

RET融合遺伝子に関するファクトシート

新規RET融合PDXモデルとそれに関連した医薬品開発リソースにより、RET阻害剤研究を加速させます

恒常的に活性化しているRET融合遺伝子はがん研究の重要なターゲットです。RETは、細胞増殖、遊走、分化などの複数の細胞メカニズムに関与する受容体型チロシンキナーゼをコードするがん原遺伝子です。RETは、染色体10(10q11.2)上の別の近くの遺伝子と融合して、恒常的に活性化する遺伝子を作成します。これにより、永続的に細胞の成長と腫瘍の発達を促進します。したがって、RET融合遺伝子は「druggable」である可能性が高く、がん研究の重要なターゲットでもあります。

これまで、RET融合遺伝子は散発性乳頭状甲状腺がんの10%から20%で発見されてきましたが⁽¹⁾、最近、一連のRET融合遺伝子が肺腺がんの約1%まで発見されました^(2,3)。この事象は、他の既知のドライバー遺伝子を欠く肺腺がんの非喫煙者で15%に増加します⁽⁴⁾。RET融合遺伝子(特にCCDC6-RETとNCOA4-RET)は、進行性結腸直腸癌(CRC)患者でも発見されています。KRAS、NRAS、BRAF、PIK3CAまたは他の融合チロシンキナーゼなどの他の既知のドライバー遺伝子変異は存在しないCRCでは、RET融合遺伝子は発生率が0.2%で、新しいタイプの発がん性ドライバー遺伝子であると考えられます⁽⁵⁾。

現在、RETのみをターゲットとする特定の阻害剤はありません。抗RET活性が知られているマルチターゲットチロシンキナーゼ阻害剤は、すでに甲状腺髄様がん(カボザンチニブやバンデタニブなど)、特定の白血病(ボナチニブなど)、腎細胞がん(スニチニブやソラフェニブなど)に対して承認されています。これらの薬剤の多くで、現在、RETに関連するNSCLCを含む、複数種類のがん治療のために臨床試験が行われています⁽⁶⁾。RET融合遺伝子に対するターゲット療法は、他の治療選択肢がない患者、特に分子標的薬治療に関するアンメットニーズが満たされていない進行CRC患者に新しい治療アプローチを提供する可能性があります⁽⁵⁾。

Crown Bioscience RET融合遺伝子関連リソース

Crown Bioscienceには、一連の xenograft および細胞株のRET融合遺伝子プラットフォームがあり、薬剤開発の *in vitro* 試験と臨床効果の間を繋ぐ幾つかのモデルを提供します。

Crown Bioscienceは2,500以上患者由来異種移植(PDX)モデルを含む、最大の商用モデルコレクションを所有しています。HuPrime® PDXコレクションは、患者の腫瘍組織病理学を厳密に反映しており、臨床診断、患者の病歴、組織病理学、変異状態など、校閲された一連の患者およびサンプルに関するデータを含んでいます。HuPrime PDXモデルの10個の遺伝子に関する遺伝子発現データ(RNAシーケンシングまたはAffymetrix® Human Genome U219アレイプレートで測定)、コピー数(Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0を使用して測定)、およびホットスポット変異は、無料アクセス可能なオンラインPDXデータベースであるHuBase™から入手可能です。HuBaseは、当社のホームページ(www.crownbio.com)から直接アクセスできます。HuPrimeコレクションには、次のようなRET融合遺伝子を含む結腸直腸腺がんの3つのユニークなPDXモデルがあります:NCOA4-RET

融合遺伝子を含むCR1520、CCDC6-RET融合遺伝子を含むCR2518(当社のモデルでは、CRC患者サンプルから最初に報告された発がん性RET融合遺伝子)⁽⁷⁾、およびCR2518のRET阻害剤耐性誘導体であるCR2545。

