

(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 I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)
 C O 7 K 19/00 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/686 (2018.01)
 C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)
 G O 1 N 33/50 (2006.01)

C 1 2 N 15/62 Z N A Z
 C O 7 K 19/00
 C 1 2 Q 1/686 Z
 C 1 2 Q 1/6886 Z
 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
 チョン・グ・ガサン・ドン・60-24・
 ワールドメルディアン・ベンチャー・セン
 ター・テンス・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(re-arranged during transfection proteain)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'-GTGAAACGTTGCAAGCAAGTTAG-3'(配列番号20)と5'-CCTTGACCACTTTTCCAAATTC-3'(配列番号21)のプライマー対、または5'-TAAGGAATGACCAACCAACAG-3'(配列番号22)と5'-CCTTGACCACTTTTCCAAATTC-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' - GTGAAACGTTGCAAGCAGTTAG - 3' (配列番号 20) と 5' - CCTTGACCACTTTTCCAAATTC - 3' (配列番号 21) のプライマー対、または 5' - TAAGGAATGACCAACCCAG - 3' (配列番号 22) と 5' - CCTTGACCACTTTTCCAAATTC - 3' (配列番号 21) のプライマー対、または

5' - CAGAAATTTCAACAAGGAGGGAAG - 3' (配列番号 18) と 5' - CAGGACCTCTGACTACAGTGGA - 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 (re-arranged 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亡者を発生させている。世界的に毎年 1.38 万人の死亡者を発生させている。従来の化学治療法を使用しても、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変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 ALK 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 (t y r o s i n e k i n a s e) ドメインの突然変異はゲフィチニブ (G e f i t i n i b) 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 (m i s s e n s e m u t a t i o n) は肺線癌腫 (l u n g a d e n o c a r c i n o m a) 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。

【 0 0 0 4 】

たとえば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 (g e n o m e) では何も発見されなかった。非小細胞癌の 4 0 % 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

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 5 】

【特許文献 1】W O 2 0 0 8 - 0 3 1 5 5 1

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

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

【 0 0 0 7 】

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。

【 0 0 0 8 】

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。

【 0 0 0 9 】

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：

1 0 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、及び癌にかから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

30

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。

【 0 0 1 0 】

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。

【 0 0 1 1 】

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。

【 0 0 1 2 】

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

【 0 0 1 3 】

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。

【 0 0 1 4 】

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った場合、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ト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 sign

50

aling) 伝達を刺激する。RETの下流シグナルカスケード(downstream signaling cascade)は細胞の生存(survival)/細胞死滅(apoptosis)、増殖(proliferation)、分化(differentiation)、及び転移(migration)を調節するMAPK(mitogen-activated protein kinase)経路である。RET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。

【0023】

RET蛋白質はヒトを含む哺乳類に由来し得る。ヒトRET蛋白質を暗号化するヒトRET遺伝子は10番染色体上に位置しており(10q11.2)、種類によって19乃至21個のエクソンを含んでいる。ヒトRET蛋白質はNCBI(寄託番号NM_020630またはNM_020975)によって代表されるヒトRET遺伝子から暗号化できる。

10

【0024】

RET蛋白質のC-末端ドメインはRET遺伝子の、例えばNM_020630またはNM_020975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。RET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、NM_020975によって暗号化されるRET蛋白質の713番目位置)、NM_020630またはNM_020975によって暗号化されるRET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、RET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)、NM_020630(19個のエクソン)またはNM_020975(20個のエクソン)によって暗号化されるRET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。

20

【0025】

キネシン(Kinesin)-1重鎖とも呼ばれるKIF5B蛋白質はKIF5B遺伝子によって暗号化される。KIF5B蛋白質はヒトを含む哺乳類に由来し得る。ヒトKIF5B蛋白質を暗号化するヒトのKIF5B遺伝子は10番染色体(10q11.22)上に位置しており、26個のエクソンを含んでいる。ヒトKIF5B蛋白質はヒトNCBI、寄託番号NM_004521によって代表されるKIF5B遺伝子によって暗号化される。

30

【0026】

KIF5B蛋白質のN-末端ドメインはKIF5B遺伝子(例えば、NM_004521)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。KIF5B蛋白質のN-末端ドメインはNM_004521によって暗号化されるKIF5B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。KIF5B蛋白質のN-末端ドメインはNM_004521によって暗号化されるKIF5B蛋白質の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NM_004521(配列番号21)によって暗号化されるKIF5B蛋白質の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。KIF5B蛋白質のN-末端ドメインはNM_004521によって暗号化されるKIF5B蛋白質の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。

40

【0027】

融合蛋白質で、融合は融合点(fusion point)または切断点(break point)と呼ばれる、KIF5B遺伝子の16番目エクソンとRET遺伝子の12

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 】

本発明で使用す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 K I F 5 B - R E T 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 K I F 5 B - R E T の融合領域であり得る。前記融合蛋白質 K I F 5 B - R E T 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 K I F 5 B - R E T 融合蛋白質を暗号化する K I F 5 B - R E T 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 K I F 5 B - R E T の融合領域であり得る。融合遺伝子 K I F 5 B - R E T 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。

【 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。

【 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 R E T - 関連染色体の再配列または R E T の過発現は癌細胞、特に肺ガン細胞でも発見される。

【 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：

逆位または転座を含む、10 番染色体で R E T - 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 R E T 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 R E T 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 】

R E T - 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

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' - CAGAA TTT CACAAGGAGGGAAG - 3'（配列番号18）及び5' - CAGGACCTCTGACTACAGTTGGA - 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】

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、抗体またはアプタマー）の間の相互作用を測定する一般的分析方法によって探知できる。このような一般的分析方法としては免疫クロマトグラフィー（immunochromatography）、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）、ウエスタンブロット法（western blotting）、及び蛍光活性化細胞選択装置（fluorescence activated cell sorter、FACS）などのような方法がある。

【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）などのような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。

【0038】

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' - CCTTGACCACTTTTCCAAATTC - 3'（RET；配列番号21）からなるプライマー対、または5' - TAAGGAATGACCAACCAAC CAG - 3'（KIF5B；配列番号22）と5' - CCTTGACCACTTTTCC

10

20

30

40

50

AAATTC - 3' (RET; 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 KIF5B - RET は融合蛋白質の KIF5B - RET 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。

【0039】

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。

【0040】

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 KIF5B - RET 融合遺伝子を探知するための 5' - GTGAACGTTGCAAGCAGTTAG - 3' (KIF5B; 配列番号 20) と 5' - CCTTGACCACTTTTCCAAATTC - 3' (RET; 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' - TAAGGAATGACCAACCAACCAAG - 3' (KIF5B; 配列番号 22) と 5' - CCTTGACCACTTTTCCAAATTC - 3' (RET; 配列番号 21) からなるプライマー対、または 5' - CAGAAATTTCAACAAGGAGGGAAG - 3' (配列番号 18) と 5' - CAGGACCTCTGACTACAGTGGA - 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とも図 1 種以上のプライマー対である。

【0041】

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。

【0042】

患者は任意の哺乳類、例えば、ヒトまたは猿のような霊長類、マウス (mouse) またはラット (rat) のようなげっ歯類であり得、特にヒトであり得る。

【0043】

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。

【0044】

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。

【0045】

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 RET 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。

【0046】

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 RET 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

10

20

30

40

50

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、RET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】

KIF5B-RET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（sorafenib）（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RET暗号化遺伝子抑制剤は、融合遺伝子またはRET暗号化遺伝子に特異的に結合可能なsiRNA、shRNA、miRNA、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。

10

【0049】

本発明で、癌はいかなる固形癌、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（small cell lung carcinoma）または肺線癌腫、扁平上皮肺ガン（squamous cell lung carcinoma）、または大細胞肺ガン（large cell lung carcinoma）のような非小細胞肺ガンであり得る。

20

【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。

30

【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。

40

【0052】

前記スクリーニング方法で使用する細胞は、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来したものであり得る。前述のように、前記癌細胞は固形癌細胞、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（immunochromatography）、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

