

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6389124号
(P6389124)

(45) 発行日 平成30年9月12日(2018.9.12)

(24) 登録日 平成30年8月24日(2018.8.24)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/62	(2006.01)	C 12 N	15/62	Z N A Z
C 07 K	19/00	(2006.01)	C 07 K	19/00	
C 12 Q	1/686	(2018.01)	C 12 Q	1/686	Z
C 12 Q	1/6886	(2018.01)	C 12 Q	1/6886	Z
G O 1 N	33/50	(2006.01)	G O 1 N	33/50	Z

請求項の数 4 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-538724 (P2014-538724)
(86) (22) 出願日	平成24年10月31日 (2012.10.31)
(65) 公表番号	特表2015-504299 (P2015-504299A)
(43) 公表日	平成27年2月12日 (2015.2.12)
(86) 国際出願番号	PCT/KR2012/009056
(87) 国際公開番号	W02013/066047
(87) 国際公開日	平成25年5月10日 (2013.5.10)
審査請求日	平成27年10月9日 (2015.10.9)
(31) 優先権主張番号	61/553,483
(32) 優先日	平成23年10月31日 (2011.10.31)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	13/663,565
(32) 優先日	平成24年10月30日 (2012.10.30)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	503137827 マクロジェン・インコーポレーテッド 大韓民国・ソウル・153-801・グム チヨング・ガサンドン・60-24・ ワールドメリディアン・ベンチャー・セン ター・テヌス・フロア
(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RET蛋白質のC-末端ドメインを含む融合蛋白質及びその診断マーカーとしての用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N - 末端位置にN - 末端ドメインとして融合パートナー及びC - 末端位置にC - 末端ドメインとしてRET蛋白質(rearranged during transfection protein)を必須的に含む、融合蛋白質であって、前記RET蛋白質は、チロシンキナーゼドメインを含み、前記融合パートナーは、KIF5B蛋白質であり、前記KIF5B蛋白質は、二重螺旋ドメインを含む、融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子を、対象から得られた試験試料で探知する段階；

前記探知する段階において得られた結果を、前記融合遺伝子が試験試料から検出される場合には前記対象が癌患者であるという基準と比較することによって、前記対象が癌患者であるかどうかを試験する段階；

を含む。

肺ガン診断の情報を提供する方法であって、

前記融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子は、5' - G T G A A A C G T T G C A A G C A G T T A G - 3' (配列番号20)と5' - C C T T G A C C A C T T T C C A A A T T C - 3' (配列番号21)のプライマー対、または5' - T A A G G A A A T G A C C A A C C A C C A G - 3' (配列番号22)と5' - C C T T G A C C A C T T T C C A A A T T C - 3' (配列番号21)のプライマー対を用いて探知される、

方法。

10

20

【請求項 2】

前記融合蛋白質は、配列番号 3、7、11または15のアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記融合遺伝子は、配列番号 1、5、9または13のヌクレオチド配列を有する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

配列番号 1、5、9または13でそれぞれ配列番号 2、6、10または14の融合領域を含む連続的な 100 乃至 200 個のヌクレオチドを含むポリヌクレオチド断片を生成できるプライマー対、及び

10番染色体上逆位領域を含む連続的な 100 乃至 200 個のヌクレオチドを含むポリヌクレオチド断片を生成できるプライマー対

からなる群より選択された少なくとも 1 種以上を含む、

肺ガン診断用組成物であって、

前記プライマー対は、

5' - G T G A A A C G T T G C A A G C A G T T A G - 3' (配列番号 20) と 5' - C C T T G A C C A C T T T C C A A A T T C - 3' (配列番号 21) のプライマー対、または 5' - T A A G G A A A T G A C C A A C C A C C A G - 3' (配列番号 22) と 5' - C C T T G A C C A C T T T C C A A A T T C - 3' (配列番号 21) のプライマー対、または

5' - C A G A A T T T C A C A A G G A G G G A A G - 3' (配列番号 18) と 5' - C A G G A C C T C T G A C T A C A G T G G A - 3' (配列番号 19) のプライマー対であり、

前記 10 番染色体上逆位は、RET 遺伝子の特定の部位と、KIF5B 遺伝子の特定の部位とで起きるものである、

肺ガン診断用組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は N - 末端位置に N - 末端ドメインとして融合パートナー (fusion partner) と C - 末端位置に C - 末端ドメインとして RET 蛋白質 (rearranged during transfection protein) を含む融合蛋白質、前記融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子、及び前記融合蛋白質または融合遺伝子の癌診断マーカーとしての用途を提供する。

【背景技術】**【0002】**

肺ガンは癌による死亡において最も多い死者を発生させている。世界的に毎年 1.38 万人の死者を発生させている。従来の化学治療療法を使用しても、進行期の肺ガン患者の中間生存期間は診断当時から 1 年にもなっていない。喫煙は西方国家で肺ガンの主な危険要素としてよく知られており、全ての肺ガンの 85% 乃至 90% は喫煙によって発生する。しかし、世界肺ガン患者の約 25% は非喫煙者である。特に、アジア国家のデータを見てみると、全体肺ガンの 70 ~ 80% は非小細胞癌 (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) が占めており、このような非小細胞癌の 30 ~ 40% は非喫煙者が占めている。このような非小細胞癌で最も多く発見される組織学的形態は腺癌種 (adenocarcinoma) である (~70%)。

【0003】

非喫煙者の肺ガン発病は遺伝的及び厚生的变化に起因するよりは、一つの体細胞突然変異 (somatic mutation) が起こることによって発生するようになる場合が多い。去る数年間の非小細胞癌で EGFR、KRAS、及び ALKB 遺伝子 (一般に 'トリプルマーカー (三重標識者) (the triple-markers)' と呼ばれる

10

20

30

40

50

) の体細胞突然変異が報告された。まず非喫煙者及びアジア人の非小細胞癌と連関がある E G F R のチロシンキナーゼ (tyrosine kinase) ドメインの突然変異はゲフィチニブ (Gefitinib) のような E G F R 標的治療に敏感である。K R A S に存在するミスセンス突然変異 (missense mutation) は肺線癌腫 (lung adenocarcinoma) にかかった喫煙者からよく発見され、E G F R 抑制剤に対する抵抗性を有する。

【0004】

たとえいくつかの遺伝子突然変異が報告されているが、大部分の肺ガン患者の癌遺伝体 (genome) では何も発見されなかった。非小細胞癌の 40 % 以上は知らされていない遺伝的事件によって発病するところ、肺ガンを診断するさらに効果的な遺伝子マーカーの発見が必要である。10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】WO2008-031551

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は融合パートナーの N - 末端ドメイン及び R E T 蛋白質の C - 末端ドメインを必須的に含む融合蛋白質を提供する。また、K I F 5 B 蛋白質の N - 末端ドメインと R E T 蛋白質 C - 末端ドメインを必須的に含む K I F 5 B - R E T 融合蛋白質を提供する。20

【0007】

本発明の他の一実施形態は、前記融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子を提供する。

【0008】

本発明の他の一実施形態は、前記融合遺伝子を含む組み換えベクターを提供する。

【0009】

本発明の他の一実施形態は、下記のような方法の肺ガン診断方法を提供する：

10番染色体上逆位または転座を含む R E T - 関連再配列、他の蛋白質と融合された R E T 蛋白質が含まれている融合蛋白質、融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子、及び癌にかかるない個別対象から得られた標準試料に比べて R E T 過発現からなる群より選択された 1 種以上のものを対象から得られた試験試料で探知する方法、または前記群より選択された 1 種以上が試料で探知される時に前記対象を肺ガン患者と決定する方法。30

【0010】

他の一実施形態は、K I F 5 B - R E T 融合蛋白質を肺ガン診断マーカーとして用いる用途を提供する。

【0011】

他の一実施形態は、融合蛋白質または融合遺伝子を検出する化合物を含む、肺ガン診断用組成物を提供する。

【0012】

他の一実施形態は、1 種以上の融合蛋白質の抑制剤、1 種以上の融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子の抑制剤、1 種以上の R E T 暗号化遺伝子の抑制剤、またはこれらの結合を治療的に効果的な量だけ患者に投与する段階を含む、肺ガンを予防または治療する方法を提供する。40

【0013】

他の一実施形態は、1 種以上の融合蛋白質の抑制剤、1 種以上の融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子の抑制剤、1 種以上の R E T 蛋白質を暗号化する遺伝子の抑制剤、またはこれらの組み合わせを含む、肺ガン予防または治療用組成物を活性成分として提供する。

【0014】

他の一実施形態は、1 種以上の融合蛋白質の抑制剤、1 種以上の融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子の抑制剤、1 種以上の R E T 蛋白質を暗号化する遺伝子の抑制剤、または50

これらの組み合わせを含む組成物の、肺ガン予防または治療用途を提供する。

【0015】

また他の一実施形態は、下記の肺ガンに対する抗ガン剤をスクリーニングする方法を提供する：融合蛋白質を発現する細胞に試料化合物を処理し；融合蛋白質の細胞内発現水準を測定して、試料化合物を処理した細胞で融合蛋白質の発現水準が、試料化合物を処理する前の細胞、または処理しない細胞に比べて低くなつた場合、当該試料化合物を肺ガンに対する抗ガン剤候補物質と決定する。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者らは肺線癌腫患者の染色体逆位によって発生した融合遺伝子を同定して、本発明を完成した。融合遺伝子は子供と非喫煙者肺線癌腫患者でも発見され、これらの癌は従来知られたトリプルマーカー（EGFR、KRAS、及びALK遺伝子）に対しては陰性反応を示す。したがって、本発明の融合遺伝子は肺ガンの効果的なマーカーとして期待され、前記融合遺伝子は従来に知られたトリプルマーカーが機能を果たさない場合にもマーカーの機能を遂行することができる。

10

【0017】

一実施形態は癌細胞で特徴的に発見される融合遺伝子及び前記融合遺伝子によって暗号化される融合蛋白質を提供する。

【0018】

特に、融合パートナーのN-末端ドメイン及びRET蛋白質のC-末端ドメインを含む融合蛋白質を提供する。融合パートナーのN-末端ドメインは融合蛋白質のN-末端に位置し、RET蛋白質のC-末端ドメインは融合蛋白質のC-末端に位置し得る。本発明はRET蛋白質を含む融合蛋白質の存在は肺ガンを含む癌の進行と関係があるのを発見した。

20

【0019】

融合パートナーは融合蛋白質のN-末端に位置しているKIF5B蛋白質のN-末端ドメインであり得、このような場合、融合蛋白質はN-末端位置にN-末端ドメインとしてKIF5B蛋白質と、C-末端位置にC-末端ドメインとしてRET蛋白質を含む、KIF5B-RET蛋白質を代表することができる。

【0020】

30

他の一実施形態は融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子を提供し、前記融合遺伝子は5'末端に位置した融合パートナーのN-末端ドメインを暗号化する遺伝子、及び3'末端に位置したRET蛋白質のC-末端ドメインを暗号化する遺伝子を含むことができる。具体的な実施例で、融合蛋白質がKIF5B-RET蛋白質である場合、融合遺伝子はKIF5B-RET遺伝子によって代表され、前記KIF5B-RET遺伝子は5'末端に位置したKIF5BのN-末端ドメインを暗号化する遺伝子及び3'末端に位置したRET蛋白質のC-末端ドメインを暗号化する遺伝子を含むことができる。

【0021】

他の一実施形態は融合遺伝子及び選択的に融合遺伝子に作動可能に連結された転写要素（例：プロモーターのような）を含む発現ベクターを提供する。また他の実験例は発現ベクターによって形質転換された細胞を提供する。

40

【0022】

RET蛋白質は膜貫通受容体チロシンキナーゼ(transmembrane receptor tyrosine kinase)である。RETは、細胞外領域（カドヘリン(Cadherin)類似ドメインを含む）、膜貫通ドメイン、及びチロシンキナーゼドメインを含む細胞内領域から構成されている。RET蛋白質がグリア細胞由来神経栄養因子(glial derived neurotrophic factor、GDNF)のような共同受容体とリガンドに結合することによって二量化(dimerization)される時、前記RET蛋白質は自己リン酸化(auto-phosphorylation)によって活性化され、下流シグナル(downstream signal

50

a l i n g) 伝達を刺激する。R E T の下流シグナルカスケード (d o w n s t r e a m s i g n a l i n g c a s c a d e) は細胞の生存 (s u r v i v a l) / 細胞死滅 (a p o p t o s i s) 、増殖 (p r o l i f e r a t i o n) 、分化 (d i f f e r e n t i a t i o n) 、及び転移 (m i g r a t i o n) を調節するM A P K (m i t o g e n - a c t i v a t e d p r o t e i n k i n a s e) 経路である。R E T の正常発現は神経発達に重要であるが、組織の分化では活性化されないのが知られている。