PDX *in vivo* 研究を実施する際に、費用効果の高いハイスループット薬物スクリーニングとモデル選択に対応する *in vitro* 細胞培養システムが欠けていることが課題となります。そこで、ユニークなPDX腫瘍モデルからマウス間質細胞を取り除いた、初代がん細胞培養に由来する *in vitro* PrimePanel™細胞株コレクションを確立しました⁽⁸⁾。これらの細胞株はすべて初期継代(<10)であり、ゲノム変異状態、生化学的シグナル伝達、腫瘍細胞自身のターゲットに対する治療への応答など、元の患者の腫瘍の本質的な組織病理学的特徴と遺伝的プロファイルを維持しています。そのため、PrimePanelは、*in vivo* 試験の前である創薬の初期段階において、薬理効果を評価するための、高いスループット、速いターンアラウンド、より機能的かつ低コストのプラットフォームを提供します。

Crown Bioscienceは、CR1520 NCOA4-RET融合遺伝子PDXモデルからPrimePanel細胞株を入手し、2Dおよび3D *in vitro* アッセイで細胞株を検証しました。さらに、関連するPrimeXeno™モデルも開発されました。PrimeXeno *in vivo* モデルは、PK/PD分析など、1回のアッセイで多数の化合物をスクリーニングするための確実なシステムが必要な早期の創薬に最適です。

HuPrime RET融合遺伝子PDXモデル:CR1520およびCR2518モデルの背景

CR1520とCR2518に関する患者の背景情報、腫瘍病理診断、および完了したシーケンスデータを表1に示します。10個の一般的ながん関連遺伝子とがん抑制遺伝子の変異状態も検証され、各特定のモデルの遺伝子評価も表1に記載されています。この二つのPDXは、KRAS、BRAF、およびPI3Kのホットスポット変異に対して陰性であり(CR2518はRNAseqによりCTNNB1で変異が検出されています)、RET融合遺伝子がこれらの腫瘍の主要な発がんドライバーである可能性を示唆しています⁽⁷⁾。各腫瘍の病理診断は当社でQCを行い、PDXモデルは少数の継代で確立されています。表1にはQCデータが含まれ、表2には代表的なH&E染色画像(400x)が含まれています。他のPDX継代数の画像はHuBaseで入手できます。



HuPrime PDXモデルのRET融合遺伝子の発現レベル

すべてのHuPrime CRCモデルと比較した、PDXモデルCR1520およびCR2518のRETの発現レベルを図1に示します。ここでは、発現レベル3以上のCRCモデルのみが示されています。図1はAffymetrix Human Genome U219 Array Plateの遺伝子発現を示しており、RNAseqの遺伝子発現はHuBaseでも見ることができます。両方のモデルで高いRET発現が見られます、CR2518に由来するCR2545も同じです。

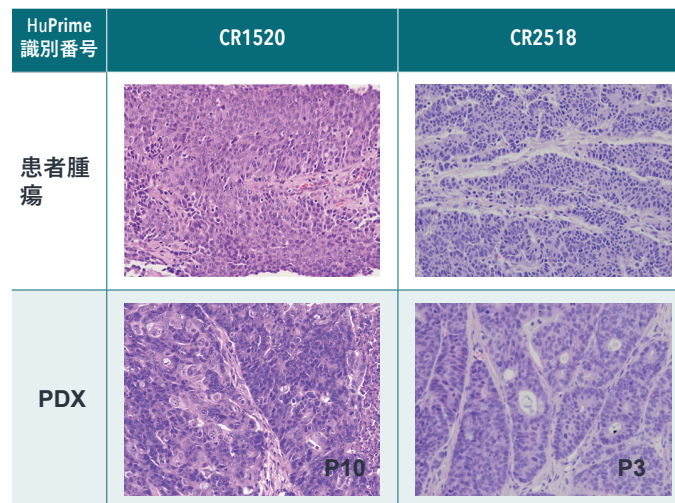
HuPrime PDXモデルのRET融合遺伝子のゲノム解析

PDXモデルのRET融合遺伝子はRNAシーケンシングによって同定されました(モデルに対する全ゲノムシーケンシングデータおよび融合遺伝子データはHuBaseで入手可能)。CR1520モデルには、NCOA4遺伝子のエクソン9とRET遺伝子のエクソン12にインフレームNCOA4-RET融合遺伝子が存在します。詳細については、図2を参照してください。患者の腫瘍とCR1520継代3代目にRT-PCR分析し、またモデルにダイレクトシーケンスすることに、融合タンパク質の存在が確認されました(図3)。CR2518モデルには、CCDC6遺伝子のエクソン8とRETのエクソン12にインフレームCCDC6-RET融合遺伝子が存在します