50

免疫測定法 (fluorescence immunoassay、FIA)、閃光免疫測定法 (luminescence immunoassay、LIA)、ウエスタンブロット法 (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】

10

【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 - 誘導生体検査 (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 - 誘導生体検査 (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】PHYRE2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 (x400) 。

【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。

【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。

【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。

【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 KC11OISI0603) 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。

10

20

30

40

50

【0059】

AK55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、低分化腫瘍細胞巢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。AK55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週間後、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、AK55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 YS, Kim JI, Kim S, et al., Nat Genet 2011”と“Kim JI, Ju YS, 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-関連体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 YS, Kim JI, 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 YS, Kim JI, Kim S, et al., Nat Genet 2011”と“Kim JI, Ju YS, 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

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 47.77x と 28.27x 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	出处	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 (bp)	処理量 (Gb)	リード深さ (倍)	PCR 及びサンガー配列分析法
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 (スパンニングリード (spanning reads) 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。

【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-spanning read) を使用した。最終融合遺伝子候補のために、相応する遺伝体の再配列、即ち、逆位、転座及び大量欠失、を全長遺伝体配列分析データを通じて調査した。

【0069】

転写体データが分析され、多くの癌は病源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300bpの長さのcDNA断片の端を101bp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。

【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】

10

20

【表 2】

[表 2]

カテゴリ	供与遺伝子	受容遺伝子	染色体	距離 (Mb)	ディスコ ーダント リードの 数	スパニン グリード の数	栓長一遺 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	—
	EEF1D P3	FRY	13	0.133	3	5	—
	RPS6K B1	TMEM49	17	0.097	4	31	—
	HACL1	COLQ	3	0.075	3	4	—
	TMEM56	RWDD3	1	0.073	4	11	—
	FAM18 B2	CDRT4	17	0.065	4	29	—
	CTBS	GNG5	1	0.065	6	27	—
	METTL 10	FAM53B	10	0.054	2	4	—
	AZGP1	GJC3	7	0.048	5	15	—
	NKX2-1	SFTA3	14	0.046	3	7	—
	ADSL	SGSM3	22	0.036	5	6	—
	ART4	C12orf69	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	ARHGAP27	17	0.024	2	10	—
	RBM14	RBM4	11	0.023	16	24	—
染色体間							
	RSPO1	HP	16;1	—	2	3	—

【0073】

これらの中、94.2% (n = 49) は隣接した遺伝子 (< 135 Kb) 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、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 K I F 5 B - R E T と K I A A 1 4 6 2 - K I F 5 B 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 M b) の間で発生した。この結果によって K I A A 1 4 6 2 - K I F 5 B は除外された。なぜなら K I A A 1 4 6 2 - K I F 5 B の発現水準が低く、K I A A 1 4 6 2 は分子機能が知られない仮定の蛋白質であるためである。K I F 5 B - R E T 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れなかった。

【 0 0 7 4 】

R E T はチロシンキナーゼガン原遺伝子 (p r o t o - o n c o g e n e) とよく知られているため、最終融合遺伝子である K I F 5 B - R E T は特に興味がある。また、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なされる。この遺伝子融合事件の特性は R N A 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 個のディスコードナントペアード - エンドリードと 60 個のフュージョン - ジャンクション (f u s i o n - j u n c t i o n) を横切るスパニングリードによって立証された (表 2 及び図 7)。図 7 は K I F 5 B - R E T 融合遺伝子を概略的に示す。転写体配列分析で、34 個のディスコードナントペアード - エンド (d i s c o r d a n t p a i r e d - e n d) リードと 60 個のエクソン - ジャンクション (e x o n - j u n c t i o n) を横切るスパ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。ディスコードナントペアード - 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 K I F 5 B の 16 番目エクソンと R E T の 12 番目エクソンの間で起こった。

【 0 0 7 5 】

このようなデータは K I F 5 B の 16 番目エクソンの端と R E T 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 R E T 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 R E T 発現はそのままの R E T 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 R E T エクソンの R N A 発現水準を示すグラフである。R E T 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 R E T 発現は正常 R E T 遺伝子より K I F 5 B - R E T 融合遺伝子に由来したのを提示する。

【 0 0 7 6 】

K I F 5 B と R E T はそれぞれ 10 p 11.22 と 10 q 11.21 に 10.6 M b 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 M b の長さの逆位が起こ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 (m a s s i v e p a r a l l e l s e q u e n c i n g) を通じた癌遺伝体の染色体での 10.6 M b の長さの逆位を概略的に示す。このような逆位は K I F 5 B - R E T 融合遺伝子の原因である。K I F 5 B 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 K I F 5 B - R E T 融合遺伝子のグローバル発現を活性化する。

【 0 0 7 7 】

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。

【 0 0 7 8 】

前記結果は遺伝体の D N A と c D N A を P C R 増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。P C R 反応は 95 ° で 10 分間、95 ° で 30 秒間 30 サイクル、62 ° で 10 秒間、72 ° で 10 秒間、最後に 72 ° で 10 分間行った。遺伝体の逆位のための P C R 及びサンガー配列分析法プライマーは 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) であった。融合転写体のためのプライマーは

5' - GTGAAACGTTGCAAGCAGTTAG - 3' (配列番号20)と5' - CCTTGACCACTTTTCCAAATTC - 3' (配列番号21)である。全てのサンガー配列分析法 (Sanger sequencing) 実験はマクロジェン (Macrogen Inc.) (<http://www.macrogen.com>) で実施した。

【0079】

AK55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PCR生成物は逆位の結果であることを示す (図10及び図11)。図10及び図11はAK55患者から得られたRNA (図10) とDNA (図11) のKIF5B-RET融合遺伝子確認のためのPCR増幅結果である。RNA及びDNAでのKIF5B-RET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PCR増幅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RNAとDNA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chr10:32,351、306-42,931、601)。図12と13はRNA (図12) とDNA (図13) の検証のためのサンガー配列分析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KIF5BとRET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chr10:42,931、604) から2つの塩基ダウストリーム (downstream) に、1-bp欠失が作られ、これはNHEJ (error-prone non-homologous end joining) が、二重鎖DNA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 (chr10:42,931、604) に2bp隣接したところで同定され、これはエラー-プローン (error-prone) DNA修復メカニズム、即ち、NHEJ、この二重鎖DNA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-quadruplex (non-BDNA) 構造はRET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、~100bpアップストリーム (upstream) にあると予想される。

30

【0082】

実施例4: KIF5B-RET融合キナーゼの機能性評価

RET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。RETは細胞外領域 (Cadherin-like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KIF5B-RET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KIF5Bの638N-末端残基及びRETの402C-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同種二量化 (homo-dimerization) を誘発する。

40

【0083】

RETがGDNF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。RET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MAPK経路である。

50

R E T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】

K I F 5 Bは微小管依存性モータ (microtubule-based motor) 蛋白質であり、普遍的にK I F 5 B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。K I F 5 B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P H Y R E 2アルゴリズムを用いて予測したK I F 5 B - R E T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K I F 5 B - R E T融合遺伝子の蛋白質配列を用いたP H Y R E 2ソフトウェアで遂行された (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>)。

10

【0086】

これと同様に、K I F 5 B - R E T融合遺伝子は高く発現され、その後、K I F 5 B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R E T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R E T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 (A K 5 5) の肺ガン (骨転移) でのK I F 5 B - R E T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 (x 4 0 0)。

20

【0087】

実施例5：他の肺ガン試料でのR E T過発現頻度評価

R E Tの発ガン性効果はP T C / R E T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、P T C) 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、M E N) 2 Aと2 B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R E Tが前立腺癌、すい臓癌、悪性黒色種で観察された。前記R E Tの腫瘍生成能力もR E T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R E T遺伝子は従来の肺ガンでは強調されなかった。

30

【0088】

肺線癌腫でのR E T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R E T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 (Omibus) : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> と癌ゲノムアトラス (The Cancer Genome Atlas、T C G A) : <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进行分析した。

