-RET-R1	RET エクソン 12	TCCAAATCGCCTTCTCCTA	14	RT-PCR及びゲノムPCR
3	KIF5B-int15-F1	KIF5B インترون 15	CCATAAGTGAATGATTGGAAC	15	ゲノムPCR
4	KIF5B-int15-F2	KIF5B インترون 15	GATTTGATGTTGCAGTAGCTG	16	ゲノムPCR
5	KIF5B-ex16-F1	KIF5B エクソン 16	GGAGTTAGCAGCATGTCAGC	17	ゲノムPCR及びシーケエンシング
6	KIF5B-ex23-F1	KIF5B エクソン 23	GCTCACTAAAGTGACAAAACAG	18	ゲノムPCR及びシーケエンシング
7	KIF5B-ex24-F1	KIF5B エクソン 24	GAAGAGGGCATTCTGCACAG	19	ゲノムPCR
8	RET-int11-R3	RET インترون 11	GGAGGCTCCAGGATACTCGG	20	ゲノムPCR
9	RET-int7-R1	RET インترون 7- エクソン 8	CCTCCTCGGCCACATCTG	21	ゲノムPCR
10	KIF5B-F-orf2438	KIF5B エクソン 22-23	AGAGTGTGAGATTGATTCTG	22	シーケエンシング
11	KIF5B-int15-F3.5	KIF5B インترون 15	CCCGAGTAGCTAGGATTACA	23	シーケエンシング
12	RET-int11-R0.5	RET インترون 11	ATGACAGGTGTGGTCACAGC	24	シーケエンシング
13	RET-int11-R1	RET インترون 11	TATCCACACATTGGGCCCCAC	25	シーケエンシング
14	RET-int7-R2	RET インترون 7	ATGGCAGCTGTGTCAGCATG	26	シーケエンシング
RET 発現					
1	RET-F-orf2154	RET exon 12	ATCCCTCGGAAGAACTTGG	27	RT-PCR
2	RET-R-orf2364	RET exon 13	GATGACATGTGGGTGTTGA	28	RT-PCR

10

20

30

40

【 0 0 7 7 】

< EGFR、KRAS、ALK変異の解析 >

全ての肺腺がん組織のゲノムDNAにおける、EGFR及びKRAS遺伝子の体細胞変異については、「Takano, T.ら、J Clin Oncol.、2005年、23巻、6829~6837ページ」に記載の高解像度融解 (high-resolution melting, HRM) 法を用いて解析した。また、同じ組織に由来するトータ

50

ルRNAについて、multiplex逆転写PCR法を用いてALK/EML4又はALK/KIF5B融合転写産物の発現を調べた。

【0078】

<ゲノムコピー数解析>

肺腺がんのゲノムコピー数は、本発明者による過去の報告(Iwakawa, R.ら、「MYC Amplification as a Prognostic Marker of Early Stage Lung Adenocarcinoma Identified by Whole Genome Copy Number Analysis」、Clin Cancer Res., 2010年12月10日オンライン)に記載したように、ジーンチップ ヒトマッピング250-K SNPアレイ(Gene Chip Human Mapping 250-K SNP arrays、登録商標、アフィメトリクス社製)とアフィメトリクス社製ジーンチップマッピングアレイ用コピー数アナライザー(CNAG)ソフトウェア(Nannya, Y.ら、Cancer Res., 2005年、65巻、6071~6079ページ 参照)とを用いて決定した。

10

【0079】

<マイクロアレー解析とデータ処理>

全部で、228例を発現プロファイル解析に供した。トータルRNA(100ng)を5xメガスク립トT7キットでラベルし、アフィメトリクス U133 プラス 2.0 アレイで解析した。得られたデータはMAS5アルゴリズムで正規化し、54,4675プローブの平均発現レベルをそれぞれのサンプルで1000になるようにした。

20

【0080】

<免疫組織化学解析>

パラフィンブロックを4µm厚にて薄切し、シランコーティングスライドに発付した。次いで、薄切切片をキシレン・アルコール系列で脱パラフィン・親水化し、スライドを3%過酸化水素水で20分処理することで内因性ペルオキシダーゼをブロックし、次に脱イオン水で2~3分洗浄した。抗原賦活化はtargeted retrieval溶液を用いて95度の温浴を40分行った。スライドを洗浄後、5%正常動物血清で10分反応させ、非特異反応をブロッキングし、一次抗体としてRET(1:250希釈、3454_1クローン)及びTTF1(1:100希釈、8G7G3/1クローン)を用い、室温にて1時間インキュベーションした。検出はTTF1に対してはEnvision-Plusシステムを用いて、RETに対してはEnvision-FLEX処理後にLINKER試薬を追加して、各々検出した。洗浄後、発色は3,3'-ジアミノベンジジン溶液を用いて5分間反応させ、流水洗浄後にヘマトキシリンによるカウンター染色で可視化した。なお、TTF1に対しては腫瘍細胞における10%を超える核染色、RETに対しては細胞質染色を陽性と判断した。

30

【0081】

<蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)>

まず1日目に、免疫染色同様、薄切切片を脱パラフィン・親水化後風乾を行った。風乾後、常温の0.2N塩酸に20分間静置し、さらに常温の精製水に3分間静置し、その後、常温の洗浄緩衝液(2xSSC Wash Buffer)にて3分間静置した。次いで、85の前処理液(Pretreatment Solution)に30分間静置し、その後洗浄緩衝液(2xSSC Wash Buffer)にて2回洗浄を行った。次いで、37のプロテアーゼ溶液に60分間静置し、酵素処理を行い、2xSSC Wash Bufferにて2回洗浄を行った。次いで、常温の10%中性緩衝ホルマリンに10分間静置して再固定を行い、常温の洗浄緩衝液(2xSSC Wash Buffer)にて2回洗浄を行った。そして、アルコール系列で脱水後風乾させた。

40

【0082】

KIF5B遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子の検出には、KIF5B遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子の形成によって生じる、RET遺伝子のキナーゼドメインのコー