表1: HuPrime RET融合遺伝子を持つPDXモデルの背景要約

HuPrime 識別番号	患者の背景	腫瘍病理学的な診断結果	PDXの病理学的QC	ゲノムプロファイル	IHC	治療歴	がん関連遺伝子の変異状態例
CR1520 (NCOA4-RET)	アジア男性、82歳。	中-低度分化の腺がん	Pa, P2: 中-低度分化の腺がん	Affy U219 および SNP6.0データ (P2) RNAseq (P3)	NA	未治療	WT: AKT, BRAF, c-MET, CTNNB1, EGFR, ERK, KRAS, PIK3CA, PTEN, TP53
CR2518 (CCDC6-RET)	アジア女性、82歳。	上行結腸腺がん、潰瘍化、低分化、腸壁から周囲の脂肪組織へ浸潤。上部と下部の断端の近くに悪性細胞なし。局所リンパ節(LN):腸管傍LN(0/17)	Pa, P3: 低度分化の腺がん	Affy U219 および SNP 6.0 データ (P3) RNAseq (P2)	CK7(+/-) CK20(+++) Syn(+++) CD56(-) Ki-67(60%+) CerbB-2(-) VEGF(-) D2-40 (リンパ管+)	未治療	WT: AKT, BRAF, EGFR, ERK, KRAS, PIK3CA, PTEN, TP53 変異: CTNNB1 Arg565His

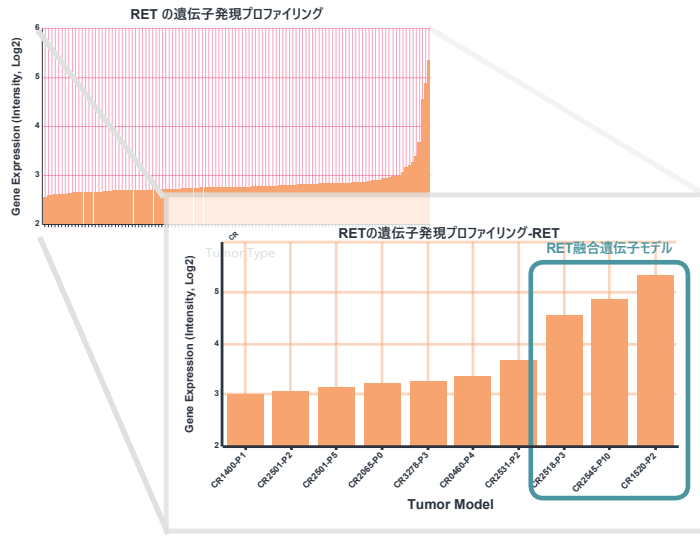
表2: HuPrime RET融合遺伝子を持つPDXモデルの病理学画像



元々の患者の腫瘍と継代数を最小限にしたPDXモデルからのH&E染色病理画像(400x)

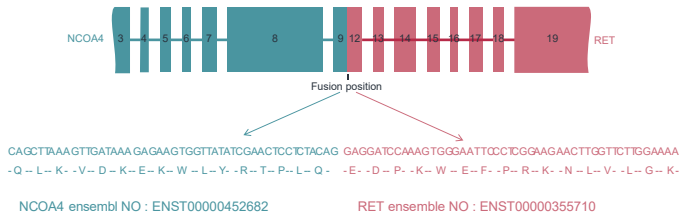


図1: HuPrime RET融合遺伝子PDXモデルの発現データ



全 HuPrime CRC PDXモデルでのRET遺伝子発現レベルの比較(Affymetrix Human Genome U219アレイプレート、probeset 5979_atを使用)、および発現レベル3以上のCRCモデル(overlaid panel)