【 0 0 2 3 】

R E T 蛋白質はヒトを含む哺乳類に由来し得る。ヒトR E T 蛋白質を暗号化するヒトR E T 遺伝子は10番染色体上に位置しており (1 0 q 1 1 . 2) 、種類によって19乃至21個のエクソンを含んでいる。ヒトR E T 蛋白質はN C B I (寄託番号N M _ 0 2 0 6 3 0 またはN M _ 0 2 0 9 7 5) によって代表されるヒトR E T 遺伝子から暗号化できる。

【 0 0 2 4 】

R E T 蛋白質のC - 末端ドメインはR E T 遺伝子の、例えばN M _ 0 2 0 6 3 0 またはN M _ 0 2 0 9 7 5 の、12番目エクソンから最後のエクソンの、例えば20番目エクソン、ポリヌクレオチドから暗号化されるアミノ酸配列を含むことができる。R E T 蛋白質のC - 末端ドメインは、12番目エクソンの開始位置から (例えば、N M _ 0 2 0 9 7 5 によって暗号化されるR E T 蛋白質の713番目位置) 、N M _ 0 2 0 6 3 0 またはN M _ 0 2 0 9 7 5 によって暗号化されるR E T 蛋白質のC - 末端に向かって、少なくとも約300個の連続的なアミノ酸を含むことができる。例えば、R E T 蛋白質のC - 末端ドメインは、12番目エクソンの開始位置から (例えば、713番目位置) 、N M _ 0 2 0 6 3 0 (19個のエクソン) またはN M _ 0 2 0 9 7 5 (20個のエクソン) によって暗号化されるR E T 蛋白質のC - 末端に向かって、連続的な約300乃至450個のアミノ酸、連続的な約300乃至420個のアミノ酸、または連続的な約300乃至402個のアミノ酸を含むことができる。

【 0 0 2 5 】

キネシン (K i n e s i n) - 1重鎖とも呼ばれるK I F 5 B 蛋白質はK I F 5 B 遺伝子によって暗号化される。K I F 5 B 蛋白質はヒトを含む哺乳類に由来し得る。ヒトK I F 5 B 蛋白質を暗号化するヒトのK I F 5 B 遺伝子は10番染色体 (1 0 q 1 1 . 2 2) 上に位置しており、26個のエクソンを含んでいる。ヒトK I F 5 B 蛋白質はヒトN C B I 、寄託番号N M _ 0 0 4 5 2 1 によって代表されるK I F 5 B 遺伝子によって暗号化される。

【 0 0 2 6 】

K I F 5 B 蛋白質のN - 末端ドメインはK I F 5 B 遺伝子 (例えば、N M _ 0 0 4 5 2 1) のポリヌクレオチドの1番目エクソンから16番目エクソン、1番目エクソンから15番目エクソン、または1番目エクソンから23番目エクソンから暗号化されたアミノ酸配列を含んでいる。K I F 5 B 蛋白質のN - 末端ドメインはN M _ 0 0 4 5 2 1 によって暗号化されるK I F 5 B 蛋白質の1番目位置から少なくとも約329個の連続的なアミノ酸を含んでいる。K I F 5 B 蛲白質のN - 末端ドメインはN M _ 0 0 4 5 2 1 によって暗号化されるK I F 5 B 蛲白質の329番目位置のアミノ酸から始まる2以上の二重螺旋ドメインをさらに含むことができる。例えば、2つの二重螺旋ドメインはN M _ 0 0 4 5 2 1 (配列番号21) によって暗号化されるK I F 5 B 蛲白質の329番目乃至638番目位置のアミノ酸配列をさらに有し得る。K I F 5 B 蛲白質のN - 末端ドメインはN M _ 0 0 4 5 2 1 によって暗号化されるK I F 5 B 蛲白質の1番目位置から、連続的な約329乃至900個のアミノ酸、連続的な約329乃至700個のアミノ酸、連続的な約329乃至650個のアミノ酸、または連続的な約329乃至638個のアミノ酸を含むことができる。

【 0 0 2 7 】

融合蛋白質で、融合は融合点 (f u s i o n p o i n t) または切断点 (b r e a k p o i n t) と呼ばれる、K I F 5 B 遺伝子の16番目エクソンとR E T 遺伝子の12

10

20

30

40

50

番目エクソンの間で起こる。“融合領域（fusion region）”という用語は融合点周辺のポリヌクレオチド断片（約～30個のヌクレオチドからなる）またはポリペプチド断片（約～30個のアミノ酸からなる）を意味する。

【0028】

本発明で使用されるエクソンの番号は、NCBIに位置したエクソンの番号によって番号を付けた。

【0029】

一例で、融合蛋白質KIF5B - RETは配列番号3、7、11または15のアミノ酸配列を有し得、配列番号3の629番目から648番目までの位置、配列番号7の629番目から648番目までの位置、配列番号11の566番目から585番目までの位置、及び配列番号15の839番目から858番目までの位置のポリペプチド断片は融合蛋白質KIF5B - RETの融合領域であり得る。前記融合蛋白質KIF5B - RETの融合領域は配列番号4、8、12または16のアミノ酸配列を有し得る。前記KIF5B - RET融合蛋白質を暗号化するKIF5B - RET融合遺伝子は配列番号1、5、9または13のヌクレオチド配列を有し得、配列番号1の1885番目から1944番目までの位置、配列番号5の1885番目から1944番目までの位置、配列番号9の1696番目から1755番目までの位置、及び配列番号13の2515番目から2574番目までの位置のポリヌクレオチドは、融合遺伝子KIF5B - RETの融合領域であり得る。融合遺伝子KIF5B - RETの融合領域は配列番号2、6、10または14のヌクレオチド配列を有し得る。前記融合遺伝子、融合蛋白質、及び融合領域は図27乃至34に示した。

10

【0030】

DNA分子のヌクレオチド配列、及びDNA分子によって暗号化されるアミノ酸配列は、自動化DNA配列分析機または自動化ペプチド配列分析機によって決定できる。自動配列分析方法によって決定されたヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は、実際配列と比較した時、部分的な間違いを有し得る。一般に、自動配列分析によって決定された配列は実際配列と比較して、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、または少なくとも約99.9%の同一性（sequence identity）を有している。したがって、融合蛋白質、融合遺伝子、または融合領域は配列番号1乃至17の配列と比較して少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、または少なくとも約99.9%の同一性を有するアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を有し得る。

20

【0031】

融合蛋白質と融合遺伝子は癌領域で特異的に存在し、癌領域周辺の他の領域では存在しないのが確認されたところ、これは融合蛋白質及び/または融合遺伝子は固形癌、特に肺ガンのような癌のバイオマーカーとしての用途に使用できるのを示唆する。さらに、10番染色体上で逆位や転座を含むRET - 関連染色体の再配列またはRETの過発現は癌細胞、特に肺ガン細胞でも発見される。

30

【0032】

また、また他の実験例は対象から得られた試験試料で、下記の群から少なくとも1種以上を探知することを含む、癌を診断する方法または癌診断用情報を提供する方法を提供する：

40

逆位または転座を含む、10番染色体でRET - 関連染色体の再配列；

融合パートナーのN - 末端ドメイン及びRET蛋白質C - 末端ドメインを含む融合蛋白質；

融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子；及び

肺ガンがかからない個人から得られた標準時料と比較してRETの過発現、

前記群より少なくとも1種以上が試験試料で探知された時、対象を癌患者と決定する。

【0033】

RET - 関連染色体の再配列は融合蛋白質または融合遺伝子の形成による結果であり

50

得る。例えば、RET - 関連染色体の再配列は、10番染色体上の逆位であり得る。前記10番染色体上の逆位は、10番染色体上の逆位領域と混成化（相補的結合）可能なポリヌクレオチド（プローブ）及び／または10番染色体上の逆位を探知可能なプライマー対、例えば、10番染色体上の逆位領域を含む連続的な100乃至200個のヌクレオチドを有しているポリヌクレオチド断片生成が可能なポリヌクレオチド断片を用いて探知することができる。例えば、10番染色体上の逆位は5' - CAGAATTTCACAAAGGAGGGAAAG - 3'（配列番号18）及び5' - CAGGACCTCTGACTACA GTGGA - 3'（配列番号19）から構成されたプライマー対を用いて探知することができる。

【0034】

10

融合蛋白質及び融合遺伝子は前述の通りである。

【0035】

具体的な実施例で、融合蛋白質は、融合蛋白質、融合遺伝子、または融合遺伝子に該当するmRNAの存在の検出から探知できる。

【0036】

融合蛋白質の存在は、融合蛋白質と融合蛋白質に特異的に結合する物質（例えば、抗体またはアブタマー）の間の相互作用を測定する一般的な分析方法によって探知できる。このような一般的な分析方法としては免疫クロマトグラフィー（immunochemical staining）、免疫組織化学的染色法（immunohistochemical staining）、酵素免疫抗体法（enzyme linked immunosorbent assay、ELISA）、放射免疫測定法（radioimmunoassay、RIA）、酵素免疫分析法（enzyme immunoassay、EIA）、蛍光免疫測定法（fluorescence immunoassay、FIA）、閃光免疫測定法（luminescence immunoassay、LIA）、ウエスタンプロット法（western blotting）、及び蛍光活性化細胞選択装置（fluorescence activated cell sorter、FACS）などの方法がある。

20

【0037】

また、融合遺伝子またはmRNAの存在は、融合遺伝子またはmRNAと混成化（相補的結合）可能なポリヌクレオチドを用いた、PCR、FISH（fluorescent in situ hybridization）などの一般的な分析方法によって検出できる。融合遺伝子は大規模並列配列分析法（massive parallel sequencing）技術を通じた、全長 - 転写体（RNA）及び／または全長 - 遺伝体（DNA）配列分析併合技術を用いて探知及び／または検証できる。融合遺伝子またはmRNAと混成化可能なポリヌクレオチドはsiRNA、オリゴヌクレオチド、DNAプローブ、またはDNAプライマーであり得、前記siRNA、オリゴヌクレオチド、DNAプローブ、またはDNAプライマーは試験試料で、融合されたまたは切断された、遺伝子または転写体との混成化を通じて融合遺伝子またはmRNAを検出することができる。

30

【0038】

40

融合遺伝子が、KIF5B - RET融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子KIF5B - RETである時、融合遺伝子KIF5B - RETは、配列番号2、6、10または14の融合領域と混成化（相補的結合）可能なポリヌクレオチド（プローブ）及び／または、配列番号1、5、9または13でそれぞれ配列番号2、6、10または14の融合領域を含む、連続的な100乃至200個のヌクレオチドを含むポリヌクレオチド断片を生成できるプライマー対を用いて探知することができる。例えば、融合遺伝子KIF5B - RETは5' - GTGAAACGTTGCAAGCAGTTAG - 3'（KIF5B；配列番号20）と5' - CCTTGACCACTTTCCAAATTC - 3'（RET；配列番号21）からなるプライマー対、または5' - TAAGGAAATGACCAACCA CAG - 3'（KIF5B；配列番号22）と5' - CCTTGACCACTTTCC - 50

A A A T T C - 3' (R E T ; 配列番号 21) からなるプライマー対を用いて探知することができる。また、融合蛋白質 K I F 5 B - R E T は融合蛋白質の K I F 5 B - R E T の融合領域に特異的に結合する抗体またはアプタマーを用いて探知することができる。例えば、融合蛋白質の融合領域は配列番号 4、 8、 12 または 16 のアミノ酸配列を有し得る。

【 0 0 3 9 】

前記 “ 融合領域（または逆位領域）と混成化可能な ” という用語は、相補的配列または相補的配列の融合領域（または逆位領域）と 90% 以上の同一性を有する配列を意味することができる。

【 0 0 4 0 】

また他の実験例は、配列番号 2、 6、 10 または 14 の融合領域と混成化可能なポリヌクレオチド、配列番号 1、 5、 9 または 13 の配列にそれぞれ配列番号 2、 6、 10 または 14 の融合領域を含む連続的な 100 乃至 200 個のヌクレオチドを含むポリヌクレオチド断片を生成できるプライマー対、 10 番染色体上の逆位領域と混成化可能なポリヌクレオチド、 10 番染色体上の逆位領域を含む 100 乃至 200 個の連続的なヌクレオチドを含むポリヌクレオチド断片を生成できるプライマー対、 及び配列番号 4、 8、 12 または 16 の融合領域に結合する抗体またはアプタマーからなる群より選択された 1 以上を含む癌診断用組成物を提供する。