50

ド領域よりも5'側のの上流領域と、RET遺伝子のキナーゼドメインのコード領域および該コード領域よりも3'側の下流領域との分離(split)を検出できるように設計された下記プローブのセットを用いた。

5' RETプローブ1: BACクローンDNA(GSP1506F09)をカバーする100~1000塩基の鎖を有する、TexRedで標識されたプローブ群(株式会社GSP研究所製)

3' RETプローブ1: FITCで標識されたBACクローンDNA(GSP1877H08、GSP1018G02、GSP1070C12、GSP0369G08又はGSP0075D03)をカバーする100~1000塩基の鎖を有する、TexRedで標識されたプローブ群(株式会社GSP研究所製)。

【0083】

なお、これらプローブの標識はニックトランスレーション法にて行った。また、これらプローブ群がハイブリダイズするゲノム上の位置を図11の下部に示す。

【0084】

そして、前記ホルマリン固定した薄切切片に前記DNAプローブ混合液を10μl添加し、カバーガラスを乗せ、ペーパーボンドでシールした。次いで、ハイブリダイザー(製品名: Thermo Brite(登録商標)、アボットジャパン社製)を用いて、75℃にて5分間インキュベートした後、さらに37℃にて72時間~96時間インキュベートすることにより、ハイブリダイゼーションを行った。

【0085】

インキュベート後に、ペーパーボンドを取り除き、常温のポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液(2xSSC/0.3%NP-40 pH7~7.5)にカバーガラスの乗った標本を入れ、5分放置した後、カバーガラスを剥がした。次いで、72±1℃に加熱したポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液(2xSSC/0.3%NP-40 pH7~7.5)に標本を入れ、30秒~1分静置した。

【0086】

次いで、アルミ箔で遮光とした2xSSC Wash Bufferを入れた常温のコプリンジャーに標本を移した。そして、DAPI 10μlをスライドガラスに添加することにより対比染色を行い、カバーガラスをのせ、マニキュアにてカバーガラスを固定化した。

【0087】

判定は蛍光顕微鏡下で行い、腫瘍50細胞にて、赤色のRET由来のシグナル及び緑色のセントロメア10由来のシグナルにおける融合、分離及び単独シグナルをそれぞれカウントした。

【0088】

(実施例1)

先ず、治療標的となりうる新規キメラ融合転写産物を同定するため、30例の肺腺がんと3例の付随非がん肺組織の全トランスクリプトームシーケンシング(RNAシーケンシング、Meyerson, M.ら、Nat Rev Genet、2010年、11巻、685~696ページ)を行った。なお、これら30例の肺腺がんは、EML4-ALK融合を有する2例、EGFR変異を有する2例、KRAS変異を有する2例、そして、EGFR/KRAS/ALK変異を有しない24例であった(表2 参照)。

【0089】

10

20

30

40

【表 2】

No.	サンプル	腫瘍又は正常組織	性別	遺伝子変異	年齢	喫煙(たばこの箱年)	病理学的分期	トータルリード数	遺伝子融合 (ペアエンドリード/ジャンクシジョンリード数)
1	BR0009	腫瘍	男性	ALK	30	喫煙経験者(30)	IIB	30,067,759	EML4-ALK (91/64)
2	BR0052*	腫瘍	女性	ALK	38	喫煙経験者(7)	IIA	27,841,176	EML4-ALK (60/67)
3	BR0003	腫瘍	女性	EGFR	60	喫煙未経験者	IIB	33,358,341	TMEM209-DPP6 (61/16). ZNF862-WDR91 (24/22)
4	BR0044	腫瘍	男性	EGFR	68	喫煙経験者(10)	IIB	32,262,234	
5	BR0005	腫瘍	男性	KRAS	59	喫煙経験者(62)	IIB	23,297,267	
6	BR0016	腫瘍	女性	KRAS	75	喫煙未経験者	IIB	27,188,879	
7	BR0001	腫瘍	男性	無し	68	喫煙経験者(86)	IB	23,467,018	MTAP-CDKN2BAS (23/37)
8	BR0004	腫瘍	男性	無し	62	喫煙経験者(46)	IIB	33,540,967	
9	BR0006	腫瘍	女性	無し	62	喫煙経験者(38)	IB	21,386,586	
10	BR0012	腫瘍	男性	無し	65	喫煙経験者(92)	IIB	28,465,957	
11	BR0013	腫瘍	女性	無し	58	喫煙未経験者	IB	28,740,939	
12	BR0014	腫瘍	男性	無し	52	喫煙経験者(68)	IIB	21,036,216	
13	BR0015	腫瘍	女性	無し	49	喫煙経験者(20)	IIB	21,125,603	
14	BR0019*	腫瘍	女性	無し	54	喫煙未経験者	IIB	28,868,572	
15	BR0020	腫瘍	男性	無し	57	喫煙未経験者	IIB	25,404,815	KIF5B-RET (30/12)
16	BR0026	腫瘍	男性	無し	58	喫煙未経験者(41)	IIB	23,458,513	
17	BR0027	腫瘍	男性	無し	68	喫煙経験者(49)	IIA	22,344,197	
18	BR0029	腫瘍	男性	無し	53	喫煙経験者(70)	IA	31,534,640	FAM3C-CADPS2 (21/20)
19	BR0031	腫瘍	男性	無し	54	喫煙未経験者	IA	32,324,822	CDC42-TMCO4 (41/28)
20	BR0032	腫瘍	女性	無し	61	喫煙未経験者	IA	22,693,962	
21	BR0033	腫瘍	男性	無し	69	喫煙経験者(102)	IIB	29,321,549	
22	BR0034	腫瘍	男性	無し	66	喫煙経験者(45)	IA	29,069,205	
23	BR0035	腫瘍	男性	無し	61	喫煙経験者(42)	IIB	25,683,757	
24	BR0036*	腫瘍	男性	無し	66	喫煙経験者(37)	IB	21,790,422	
25	BR0037	腫瘍	男性	無し	63	喫煙経験者(40)	IB	31,571,318	
26	BR0038	腫瘍	女性	無し	47	喫煙未経験者	IA	26,967,632	
27	BR0040	腫瘍	女性	無し	69	喫煙経験者(105)	IIA	27,417,202	
28	BR0041	腫瘍	男性	無し	46	喫煙経験者(27)	IIB	29,761,895	
29	BR0043	腫瘍	男性	無し	68	喫煙経験者(48)	IIB	26,223,934	
30	BR0045	腫瘍	女性	無し	64	喫煙未経験者	IIB	24,191,784	
31	BR0052	正常組織	女性	-	38	喫煙経験者(7)	IIA	28,563,803	
32	BR0036	正常組織	男性	-	66	喫煙経験者(37)	IB	33,523,557	
33	BR0019	正常組織	女性	-	54	喫煙未経験者	IIB	29,088,007	