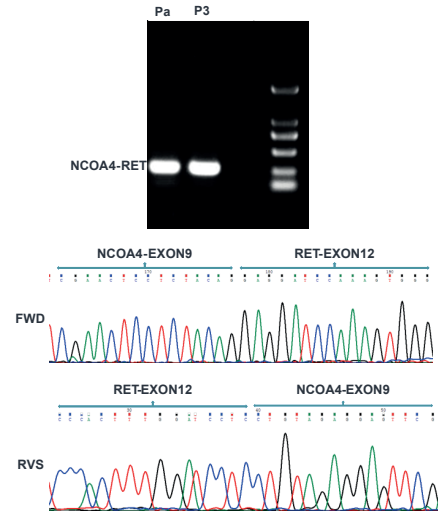
図2: HuPrime RET融合遺伝子PDXモデルのゲノム解析: CR1520遺伝子融合



NCOA4-RET融合タンパク質および関連する融合タンパク質配列の染色体10の位置。

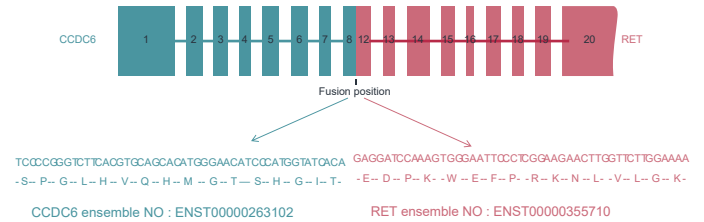
PDX model	Up stream Fusion Gene	Up stream Chromosome	Up stream Strand	Up stream Genome Junction Position	Down stream Fusion Gene	Down stream Chromosome	Down stream Strand	Down stream Genome Junction Position
CR1520	NCOA4	10	+	51586411	RET	10	+	43612032

図3: HuPrime RET融合遺伝子PDXモデルのゲノム解析: CR1520 RT-PCR分析とシーケンス



RT-PCRとCR1520のダイレクトシーケンスにより、NCOA4-RET融合遺伝子の存在が確認された

図4: HuPrime RET融合遺伝子PDXモデルのゲノム解析: CR2518遺伝子融合



CCDC6-RET融合タンパク質および関連する融合タンパク質配列の染色体10の位置。

PDX model	Up stream Fusion Gene	Up stream Chromosome	Up stream Strand	Up stream Genome Junction Position	Down stream Fusion Gene	Down stream Chromosome	Down stream Strand	Down stream Genome Junction Position
CR2518	CCDC6	10	-	v61554231	RET	10	+	43612032