40

【0089】

10個の腺癌種細胞株 (G e m m A , L i C , S u g i y a m Y , e t a l . , B M C C a n c e r 2 0 0 6 ; 6 : 1 7 4) の発現プロファイルは二つの試料でR E Tが高く発現されたのを示す。反面、R E T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R E T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 (D i n g L , G e t z G , W h e e l e r D A , e t a l . , N a t u r e 2 0 0 8 ; 4 5 5 : 1 0 6 9 - 7 5) 、75個のうちの6個の腫瘍 (8%) でR E Tが過発現した。また他のデータセット (K u n e r R , M u l e y T , M e i s t e r M ,

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%であることを提示する。

【0090】

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

10

【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Mimipugin(<http://mimipugin.ncibi.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

20

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(pH6.0)10mmol/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℃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(7ul LSI buffer[Vysis, Downers Grove, IL]、3ul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℃で5分間変成させ、湿度室(humidified chamber)内で37℃で12時間インキュベーションした。スライドを2XSSC(saline sodium citrate)/0.1%NP40(US Biological, Swampscott, MA)で70℃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(flanck)RET転座サイト分裂を示す(矢印)。

30

40

【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した。NIH3T3細胞(ATCC/ATCC

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 (2 µg/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) メンブレインの上にブロッティングをした。ブロッティングは 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、メンブレイ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ブ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ことを示す。

【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ブ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チ (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EML4-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
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

10

20

【0101】

K I F 5 B は通常分化された組織で発現されるため、K I F 5 B - R E T 融合遺伝子はこのような肺ガン組織 (A K 5 5 と L C _ S 2) に存在する K I F 5 B 活性プロモーターによって発現できる。前記 L C _ S 2 に存在する融合転写体は c D N A P C R を用いて検証した。

【0102】

A K 5 5 と L C _ S 2 から得られた検証データを図 2 4 に示した。図 2 4 は K I F 5 B - R E T 融合転写体を対象にした c D N A P C R 及び A K 5 5 の肝転移性肺ガンと追加的に 3 重陰性肺線癌腫 (L C _ S 2) でのゲル電気泳動の分析結果を示す。A K 5 5 (配列番号 1) 及び L C _ S 2 (配列番号 9) から来た c D N A は融合転写体の明白な証拠を示す。A K 5 5 の融合転写体は L C _ S 2 (エクソン 1 5) のエクソンと比較して K I F 5 B (エクソン 1 6) のエクソンを 1 つ以上さらに含んでいるため、A K 5 5 の P C R 生成物の長さは L C _ S 2 の P C R 生成物の長さより長かった。

30

【0103】

また、K I F 5 B - R E T 融合遺伝子は二重陰性 (病理学研究で E G F R と E M L 4 - A L K は陰性 ; K R A S 突然変異状態は分からない) 原発性肺線癌腫 (L C _ S 6 (肺線癌腫 1 A 期診断を受けた 5 8 歳男患者) の c D N A P C R を用いてさらに評価した。L C _ S 2 の試料は前記実施例 1 の方法で準備した。L C _ S 2 の融合転写体は c D N A P C R を用いて検証して、L C _ S 6 は K I F 5 B - R E T 融合遺伝子 (配列番号 1 3) を示すのを確認した (図 2 5) 。図 2 5 は K I F 5 B - R E T 融合転写体を目標にした c D N A P C R と二重陰性肺線癌腫 (L C _ S 6) のゲル電気泳動を用いた確認結果を示す。L C _ S 6 融合転写体の明白な証拠を示す。L C _ S 6 での融合転写体は A K 5 5 と比較して 7 つ以上の K I F 5 B (エクソン 1 7 乃至 2 3) エクソンを含んでいるのを示す。

40

【0104】

L C _ S 6 の融合遺伝子切断点をサンガー配列分析法を用いて同定し、得られた結果は図 2 5 b に示した。

【0105】

50

図24、25a、及び25bに関連する検証はPCR増幅及び遺伝体DNAとcDNAサンガー配列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遺伝体の逆位のためのPCRとサンガー配列分析法のプライマーは5'-CAGAAATTTTCACAAAGGAGGGAAG-3' (KIF5B；配列番号18)と5'-CAGGACCTCTGACTACAGTGGA-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のための)と5'-CCTTGACCACTTTTCCAAATTTC-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'-TAAGGAATGACCAACCAACCAAG-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。全てのサンガー配列分析実験はマクロジェン(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らないだろう。

【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】

10

20

30

【表 4】

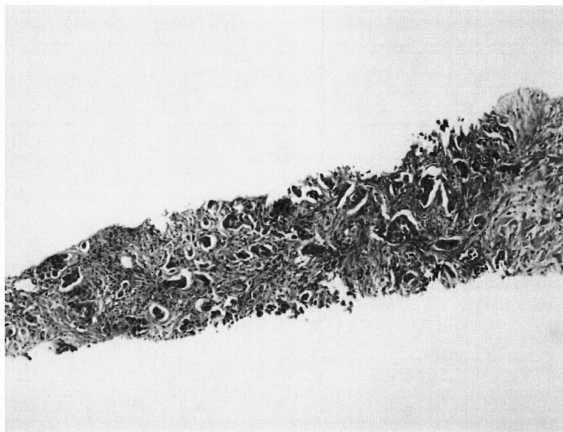
[表 4]

		K I F 5 B (NM_004521)	R E T (NM_020975)	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