*これらの症例において対応する非癌性肺組織由来のRNAは、RNAシーケンシングにも供した。

【0090】

そして、前記RNAシーケンシングで得られた2 × 10⁷以上のペアエンドリードを解析し、逆転写(RT) - PCR産物のサンガーシーケンシングを行った。得られた結果を表2、図1及び図2に示す。

【0091】

表2に示した結果から明らかなように、EML4 - ALKの2例を含む7つの融合転写

10

20

30

40

50

産物が同定され、これらの中で、染色体10p11.2に存在するKIF5B遺伝子と染色体10q11.2に存在するRET遺伝子の融合が症例BR0020において検出された(図1のKIF5B-RETバリエーション1、図2 参照)。

【0092】

なお、RET遺伝子については、KIF5B以外の他の遺伝子との融合が甲状腺乳頭癌におけるdriver変異(責任変異)であることが示されている(Mani, R.S.ら、Nat Rev Genet、2010年、11巻、819~829ページ、及びWells, S.A., Jr.ら、Clin Cancer Res、2009年、15巻、7119~7123ページ 参照)。しかしながら、肺腺がんを含めたがんとKIF5B-RET融合転写産物との関係は知られていなかったため、この融合遺伝子について着目して更なる解析を進めた。

10

【0093】

(実施例2)

次に、全トランスクリプトームシーケンシングを行った30例を含む319例の日本の肺腺がんを対象としたRT-PCRスクリーニングとPCR産物のサンガーシーケンシングとを行った。得られた結果を表3、図3及び図4に示す。

【0094】

【表 3】

変数	日本					アメリカ
	全 (%)	変異型				
		EGFR ^a (%)	KRAS ^a (%)	ALK ^b (%)	RET ^b (%)	無 (%)
トータル	319	169	30	11	6	103
年齢 (平均値 ± 標準偏差; 年)	61.7 ± 8.6	61.0 ± 7.9	62.3 ± 9.1	53.5 ± 13.2	57.0 ± 15.2	63.6 ± 8.2
性別						
男性 (%)	158 (49.5)	68 (40.2)	19 (63.3)	2 (18.2)	3 (50.0)	66 (64.1)
女性 (%)	161 (50.5)	101 (59.8)	11 (36.7)	9 (81.8)	3 (50.0)	37 (35.9)
喫煙習慣						
喫煙未経験者 (%)	157 (49.2)	92 (54.4)	12 (40.0)	7 (63.6)	6 (100.0)	40 (38.8)
喫煙経験者 (%)	162 (50.8)	77 (45.6)	18 (60.0)	4 (36.4)	0 (0.0)	63 (61.2)

^a変異は高解像度融解 (HRM) 分析によって検出した。

^b融合はRT-PCRによって検出した。

【 0 0 9 5 】

表 3、図 3 及び図 4 に示す通り、2.0% (6 / 319) の症例において、KIF5B - RET 融合転写産物を発現していることが明らかになった。また、4つの variant が同定され、そのすべてが in-frame であることも明らかになった。さらに、これらの融合転写産物にコードされる蛋白質は、KIF5B のコイルドコイルドメインと R

10

20

30

40

50

ETのキナーゼドメインを有していることも明らかになった(図1 参照)。なお、このKIF5Bのコイルドコイルドメインは、KIF5Bのホモダイマー形成において機能することが知られているため(Hirokawa, N., Nat Rev Mol Cell Biol, 2009年、10巻、682~696ページ)、PTC-RETやKIF5B-ALK融合と同様に、KIF5B-RET蛋白質はKIF5Bのコイルドコイルドメインを介してホモダイマーを形成し、RETのキナーゼ機能の恒常的な活性化をもたらすことが想定される。

【0096】

また、KIF5B-RET融合は、他の主要なタイプの肺がん(0/205扁平上皮がん、0/20小細胞がん)や40例の肺腺がんを含む90の肺がん細胞株では検出されなかった。なお、これらの肺がん細胞株については、Blanco, R.ら、Hum Mutat, 2009年、30巻、1199~1206ページを参照のこと。

10

【0097】

(実施例3)

次に、6例のRET融合陽性例のゲノムPCR解析を行った。得られた結果を図5~10に示す。

【0098】

図5~7に示す通り、ヒト染色体10p11.2のKIF5Bイントロン15, 16, 24と染色体10q11.2のRETイントロン7, 11とが体細胞レベルにて融合していることが明らかになった。

20

【0099】

また、これらの結果から、さらに図8及び9に示す通り、両座位でゲノムコピー数の変化が生じていないことから、図10に示すような第10染色体のセントロメア領域で長腕と短腕の間で染色体逆位が生じたことを示していることも明らかになった。

【0100】

また、RET融合陽性例のゲノムにおける切断点周辺のDNA配列は、有意な相同性を示していなかった。さらに、症例BR0020では、切断点はヌクレオチドの重なりや挿入なしに結合しているのに対し、他の症例においては、挿入(BR1001及びBR1003)や重なり(BR1002及びBR0030)が生じていることが明らかになった(図6 参照)。また、症例BR1004では、349bpのDNA断片の挿入を伴う結合が見出された(図7 参照)。