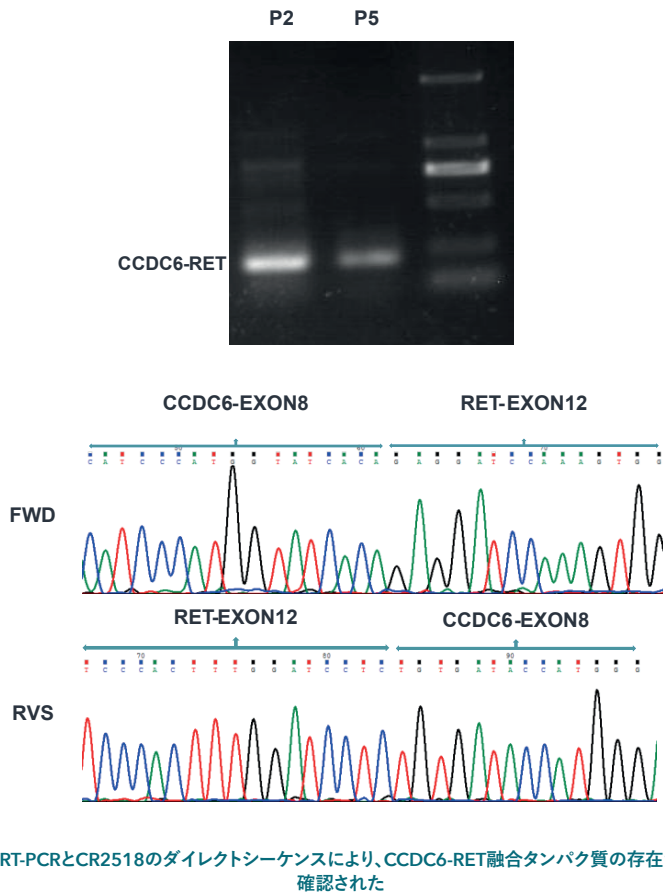
HuPrime RET融合遺伝子PDXモデルの治療データ

5-FUでCR1520および5-FUとイリノテカンを用いたCR2518に対する治療効果に関するデータはHuBaseに保存されています。CR1520モデルは5-FUに感受性があり、CR2518は5-FUに部分的にしか反応しませんが、イリノテカンには感受性があります。PDXモデルでもRET阻害剤で治療効果が見られ、CR1520とCR2518の両方が感受性を示しました(図6)。

RET阻害剤に耐性のあるRET融合遺伝子PDXモデルの確立

上記のように、CR2518モデルはRET阻害剤に感受性を示します。しかし、RET阻害剤AP24534による連続サイクルでの治療により、RET阻害剤耐性PDX変異体のCR2545においてこのRET阻害剤に対する耐性が生じました(図7)。このモデルを検証し、CCDC6-RET融合遺伝子がまだ存在していることを確認しました。そしてRNAseqのデータにより、獲得した耐性が、阻害剤の結合ドメインであるRETキナーゼドメイン(V804M)の新規変異によるものであることが分かりました。

図5: HuPrime RET融合遺伝子PDXモデルのゲノムプロファイル: CR2518 RT-PCR分析とシーケンス**p<0.01, ***p<0.001。



PrimePanel の RET融合遺伝子を持つ細胞株: CR1520

PrimePanel CR1520原発がん細胞株はCR1520 PDXモデルから派生し、NCOA4-RET融合遺伝子がまだ存在していることを確認しました(図8)。CR1520細胞株は、さまざまなRET阻害剤に感受性があることが示されています(図9)。

図6: HuPrime RET融合遺伝子PDXモデルCR1520およびCR2518はRET阻害剤に感受性を示す

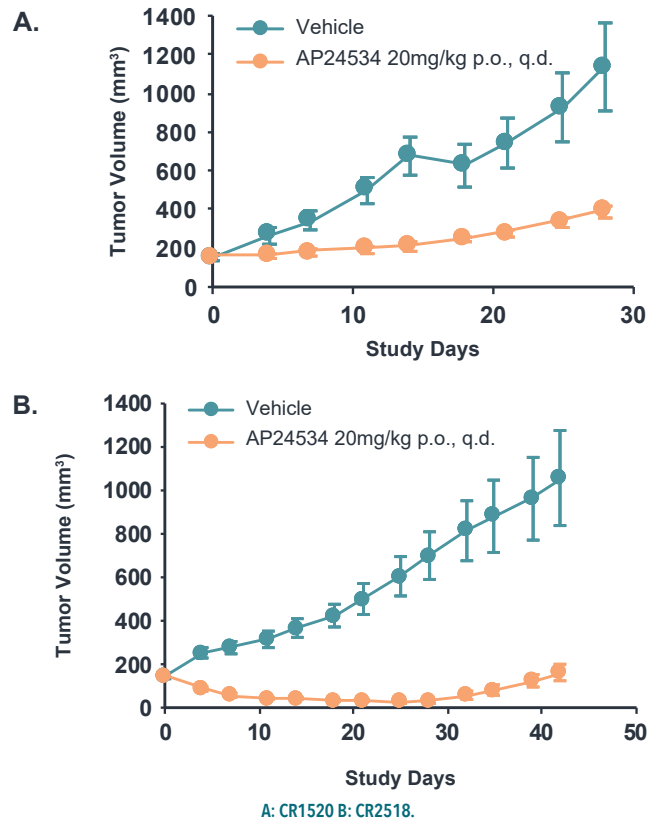
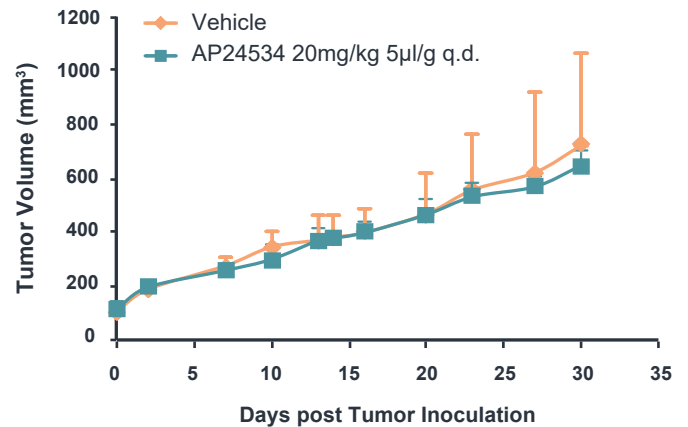