例えば、プライマー対は融合蛋白質を暗号化する K I F 5 B - R E T 融合遺伝子を探知するための 5' - G T G A A A C G T T G C A A G C A G T T A G - 3' (K I F 5 B ; 配列番号 20) と 5' - C C T T G A C C A C T T T C C A A A T T C - 3' (R E T ; 配列番号 21) からなるプライマー対、 または 10 番染色体上の逆位を探知するための 5' - T A A G G A A A T G A C C A A C C A C C A G - 3' (K I F 5 B ; 配列番号 22) と 5' - C C T T G A C C A C T T T C C A A A T T C - 3' (R E T ; 配列番号 21) からなるプライマー対、 または 5' - C A G A A T T T C A C A A G G A G G A G - 3' (配列番号 18) と 5' - C A G G A C C T C T G A C T A C A G T G G A - 3' (配列番号 19) からなるプライマー対からなる群より選択された少なくて図 1 種以上のプライマー対である。

【 0 0 4 1 】

また他の実験例は融合蛋白質及び / または融合遺伝子の癌診断用途を提供する。

【 0 0 4 2 】

患者は任意の哺乳類、 例えば、ヒトまたは猿のような靈長類、 マウス (m o u s e) またはラット (r a t) のようななげっ歯類であり得、 特にヒトであり得る。

【 0 0 4 3 】

試験試料は患者（ 例えばヒト ）から分離された細胞（ 例えば肺細胞 ）、組織（ 例えば肺組織 ）、 または体液（ 例えば血液 ）であり得る。患者はキナーゼ抑制剤を処方を受けるか、 処方を受ける予定である。試験試料はヒトの癌細胞、 またはヒトの癌細胞抽出物に由来した細胞を含むことができる。

【 0 0 4 4 】

融合蛋白質及び / または融合遺伝子はガン治療のための標的として作用できる。

【 0 0 4 5 】

したがって、 また他の実験例は、 少なくとも 1 種以上の融合蛋白質の抑制剤、 少なくとも 1 種以上の融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子の抑制剤、 少なくとも 1 種以上の R E T 暗号化遺伝子の抑制剤、 またはこれらの結合を患者に薬学的に（ 治療的に ）効果的な量の投与段階を含む、 癌予防及び / または治療のための方法を提供する。前記方法は投与段階以前に予防及び / または治療が必要な患者を同定する段階をさらに含むことができる。

【 0 0 4 6 】

また他の実験例は癌の予防及び / または治療のために、 少なくとも 1 種以上の融合蛋白質の抑制剤、 少なくとも 1 種以上の融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子の阻害体、 少なくとも 1 種以上の R E T 暗号化遺伝子の抑制剤、 またはこれらの結合を含む組成物を提供

する。

【0047】

また他の実験例は融合蛋白質の抑制剤、融合蛋白質を暗号化する融合遺伝子の阻害体、R E T 暗号化遺伝子の抑制剤、またはこれらの結合を癌予防及び／または治療のための用途を提供する。

【0048】

K I F 5 B - R E T 融合蛋白質抑制剤は融合蛋白質に特異的に結合するアプタマー；融合蛋白質に特異的に結合する抗体；及びキナーゼ抑制剤（例えば、ソラフェニブ（s o r a f e n i b ）(4-[4-[[4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル]カルバモイルアミノ]フェノキシ]-N-メチル-ピリジン-2-カルボキサミド)、カボザンチニブ(Cabozantinib)(N-4-(6,7-ジメトキシキノリン-4-イル)オキシ)フェニル)-N-4-フルオロフェニル)シクロプロパン-1,1-ジカルボキサミドなど）からなる群より選択された1種以上であり得る。融合遺伝子またはR E T 暗号化遺伝子抑制剤は、融合遺伝子またはR E T 暗号化遺伝子に特異的に結合可能なs i R N A、s h R N A、m i R N A、及びアプタマーからなる群より選択された1種以上であり得る。

【0049】

本発明で、癌はいかなる固体癌、例えば、肺ガン、肝癌、大腸癌、すい臓癌、胃ガン、乳癌、卵巣ガン、腎臓癌、甲状腺癌、食道癌、前立腺癌、または脳腫瘍であり得る。具体的な実施例で癌は肺ガン、特に小細胞肺ガン(s m a l l c e l l l u n g c a r c i n o m a)または肺線癌腫、扁平上皮肺ガン(s q u a m o u s c e l l l u n g c a r c i n o m a)、または大細胞肺ガン(l a r g e c e l l l u n g c a r c i n o m a)のような非小細胞肺ガンであり得る。

【0050】

さらに、また他の実験例は次を含む抗ガン剤スクリーニング方法を提供する：

融合蛋白質を発現する細胞に試料化合物を接触させ；及び細胞内融合蛋白質の発現水準を測定する段階を含み、

前記試料化合物を処理した細胞内融合蛋白質の発現水準が、試料化合物を処理する前の細胞または試料化合物を処理しない細胞の融合蛋白質の発現水準に比べて減少した場合、前記試料化合物を抗ガン剤候補物質と決定する。

【0051】

前記抗ガン剤スクリーニング方法は、試料化合物を接触させる段階以前に、細胞内融合蛋白質の発現水準測定段階をさらに含むことができる。この場合、試料化合物を処理した後の融合蛋白質の発現水準が、試料化合物を処理する前の細胞の融合蛋白質の発現水準に比べて減少した場合、試料化合物を抗ガン剤候補物質と決定することができる。また他の抗ガン剤スクリーニング方法は、融合蛋白質を発現する細胞を提供する段階、及び試料化合物を提供された細胞の一部に接触させる段階を含むことができる。試料化合物を処理した細胞の融合蛋白質の発現水準が、試料化合物を処理しない細胞に比べて減少した場合、試料化合物を抗ガン剤の候補物質と決定することができる。

【0052】

前記スクリーニング方法で使用される細胞は、融合遺伝子または融合蛋白質が発現及び／または活性化された、癌細胞、細胞抽出物、または細胞培養に由來したものであり得る。前述のように、前記癌細胞は固体癌細胞、特に肺ガン、例えば肺線癌腫のような非小細胞肺ガン細胞であり得る。

【0053】

融合蛋白質の発現水準は免疫クロマトグラフィー(i m m u n o c h r o m a t o g r a p h y)、免疫組織化学的染色法(i m m u n o h i s t o c h e m i c a l s t a i n i n g)、酵素免疫抗体法(e n z y m e l i k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y、E L I S A)、放射免疫測定法(r a d i o i m m u n o a s s a y、R I A)、酵素免疫分析法(e n z y m e i m m u n o a s s a y、E I A)、蛍光

10

20

30

40

50

免疫測定法 (fluorescence immunoassay、FIA)、閃光免疫測定法 (luminescence immunoassay、LIA)、ウエスタンプロット法 (western blotting)、及び蛍光活性化細胞選択装置 (fluorescence activated cell sorter、FACS) のような一般的な分析方法を通じて探知することができる。

【0054】

試料化合物はいかなる天然化合物または合成化合物でもよい。例えば、一般的な化合物、DNA、RNA、蛋白質、及びこのような化合物からなる群より1種以上選択されたものであり得る。

【発明の効果】

【0055】

本発明は肺線癌腫患者の染色体逆位によって発生した融合遺伝子を同定し、融合遺伝子は子供と非喫煙者肺線癌腫患者からも発見され、これらの癌は従来に知られたトリプルマーカー (EGFR、KRAS、及びALK遺伝子) に対しては陰性反応を示す。したがって、本発明の融合遺伝子は肺ガンの効果的なマーカーとして期待され、前記融合遺伝子は従来に知られたトリプルマーカーが機能を果たさない場合にもマーカーの機能を遂行することができる。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】患者(AK55)のCT-誘導生検(CT-guided biopsy)を通じて得られた原発性肺ガン組織のパラフィン切片の100倍率顕微鏡写真である。

20

【図2】患者(AK55)のCT-誘導生検(CT-guided biopsy)を通じて得られた原発性肺ガン組織のパラフィン切片の400倍率顕微鏡写真である。

【図3】原発性肺ガン組織のCK7に対する免疫組織化学的分析結果を示す顕微鏡写真である。

【図4】原発性肺ガン組織のTTF1に対する免疫組織化学的分析結果を示す顕微鏡写真である。

【図5】原発性肺ガン組織のCK20に対する免疫組織化学的分析結果を示す顕微鏡写真である。

【図6】肺ガン転写体配列分析を通じて同定された融合遺伝子のグラフィック表現を示す。

30

【図7】KIF5B-RET融合遺伝子を概略的に示す。

【図8】各RETエクソンの、RNA発現水準を示すグラフである。

【図9】癌遺伝体の大規模並列配列分析法 (massive parallel sequencing) を通じた10番染色体上で10.6Mbの長さの逆位を概略的に示す。

【図10】KIF5B-RET融合遺伝子の確認のためのAK55のRNAのPCR増幅結果を示す。

【図11】KIF5B-RET融合遺伝子確認のためのAK55のDNAのPCR増幅結果を示す。

【図12】RNA確認のためのサンガー配列分析法 (Sanger sequencing) を通じた逆位切断点探知結果を示す。

40

【図13】DNA確認のためのサンガー配列分析法 (Sanger sequencing) を通じた逆位切断点探知結果を示す。

【図14】KIF5B-RET融合蛋白質の機能的ドメインを概略的に示す。

【図15】HYRE2アルゴリズムを通じて予測したKIF5B-RET融合蛋白質の3次元構造を示す。

【図16】患者(AK55)から得られた肺ガン(骨転移)でのKIF5B-RET発現の免疫組織化学的分析結果の顕微鏡写真を示す(×400)。

【図17】他の肺線癌腫(lung adenocarcinoma)でのRET発現分析結果を示すグラフである。

50

【図18】肝転移での遺伝子発現ネットワーク分析結果を示す。

【図19】正常細胞（A）と肺ガン細胞（B）のFISH分析結果を示す。

【図20】NIH3T3細胞株でのKIF5B-RET融合蛋白質の発現を示すウエスタンブロッティング結果である。

【図21】KIF5B-RET融合遺伝子に形質転換されたNIH3T3細胞株のコロニー形成能力を示す。

【図22】キナーゼ抑制剤、カボザンチニブ（Cabozantinib）を処理した状態でのKIF5B-RET融合遺伝子に形質転換されたNIH3T3細胞株での蛋白質発現水準を示す。 10

【図23】キナーゼ抑制剤、カボザンチニブ（Cabozantinib）を処理した状態でのKIF5B-RET融合蛋白質発現細胞の細胞成長率を示すグラフである。

【図24】肝転移性肺ガン（AK55）及びトリプルマーカー陰性の肺線癌腫（LC_S2）のゲル電気泳動イメージである。

【図25A】二重陰性肺線癌腫（LC_S6）のゲル電気泳動イメージである。

【図25B】LC_S6のサンガー配列分析法を用いたKIF5B-RET融合遺伝子の切断点同定結果である。

【図26】AK55、LC_S2及びLC_S6のKIF5B-RET融合転写体を概略的に示す。

【図27】KIF5B-RET融合遺伝子及びNM_020975に由来したKIF5Bドメインを含む融合領域のヌクレオチド配列を示す。 20

【図28】KIF5B-RET融合蛋白質及びNM_020975に由来したKIF5Bドメインを含む融合領域のアミノ酸配列を示す。

【図29】KIF5B-RET融合遺伝子及びNM_020630に由来したKIF5Bドメインを含む融合領域のヌクレオチド配列を示す。

【図30】KIF5B-RET融合蛋白質及びNM_020630に由来したKIF5Bドメインを含む融合領域のアミノ酸配列を示す。

【図31】LC_S2から得られたKIF5B-RET変種融合遺伝子の、ヌクレオチド配列及び融合領域を示す。

【図32】LC_S2から得られたKIF5B-RET変種融合蛋白質の、アミノ酸配列及び融合領域を示す。 30

【図33】LC_S6から得られたKIF5B-RET変種融合遺伝子の、ヌクレオチド配列及び融合領域を示す。

【図34】LC_S6から得られたKIF5B-RET変種融合蛋白質の、アミノ酸配列及び融合領域を示す。

【発明を実施するための形態】

【0057】

以下、本発明を実施例によって詳しく説明する。但し、下記の実施例は本発明を例示するものに過ぎず、本発明が下記の実施例によって限定されるのではない。

【実施例】

【0058】

実施例1：試料準備段階

実施例で使用された全てのプロトコルはソウル聖母病院（承認番号KC1101S10603）の臨床試験審査委員会によって承認されたものである。パラフィン包埋組織（Paraffin-embedded tissues）はAK55患者の原発性肺がん及び骨転移癌から得られた。また、AK55の肝転移性癌の生検（biopsy）を通じて得られた冷凍組織も用いることができた。また、AK55の静脈血を採取した。AK55患者の肺ガン、骨転移癌、肝転移癌、及び血液から遺伝体DNAを抽出した。さらに、AK55患者の冷凍された肝転移癌からRNAを抽出した。そして、本願発明に参考として引用された“Ju YS, Kim JI, Kim S, et al., Nat Genet 2011,”のように全体RNAからcDNAを合成した。 40 50