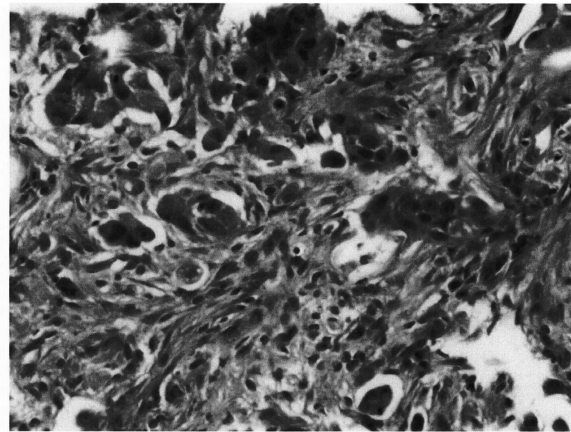
10

20

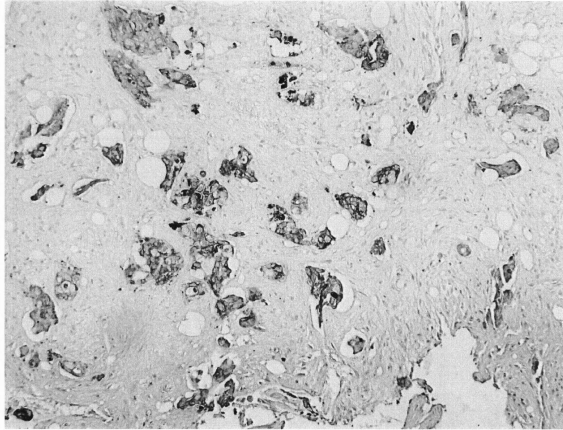
【図 1】



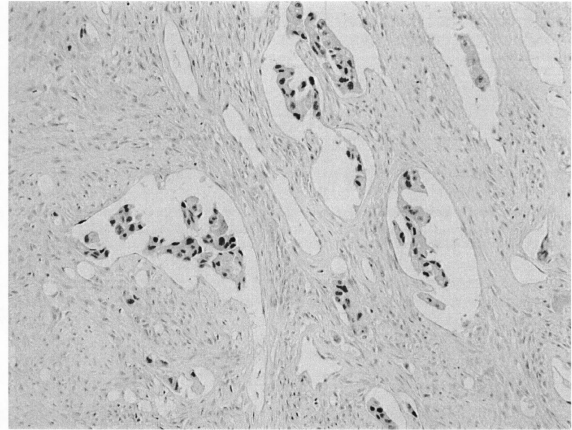
【図 2】



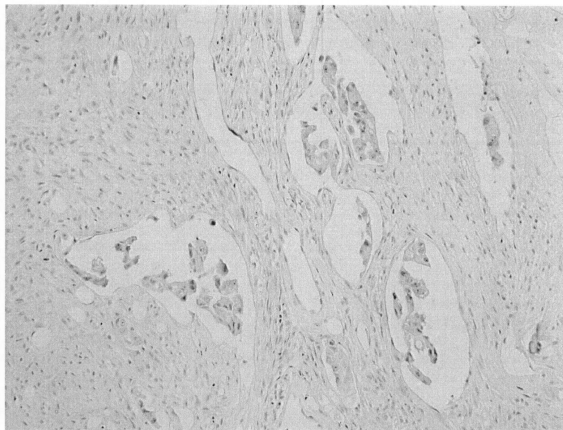
【図 3】



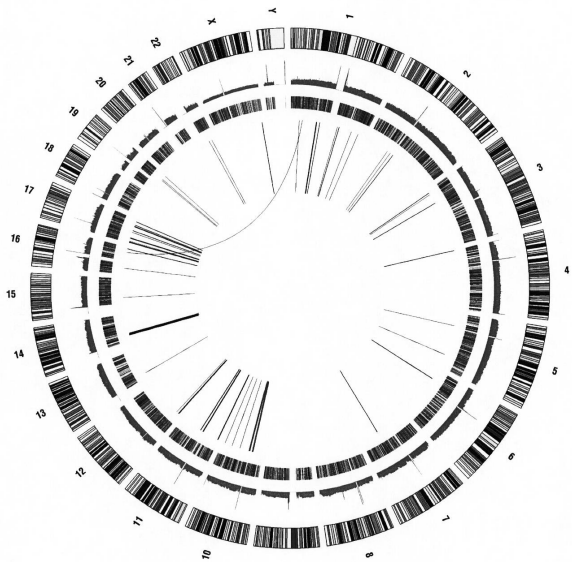
【図 4】



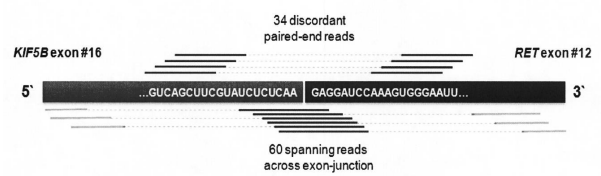
【図 5】



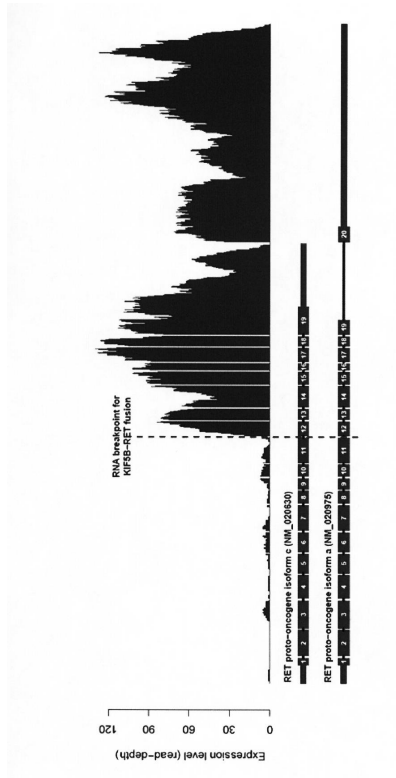
【図 6】



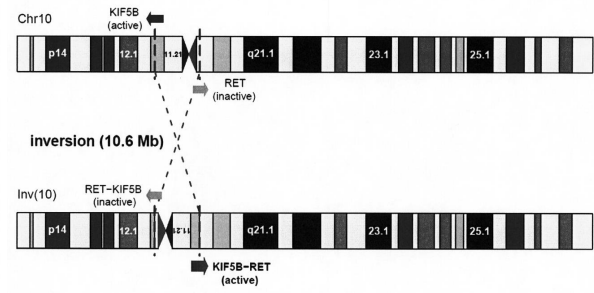
【図 7】



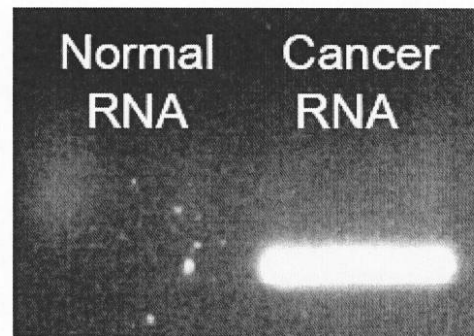
【 図 8 】



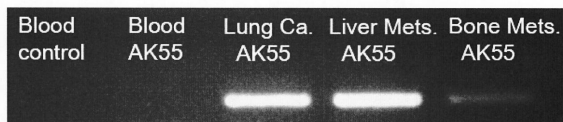
【 図 9 】



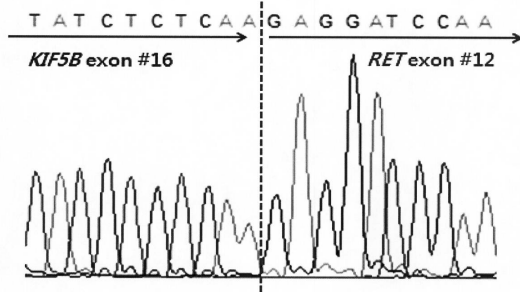
【 図 10 】



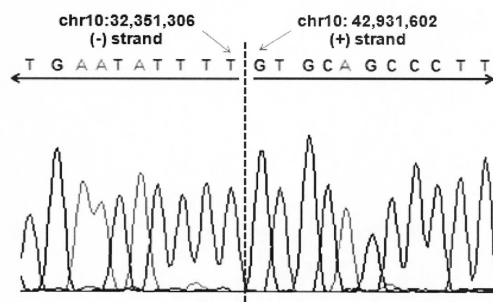
【 図 11 】



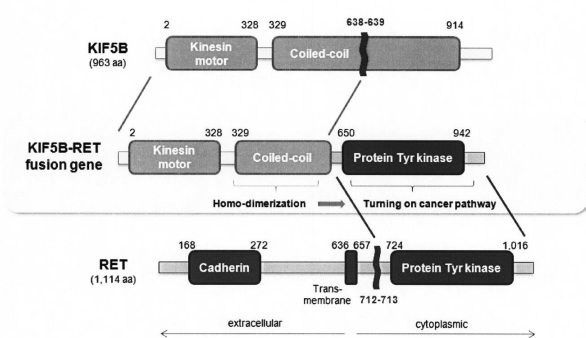
【 図 12 】



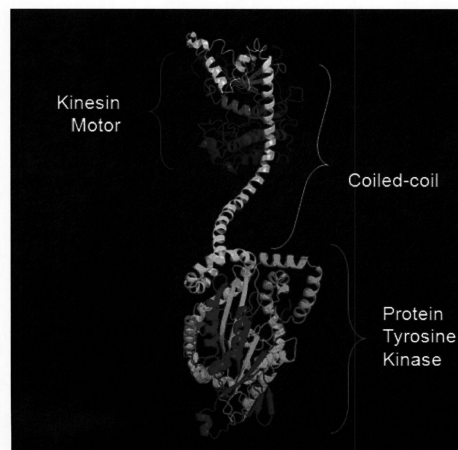
【 図 13 】