30

【0101】

従って、これらの結果はヒトがんで見出されている他の多くの染色体転座例(Mani, R.S.ら、Nat Rev Genet, 2010年、11巻、819~829ページ 参照)と合致しているため、KIF5B-RET融合は、非相同末端結合を介した誤ったDNA2本鎖切断の修復により形成されたことを示唆している。

【0102】

(実施例4)

次に、RET融合陽性例(BR0020)の蛍光in situ ハイブリダイゼーション解析を行った。得られた結果を図11に示す。図11に示した結果から明らかなように、RET遺伝子のキナーゼドメインのコード領域よりも5'側の上流領域にハイブリダイズするプローブ(5'RETプローブ1)と、RET遺伝子のキナーゼドメインのコード領域および該コード領域よりも3'側の下流領域にハイブリダイズするプローブ(3'RETプローブ1)を用いた場合、プローブシグナルの分離(split)が検出された。

40

【0103】

(実施例5)

次に、KIF5B-RET融合を持つ全6例の肺腺がんにおける他の公知の変異(EGFR, KRAS及びALK変異、非特許文献1、5及び7 参照)の有無を調べた。得られた結果を表4に示す。また、KIF5B-RET融合を持つ全6例の肺腺がんの病理学

50

的所見についても観察した。得られた結果を図11及び12に示す。なお、表4および5に記載の「ADC」は「腺がん」であることを示す。

【0104】

【表4】

No.	サンプル	国	性別	年齢	喫煙 (Pack-years [またはこの箱年])	KIF5B-RET 融合(融合しているエクソン)	遺伝子変異*	病理学的病期	病理学的所見	RET 染色	TTF1 染色
1	BR0020	日本	男性	57	喫煙未経験者	バリアント1 (ex15-ex12)	無	II B	中分化型ADC	+	+
2	BR1001	日本	女性	65	喫煙未経験者	バリアント1 (ex15-ex12)	無	IB	高分化型ADC	+	+
3	BR1002	日本	女性	64	喫煙未経験者	バリアント1 (ex15-ex12)	無	IB	高分化型ADC	+	+
4	BR0030	日本	男性	57	喫煙未経験者	バリアント2 (ex16-ex12)	無	IA	高分化型ADC	+	+
5	BR1003	日本	男性	28	喫煙未経験者	バリアント3 (ex23-ex12)	無	IA	高分化型ADC	+	+
6	BR1004	日本	女性	71	喫煙未経験者	バリアント4 (ex24-ex8)	無	IA	中分化型ADC	NT	NT
7	NCI1580	米国	男性	63	喫煙経験者(不明)	バリアント1 (ex15-ex12)	不明	II	中分化型ADC	NT	NT
8	NCI16052	米国	男性	62	喫煙経験者(78)	バリアント1 (ex15-ex12)	不明	III	中分化型ADC	NT	NT
9	NOR696	ノルウェイ	男性	55	喫煙経験者(26)	バリアント1 (ex15-ex12)	不明	IB	ADC	NT	NT

*EGFR変異、KRAS変異、ALK融合
NT: 未試験

【0105】

表4に示した結果から明らかのように、前記全6例のいずれも、EGFR、KRAS、ALK変異が陰性、つまりtriple negative症例であり、RET融合と他

10

20

30

40

50

のがん遺伝子変化とは相互排他的な関係にあった。なお、全ての症例において、肺腺がんのマーカである甲状腺転写因子 - 1 (T T F 1) は陽性であった。

【 0 1 0 6 】

従って、この結果から、K I F 5 B - R E T 融合が責任変異であり、t r i p l e n e g a t i v e 肺腺がんの 5 . 5 % (6 / 1 0 9) の原因となることが示唆された。

【 0 1 0 7 】

また、図 1 2 及び図 1 3 に示す通り、K I F 5 B - R E T 融合陽性腫瘍は乳頭状あるいは肺胞上皮置換性の増殖形態を示し、高・中程度の分化度を示していることが明らかになった。

【 0 1 0 8 】

(実施例 6)

次に、K I F 5 B - R E T 融合陽性肺腺がんにおける R E T の発現レベルを調べた。得られた結果を図 3、図 1 4、図 1 5 及び表 4 に示す。

【 0 1 0 9 】

図 3 及び図 1 4 に示す通り、K I F 5 B - R E T 融合陽性肺腺がんは融合陰性肺腺がんや非がん肺組織よりも高い R E T 発現レベルを示した (図 3 参照)。また、6 例の融合陽性例を含めた 2 2 8 例の遺伝子発現データによっても、R E T 発現レベルのその傾向は確かめられた (図 1 4 参照)。

【 0 1 1 0 】

さらに図 1 5 に示した結果から明らかなように、R E T 蛋白質の C 末端領域に対する抗体を用いた免疫組織化学解析では、検索した融合陽性例の腫瘍細胞の細胞質内に R E T 陽性の染色像が見られた (図 1 5 及び表 4 参照)。一方、非がん肺細胞やいくつかの融合陰性例の腫瘍細胞では、そのような染色像は見られなかった。

【 0 1 1 1 】

なお、K I F 5 B - R E T 融合のない肺腺がんの一部 (2 2 % , 4 8 / 2 2 2) においても、非がん肺組織よりも高いレベルの R E T 遺伝子の発現がみられた。6 例のそのような症例 (表 5 参照) については、R N A シークエンシングにて解析したが、K I F 5 B 以外の遺伝子への R E T 遺伝子の融合や R E T 遺伝子の体細胞変異、R E T 座位のコピー数増加は見出されなかった (図 1 6 及び 1 7 参照)。

【 0 1 1 2 】

【 表 5 】

No.	サンプル	性別	年齢	喫煙 (たばこの箱年)	癌遺伝子変異	病理学的病期	病理学的所見
1	BR0012	男性	65	喫煙経験者(92)	無	IIB	低分化型 ADC
2	BR0005	男性	59	喫煙経験者(62)	KRAS	IIB	低分化型 ADC
3	BR0015	女性	49	喫煙経験者(20)	無	IIB	低分化型 ADC
4	BR0031	男性	54	喫煙未経験者	無	IA	高分化型 ADC
5	BR0043	男性	68	喫煙経験者(48)	無	IIB	中分化型 ADC
6	BR0032	女性	61	喫煙未経験者	無	IA	高分化型 ADC