【0059】

A K 5 5 患者（肺線癌腫及び多発性転移を有する33歳の男患者）は33歳までは元気であったが、図1と図2に示すように肺の右上葉に低分化腺癌（adenocarcinoma）が発達していた。図1と図2はCT-誘導生体検査（ヘマトキシリソニン及びエオシン染色）を通じて得られた原発性肺ガン組織のパラフィン切片顕微鏡写真である（図1：x100；図2：x400）。ガン組織で、低分化腫瘍細胞巣が結合組織形成基質（desmoplastic stroma）に存在した。さらに、癌細胞は膨らんだ細胞質と大きい多形性核を有していた。

【0060】

PET (positron emission tomography) を通じて、肝と多数の骨でも転移が発見された。病理学的診断のために、彼は原発性肺がんのCT誘導生体検査（CT-guided biopsy）だけでなく肝転移性癌の超音波誘導生体検査（ultrasound-guided biopsy）もした。A K 5 5 患者は祖父母世帯から癌家族歴はなく、彼は喫煙したことがなかった。診断1週後、彼は頸椎（cervical bone）への転移によって首骨折され、そのためにC7頸椎体除去術（corpectomy）を受けた。病理学研究で、彼の肺線癌腫は、知られたEGFR、KRAS、及びALK突然変異に対して陰性反応を示した。CK7、CK20、及びTTF1に対する免疫組織化学的分析結果は肺線癌腫と一致した（図3乃至図5；CK7陽性（図3）、TTF1陽性（図4）、CK20陰性（図5））。

【0061】

図3乃至図5は原発性肺ガン組織（図3；CK7；図4；TTF1；図5；CK20）の免疫組織化学的結果を示す顕微鏡写真である。このような分析は頸椎に転移された腫瘍で行われた。CK7とTTF1は陽性であったが、CK20は陰性であった。結果は原発性肺線癌腫がこの癌の起源である可能性を高く示す。

【0062】

実施例2：全長遺伝体分析

前記実施例1の方法のように、A K 5 5 患者から得られたそれぞれ試料の遺伝体変種（Genomic variants）は単一塩基変異（single nucleotide variation、SNV）、短い挿入（short insertion）と欠失（挿入欠失、indel）、及び大量欠失（large deletions）に、本願発明に参考として引用された“Ju Y S, Kim J I, Kim S, et al., Nat Genet 2011”と“Kim J I, Ju Y S, Park H, et al., Nature 2009; 460: 1011-5”で叙述されたように、全長-遺伝体配列分析法（whole-genome sequencing）の修正された基準を用いて分類された。その後、ガン組織での前記遺伝体変種を癌-関連細胞突然変異を同定するために血液内の遺伝体と比較した。DNA及びRNA配列データも本願発明に参考として引用された“Ju Y S, Kim J I, Kim S, et al., Nat Genet 2011,”で叙述した方法で分析した。

【0063】

原発性肺がんのDNAはパラフィン包埋組織にある少量のDNAから抽出されるため、分析のための短い-リード重複（short-read redundancy）が高すぎた。したがって、主要比較は肝転移と血液の配列の間で行われた。配列分析実験は、イルミナ（Illumina）の標準方法、及び本願発明に参考として引用された“Ju Y S, Kim J I, Kim S, et al., Nat Genet 2011”と“Kim J I, Ju Y S, Park H, et al., Nature 2009; 460: 1011-5”で叙述された方法を用いて行った。

【0064】

配列ライブラリ（sequencing library）はイルミナ社（Illumina Inc.）の標準プロトコルによって作った。配列分析の高い処理量のために、パラフィン包埋骨転移からの遺伝体DNA（DNA濃度が低すぎ、発明者の基準に満た

10

20

30

40

50

されず配列ライブラリ構築をするには不適合)を除いた試料はイルミナ(Illumina)のHiSeq 2000とGenome Analyzer IIxを用いて配列分析した。AK55患者の癌(肝転移)及び正常組織(血液)の全長-遺伝体ディープシーケンシング(whole-genome deep sequencing)から、発明者らはそれぞれ47.77×と28.27×の平均リード-深さ(read-depth)を得た。表1は得られた結果を示す。肺ガン患者AK55の配列分析統計要約を表1に示した。

【0065】

【表1】

[表1]

分析	組織	出處	大量並列配列分析法				検証
			並んだリードの数	リードの長さ(b p)	処理量(G bp)	リード深さ(倍)	
遺伝体	血液	新鮮(Fresh)	392, 194, 564	103	80.79	28.27	ある
	肺がん	パラフィン包埋	274, 909, 815	103	56.63	19.81	ある
	肝転移	冷凍	362, 530, 401	101	136.55	47.77	ある
			293, 140, 533	108			
	骨転移	パラフィン包埋	—	—	—	—	ある
転写体	肝転移	冷凍	89, 682, 934	101, 68	15.16	—	ある

【0066】

全長-遺伝体範囲は均一に分散されていた(中心小体(centromeric)または末端小粒(telomeric)領域での正常‘スパイク(spikes)’除外)。これはガン組織で異数性の証拠がないのを示す(図6)。図6は肺ガンの転写体配列分析で同定された融合遺伝子の視覚的表現を示す。染色体内部、及び染色体間の融合遺伝子は中間層で観察される。線の厚さは証拠の量(spanning read)の数)を示す。KIF5B-RET融合遺伝子は赤色で表示された。染色体イデオグラム(ideograms)は外層で観察される。癌全長遺伝体配列分析の範囲は1番目中間層で観察される。このような結果は、癌遺伝体は広範囲な染色体の異数性を有していないのを示唆する。ヒットマップ(Heatmap)を用いた遺伝子の発現水準は2番目中間層で観察される。

【0067】

癌全長-遺伝体配列で、私たちはOMIM(Online Mendelian Inheritance in Man)及びSNPediaに保管されて知られたいかなる癌関連体細胞点突然変異(somatic point mutations)も見つけられなかった。癌と血液間のSNVs、挿入欠失、及びCNVs(copy number variants)の比較では発癌可能性がある癌関連遺伝子でのどんな眼に触れる突然変異も見つけられなかった。

10

20

30

40

50

【0068】**実施例3：融合遺伝子分析**

融合遺伝子を検出するために、転写体配列分析 (transcriptome sequencing)、他の遺伝子と並んでいるリード (read) の端に存在するディスコードントリード (discordant read)、及びキメリック転写体 (chimeric transcripts) の融合切断点を横切っているエクソン - スパニングリード (exon-splicing read) を使用した。最終融合遺伝子候補のために、相応する遺伝子の再配列、即ち、逆位、転座及び大量欠失、を全長遺伝子配列分析データを通じて調査した。

【0069】

10

転写体データが分析され、多くの癌は病原性染色体の転座または逆位による融合遺伝子によって由来すると知られているため、発明者らは融合遺伝子を見つけることに焦点を合わせた。

【0070】

融合遺伝子を見つけるために、それぞれ約300 bp の長さのcDNA断片の端を101 bpまで次世代塩基配列分析 (next generation sequencing) を通じて配列分析した (Ju YS et al., Genome Res. 2012 22: 436-445)。配列データから、私たちは他の染色体に整列されている配列の両端にあるディスコードントリードの存在を調査した。さらに、各最終の配列の一つは融合遺伝子の切断点から作られ、エクソン - スパニングリードの存在も調査した。ディスコードントリード及びエクソン - スパニングリードは融合遺伝子の存在を示す。ディスコードントリードとエクソン - スパニングリードを全て有する遺伝子を肺ガン融合遺伝子と決めた。

20

【0071】

AK55で同定された融合遺伝子の中で選択されたもの（52個のうちの20個）に対して融合遺伝子の確認方法を表2及び図6に示した。

【0072】

【表2】

[表2]

カテゴリ	供与遺伝子	受容遺伝子	染色体	距離 (M b)	ディスクーダントリードの数	スパングリードの数	栓長 - 遺伝体配列内の証拠
染色体内							
	KIF5B	RET	10	10.580	34	60	ある(逆位)
	KIF5B	KIAA1462	10	1.970	4	4	-
	EEDP3	FRY	13	0.133	3	5	-
	RPS6KB1	TMEM49	17	0.097	4	31	-
	HACL1	COLQ	3	0.075	3	4	-
	TMEM56	RWDD3	1	0.073	4	11	-
	FAM18B2	CDRT4	17	0.065	4	29	-
	CTBS	GNG5	1	0.065	6	27	-
	METTL10	FAM53B	10	0.054	2	4	-
	AZGP1	GJCG3	7	0.048	5	15	-
	NKX2-13	SFTA	14	0.046	3	7	-
	ADSL	SGSM3	22	0.036	5	6	-
	ART4	C120rf69	12	0.034	3	4	--
	LOC100131434	IDS	X	0.031	2	11	-
	LOC100130093	SNAP47	1	0.030	2	2	-
	C15orf57	MRPL42P5	15	0.025	2	7	-
	MIA2	CTAGE5	14	0.024	30	102	-
	SH3D20	ARHGAAP27	17	0.024	2	10	-
	RBM14	RBM4	11	0.023	16	24	-
染色体間							
	RSP01	HP	16;1	-	2	3	-

【0073】

これらの中、94.2% (n = 49) は隣接した遺伝子 (< 135 K b) の間の染色体間融合であり、これは発癌でいかなる機能的役割も有していないだろう(表2)。また、1.9% (n = 1) は染色体内融合であったが、これは肝で高く発現される遺伝子であるハプトグロビン (haptoglobin、HP) によって発生したものである。たとえ前記融合遺伝子の存在は生物学的に遺伝子の分子的機能と関連して興味深いが、これが腫

10

20

30

40

50

瘍形成をするとは考えられない。残った3.8% (n = 2) はKIF5B - RETとKIAA1462 - KIF5B融合遺伝子であり、これらの染色体内融合は離れている遺伝子 (> ~2 Mb) の間で発生した。この結果によってKIAA1462 - KIF5Bは除外された。なぜならKIAA1462 - KIF5Bの発現水準が低く、KIAA1462は分子機能が知られない仮想の蛋白質であるためである。KIF5B - RET融合を除いては、私たちは融合遺伝子候補内で染色体の再配列（例えば、大量欠失、逆位、または転座）に該当するものが見つけられなかった。

【0074】

RETはチロシンキナーゼガン原遺伝子 (proto-oncogene) とよく知られているため、最終融合遺伝子であるKIF5B - RETは特に興味がある。10 前記融合遺伝子はヒトの癌では報告されたことがない。さらに、それは新規なものと見なされる。この遺伝子融合事件の特性はRNA配列分析データを用いてさらに確認された。融合遺伝子は高く発現され、34個のディスコーダントペアード - エンドリードと60個のフュージョン - ジャンクション (fusion-junction) を横切るスパンニングリードによって立証された（表2及び図7）。図7はKIF5B - RET融合遺伝子を概略的に示す。転写体配列分析で、34個のディスコーダントペアード - エンド (discordant paired-end) リードと60個のエクソン - ジャンクション (exon-junction) を横切るスパンニングリードが同定された。このようなリードの存在は融合遺伝子の強力な証拠である。ディスコーダントペアード - エンドリードは末端配列が異なる遺伝子と整列されたリードと定義した。スパンニングリードは予測された融合転写体のジャンクションを横切って整列された末端配列を有するリードをいう。前記分析で、融合はKIF5Bの16番目エクソンとRETの12番目エクソンの間で起こった。

【0075】

このようなデータはKIF5Bの16番目エクソンの端とRETガン原遺伝子の12番目エクソンの開始が合わせられるのを示す。発現プロファイルはガン組織でRETの1番目乃至12番目エクソンは発現されないのを示し（図8）、これは癌での大部分のRET発現はそのままのRET遺伝子より融合遺伝子で起こるのを示す。図8はそれぞれのRETエクソンのRNA発現水準を示すグラフである。RET発現は12番目エクソン、即ち、融合遺伝子のジャンクションの下側で観察された。これは全てのRET発現は正常RET遺伝子よりKIF5B - RET融合遺伝子に由来したのを提示する。20

【0076】

KIF5BとRETはそれぞれ10p11.22と10q11.21に10.6 Mbだけ離れて存在する。二つの遺伝子を暗号化するストランドが異なるため、融合遺伝子を作られるためには10.6 Mbの長さの逆位が起らなければならない（図9）。図9は10番大規模並列配列分析法 (massive parallel sequencing) を通じた癌遺伝体の染色体での10.6 Mbの長さの逆位を概略的に示す。このような逆位はKIF5B - RET融合遺伝子の原因である。KIF5Bは一般に自身のユニバーサルプロモーターと共に発現される。逆位が起こった後、前記プロモーターはKIF5B - RET融合遺伝子のグローバル発現を活性化する。