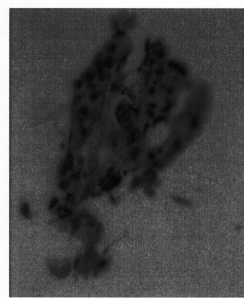
【 図 14 】



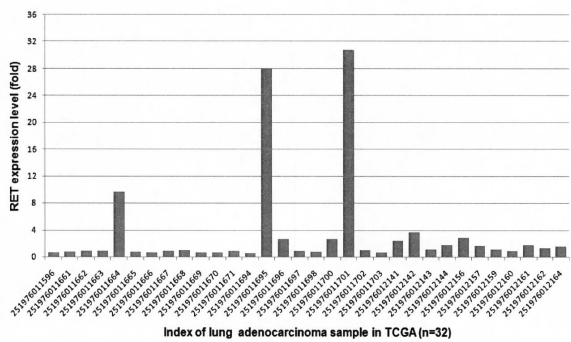
【 図 15 】



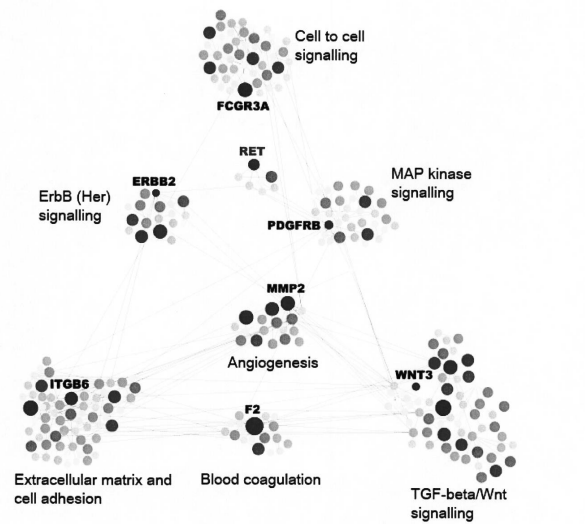
【 図 1 6 】



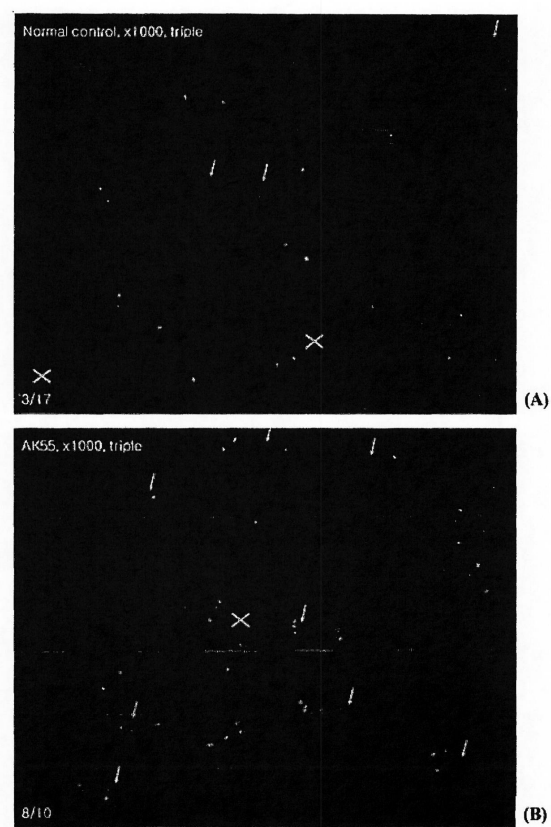
【 図 1 7 】



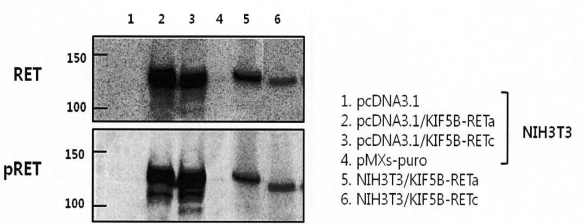
【 図 1 8 】



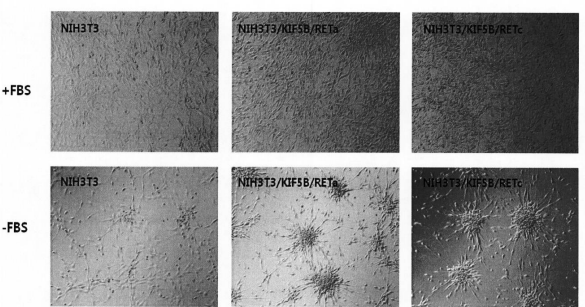
【 図 1 9 】



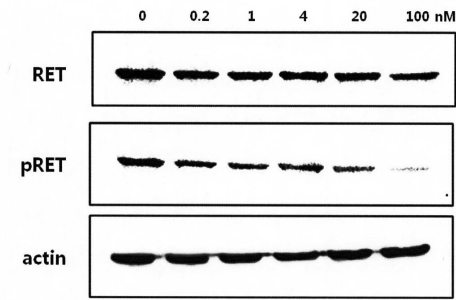
【 図 2 0 】



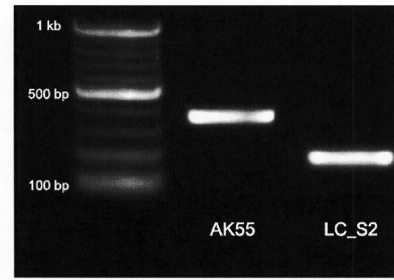
【 図 2 1 】



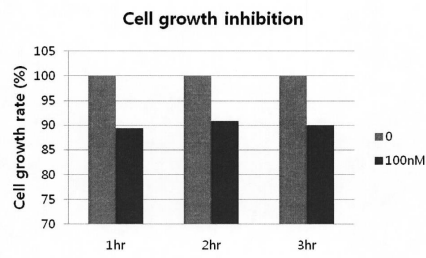
【 図 2 2 】



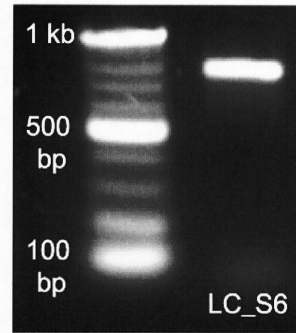
【 図 2 4 】



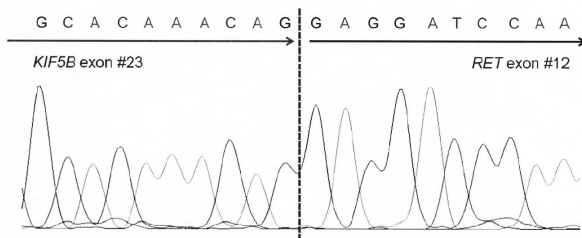
【 図 2 3 】



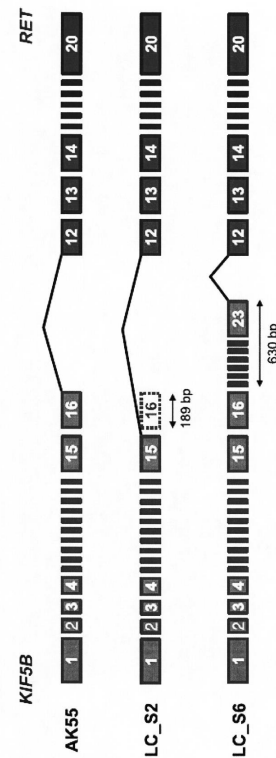
【 図 2 5 A 】



【 図 2 5 B 】



【 図 2 6 】



【 図 2 7 】

KIF5B-RETa 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)