【 0 1 1 3 】

(実施例 7)

肺腺がんにおけるがん遺伝子変異の分布は民族によって異なることが示されている。アジア人では非アジア人よりも E G F R 変異の頻度が高く (5 0 % v s 1 0 %)、K R A S 変異では逆の傾向にある (1 0 % v s 3 0 %)。その一方、A L K 融合においては同等であること (5 %) が知られている (非特許文献 6、及び S h i g e m a t s u , H . ら、J N a t l C a n c e r I n s t、2 0 0 5 年、9 7 巻、3 3 9 ~ 3 4 6 ページ 参照)。そこで、非アジア人における K I F 5 B - R E T 融合の分布を知るため

10

20

30

40

50

、USAコホート由来の腺がん症例（表3 参照）におけるKIF5B-RET融合の頻度を調べた。得られた結果を図18及び19に示す。

【0114】

図18及び19に示した結果から明らかなように、バリエーション1転写産物はUSA症例において1/80（1.3%）検出され、その1例はコケージャンであった。この症例は、前記の日本人症例と同様EGFR、KRAS、ALK変異が陰性、つまりトリプルネガティブ（triple negative）症例であり、前記3変異とKIF5B-RET融合とは相互排他的な関係にあることが明らかになった。

【0115】

従って、KIF5B-RET融合はアジア人、非アジア人共に肺腺がんの1～3%に生じていることが明らかになった。なお、1例のRET融合をもつ非アジア人症例は喫煙者であるが、6例の日本人融合陽性症例は非喫煙者であり、KIF5B-RET融合陽性症例における喫煙による影響は不明である。

【産業上の利用可能性】

【0116】

以上説明したように、本発明によれば、RETチロシンキナーゼ阻害剤によるがん治療の有効性を予測することが可能となる。

【0117】

RET受容体型チロシンキナーゼに対する阻害効果を持つ阻害剤は既にごん医療に導入されている。FDA承認阻害剤、例えばバンデタニブやソラフェニブは非小細胞肺がんに対して抗がん活性を有することが示されている。上記の通り、KIF5B遺伝子とRET遺伝子とのインフレーム融合が複数例で生じている。さらにKIF5B遺伝子とRET遺伝子との融合は、EGFR/KRAS/ALK変異型腫瘍から乖離している。従って、KIF5B-RET融合は、既存のチロシンキナーゼ阻害剤の標的となりうる。また、KIF5B-RET融合は日本人を含むアジア人に限らず、欧米人においても認められる。従って、本発明の方法は、幅広い人種において、がん治療の効率を高める上で、極めて有用である。