図7: HuPrime RET融合遺伝子PDXモデルCR2545はRET阻害剤に耐性を示す



PrimeXeno RET融合遺伝子 Xenograft:CR1520

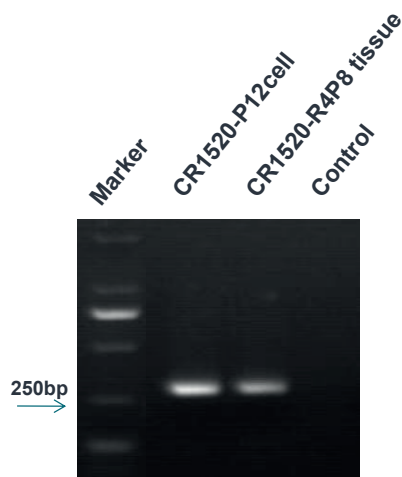
PrimeXeno *in vivo*モデルは、CR1520 Prime Panel細胞株を使用し、確立されました。この皮下異種移植モデルは、接種後に確実に成長しました(図10)。

結論

CRCおよび肺癌におけるRET融合遺伝子の最近の発見により、創薬のすべての段階でRET融合遺伝子モデル検証が必要になりました。Crown Bioscienceには、一連の異種移植および細胞株RET融合遺伝子プラットフォームがあり、薬剤開発の*in vitro*試験と臨床薬理効果の間で橋渡しが可能となります。

HuPrime PDXモデルは、CRC患者サンプルにおけるRET発がん性融合遺伝子の最初の事例を提供し⁽⁷⁾、進行CRC患者におけるNCOA4-RET融合遺伝子とCCDC6-RET融合遺伝子に関する事例を提供しています(5)。これらのモデルに関連し、RET融合遺伝子をターゲットとする治療法評価のためのXenograftを提供可能であり、RET阻害剤に応答性および耐性のあるモデルも提供することが可能です。

図8: PrimePanel RET融合遺伝子細胞株のゲノムプロファイル: CR1520 RT-PCR分析

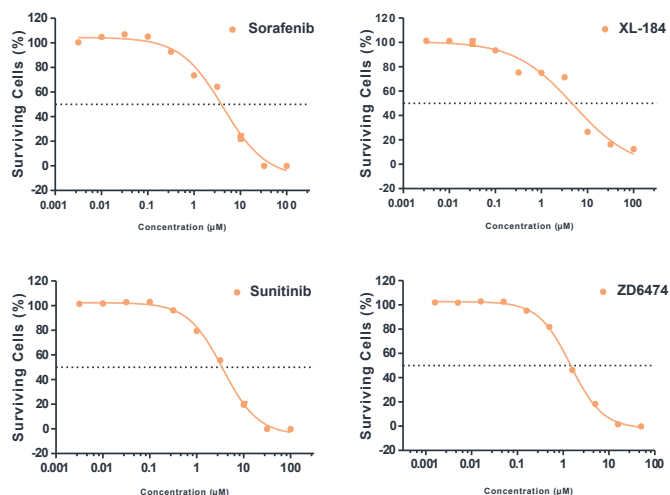


RT-PCRにより、NCOA4-RET融合産物(271 bp)が確認された

当社のPDXモデルは、PrimePanel細胞株の樹立にも使用されています。これら細胞株は費用効果の高いハイスループット薬物スクリーニングとモデル選択のための対応する*in vitro*細胞培養システムで利用可能です。また、PrimeXeno CDXモデルは、細胞株、CDX、PDXの完全なリソースプラットフォームに関連し、RET融合遺伝子に関するすべての研究ニーズに対応します。