ATGGCGGACCTGGCGCGAGTGCACATCAAAAGTGATGTGTCGCTTCAGACCTCTCAACGAGTCT
 TGAAGTGAACCGCGCGGAGCAAGTATCATCGCCCAAGTTTCAGGGGAGAGACACGGCTCGTATGCG
 CGTCCAAAGCCTTATGCAATTTGATCGGGGTGTTCCAGTCAAGCACATCTCAAGAGCAAGTGATATA
 TGACTGTGCAAAAGAAAGATTGTGAAGATGTATCTTGAAGGATATAATGGAAACAATATTTGCAATG
 GACAAACATCCTCTGGGAGTGAACAGACATCATCTGAGGGTAACTCTCATGATCCAGAAAGGATGG
 GAATTAITCCGAAGATTGTGCAAGATATTTTAATATAATTACTCCATGGATGAATAATTTGGAATT
 TCATATTAAGGTTTCATATTTGAATAATATTTGGATAAGATAAGGACCTGTAGATGTTTCAAAAG
 ACCAAACCTTTGATGTCATGAAGACAAACCAAGGATGTCCTATGTAAAGGGGTGCACAGAGCGT
 TTGTATGTAGTCCAGATGAAGTTATGTGATACCATAGTAAGGAAAATCCAAACAGACATGTAGC
 AGTTACAAATTAAGATGAACATAGCTCTAGGAGTCAACAATATTTCTATTAATGTCAAAACAAGA
 GAAACACACAAACGGAACAAAGCTGAGTGGAAAACCTTATCTGGTTGATTAGCTGGTAGTGA
 AAGGTTAGTAAACCTGGAGCTGAACAGTCTGCTGCTGATGAAGAGTAAAGCAATCAACAAAGTCA
 CTTTCTGCTCTCGCAATGTATATCTGCTTTGGCTGAGGGTAGTACAATAGTTCCTCATATGCGAT
 AGTAAATGAACAAGATCCTTCAAGATTCATAGTGGCAACTGTAGAACAACCTATTGTAATTTTG
 CTGCTCTCCATCATCAATAGTCTGAACAACTTCACTCTATTGGCCAAAGGGCCCA
 AAAACAATTAGAACATCGTTGTGTCAATGTGGAAGTAACTGCGAGAACAGTGGAAGAAAGAAAGTA
 TGAAAAAGAAAAAGAAAAATAAGATCCTGCGGGAACAATCTCAGTGGCTTGAATAAGAGCTC
 AACAGATGGCGTAATGGGGAGACGGTGCCCTATTGATGAACAGATTGACAAAGAGAAAGGCCAAC
 TTGGAAGCTTTCCAGCTGGATAAAGATATTCCTTACCAATGATAAAGCAAGCAACCGCAATTGG
 AGTTATAGCAAAATTTAATGATGCTGAAGAGAAAGTGTGAAGAAAGAAATGCTCAAAATATACA
 AACAGCTTGATGACAAAGATGAAGAAATTAACAGCAAAAGTCAACTGGTAGAGAACTGAAGA
 CGCAAAATGTTGATCAGGAGGAGCTTTTGGCATCTACCAAGAGGATCAAGACAATGTCAAG
 CTGAGCTGAATCGCCTTCAAGCAAGAAATGATGCCCTCAAGAGAAAGTGAAGAAAGTTTACA
 GGCCCTAGAAGAACTTGTCTGCAATATGATCAGAAGTCTCAGGAAGTTGAAGACAAACCTAAG
 GAATATGAATTCGTAGTGATGAATGAATCAGAAATCGGCAACTTACGCGAGTATAGATGCTGGA
 GCTTCAAGAACTTAAGAAATAGCAACAGCAGCAAGAAAGAGGAGGATGATGATGATGATGATGAT
 TTATCAAGAGCACTGACGAAATGCAATTCGTGTGTGGGAAATGATGATGAAGAGCGCTGAG
 GAACTGGCATGATAGTGAAGAGTTCACCTGTTGCAAGACTCTCAATTAGCAAAATGAAGTCAAG
 AAGTAAAGAAACCATGGTGAAGCTGTCAAGCACTGAAGAAAGCAACAACTGAGAGCAACAA
 AATGGGAAGAAATGAAGAGGAGTAGCAGCACTGTGAGCTTGTATCTCTCAAGAGGATCCAA
 AGTGGGAATTCCTCGGAAGAACTTGGTCTTGGAAAACTCTAGGAGAAGGCGAATTTGG
 AAAAGTGGTCAAGGCAACGGCTTTCATCTGAAGAGCAGAGCAGGGTACACACCGTGGC
 CCGTGAAGATCTGAAGAGCAAGCGCTCCCGGAGTCTGAGACTCTGCTGCAAGTCTC
 AAGCTCTGAAGCAGGTCAACCAACCCATGTATCAAAATGTATGGGGCTGCAAGCAGG
 ATGGCCCGCTCTCTCATCTGCGAGTACGCCAAATACGGCTCTCTGCGGGCTCTCTCCG
 CGAGAGCCGCAAGATGGGGCTGGCTACCTGGGCACTGGAGGAGCGCGCAACTCCAGCTC
 CTGGACCAACCGGATGAGCGGGCCCTCACCATGGGCACTCATCTATTGCTGGCAG
 ATCTCACAGGGGATGAGATCTGGCCGAGTGAAGCTCGTTTATCGGCACTTGGCAGCCA
 GAAACATCTGGTAGCTGAGGGGCGAAGATGAAGATTCGGATTCGGCTTGGCTGCGCCAGAT
 GTTATGAAGAGATCTCTAGCTGAAGAGGCGGAGCTGGCTGCAATTCAGATGATGGATGGC
 TTTTATGATCCCTTTTATGATCATCTACACACCAAGTGAATGATGCTCTTTGGGCTCTCT
 CTGTGGGAGATCGTGACCTAGGGGGAACCCCTATCTCGGATTCCTCTGAGCGGCTCT
 CAACCTCTGAAGACCGGCCACCGGATGGAGAGGCCAGACAACCTGACGCGAGGAGATGTA
 CGCGCTGATGCTGCAATGCTGGAAGCAGGAGCGGCAACAAAGGCGGTTGTTGCGGACAT
 CAGCAAGACCTGGAGAAGATGATGGTTAAGAGGAGAGACTACTTGGACCTTCGGCGCTCC
 ACTCCATCTGACCTCCTGATTATGACGACGGCTCTCAGAGGAGGAGACACCGCTGGTGG
 ACTGTAATAGCTGACCTGAGGCTCTGAGGCTCTGAGTCAATGGATGAAGAAACCACTATG
 CAGTGTCAAGCCGAACCTGGCTGGAGAGAGTCTGTGCTGAGGAGAAATGCTGAATATGATGA
 TACACCTGGGTTTCCAAGATATCCAATGATAGTATATGCTAACTGGATGCTTCAACCTCA
 GCGCAAAATTAATGGACACGTTGATGATTAA

【 図 2 8 】

KIF5B-RETa 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)

MADLAECNKKVMCRFRPLNESEVNRGDKYIAKFGQEDTVIASKPYAFDRVFQSSTSQEQQVNDY
 AKKIVKDVLEGVNGTIFAYGQTSNGKTHMEGLHDPGEMGIPIRVQDIFNYISMENLEPHIKVS
 YFEIYLDKIRDLDDVSKTNLSVHEDKNRVPYVKGCTERFVCSPEVMDTIDEGKSNRHVAVTNMNE
 HSSRSHSIFLINVQKENTQTEQKLSGLYLVDLAGSEKVSKTGAEGAVLDEAKNINKLSALGNVIS
 ALAEGSTVYPYRDSKMTRILQDLSGGNCRTTIVICCPSPSSYNESETKSLFLFGQRAKTIKNTVCNV
 ELTAEGWKKKYEKEKNILNRTIQWLENELNWRNGETVPIDEGFDEKANLEAFTVDKIDITL
 NDKPATAIGVGNFTDAERPKCEEIAKLKQLDDKDEEINQQSQLVEKLTOMLDOEELLASTRP
 DDQNMQAEINRLQAENDASKEEVKEVLALEELAVINVDQKSEVEDKTEYELLSDENLQKSA
 LASIDAEQLKLEMTNHHQKRAAEMMASLLKDLAEGIAVGNNVDKQPEGTGMIDEEFTVARLYSK
 MKSEVKTVMKRCQKLESTQTESNKKMEENEKELAACQLRISQEDPKWKEEPRKNLVLGKTLGE
 FGKVVKATAFHLKGRAGYTTAVKMKLENA SPSELRLDLSEFNVLKQVNHHPHVKLYGACSDG
 PLLLIVEYAKYGLRGFLRESRKVGPYLGSGGSRNSSLDHPDERALTMGLDISFAWQISQGM
 QYLAEMKLVHRDLAARNILVAEGRKMKISDFGLSRDYEDDSYVYKRSQGRIPVKWMAIESLFDHI
 YTTGSDVWSFGVLWEIVLGGNYPGIPPERFLNLTGHRMERPDNCSSEMYRLMLQCWKQ
 EPDKRPVFADISKOLEKMMVKRRDYLDLAASFTPSDSLIYDDGLSEETPLVDCNNAPLRALPST
 WIENKLYGMSDPNPWPGFSPVPLTRADGTNTGFRYPNDVSVYANWMLSPSAAKLMDTFDS