【配列表フリーテキスト】

【0118】

配列番号1

<223> KIF5B cDNA

配列番号3

<223> RET cDNA

配列番号5

<223> KIF5B-RET融合バリエーション1

配列番号7

<223> KIF5B-RET融合バリエーション2

配列番号9

<223> KIF5B-RET融合バリエーション3

配列番号11

<223> KIF5B-RET融合バリエーション4

配列番号13～28

<223> 人工的に合成されたプライマーの配列

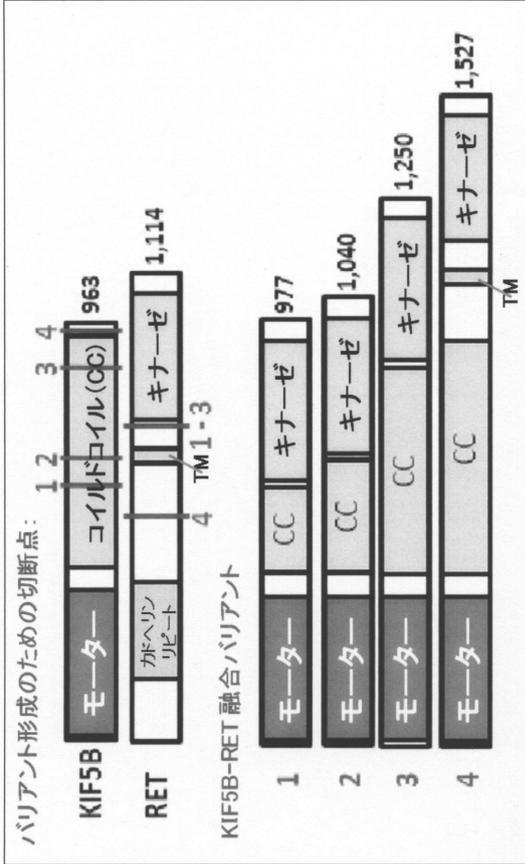
10

20

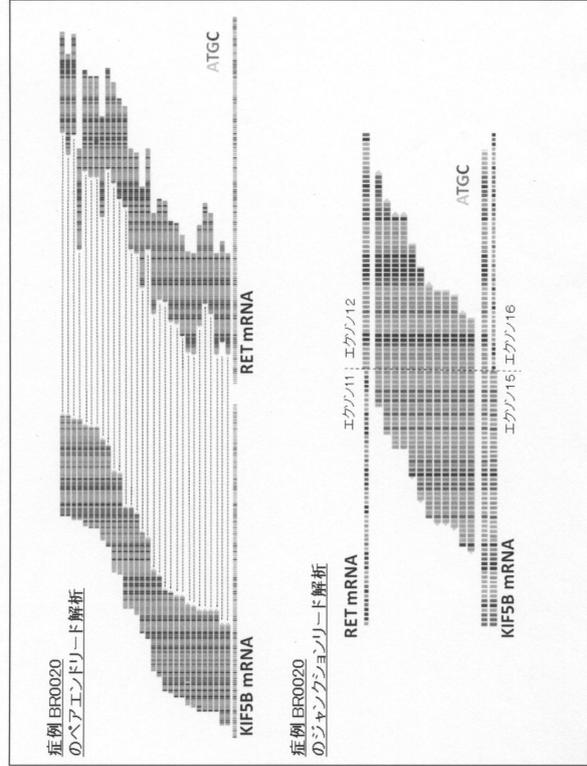
30

40

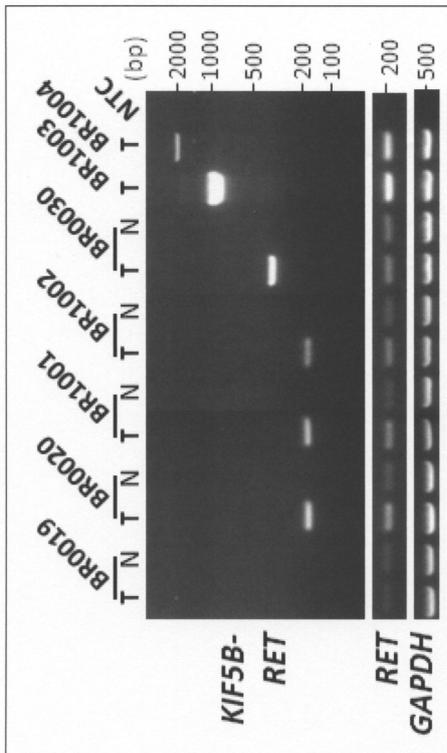
【 図 1 】



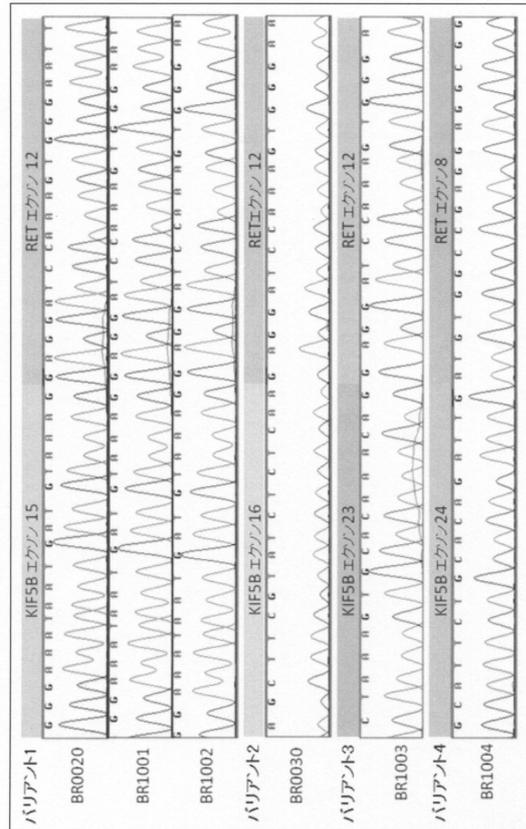
【 図 2 】



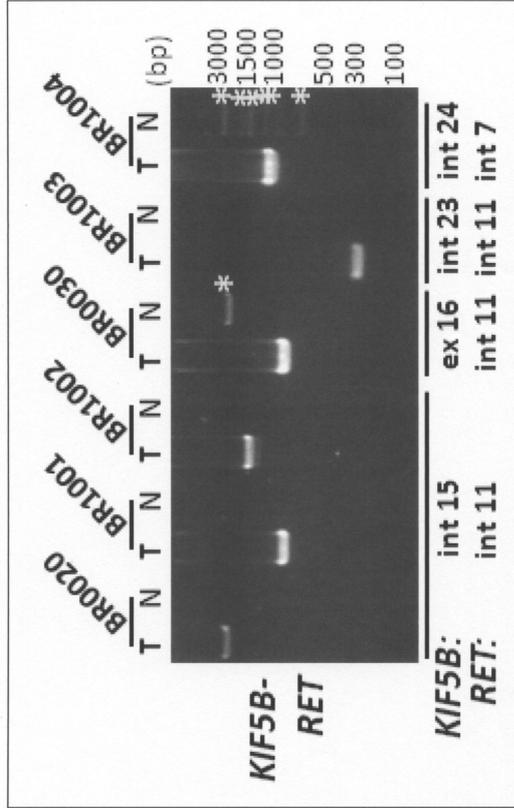
【 図 3 】



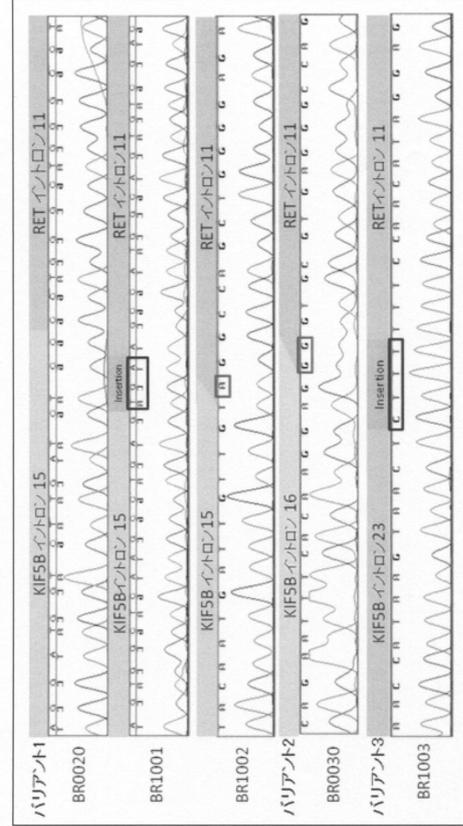
【 図 4 】



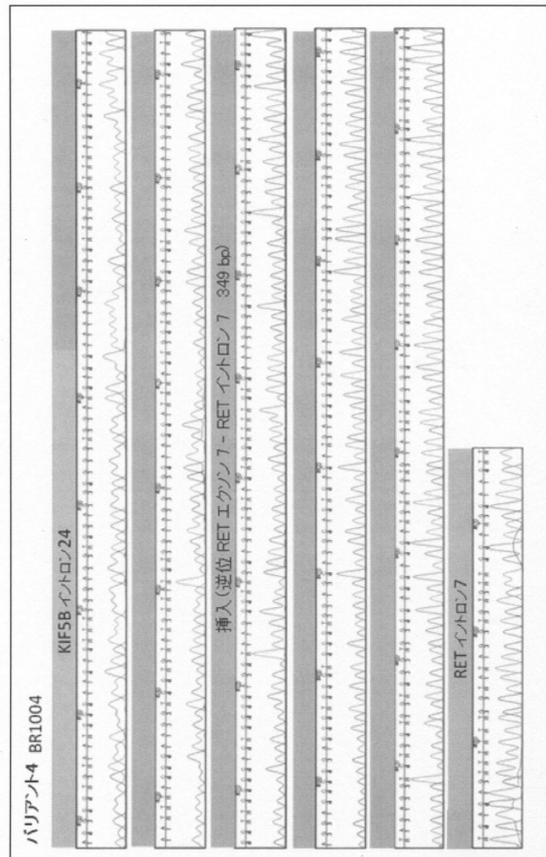
【 図 5 】



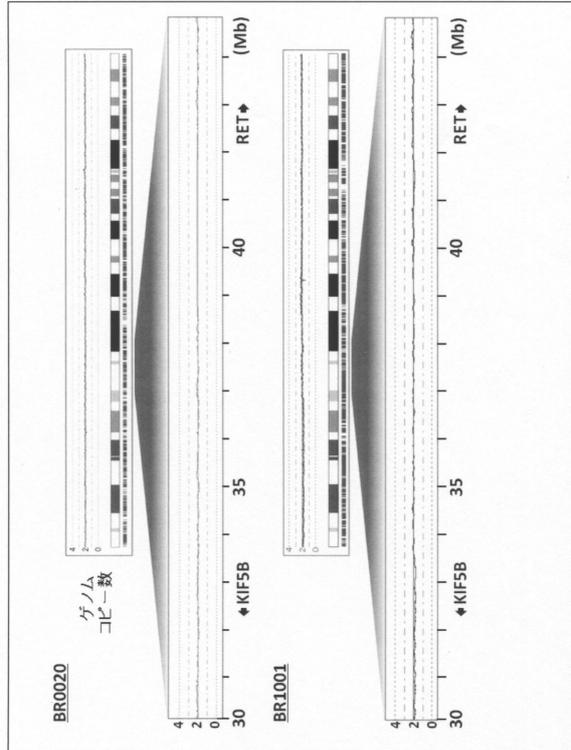
【 図 6 】



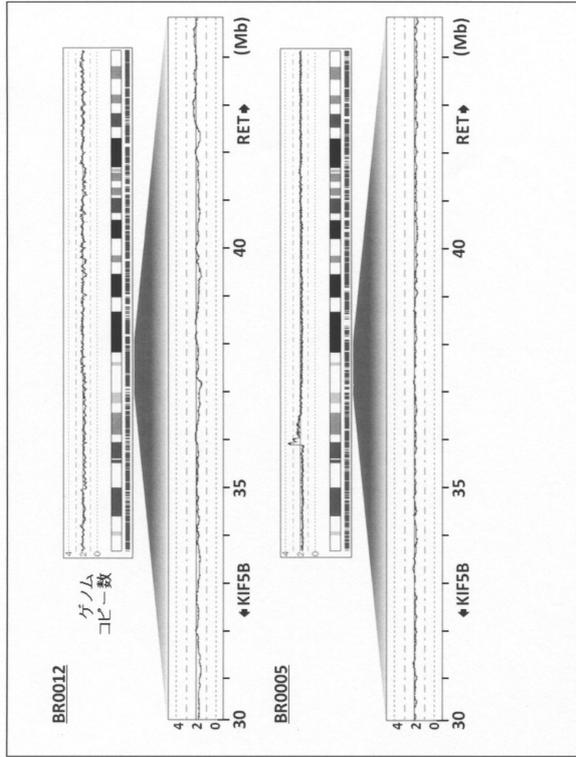
【 図 7 】



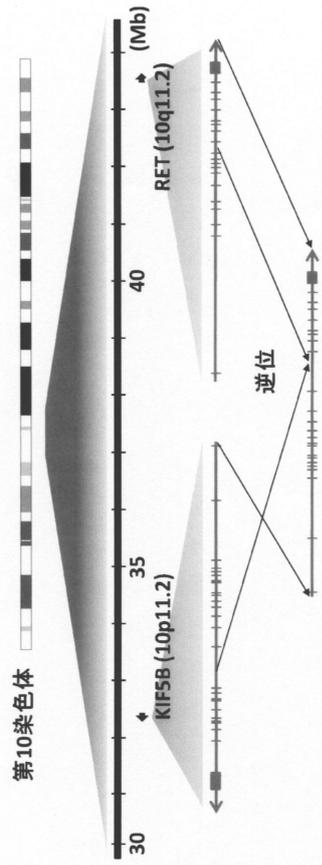
【 図 8 】



【 図 9 】



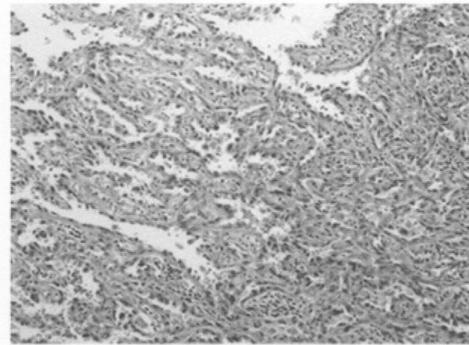
【 図 10 】



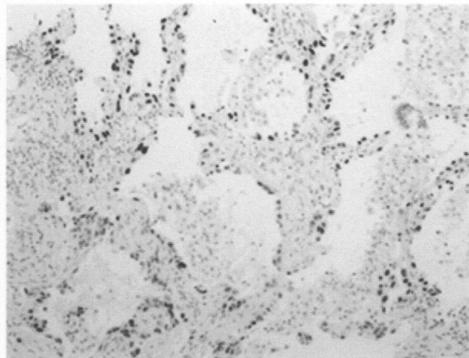
【 図 11 】



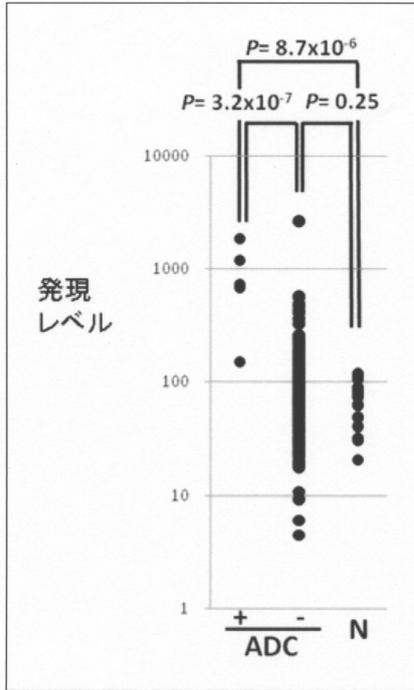
【 図 12 】



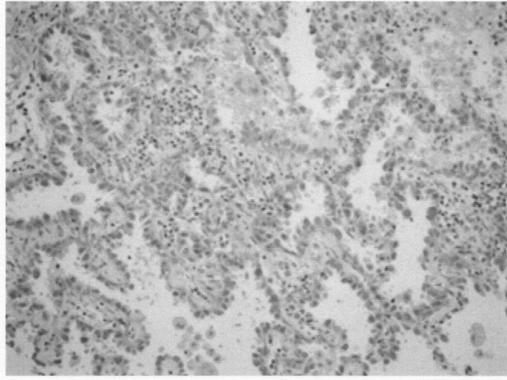
【 図 13 】



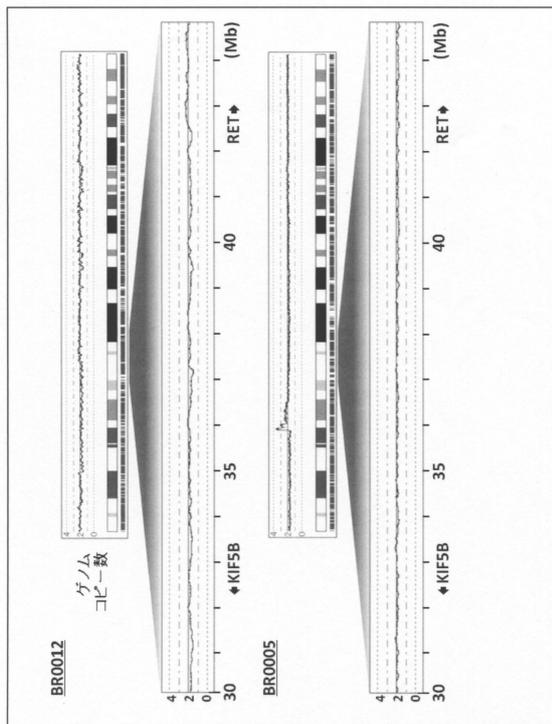
【 図 1 4 】



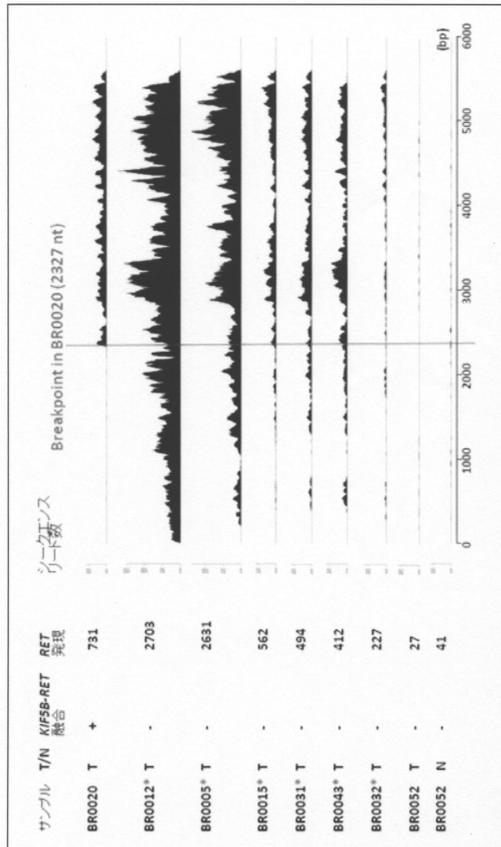
【 図 1 5 】



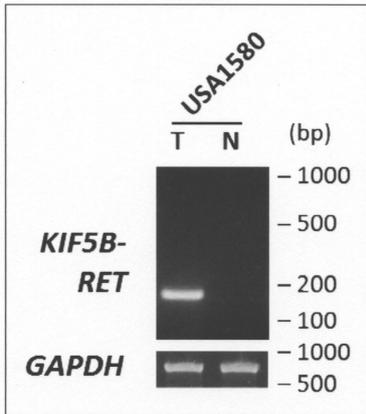
【 図 1 6 】



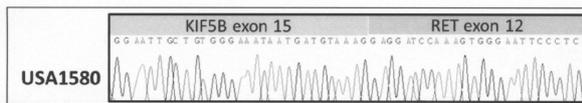
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 配列表 】

0006032616000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100117813

弁理士 深澤 憲広

(74)代理人 100188374

弁理士 一宮 維幸

(72)発明者 河野 隆志

東京都中央区築地5 - 1 - 1 独立行政法人国立がん研究センター内

(72)発明者 薦 幸治

東京都中央区築地5 - 1 - 1 独立行政法人国立がん研究センター内

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 国際公開第2010/000012(WO, A1)

国際公開第2007/049624(WO, A1)

特表2010-509289(JP, A)

国際公開第2012/053606(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 14/82

C12N 15/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

CPlus/REGISTRY(STN)