【0077】

前記遺伝体の逆位は癌で逆位（肝転移に8個のリード；原発性肺がんに1つのリード）を裏付けるリードの検出を通じて確認された。しかし、血液組織の全体遺伝体配列分析では相応する染色体の再配列がなかった。

【0078】

前記結果は遺伝体のDNAとcDNAをPCR增幅とサンガー配列分析法を通じた分析を用いてさらに立証された。PCR反応は95度10分間、95度30秒間30サイクル、62度10秒間、72度10秒間、最後に72度10分間行った。遺伝体の逆位のためのPCR及びサンガー配列分析法プライマーは5' - CAGAACCTTCA - 3' (配列番号18) と 5' - CAGGACCTCTGAC - 3' (配列番号19) であった。融合転写体のためのプライマーは

10

20

30

40

50

5' - G T G A A A C G T T G C A A G C A G T T A G - 3' (配列番号20) と 5' - C C T T G A C C A C T T T T C C A A A T T C - 3' (配列番号21) である。全てのサンガー配列分析法 (Sanger sequencing) 実験はマクロジエン (Macrogen Inc.) (<http://www.macrogen.com>) で実施した。

【0079】

A K 5 5 患者 (肺ガン、骨と肝に転移) の三つの癌関連組織は正常血液を除いた全てが P C R 生成物は逆位の結果であるのを示す (図10及び図11)。図10及び図11は A K 5 5 患者から得られた R N A (図10) と D N A (図11) の K I F 5 B - R E T 融合遺伝子確認のための P C R 増幅結果である。R N A 及び D N A での K I F 5 B - R E T 融合遺伝子の確認は前述の逆位に特異的なプライマーを用いた P C R 増幅及び及び電気泳動を通じて行われた。融合遺伝子患者の癌組織の R N A と D N A のみから発見された。

10

【0080】

これら結果物のサンガー配列分析はヌクレオチド分解を有する逆位の切断点を見つけることによって融合転写体を検証した (ヒト委託遺伝体ビルド36.3 (human reference genome build 36.3) の c h r 1 0 : 3 2, 3 5 1 、 3 0 6 - 4 2, 9 3 1, 6 0 1)。図12と13はR N A (図12) と D N A (図13) の検証のためのサンガー配列分析法を通じた逆位切断点の探知結果を示す。融合遺伝子はサンガー配列分析法を用いて成功的に確認された。遺伝体にある逆位切断点はまたシングル - ヌクレオチドレゾリューション (single-nucleotide resolution) で確認された。遺伝体の切断点は K I F 5 B と R E T のイントロン (intron) に位置している。切断点 (ヒト委託遺伝体ビルド36.3の c h r 1 0 : 4 2 、 9 3 1, 6 0 4) から 2 つの塩基ダウンストリーム (downstream) に、 1 - b p 欠失が作られ、これは N H E J (error-prone non-homologous end joining) が、二重鎖 D N A の切断以後に発生した前記逆位から起因した可能性があるのを提示する。

20

【0081】

興味深いことに、単一塩基対欠失は切断点 (c h r 1 0 : 4 2, 9 3 1, 6 0 4) に 2 b p 隣接したところで同定され、これはエラー - プローン (error-prone) D N A 修復メカニズム、即ち、N H E J、この二重鎖 D N A の切断以後に発生した前記逆位から起因した可能性があるのを提示する。これに加えて、G - q u a d r u p l e x (non-B D N A) 構造は R E T に存在する、こわれやすく染色体の転座の根源と知られた切断点の、~1 0 0 b p アップストリーム (upstream) にあると予想される。

30

【0082】

実施例4：K I F 5 B - R E T 融合キナーゼの機能性評価

R E T 腫瘍遺伝子は膜貫通受容体チロシンキナーゼ (transmembrane receptor tyrosine kinase) である。R E T は細胞外領域 (C a d h e r i n - l i k e ドメインを含んでいる)、膜貫通ドメイン及びチロシンキナーゼドメインを含む細胞内領域から構成されている (図14)。図14は K I F 5 B - R E T 融合蛋白質の機能的なドメインを概略的に示す。融合蛋白質は K I F 5 B の 6 3 8 N - 末端残基及び R E T の 4 0 2 C - 末端残基から構成されている。融合遺伝子は二重螺旋ドメインを含んで蛋白質チロシンキナーゼドメインを有している。二重螺旋ドメインは自己リン酸化によって発ガン性蛋白質チロシンキナーゼドメイン (oncogenic protein tyrosine kinase domain) を活性化させることができると種二量化 (homo-dimerization) を誘発する。

40

【0083】

R E T が G D N F のような共同受容体やリガンドに結合することによって二量化される時、自己リン酸化によって活性化され、下流シグナル伝達を刺激する。R E T ガン原遺伝子の下流シグナルカスケード (downstream signaling cascade) は細胞生存 / 細胞死滅、増殖、分化、及び転移を調節する M A P K 経路である。

50

RETの正常発現は神経発達に重要であるが、分化した組織では活性化されないのが知られている。

【0084】

KIF5Bは微小管依存性モータ(microtubule-based motor)蛋白質であり、普遍的にKIF5Bの活性化プロモーターによって発現され、真核細胞内の細胞小器官の輸送に参加する。KIF5Bの二重螺旋ドメインは自分の動きに必須の同種二量化を誘導する。

【0085】

図15はPHYRE2アルゴリズムを用いて予測したKIF5B-RET融合蛋白質の3次元構造を示す。融合蛋白質のN-末端及びC-末端は赤色と青色で表示された。それぞれ蛋白質3DモデリングはKIF5B-RET融合遺伝子の蛋白質配列を用いたPHYRE2ソフトウェアで遂行された(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>)。

【0086】

これと同様に、KIF5B-RET融合遺伝子は高く発現され、その後、KIF5Bによって翻訳された後に二量化される(図14及び15)。その後、二量化されたRET蛋白質チロシンキナーゼドメインは非正常的に刺激され、これにより発癌経路の磁極が促進される。免疫組織化学的分析はRETのチロシンキナーゼドメインは肺ガン組織で高く発現されたのを示す(図16)。図16は患者(AK55)の肺ガン(骨転移)でのKIF5B-RET発現を免疫組織化学的分析した結果を示す顕微鏡写真である(×400)。蛋白質が腫瘍細胞で独占的に観察されたことは、KIF5B-RET融合蛋白質は癌で重要な役割を果たすのを意味する。

【0087】

実施例5：他の肺ガン試料でのRET過発現頻度評価

RETの発ガン性効果はPTC/RET融合蛋白質の形成を主導する、多様な種類の染色体の転座と逆位がある、甲状腺乳頭状癌(papillary thyroid carcinoma、PTC)で初めて確認された。特定の点突然変異も多発性内分泌腫瘍症(multiple endocrine neoplasia、MEN)2Aと2Bタイプでドライバー(driver)として報告された。また、活性化されたRETが前立腺癌、すい臓癌、悪性黒色腫で観察された。前記RETの腫瘍生成能力もRET形質転換されたネズミ研究で多様な種類の悪性腫瘍を作り出すことによって裏付けられる。しかし、前記RET遺伝子は従来の肺ガンでは強調されなかった。

【0088】

肺線癌腫でのRET過発現頻度はデータベースに保管されている従来マイクロアレイデータを用いて評価した。特に、一般的な肺線癌腫(lung adenocarcinoma)でのRET過発現を調査するために、私たちはデータベース(遺伝子発現オムニバス(Omnibus)：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>と癌ゲノムアトラス(The Cancer Genome Atlas、TCGA)：<http://cancergenome.nih.gov/>)に保管されている肺線癌腫の発現プロファイルを分析した。

【0089】

10個の腺癌種細胞株(GemmA, LiC, SugiyamY, et al., BMC Cancer 2006; 6: 174)の発現プロファイルは二つの試料でRETが高く発現されたのを示す。反面、RETは本データセットの10個の小細胞癌細胞株と9個の扁平細胞癌腫(squamous cell carcinoma)細胞株で活性化されなかった。私たちは原発性肺がんでのRETガン原遺伝子発現をプロファイルした3つの研究をさらに発見した。第一の研究のデータセットで(Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al., Nature 2008; 455: 1069-75)、75個のうちの6個の腫瘍(8%)でRETが過発現した。また他のデータセット(Kuner R, Mulley T, Meister M,

10

20

30

40

50

et al., Lung Cancer 2009; 63: 32 - 8) は 40 個のうちの 5 個の試料 (12.5%) で RET 活性を示した。最後に、癌ゲノムアトラス (The Cancer Genome Atlas、TCGA) データセットは 32 個のうちの 3 つの試料 (9.4% ; 図 17) で RET 過発現を示した。図 17 は他の肺線癌腫で RET 発現分析結果を示すグラフである。TCGA (The Cancer Genome Atlas) に寄託されている 32 個の発現マイクロアレイデータを分析した。これらのうちの 3 つの試料は明白な RET 過発現を示し、これは肺線癌腫での過発現頻度は約 10 % であるのを提示する。

【0090】

これと共に、前記結果は肺線癌腫で RET 過発現頻度は ~10 % であるのを提示する。
。

【0091】

図 18 は肝転移での遺伝子発現ネットワーク分析結果を示す。ネットワーク分析は MiMI plugin (<http://mimiplugin.ncbi.org/>) と共に Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) を用いて行われた。癌で遺伝子が過発現されることとはネットワークでマッピングされ、ノードの大きさは相対的な発現に比例する。主な官能基は標識され、機能的に重要な遺伝子は赤色で標識された。

【0092】

実施例 6 : FISH 分析を通じた KIF5B - RET 融合遺伝子の同定

RET 再配列を同定するために、FISH を AK55 細胞株と対照群として正常細胞に、RET のためにブレイク - アパートプローブ (break-apart probe) を用いて行った。スライドは CitriSolve (Fisher Scientific、Pittsburgh、PA) に 15 分間浸漬させ、ジェット空気で乾燥させた後、再びルゴール溶液 (Lugol solution) に 5 分間浸漬させた。その後、2.5 % チオシアン酸ナトリウム (sodium thiocyanate) に 30 秒間浸漬させた。その後、スライドをクエン酸塩 / クエン酸 (citrate/citric acid) 溶液 (pH 6.0) 10 mmol/L に位置させ、5 分間高い設定でマイクロウェーブ (microwave) し、次いで 37 °C で 15 乃至 45 分間 0.4 % ペプシン溶液 (pepsin A / 0.9% sodium chloride at pH 1.5) でマイクロウェーブする。10 マイクロリットルの FISH 試薬 (7 μl LSI buff-fer [Vysis, Downers Grove, IL]、3 μl プローブ) をそれぞれのスライドに入れた後、スライドにカバースライドをかぶせる。Hybrite (Vysis) で融点 80 °C で 5 分間変成させ、湿度室 (humidified chamber) 内で 37 °C で 12 時間インキュベーティングした。スライドを 2X SSC (saline sodium citrate) / 0.1% NP40 (US Biological, Swampscott, MA) で 70 °C で 2 分間洗浄した後、DAPI (4,6-diamidino-2-phenyl indole dihydrochloride) と対照した。細胞はマイクロスコピスト (microscopist) によって適切なフィルターセットが装着された蛍光顕微鏡を用いて分析された。染色体逆位、即ち、推論された染色体の再配列は KIF5B - RET 融合に責任がある。得られた FISH 結果は図 19 で示され、赤色と緑色プローブの、KIF5B - RET 融合陽性腫瘍に側面 (flank) RET 転座サイト分裂を示す (矢印)。

【0093】

実施例 7 : KIF5B - RET 融合遺伝子に形質転換された哺乳類細胞の細胞成長率及び生存力実験

NIH3T3 細胞を KIF5B - RET 融合蛋白質を暗号化し KIF5B - RET 融合蛋白質を発現させる cDNA が含まれたコンストラクト (construct) に形質転換させることによって、KIF5B - RET 融合蛋白質の発現が正常細胞を腫瘍細胞に変換させるのに寄与するか否かは確実になった。NIH3T3 細胞 (ATCC / ATCC