【 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)

ATGGCGGACCTGGCGCGAGTGCACATCAAAAGTGATGTGTCGCTTCAGACCTCTCAACGAGTCT
 TGAAGTGAACCGCGCGGAGCAAGTATCATCGCCCAAGTTTCAGGGGAGAGACACGGCTCGTATGCG
 CGTCCAAAGCCTTATGCAATTTGATCGGGGTGTTCCAGTCAAGCACATCTCAAGAGCAAGTGATATA
 TGACTGTGCAAAAGAAAGATTGTGAAGATGTATCTTGAAGGATATAATGGAAACAATATTTGCAATG
 GACAAACATCCTCTGGGAGAGACACACAAATGAGGGTAACTCTCATGATCCAGAAAGGATGG
 GAATTAITCCGAAGATTGTGCAAGATATTTTAATATAATTACTCCATGGATGAATAATTTGGAATT
 TCATATTAAGGTTTCATATTTGAATATATTGATAGATAAGGAACCTGTAGATGTTTCAAAAG
 ACCAAACCTTTGATGTCATGAAGACAAACCAAGGATGTCCTATGTAAAGGGGTGCAACAGAGCGT
 TTGTATGTAGTCCAGATGAAGTTATGGATAACATAGATGAAGGAAATCCAAACAGCATGTAGC
 AGTTACAAATTAAGATGAACATAGCTCTAGGAGTCAACAATATTTCTATTAATGTCAAAACAAGA
 GAAACACACAAACGGAACAAAGCTGAGTGGAACAACTTATCTGGTTGATTAGCTGAGTGAAG
 AAGGTTAGTAAACCTGGAAGTGAAGTCTGCTGCTGCTGATGAAGCTAAAGATCAACAAAGTCA
 GTTTTGTGCTGTGGAATGTATTTCTGCTTTGGGTGAGGGTAGTACAATGTTCATATGATGAGAT
 AGTAAATGAACAAGATCTTCAAGATTCATAGTGGCAACTGTAGAACAACCTATTGTAATTTTG
 CTGCTCTCCATCATCAATAGTCTGAAACAAATCTACACTCTTATTGGCCAAAGGGCCCA
 AAAACAATTAGAAACACAGTTTGTGTCATGTGGAATTAACCTGCAAGAGTGAAGAAAGAAAGTA
 TGAAAAAGAAAAAGAAAAATAAGATCCTGCGGGAACAATCTCAGTGGCTTGAATAAGTGAAGCTC
 AACAGATGGCGTAATGGGGAGACGGTGCCCTATTGATGAACAGTTTGAACAAAGAGAAAGCCAA
 TTGGAAGCTTTTCAAGGTGAATAAGATATTAATCTTACCAATGATAAAGCAAGCAACCGCAATTGG
 AGTTATGCAAAATTTAATGATGCTGAAGAGAAAGTGTGAAGAGAAATGCTGAATATATACA
 AACAGCTTGATGACAAAGATGAAGAAATTAACAGCAAAAGTCAACTGTGTAAGAGAACTGAAGA
 CGCAAAATGTTGATCAGGAGGAGCTTTTGGCATCTACCAAGAGGGATCAAGACAATAGTGAAG
 CTGAGCTGAATCGCCTTCAAGCAGAAATGATGCTTCAAGAGAAAGTGAAGAAAGTTTACA
 GGCCCTAGAAGAACTTGTCTGCAATATGATCAGAAGTCTCAGGAAGTTGAAGAACAAACCTAAG
 GAATATGAATTTGCTGATGAATTTGAATCAAGATCGGCAACTTACGCGAGTATAGATGCTGGA
 GCTTCAAGAACTTAAGAAATGACCAACCAAGCAAGAAAGAGCAGCTGAGATGATGCGATC
 TTATCAAGAAAGCTTGGAGAAATGAAGATTGCTGGGAAATGAATGATGAAGAGAGCTGAG
 GGAACCTGGCATGATAGATGAAGGTTCACTGTTGCAAGACTCTCAATTAGCAAAATGAAGTCAAG
 AAGTAAAGAAACCATGGTGAAGCGTTGCAAGCACTGAGAAGCACAACAACTGAGAGCAACAA
 AATGGGAAGAAATGAAGAGGATTGAGCAGCACTGAGCTTGTATCTCTCAAGAGGATCCAA
 AGTGGGAATTCCTCGGAAGAACTTGGTCTTGGAAAACTCTAGGAGAAGGCGAATTTTG
 AAAAGTGGTCAAGGCAACGGCTTTCATCTGAAGAGCAGAGCAGGGTACACACCGTGGC
 CCGTGAAGATCTGAAGAGCAAGCGCTCCCGGAGTCTGAGACTCTGCTGCAAGTCTC
 AAGCTCTGAAGCAGGTCAACCAACCCATGTATCAAAATGTATGGGGCTGCAAGCAGG
 ATGGCCCGCTCTCTCATCTGCGAGTACGCCAAATACGGCTCTCTGCGGGCTCTCTCCG
 CGAGAGCCGCAAGATGGGGCTGGCTACCTGGGCACTGGAGGAGCGCGCAACTCCAGCTC
 CTGGACCAACCGGATGAGCGGGCCCTCACCATGGGCACTCATCTATTGCTGGCAG
 ATCTCACAGGGGATGACGATCTGGCCGAGATGAAGCTCGTTTATCGGCACTTGGCAGCCA
 GAAACATCTGGTAGCTGAGGGGCGAAGATGAAGATTCGGATTCGGCTTGGCTGCGCCAGAT
 GTTATGAAGAGATCTTATGATCATATCTACACACCGCAAGTGAATGATGCTCTTTGGGCTCTCT
 GCAATGAATCCCTTTTGTATCATATCTACACACCGCAAGATGATGATGGTCTTTTGGTGTCT
 CTGCTGTGGGAGATCGTACCTTAGGGGGAACCCCTATCTGCGGATTCTCTGAGCGGCTC
 TCTTCAACCTCTGGAAGACCGGCCACCGGATGGAAGAGGCGAGACAACCTGACGAGGAGGA
 GTACCGCTGATGCTGCAATGCTGGAAGCAGGAGCGGACAAAAGGCGGCTGTTTGGG
 ACATCAGCAAGACCTGGAGAGATGATGTTAAGAGGAGAGACTACTTGGACCTTGGCG
 CGTCACTCTGCTGACCTCCGTATTATGACGAGCGGCTCTCAGAGGAGGAGACACCGCT
 GTGGGCTGTAAATGACCGCCCTCCCTCGAGCTCTCTTCCACATGGATTGAAGAAACAA
 CTCTATGATGAATTTCCATGCAATTAATGATGATTCTAG

【 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)

MADLAECNKKVMCRFRPLNESEVNRGDKYIAKFGQEDTVIASKPYAFDRVFQSSTSQEQQVNDY
 AKKIVKDVLEGVNGTIFAYGQTSNGKTHMEGLHDPGEMGIPIRVQDIFNYISMENLEPHIKVS
 YFEIYLDKIRDLDDVSKTNLSVHEDKNRVPYVKGCTERFVCSPEVMDTIDEGKSNRHVAVTNMNE
 HSSRSHSIFLINVQKENTQTEQKLSGLYLVDLAGSEKVSKTGAEGAVLDEAKNINKLSALGNVIS
 ALAEGSTVYPYRDSKMTRILQDLSGGNCRTTIVICCPSPSSYNESETKSLFLFGQRAKTIKNTVCNV
 ELTAEGWKKKYEKEKNILNRTIQWLENELNWRNGETVPIDEGFDEKANLEAFTVDKIDITL
 NDKPATAIGVGNFTDAERPKCEEIAKLKQLDDKDEEINQQSQLVEKLTOMLDOEELLASTRP
 DDQNMQAEINRLQAENDASKEEVKEVLALEELAVINVDQKSEVEDKTEYELLSDENLQKSA
 LASIDAEQLKLEMTNHHQKRAAEMMASLLKDLAEGIAVGNNVDKQPEGTGMIDEEFTVARLYSK
 MKSEVKTVMKRCQKLESTQTESNKKMEENEKELAACQLRISQEDPKWKEEPRKNLVLGKTLGE
 FGKVVKATAFHLKGRAGYTTAVKMKLENA SPSELRLDLSEFNVLKQVNHHPHVKLYGACSDG
 PLLLIVEYAKYGLRGFLRESRKVGPYLGSGGSRNSSLDHPDERALTMGLDISFAWQISQGM
 QYLAEMKLVHRDLAARNILVAEGRKMKISDFGLSRDYEDDSYVYKRSQGRIPVKWMAIESLFDHI
 YTTGSDVWSFGVLWEIVLGGNYPGIPPERFLNLTGHRMERPDNCSSEMYRLMLQCWKQ
 EPDKRPVFADISKOLEKMMVKRRDYLDLAASFTPSDSLIYDDGLSEETPLVDCNNAPLRALPST
 WIENKLYGRISHAFTRF

【 図 3 2 】

KIF5B-RETA 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)

[illegible]

【 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)

TACGGCAGCAGCTGCGCCGACAGCCCAATCAAAATGTGTGCTGCTCGACAGCTCTCCAAAGCGCTTGAAGTGG
 ACCGCGCGCAGACAGATACATCGCCAGAAATTTTCAGGAGAGACAGACAGCGCTGTGATCGCGTCCAGCCGCTTAT
 GCAATTTGATCGGGTGTGTCCAGGTACAGCAGCATCTCCAGAGACAGATGTATATAAGCATCTGCCAAAGAAATGAT
 ATGATGAGCTTCAGTTGAAGATATATATGATGACAAATATATTTGATATAGCATCTCTCGGAGAGAAATGCTG
 AATATGAGAT
 TATATATATCTCCATCGATGAAATATTTGGAATTTTCATATTAATGCTGTTATCTTTTAAATATATTTGCGATATG
 ATAGAAGCATCTGTAGATGTTTCTTCAAAGCAACCACTTTCAGTCTTGAAGACAAACCGAGTTCGCTTAAGT
 AAAGGGTCTCGACAGAGCGTCTTTGATGTATGTC TCCAGATAGATATATGATATAGATATAGATAGAGAAATCTG
 TCGGAGTCTGAT
 CAACACAGAGAACCAACAAACGAGCAAAACCTGAGTGTGAGAAACCTTATCTCGGTTTGAATTCAGTGTGCTG
 CAGAAAGTGTATTAACATCGTGCAGTGAAGTGTGCTGCTGGAAGATATATAAACCATCTCAACCAAGTCTCAT
 GTATCTCTGGAATATGTATTGTTGCTTGTGGCTGAGGTGATATACATATGTTCCTCATCGATATAGATTAAGATG
 TCGGAGTCTGAT
 ATACGATAGATGCTGAAACAAATCTACACTCTTATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
 TGTGCTAATGTGGAGTGTCTGACGACAGCATGTGGAAAGAAAGAATGTAAAGAAAGAAAGAAAGAAATTAAGAT
 CTCGTCGAGACACATCTTACATGGTGTGAAATGATGCTACACAGATGCGGCTAATGTGGGACAGAGCGTGCTCAT
 TGTAGAACACTTTGACAAAGAGAGAGCAACTGTGAAGACTTTTCACAGTGTAGATGAATATATTCTTTACCA
 TCGGAGTCTGAT
 AGAAATTTGCTAAATTTATCAACACAGCTGTGATGACAGAGATGAGAAGAAATTAACACGCAAGATCAACTGCTGAT
 AGAATAGTACAGACGCAAAATGTGGATCAGAGAGAGAAATTTTGGCATCTACCGAAGACGGATCAAGAACAATG
 CGAAGCTGTGAT
 TCGGAGTCTGAT
 AATGCTCTGAT
 AGGAAATAGCAACCAACCAAGAAAGAAACGAGCACCTGAGATGATGATGATCTTTAAAGAAAGACCTTGCAG
 AATATAGGAATTTGCTGTGGAAATATATAGATGTATTAAGACAGCTGTGGAAGAACTGCGATATATAGATAGAAATG
 TCGGAGTCTGAT
 TTTGAAGAGCAACTGAT
 TGTGATCTCTCTCAACATCTGAGCGCAAAATCGACATCTTGATGGAATACCTTCAAATGTGGAACAAAGAAAGAA
 ACAGATGTTGAGGAATGATCTGTGATGCTGCCCTTAAGTGTAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
 CATGAAATGTGTTGAAGAGACATTTAAATAGGTTTCAGATCGCAATGCAAGTTATGACAGACGTTGTGGAACGCG
 TTTGAAGAGCAACTGAT
 AAACATTTATTATGCTGTTCTTCAGACCAACCAAGCAAAAGATGTTGATGAGACAGAAAGCTCTGAAGATAGAAC
 ATGAGAAGTTGTGAAGCCAGCATATAGGAAGAAAGCAAGAAATCACTAGCAATCTACAGGTTATGCGAATGATG
 ATCGAAGACAGACAGACAGACCTGTGAAGGTTTGTGAAGAGACAGATGTGCGAAGAAAGACTCTCAGATCTTTACA
 TCGGAGTCTGAT
 GACACCGAGACAGACAGCTCTGCAAGACCAAAATCTCTCTTGTGAAATATGTATGAAAGCGATCTACTT
 ATGTCGACCAATCAAGAGGATCTCAAGTGTGGAAATCTCTCGGAAGACATCTGGTCTTGTTGAAATATCTCTAG
 GAGAGAGCGAATTTGAGGAGGCTGCTCAAGCTGACAGCGATCCGCTTATCTTCAAGGAGAGAGCGGTCACAT
 TCGGAGTCTGAT
 TCAACGCTCTGGAAGCAGAGCTACCCACCATCTGTCATCAAAATGTGTGGGCTGCTGATGATGATGATGATGATGAT
 CCGCTCTCTCTCATCTGTTGAGATGCTGCAAAATCGAGTCCGCTGGGGGCTCTCTCCGCGAGAGCGCGCA
 AGTTGGGGCTGTGCTCATCTGGGAGATGGAGGAGAGGCTGCACTCCAGCTCCAGCTCCAGGACAGCCCGGATGAT
 TCGGAGTCTGAT
 CCGATGAGGATCTCTCTCTCGGAGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
 GAAAGTTTCTGGATTTCTGCTCTCGCTGAAGTGTATGTATGAAGAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
 TCGATTCAGTGAATTAAGTATGATGSCATTAATGATCCCTTTTGTATCTATCTACCTACCCAGCGAAGTGAITGAT
 GGTCTTTTGGTGTCTGCTGTGGGAGATCTGTGACCTGAGGGGAAACCTCTGATCTGGAATTTCTCTCTG
 TCGGAGTCTGAT
 GTACCCGCTG
 AAGAACCTTGGAAGAT
 TCTCTTGATTTATGACGAGGCTCTCTCTGAGGAGAGAGACATCGGCTGTGTTGATGATGATTAATATAGCCGCCCT
 TCGGAGTCTGAT
 AGATGATCTTGATCTACCTACGAGAGCTGTAGGCTACATCTGGGTTTCTCAAGATATCCAAATGATGATGATGAT
 TGTATATGCTGATCTGGATGCTTTTACCTCTACGCGCAAAATATGAGCACCTGTTGTATGATGATTA

KIF5B-RETA 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)

[illegible]

【 図 3 4 】

KIF5B-RETA 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)

[illegible]

【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・テンス・フロア

(72)発明者 ジョン・スン・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・テンス・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・テンス・フロア

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 国際公開第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 0 7 K １／００－１９／００
C 1 2 N １５／００－１５／９０
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q