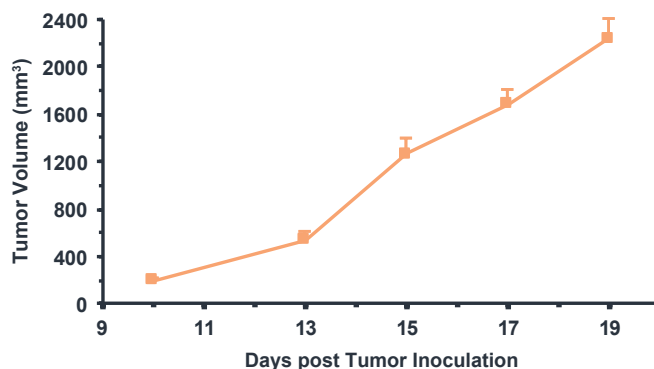
これらRET融合遺伝子リソースに関する情報、またはご質問がある場合、またはCrown Bioscienceの他の製品やサービスについて詳しく知りたい場合は、busdev@crownbio.comまでご連絡ください。

図9: HuPrime RET融合遺伝子細胞株CR1520はRET阻害剤治療に感受性を示す



RET 阻害剤	Sorafenib	Sunitinib	XL-184	ZD6474
IC ₅₀ (µM)	3.87	3.45	4.58	1.46

図10: PrimeXeno RET融合遺伝子 XenograftモデルCR1520の増殖曲線





参考文献

- 1 My Cancer Genome® RET Fusions in Thyroid Cancer
<http://www.mycancergenome.org/content/disease/thyroid-cancer/ret/127> Accessed 08 April 2016.
- 2 Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nature Medicine* 2012; 18(3): 375-377.
- 3 Takeuchi K, Soda M, Togashi Y et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nature Medicine* 2012; 18: 378-381.
- 4 Drillon A, Wang L, Hasanovic A et al. Screening for RET and ROS1 fusions in an enriched cohort of pan-negative never-smokers with advanced lung adenocarcinomas to identify patients for treatment in targeted therapy trials. *Journal of Clinical Oncology* 2013; 31:suppl abstr 8067.
- 5 Le Rolle A-F, Klempner SJ, Garrett CR et al. Identification and characterization of RET fusions in advanced colorectal cancer. *Oncotarget* 2015; 6(30):28929-28937.
- 6 Shaw AT, Hsu PP, Awad MM et al. Tyrosine kinase gene rearrangements in epithelial malignancies. *Nature Reviews Cancer* 2013; 13(11):772-787.
- 7 Gozgit JM, Chen T-H, Clackson T et al. RET fusions identified in colorectal cancer PDX models are sensitive to the potent RET inhibitor ponatinib [abstract]. In: Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2014 Apr 5-9; San Diego, CA. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Research* 2014; 74(19 Suppl):Abstract nr 2726.
- 8 Zhang Y, Ge Y, Liu Y et al. PrimePanel provides a high throughput in vitro drug screening platform that intimately links to in vivo pharmacological analysis in PDX models [abstract]. In: Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2013 Apr 6-10; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Research* 2013; 73(8 Suppl):Abstract nr 2787.

MBL 株式会社 医学生物学研究所

A JSR Life Sciences Company <https://crownmbi.co.jp/>

©学術部

〒105-0012

東京都港区芝大門2丁目11番8号 住友不動産芝大門二丁目ビル

TEL: +81-3-4363-1361 E-mail: consultation@crownmbi.co.jp