10

20

30

40

50

Number CRL-1658)は10% (v/v)牛胎児血清 (fetal bovine serum、FBS; Gibco BRL)、ペニシリン、及びストレプトマイシンが含まれているDMEM培地 (Gibco BRL)で保管された。レトロウイルスの上清液準備と形質転換はCELL BIO LABsから購入したPlatinum Retrovirus Expression Systemが提供するプロトコルにより行われた。NIH3T3細胞はpMXs-puro/Fusion蛋白質発現ベクターを含むレトロウイルスの上清液を通じて形質導入し、その後に形質導入された細胞をピューロマイシン (2ug/ml)を用いて選別した。細胞株からの全ての細胞溶解物はSDS-PAGE遂行後、PVDF (polyvinylidene difluoride) メンブレンの上にプロッティングをした。プロッティングは0.1%ツイン20と5% BSAが含まれているTBSで遮断され、anti-RET (#3223, Cell signaling, USA)、anti-phospho-RET (Tyr905) (#3221, Cell signaling, USA)、及びanti-actin (A5441, Sigma-Aldrich, USA)で探索した。0.1%ツイン20が含まれているTBSで洗浄後、メンブレンはワサビダイコン過酸化酵素 (西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase)) 結合された抗マウス (anti-mouse) または抗ウサギ (anti-rabbit) 2次抗体と共にインキュベートし、ECL (enhanced chemiluminescence reagent; Pierce, #34080) を処理した。得られた結果は図20に示し、選別されたNIH3T3細胞が安定的にKIF5B-RET融合遺伝子に形質転換されたのをウエスタンプロット法を通じて示す。

【0094】

FBSが含まれるかまたはFBSが含まれない培地で、NIH3T3両親世帯細胞とKIF5B-RETaを発現するNIH3T3安定した細胞株、またはKIF5B-RETc融合遺伝子 (NIH3T3/KIF5B-RETa, NIH3T3/KIF5B-RETc) 細胞の成長率を測定し、それぞれを比較した。NIH3T3細胞とNIH3T3/KIF5B-RET細胞はFBSが含まれている培地とFBSが含まれない培地でそれぞれ24時間培養した。その後に得られたイメージを図21に示した。図21で示されているように、形質転換されないNIH3T3細胞の成長率はFBSが含まれない培地で抑制されたが、KIF5B-RET融合遺伝子に形質転換されたNIH3T3細胞はFBSが含まれない培地でも成長し、コロニーをよく形成した。前記結果はKIF5B-RET融合蛋白質の発現はNIH3T3細胞の特性を変化させ、KIF5B-RET融合遺伝子に形質転換された細胞はKIF5B-RET融合蛋白質のためにFBSが不足した培地のような非正常条件でも生存と成長可能であるのを示す。

【0095】

実施例8：融合蛋白質抑制剤 (カボザンチニブ (Cabozantinib))による哺乳類固形癌細胞成長阻害試験。

融合蛋白質が融合蛋白質を発現する細胞株 (または腫瘍細胞) の成長及び生存を刺激するかに対する効果を確認するために、細胞株にキナーゼに対する阻害剤または融合蛋白質に含まれている他のドメインに対する阻害剤を処理した。

【0096】

特に、KIF5B-RETに形質転換されたNIH3T3細胞 (NIH3T3/KIF5B-RET) (実施例7) に、図22で示されるように、カボザンチニブ (Cabozantinib) (4Chem、韓国) を多様な濃度で2日間処理した。そして、RET、phospho-RET、及びアクチン (actin) の発現水準 (対照群) を相応する抗体を用いた免疫プロッティングを通じて測定した。抗RET (anti-RET) 及び抗ホスホRET (anti-phospho-RET) (Tyr905) 抗体はそれぞれセルシグナリングテクノロジー (Cell Signaling Technology) (#3223, #3221) から入手した。抗アクチン (anti-actin) 抗体はシグマアルドリッヂ (Sigma Aldrich) (#A5441) から入手し

た。

【0097】

得られた結果は図22に示し、RETの活性化された形態であるphospho-RETの発現がカボザンチニブ(Cabozantinib)の濃度によって減少することを示す。前記結果はRET蛋白質が融合蛋白質形質転換された細胞で非正常的に活性化されたのを示し、融合蛋白質形質転換された細胞の成長はキナーゼ抑制剤を処理することによって阻害できるのを示す。

【0098】

細胞成長阻害に対する定量的分析のために、融合蛋白質を発現する細胞の数を数えてみて、細胞成長阻害は製造者が提供したプロトコルによってWST-1 solution cell proliferation assay(Roche)を用いて分析した。KIF5B-RETに形質転換されたNIH3T3細胞を約1000乃至5000個を96-wellプレートにシード(seed)し、10%(v/v)FBSが供給された完全培地(DMEM、Gibco)で培養した。24時間が経過した後、図23で示されるように培地を10%(v/v)FBSと100nM濃度のカボザンチニブ(Cabozantinib)が含まれている完全成長培地100μlに交替した後、細胞を72時間さらに培養した。細胞培養最後に、それぞれのwellにWST-1溶液を10μl添加し、1乃至3時間さらに培養を実施した。450nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(microplate reader)を用いて測定した。成長阻害はカボザンチニブ(Cabozantinib)を処理した細胞と処理しない細胞で測定された吸光率の平均±SD値を比較して評価した。分析は3回実施し、得られた結果は図23に示した。図23で示されるように、KIF5B-RET融合蛋白質は細胞成長率増加とヒト腫瘍細胞(NSCLCなど)の細胞生存に寄与し、融合蛋白質阻害剤は細胞生存減少及び細胞死滅増加につながる可能性がある。

【0099】

実施例9：他の患者らでKIF5B-RET融合遺伝子の検出

他の原発性肺線癌腫でもKIF5B-RET融合遺伝子がまた存在するのを示すために、追加的に3重陰性(EGFR、KRAS、及びML4-ALKに陰性)原発性肺線癌腫の転写体を大規模並列配列分析法を用いて分析した。追加された試料はLC_S2(肺線癌腫3A期診断を受けた62歳男患者)と命名した。LC_S2試料を実施例1での方法で準備した。KIF5B-RET融合転写体がLC_S2で発見された。表3で示すようにLC_S2にある12番目エクソンで、RETがAK55と同様に高く発現された。
exon-by-exon RET発現を表3に示した。

【0100】

10

20

30

【表3】

[表3]

gene	accession	chrom	exon	start	end	length	strand	AK55	LC_S2	
RET	NM_020630	10	exon1	43572516	43572779	263	+	0.03	0.10	10
RET	NM_020630	10	exon2	43595906	43596170	264	+	0.00	0.38	
RET	NM_020630	10	exon3	43597789	43598077	288	+	0.18	0.68	
RET	NM_020630	10	exon4	43600399	43600641	242	+	0.06	0.41	
RET	NM_020630	10	exon5	43601823	43602019	196	+	0.07	0.32	
RET	NM_020630	10	exon6	43604478	43604678	200	+	0.24	0.33	
RET	NM_020630	10	exon7	43606654	43606913	259	+	0.14	0.43	
RET	NM_020630	10	exon8	43607546	43607672	126	+	0.11	0.00	
RET	NM_020630	10	exon9	43608300	43608411	111	+	0.26	0.27	
RET	NM_020630	10	exon10	43609003	43609123	120	+	0.40	0.58	
RET	NM_020630	10	exon11	43609927	43610184	257	+	0.24	0.66	
RET	NM_020630	10	exon12	43612031	43612179	148	+	4.25	12.50	
RET	NM_020630	10	exon13	43613820	43613928	108	+	5.82	7.74	
RET	NM_020630	10	exon14	43614978	43615193	215	+	4.49	8.41	
RET	NM_020630	10	exon15	43615528	43615651	123	+	7.13	14.60	
RET	NM_020630	10	exon16	43617393	43617464	71	+	7.45	17.86	
RET	NM_020630	10	exon17	43619118	43619256	138	+	8.94	18.15	
RET	NM_020630	10	exon18	43620330	43620430	100	+	8.88	15.81	
RET	NM_020630	10	exon19	43622022	43622952	930	+	8.21	8.37	20

【0101】

KIF5Bは通常分化された組織で発現されるため、KIF5B - RET融合遺伝子はこのような肺ガン組織（AK55とLC_S2）に存在するKIF5B活性プロモーターによって発現できる。前記LC_S2に存在する融合転写体はcDNA PCRを用いて検証した。

【0102】

AK55とLC_S2から得られた検証データを図24に示した。図24はKIF5B - RET融合転写体を対象にしたcDNA PCR及びAK55の肝転移性肺ガンと追加的に3重陰性肺線癌腫（LC_S2）でのゲル電気泳動の分析結果を示す。AK55（配列番号1）及びLC_S2（配列番号9）から来たcDNAは融合転写体の明白な証拠を示す。AK55の融合転写体はLC_S2（エクソン15）のエクソンと比較してKIF5B（エクソン16）のエクソンを1つ以上さらに含んでいるため、AK55のPCR生成物の長さはLC_S2のPCR生成物の長さより長かった。

【0103】

また、KIF5B - RET融合遺伝子は二重陰性（病理学研究でEGFRとEML4 - ALKは陰性；KRAS突然変異状態は分からぬ）原発性肺線癌腫（LC_S6（肺線癌腫1A期診断を受けた58歳男患者）のcDNA PCRを用いてさらに評価した。

LC_S2の試料は前記実施例1の方法で準備した。LC_S2の融合転写体はcDNA PCRを用いて検証して、LC_S6はKIF5B - RET融合遺伝子（配列番号13）を示すのを確認した（図25）。図25はKIF5B - RET融合転写体を目標にしたcDNA PCRと二重陰性肺線癌腫（LC_S6）のゲル電気泳動を用いた確認結果を示す。LC_S6融合転写体の明白な証拠を示す。LC_S6での融合転写体はAK55と比較して7つ以上のKIF5B（エクソン17乃至23）エクソンを含んでいるのを示す。

【0104】

LC_S6の融合遺伝子切断点をサンガーパリエット分析法を用いて同定し、得られた結果は図25bに示した。

【0105】

30

40

50

図24、25a、及び25bに関連する検証はPCR増幅及び遺伝子DNAとcDNAサンガーパターン分析法を用いて行った。PCRは95℃で10分間；95℃で30秒間30サイクル、62℃で10秒間、そして72℃で10秒間；最後に、72℃で10分間実施した。AK55遺伝子の逆位のためのPCRとサンガーパターン分析法のプライマーは5'-CAGAATTTCACAGGAGGGAAAG-3' (KIF5B；配列番号18)と5'-CAGGACCTCTGACTACAGTGGAA-3' (RET；配列番号19)であった。融合転写体のためのプライマーは5'-GTGAAACGTTGCAAGCAGTTAG-3' (KIF5B；配列番号20；AK55及びLC_S6のため)と5'-CCCTTGACCACTTTTCCAAATTG-3' (RET；配列番号21；またはAK55、LC_S2、及びLC_S6)を使用した。複製研究でcDNA PCRのために、他のKIF5Bプライマー(5'-TAAGGAAATGACCAACCACCAG-3' (配列番号22))がLC_S2のために使用された。なぜなら、LC_S2でのKIF5B融合切断点はAK55の切断点と異なるためである。全てのサンガーパターン分析実験はマクロジエン(Macrogen Inc.) (<http://www.macrogen.com>)で行われた。

【0106】

総合的に、複製研究で私たちは2つの原発性肺線癌腫でのKIF5BRET融合遺伝子(LC_S2及びLC_S6)事例をさらに分析した。このような結果はKIF5B-RET融合がめずらしいものでなく、融合転写体が一般に原発性肺線癌腫に存在するのを明白に示す。また、他のガン組織で同一な非機能的融合遺伝子を見つけるのは非常に難しいため、このような結果はKIF5B-RET融合遺伝子の発現は肺ガンで重要な機能的影響を有するという間接的な証拠を提供する。

【0107】

興味深いことに、LC_S2とLC_S6でRETのエクソン12はAK55のようにKIF5Bのエクソン16の代わりにエクソン15(LC_S2)及びエクソン23(LC_S6)と結合した。図26はAK55(配列番号1)、LC_S2(配列番号9)、及びLC_S6(配列番号13)のKIF5B-RET融合転写体を概略的に示す。それぞれの長方形はKIF5B遺伝子(青)及びRET遺伝子(赤)のエクソンを示す。

【0108】

前記結果はKIF5BにDNA二重鎖の壊れ(break)は原発性肺ガンの中で一致しないことがあるのを提示する。しかし、その両試料(融合遺伝子の中の二重螺旋ドメインの長さはLC_S2の場合に247個のアミノ酸であり、LC_S6の場合に520個のアミノ酸であった)で二重螺旋ドメインはKIF5B-RETキメリック腫瘍遺伝子でよく保存されているため、二量化活性度はAK55(310アミノ酸)と比較して大きく異なるだろう。

【0109】

肺線癌腫試料(AK55、LC_S2、及びLC_S6)で得られたKIF5B-RET融合遺伝子とKIF5B-RET融合蛋白質は表4に要約した：

【0110】

【表4】

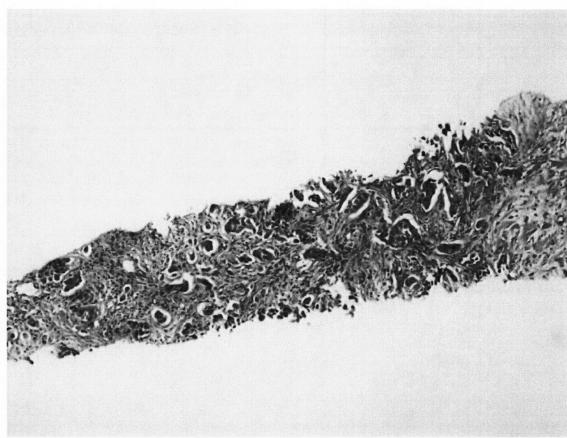
[表4]

		K I F 5 B (NM_00452 1)	R E T (NM_02097 5)	大きさ
A K 5 5	ヌクレオ チド	1 9 1 4 n t	1 2 0 9 n t	3 1 2 3 n t
	アミノ酸	6 3 8 a . a	4 0 2 a . a	1 0 4 0 a . a
	エクソン	1 - 1 6 e x o n	1 2 - 2 0 e x o n	2 5 e x o n
L C - S 2	ヌクレオ チド	1 7 2 5 n t	1 2 0 9 n t	2 9 3 4 n t
	アミノ酸	5 7 5 a . a	4 0 2 a . a	9 7 7 a . a
	エクソン	1 - 1 5 e x o n	1 2 - 2 0 e x o n	2 4 e x o n
L C - S 6	ヌクレオ チド	2 5 4 4 n t	1 2 0 9 n t	3 7 5 3 n t
	アミノ酸	8 4 8 a . a	4 0 2 a . a	1 2 5 0 a . a
	エクソン	1 - 2 3 e x o n	1 2 - 2 0 e x o n	3 2 e x o n

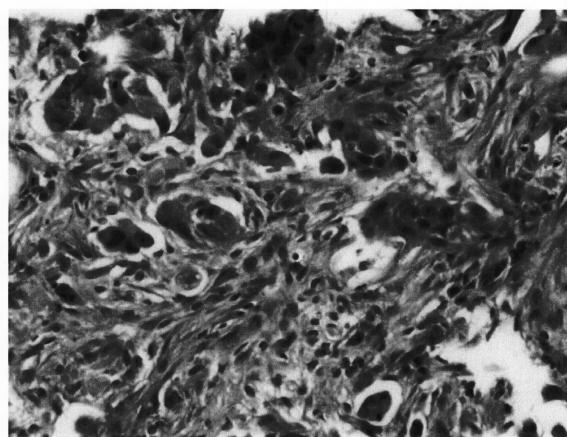
10

20

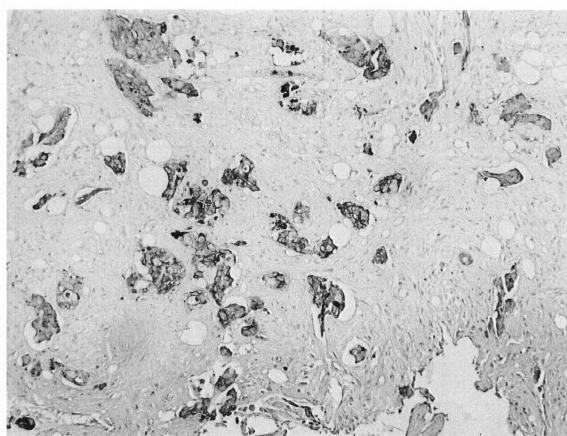
【図1】



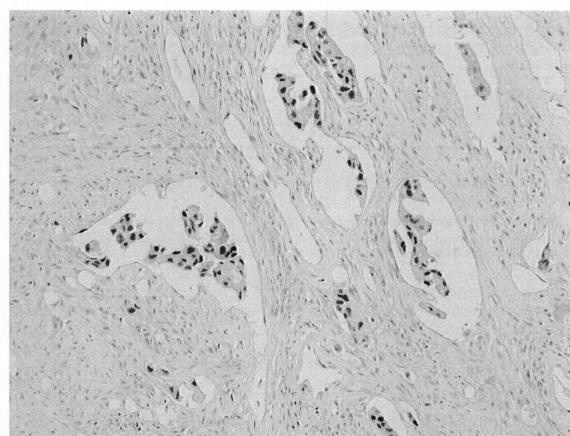
【図2】



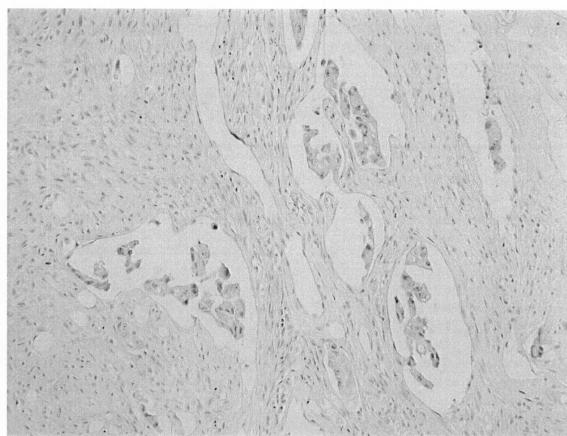
【図3】



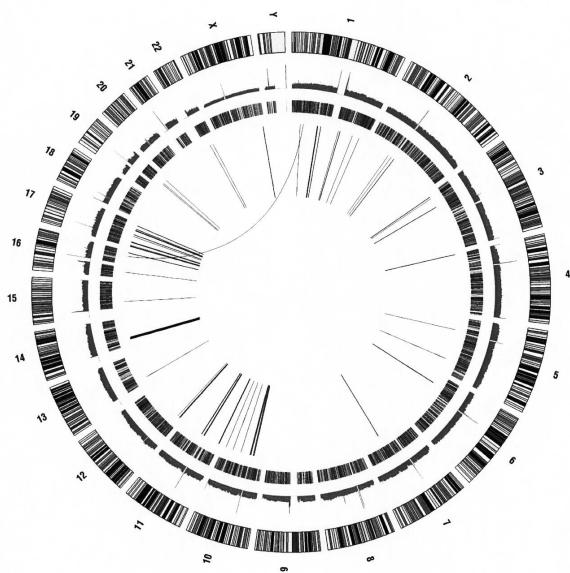
【図4】



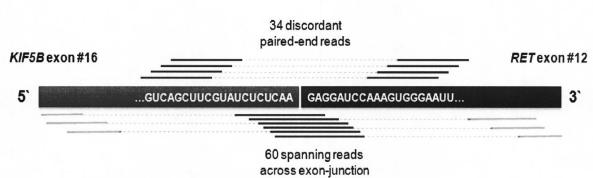
【図5】



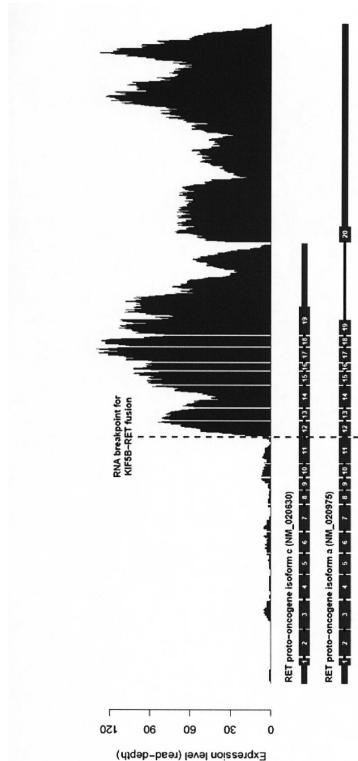
【図6】



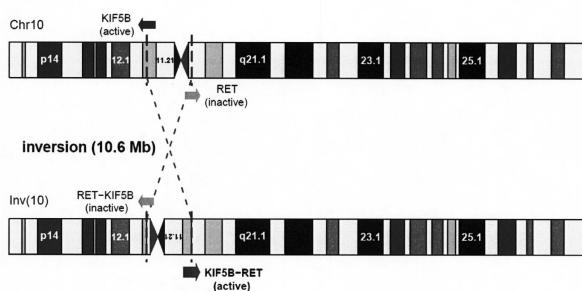
【図7】



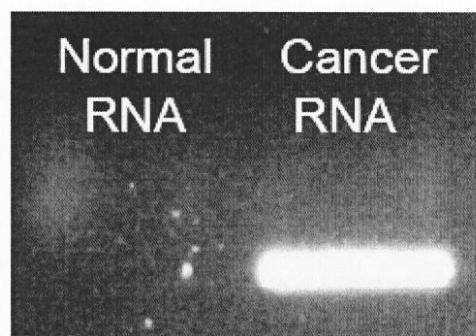
【図8】



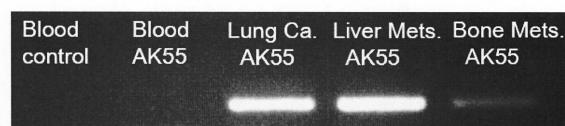
【図9】



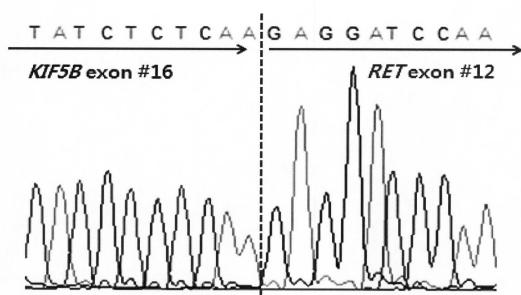
【図10】



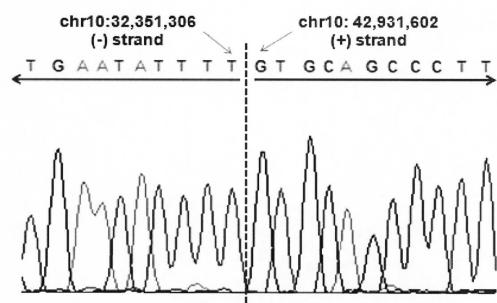
【図11】



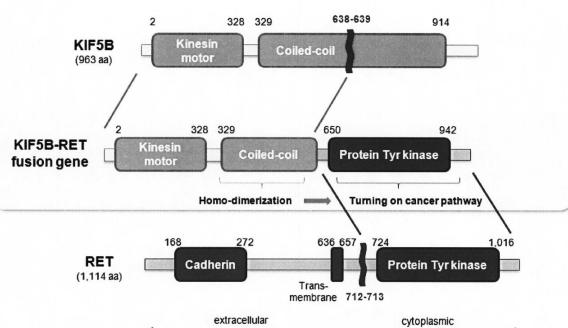
【図12】



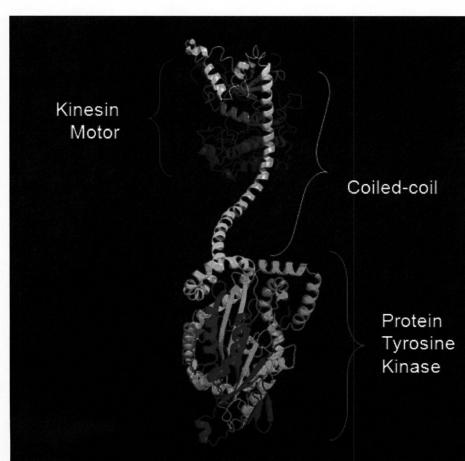
【図13】



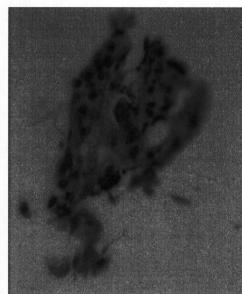
【図14】



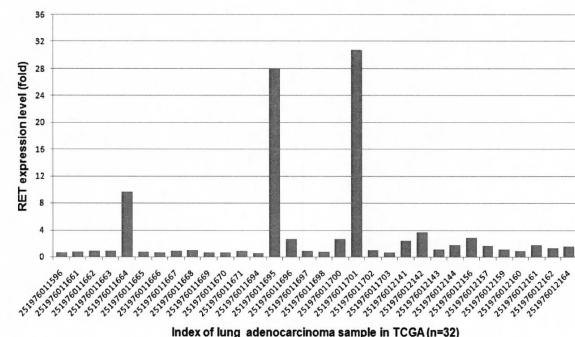
【図15】



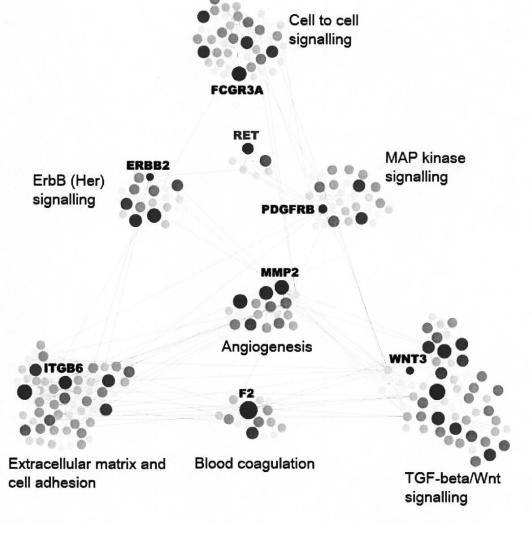
【図16】



【図17】



【図18】



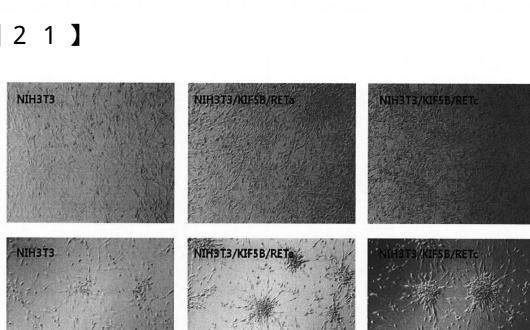
AK55, x1000, triple



(B)

-FBS

+FBS



NIH3T3 NIH3T3/KIF5B/RETa NIH3T3/KIF5B/RETc

NIH3T3 NIH3T3/KIF5B/RETa NIH3T3/KIF5B/RETc

-FBS +FBS -FBS

NIH3T3 NIH3T3/KIF5B/RETa NIH3T3/KIF5B/RETc

NIH3T3 NIH3T3/KIF5B/RETa NIH3T3/KIF5B/RETc

-FBS +FBS -FBS

NIH3T3 NIH3T3/KIF5B/RETa NIH3T3/KIF5B/RETc

NIH3T3 NIH3T3/KIF5B/RETa NIH3T3/KIF5B/RETc

-FBS +FBS -FBS

NIH3T3 NIH3T3/KIF5B/RETa NIH3T3/KIF5B/RETc

NIH3T3 NIH3T3/KIF5B/RETa NIH3T3/KIF5B/RETc

-FBS +FBS -FBS

NIH3T3 NIH3T3/KIF5B/RETa NIH3T3/KIF5B/RETc

NIH3T3 NIH3T3/KIF5B/RETa NIH3T3/KIF5B/RETc

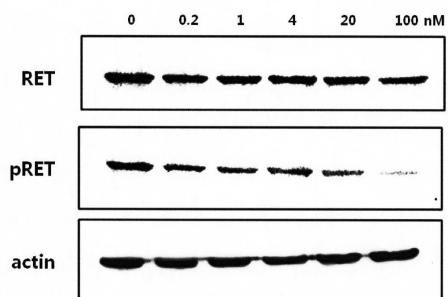
-FBS +FBS -FBS

NIH3T3 NIH3T3/KIF5B/RETa NIH3T3/KIF5B/RETc

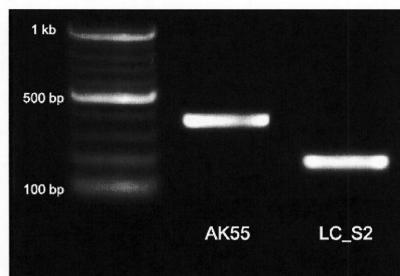
NIH3T3 NIH3T3/KIF5B/RETa NIH3T3/KIF5B/RETc

-FBS +FBS -FBS

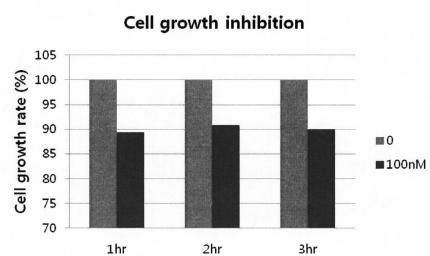
【図2-2】



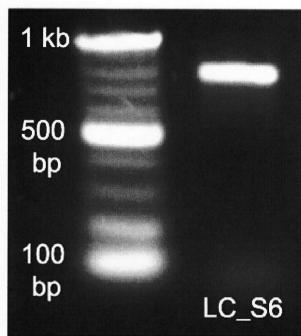
【図2-4】



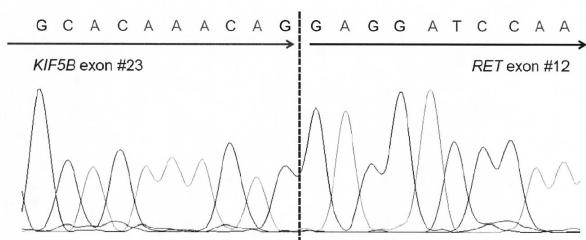
【図2-3】



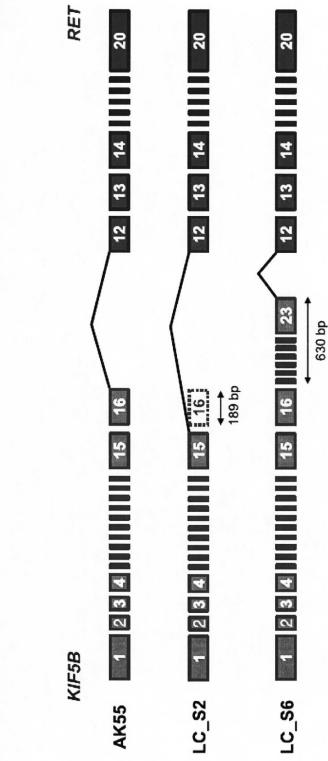
【図2-5 A】



【図2-5 B】



【図2-6】



【図27】

**KIF5B-RET α fusion gene (3123bp; SEQ ID NO: 1; 5'-terminal domain of KIF5B: italic type; 3'-terminal of RET: boldface)
Fusion region (SEQ ID NO: 2; underlined)**

【図28】

KIF5B-RET α fusion protein (1040aa; SEQ ID NO: 3; N-terminal domain of KIF5B: italic type; C-terminal of RET: boldface)
Fusion region (SEQ ID NO: 4: underlined)

【 図 2 9 】

KIF5B-RETc fusion gene (2997bp: SEQ ID NO:5; 5'-terminal domain of KIF5B italic type; 3'-terminal of RET: boldface)
Fusion region (SEQ ID NO: 6; underlined)

【 図 3 0 】

**KIF5B-RETc fusion protein (998aa; SEQ ID NO: 7; N-terminal domain of KIF5B: italic type; C-terminal of RET: boldface)
Fusion region (SEQ ID NO:8; underlined)**

MADLAECNUKVMPPRFLNNEVSRNDKYKAQFQDGETVIASPKYAFDRVSFGTSQEYQVND
AKVKVDFLEGYNTQSFSGTTMEKGHLHDPGEMIPIVPRQDVFNYISMDLENLEHFKV
YEIYFIDKIRDLDDSKTNSVHEDKRVPYVCKGTERFCVSPDEWMTDIEGKSNRHVATVNME
HSSRSHSFLINVKQENTOFTLSKGVYVLLDAGSEVKSTKVGAEAVLDEAKINIKNLSSALGNVIS
ALAEGSTVYPRDSKMLNGCRRTTIVCCSPSSNEYSETKSTLFGORKATIKTVCV
ELAEGSTVYPRDSKMLNGCRRTTIVCCSPSSNEYSETKSTLFGORKATIKTVCV
NDKPAFTA/GVING/FTDAERKEEIAKYLKQDLDKDEEINQSQSLVEKLTKMQLDGEELLASTR
QDQMDAQEALRNQDAEKASKEEVEVQLQALEEFVNAYDVKQSEVEDKTKEYELSDLENOKSAT
LAS/ADALQKLKMTHNKKHRAEAMMASLKLDAEIGAVGNVDNUKPOEGTGM/DEFEEPTARVILSK
MKSEVTMVVKRCKQLESTQESTNSKMKKEENELAKEAQLCRLS/SEQDWPWKEP RKN V LGTKLGE
FGVKVKAUTAHFLKGRAYGTWVKAUMLKENASAPSELRD L SEF NVL KQVHN PFKVLYQACGSOD
PLLIVEAYKGSRLGRFLRSPRUGVPGYLGSSGRRNSSLSDH DERALTMGLDLSFAWQSGM
AEGALKMVRHDLARLNILVAEGRKGMSIDF GLS RDVEYEVDSSYKRSQGRIPVKWMAE SLFDH
YTQTSWDWSFWGLVLEWITL GGNPYPGIPPERL FNLLKTHGRPNDCE SEMYRMLM CQWKQ
EPDKPRVFAIDI SKDLEKMMVKRDRYDLA A STPSDSL IYDG L SEEETPLVDCN NAPL PRALP ST
WIENKI YGRISHATE.

【 図 3 1 】

KIF5B-RE^Ta variant (LC-S2) fusion gene (2934bp; SEQ ID NO 9; 5'-terminal domain of KIF5B: italic type; 3'-terminal of RET: boldface)
Fusion region (SEQ ID NO:10; underlined)

【図32】

KIF5B-RET_a variant (LC-S2) fusion protein (977aa; SEQ ID NO 11; N-terminal domain of KIF5B: italic type; C-terminal of RET: boldface)
Fusion region (SEQ ID NO:12; underlined)

MAADLAECNIKVMCRPLPNSEVNRGDKYQAKQFEDVTIASKPAPYFDRFVQFSSTQEYQD
AKKVKDVLLEGNTYFATQYSQTSCKTHTEMGHDFPEGMIVPRQVDFQFNYVSMDNELEHFKV
FEYIQLKDRDLSLTKNTLWSHEKDNRVPRVYKCGTCERPVCPDEWVNTDIEGKSNRHATTNME
HSRSRSLFLINVKQENTQEQLKSGLWLVLDAESEKVSXTGAEGELDEANKNSLGLANVNS
ADLAGSTPYVRQDSKMRTLQDLSGNGRCRTTVCSPSSYETNSTKLHGQRKATVTCVNT
ELTAEQWWKKYKEEEKEKNKLRTNLQWLENELRNWRSPNEYTVPEQDFDKEFALKAETVVDKT
NDKPATVAIGVNGFTDAKRKEEEAIYKLOKLDDKEENIQSQSLVEKLTKPLDOEELASTR
DDQDMAEALPRLNQANDAESAEEKVKEVOLAALEAVLNVDQSOEVEDTKTVEYLLSDELNOA
LASIDAEALQKLKMETHNOKHRRAEAAMMSLKLQDIAE1GAJGNNDVKEPDWKMEPFRNKLNVLGKTLG
EGEGFKVVKATAFHLLKGRAJYTTVAVKMLKENASPELRDLSSEFNFVQLKHNPHYLGAC
QDGPLLIVEYAKYHGSRLGFLRESRVKGPGYLSGGSSRNSSLDHPDERALTGMGDLISFAWQS
QGMQYLMMVHLRDLAARNLVIAEGRKMKSDLGRSLDHRSSYVSRKQGRIPVWKMAEIS
FDHYITQZLSDWFSVGFLLWEVLT1LGNQYGPPIPERFLNLKTHGMRP RDPCSEMEYMLMLQ
WKQPEQDPKRVPAFDASDKEKMMVKKRDLYDLAAPSTSDLSYIYDGL SEETPTLVDNCNNPLRA
PLSTWIENLYGMDSNPWNGPEVSPVLPTRADGTNGTFPRPVDSNDSVYANWMA PSSAALKMDFTS

【 図 3 3 】

KIF5B-RETa variant (LC-S6) fusion gene (3753bp; SEQ ID NO 13; 5'-terminal domain of KIF5B: italic type; 3'-terminal of RET: boldface)
Fusion region (SEQ ID NO:14; underlined)

【図34】

KIF5B-RET α variant (LC-S6) fusion protein (1250aa; SEQ ID NO:15; N-terminal domain of KIF5B: italic type; C-terminal of RET: boldface)
Fusion region (SEQ ID NO:16; underlined)

【配列表】

0006389124000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088

(72)発明者 ヨン - ソク・ジュ
大韓民国・ソウル・153-781・グムチョン - グ・ガサン - ドン・(番地なし)・ワールドメ
ルディアン・ヴェンチャー・センター・1・チャ・テヌス・フロア

(72)発明者 ジヨン - ソン・セオ
大韓民国・ソウル・153-781・グムチョン - グ・ガサン - ドン・(番地なし)・ワールドメ
ルディアン・ヴェンチャー・センター・1・チャ・テヌス・フロア

(72)発明者 ウン - ヒ・キム
大韓民国・ソウル・153-781・グムチョン - グ・ガサン - ドン・(番地なし)・ワールドメ
ルディアン・ヴェンチャー・センター・1・チャ・テヌス・フロア

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 國際公開第2013/018882(WO, A1)
J. Cell. Physiol., 2003年, Vol.195, pp.168-186
Trends Mol. Med., 2011年, Vol.17, No.3, pp.149-157
Jpn. J. Cancer Res., 1995年, Vol.86, pp.1127-1130

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 07 K 1 / 00 - 19 / 00
C 12 N 15 / 00 - 15 / 90
Capplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)
UniProt / GeneSeq
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq