

201019020A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

第3次総合戦略研究事業

網羅的なゲノム異常解析と詳細な臨床情報に基づく、ヒトがんの多様な  
多段階発がん過程の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横田 淳

平成23(2011)年 5月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告

網羅的なゲノム異常解析と詳細な臨床情報に基づく、ヒトがんの多様な多段階発がん過程の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究  
横田 淳

II. 分担研究報告

1. 肺がんの診断と治療の標的分子の同定  
横田 淳
2. 肺がんの治療時期や治療法の選択に有用な分子病理学的分類法の確立  
野口 雅之
3. 腎細胞がんの網羅的ゲノム解析  
小川 誠司
4. 難治性白血病に対する多段階発がん機構の解明  
森下 和広
5. 難治がんにおける包括的ゲノム解析  
柴田 龍弘
6. 諸臓器がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析  
稲澤 譲治

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷



総括研究報告書

網羅的なゲノム異常解析と詳細な臨床情報に基づく、ヒトがんの多様な多段階発がん過程の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究

研究代表者 横田 淳 国立がん研究センター研究所・多段階発がん研究分野・分野長

研究要旨

早期肺腺がんの術後再発予後を規定する因子としてMYC遺伝子の増幅とmiR-21の高発現を同定し、浸潤がんへの移行にSFN遺伝子の脱メチル化による高発現を同定した。SNPを用いた網羅的なゲノム解析により腎細胞がんにおける染色体の多倍体化と14qのLOHが独立した予後因子であることを見出した。ATLの候補がん抑制遺伝子として同定したNDRG2は口腔がんにおいてもメチル化で発現が抑制され、PI3K/AKTを活性化することを見出した。胃がんの染色体構造異常プロファイルと機能的スクリーニングにより新規がん遺伝子GLO1を見出した。マイクロRNAのデータベース解析、メチル化解析により、miR-124とmiR-203が、腫瘍特異的DNA過剰メチル化で機能を消失している肝がん抑制型miRNAであることを明らかにした。

研究分担者

- |          |            |       |
|----------|------------|-------|
| 1. 横田 淳  | 国立がん研究センター | 分野長   |
| 2. 野口 雅之 | 筑波大学大学院    | 教授    |
| 3. 小川 誠司 | 東京大学医学部    | 特任准教授 |
| 4. 森下 和広 | 宮崎大学医学部    | 教授    |
| 5. 柴田 龍弘 | 国立がん研究センター | 分野長   |
| 6. 稲澤 謙治 | 東京医科歯科大学   | 教授    |

A. 研究目的

本研究の目的は、多段階発がん過程および多様性のあるがんの臨床病態を、がん細胞内に蓄積しているゲノム異常との対応で把握し、個々のがんに最適の治療法を提供する個別医療・予知医療の実現へ向けて、がんの新たな分子診断法や分子標的療法の実現を加速させる新たな情報を集約することである。がんは細胞内に遺伝子異常が蓄積することにより発生、進展していく病気なので、がんの罹患率・死亡率を減少させるためには、ゲノム異常を中心とした発がんの分子基盤を明らかにし、得られた情報を臨床へ導入していく必要がある。

近年、一部のがんでは、がんの分子情報に基づいた診断法や治療法の開発により、予後の改善が見られている。しかし、まだ多くのがんでは、がんの特性である浸潤・転移や脱分化、ゲノム不安定性などの機構に関して、がん細胞内に蓄積している遺伝子異常との対応では把握されておらず、治療の標的となる特定の分子も同定されていない。一方、ヒトゲノムの情報が充実してきており、様々なゲノム網羅的な遺伝子の解析技術も急速に進歩している。また、ヒト不死化上皮細胞や各種がん幹細胞など、細胞生物学的な解析技術も進歩が目覚ましい状況にある。そんな背景の中、ヒトがんにおけるゲノム異常に関して、全ゲノムに亘って網羅的に解析することが必須であると世界的にも認識されており、我が国でも申請者や研究分担者等らのグループを中心に積極的にゲノム研究が展開されている。本研究班は、国内でリーダーシップを取るがんのゲノム研究者を中心に構成し、情報、技術、

材料など、すべてにおいて、世界に先駆けた研究を展開できる体制を整えている。また、ヒト細胞を用いた細胞生物学的解析や新規がん関連遺伝子の単離研究においても優れた研究歴を持つ研究者を加えたことにより、本研究で同定された新たな遺伝子の機能に関しても迅速に結果を集約でき、がん細胞の特性を制御する新たな手法の開発を進めることも可能である。さらには、分子病理学研究者の参加により、がんの臨床病理学的な所見との関連性に関しても解析を進め、臨床への応用研究を展開できる体制を整えている。本研究は、世界的にもその重要性が認識されているものの、研究の展開が遅れている分野であり、ゲノム解析分野で独自の研究歴を持つ構成研究者の協力によって飛躍的な研究の発展が望まれるものである。

本研究では、難治がんを中心とした種々のがんの網羅的なゲノム異常解析を行い、その結果の中から実際にがんの診断、治療に役立つ標的分子を同定し、がんの臨床応用開発へ向けた分子基盤を構築していく。第一に、高精度なゲノム解析技術を駆使して、死亡率の高い肺がん、膵がん、白血病などのゲノム異常に関して網羅的な解析を行い、がん細胞におけるゲノム異常の全容を明らかにする。また、独自に解析技術の開発も進める。第二に、高頻度にゲノム異常を起こしている遺伝子に関しては、整備された臨床検体を用いた解析から臨床病理学的所見との関連性を明らかにし、診断法の開発に結び付ける。第三に、正常上皮細胞やがん細胞株を用いて、細胞のがん化過程の再現とがん形質の抑制・誘導の検討を行い、ゲノム異常を起こしている遺伝子の生物学的機能とがん特性発現における分子経路を明らかにし、その制御法を追求する。第四に、これらの研究成果を統合して、がんの新たな診断法、治療法の開発に向けた研究を展開する。がんのゲノム解析に基づいた新たな分子診断法や分子標的療法の開発が進みつつある現在、ゲノム網羅的な解析によりがんのゲノム異常の全容を明らかにすることは、今後の更なる開発に向けて必須の情報となる。

## B. 研究方法

### 1. 肺がんの診断と治療の標的分子の同定

小型肺腺がんの手術組織標本65例からDNAの抽出を行い、10K SNP アレイを用いて遺伝子過増幅(>5 copies)領域の全ゲノム網羅的解析を行った。また、40例の肺腺がん細胞株について250K SNP アレイ解析を行い、小型腺がんと共通して過増幅している領域と遺伝子を同定した。162例の病理学的病期I期の肺腺がんにおけるMYC遺伝子過増幅を定量的ゲノムPCR法で算出し、臨床病理学的所見、他の遺伝子異常との関連性を解析した。

アメリカ、ノルウェー、日本の計317例の腺がん検体を用いてmiR-21、miR-17、miR-155の定量的なRT-PCR法を行い、発現と予後との関連性を検証した。

不死化肺上皮細胞や肺腺がん細胞株にsiRNAやベクターを用いてLKB1遺伝子の発現が低下した細胞を作製し、細胞の運動能、浸潤能の変化を調べるとともに、上皮間葉移行に関わる様々な分子の変動をウェスタンブロット法やRT-PCR法で検討した。PTENに関しては、正常型と失活型のテトラサイクリン誘導発現ベクターを作製し、内在性のPTENが発現していない肺がん細胞に導入して、浸潤能等の生物学的変化とPI3K/ALK/NFκB経路の活性との関連を検討した。

### 2. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

SFNのゲノム増幅を検討するために初期肺腺がん、進行肺腺がん、および周囲の正常肺組織から抽出したDNAをサンプルとしてゲノムPCR法を行った。さらにメチル化の異常を検出するために、bisulfite sequencing法とメチル化特異的PCR(MSP)法を用いた。ゲノムPCR同様、新鮮肺腺がん組織からDNAを抽出し、bisulfite処理にて非メチル化チミジンをウラシルへと変換した。そのDNAをサンプルとしてbisulfite sequencingおよびreal time MSPを実施した。

### 3. 腎細胞がんの網羅的ゲノム解析

腎細胞がんと診断された200例について、手術時に切除された腫瘍および正常腎組織からDNAを抽出、高密度SNPアレイを用いてコピー数およびLOHの網羅的な解析を行った。また、解析によって得られたゲノム異常と臨床情報を比較し、予後と関連する因子の同定を試みた。腎細胞がんにおける遺伝子変異をより詳細に解析するために、次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンシングを行った。腫瘍ゲノムおよびそれに対応する正常ゲノムに対し、全エクソンをキャプチャーした後、次世代シーケンサーにてリシーケンシングを行った。

### 4. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

これまで同定した転写因子ZEB1、接着因子TSLC1、情報伝達因子NDRG2、遺伝子Xのそれぞれの遺伝子の機能解析を行った。またATL-14q32領域、AML-7番染色体より新規がん遺伝子・がん抑制遺伝子同定を試みた。さらにNDRG2欠損マウスを作製してがん発症機構を追求した。

### 5. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

難治がん臨床検体を用いて、レーザーマイクロダイセク

ションにより腫瘍細胞のみを選別し、高純度のがんゲノムバンクを構築し、ヒトゲノム全体をカバーする4500個のBACクローンを搭載した高密度BACアレイあるいは25万個のオリゴプローブを搭載した高密度オリゴゲノムアレイによる網羅的な染色体コピー数異常の解析を進めた。高速シーケンサーを用いて、RNA解読並びにエクソンキャプチャー法によって濃縮したエクソン領域の解読を行なった。当該分子のゲノム異常を持つがん細胞株を用いて、細胞増殖能、造腫瘍能測定や薬剤感受性などについて検索を行なった。免疫染色による臨床検体での発現解析等の検討を行った。

### 6. 諸臓器がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析

高精度の自作ゲノムアレイとその応用技術を確立し、これらにより各種がんのゲノムコピー数異常を体系的に解析し、がん特異的ゲノム構造異常のデータを得た。特に悪性度の高い小児神経芽腫、甲状腺未分化がん、肺小細胞がん、口腔がん、肝がんなどの生命予後が不良で有効な治療法が確立されていない難治がんを研究の主たる対象とした。これら難治がんにおいて、新規に見出された病型特異的な増幅や欠失、さらにがん特異的DNAメチル化などをランドマークに、新規がん関連遺伝子やマイクロRNAを同定し、がん悪性度診断のバイオマーカーとしての有用性を検討した。同定したがん関連遺伝子の機能を解析し、その破綻によって起きるがん病態を解明するとともに、これを新たながん治療薬開発のシードとした。また、ゲノムアレイによるがん個性診断システムの確立と実用化に向けての開発研究を行った。

### (倫理面への配慮)

手術で得られたヒト正常細胞の使用は、倫理審査委員会の承認を得て、提供者に不利益の生じないよう、また、同意を確認して行っている。ヒトがん組織の使用に当たっては、「臨床研究に関する倫理指針」に従い、個人情報の保護に十分に配慮し、必要に応じて倫理審査委員会の承諾を得て進めている。動物の操作は、各施設の動物倫理委員会の定める規則に基づいて、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛を伴う実験への十分な配慮のもとに進んでいる。

## C. 研究結果

### 1. 肺がんの診断と治療の標的分子の同定

小型肺腺がんでは第5、7、8、14染色体上の11領域が高頻度(>10%)に過増幅を起こしていた。一方、細胞株における250K SNPアレイのデータでも、やはり第5、7、8、14染色体上の13領域に高頻度の過増幅が認められた。両者の結果を併せて解析した結果、第8染色体の5領域が共通領域として同定され、それらの領域内ではMYC遺伝子のみが蛋白質をコードする遺伝子であった。そこで、臨床所見や遺伝子変異との関連性を検討したところ、MYC遺伝子の過増幅は小型肺腺がん患者の予後と有意に関連することが分かった。次に、定量的リアルタイムPCR法キットを用いて過増幅の確認を行った結果、CNAG softwareの解析結果とPCR法の結果がよく一致した。そこで、I期の肺腺がん162症例を用いて定量的リアルタイムPCR法で検討したところ、MYC過増幅は術後の再発予後と有意に相関し、

早期肺腺がんの予後予測因子として有用であることが示された。また、miR-21 の発現は3つの異なるコホートで予後との有意な相関を示した。即ち、アメリカとノルウェーの症例ではがん特異的な死亡率との相関を、日本の症例では再発予後との相関を示した。miR-21 の発現は進行がんで高く、ステージIの患者においても発現量と予後との相関があった。

LKB1 の発現低下によって不死化肺上皮細胞と肺腺がん細胞株の運動能、浸潤能が増強し、E-cadherin などの上皮細胞のマーカーの発現が低下して間葉細胞のマーカーの発現が亢進した。また、EMT 誘導転写因子である ZEB1 の発現が亢進し、miR-200a/c の発現は低下した。PTEN が発現していない肺腺がん細胞株を用いて、正常あるいは脱リン酸化酵素活性のない PTEN の発現誘導を行うと、正常型の PTEN を誘導したときのみ AKT のリン酸化が低下して NFκB の転写活性も低下した。さらに、足場非依存性増殖や浸潤能も低下した。

## 2. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

我々は以前初期肺腺がんにおいて上皮内がんから浸潤がんへ増悪する際に SFN 発現亢進が起こり、SFN 蛋白質は肺腺がんの増殖能を亢進させることを報告したが、その発現亢進が起こる機序は明らかではない。そこで、SFN ゲノム上の遺伝子増幅を検出するために、ゲノム PCR 法を用いた解析を行ったが、初期腺がんでは SFN をコードする領域の増幅は認めなかった。

次にメチル化の異常を解析した結果、正常肺組織および初期肺腺がんにおいて SFN プロモーター領域は完全メチル化されていたのに対し、進行肺腺がんでは部分メチル化がほぼすべての症例で検出された。さらに MSP と同じサンプルを用いて、real time RT-PCR と免疫染色を行い SFN の mRNA および蛋白レベルでの発現解析を行なった。その結果を real time MSP から算出した SFN プロモーター領域のメチル化率と照らし合わせると、メチル化率と SFN 発現量は有意に相関していた。さらに、症例の病期との関連を解析し、メチル化率は進行した病期の腫瘍ほど低いことが分かった。

## 3. 腎細胞がんの網羅的ゲノム解析

200 例のうち 96% の症例において何らかのゲノム異常が観察された。淡明細胞がんにおいては VHL 遺伝子を含む 3p の欠失を 68% に、aUPD を 23% に認めたほか、5q の増幅 (63%)、7q の増幅 (41%)、9p の欠失 (17%)、14q の欠失 (27%) を高頻度に認めた。また、約 4 分の 1 の症例では染色体の多倍体化が見られた。これら多倍体化した症例では、ploidy の変化を除くと近 2 倍体の症例と類似したコピー数変化のパターンを示していた。嫌色素性腎がんでは 1, 2, 6, 9, 10, 13, 17, 21 の欠失を、乳頭状腎がんでは 2q, 8, 17 の増幅を高頻度に認め、組織型に特徴的なゲノム異常のパターンが観察された。ゲノム異常と臨床情報を比較したところ、多倍体化したケースでは遠隔転移をきたした症例が有意に多く、生存率の低下が認められた。また、多変量解析を行った結果、多倍体化と 14q の LOH は独立した予後不良因子であった。

7 例の淡明細胞がんに対して全エクソンシーケンスを行ったところ、VHL 遺伝子の他にも多数の体細胞遺伝

子変異が認められた。1 症例あたり平均 34 の遺伝子変異を検出することができ、その一部はがんの発生や進展に寄与していると考えられた。

## 4. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

ATL 関連がん抑制遺伝子 ZEB1 は SMAD7 に結合し機能抑制をすることで TGFβ 情報伝達系の negative feedback を抑制して情報伝達を促進することを明らかにした。ATL では ZEB1 のプロモーターメチル化による低発現と SMAD7 の NFκB 活性化に伴う高発現が重なり TGFβ 反応性の欠如に繋がることを突き止めた。同定したがん抑制遺伝子 NDRG2 は ATL 細胞の増殖抑制機能を有し、さらに口腔がんにおいてもプロモーターメチル化により発現抑制され、かつ NDRG2 欠損は PI3K/AKT 情報伝達系の活性化に繋がることを突き止めた。HTLV-1 感染細胞株では CDKN1A は HTLV-1 Tax により活性化されることが知られているが、ATL では逆にプロモーターメチル化により低発現し、HTLV-1 から ATL への移行に DNA メチル化異常が重要であることが示唆された。

## 5. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

胃がん染色体構造異常プロファイル並びに機能的スクリーニングにより新規がん遺伝子 GLO1 を同定した。網羅的発現解析によってがん遺伝子 NRF2 が mTOR 経路を活性化し、NRF2 変異を持つ肺がん細胞が mTOR 阻害剤に感受性を示すことを発見した。NRF2 変異が食道がんの 20% 程度で起こっており、化学療法や放射線治療に対する抵抗性と相関することを見出した。低分化胃がん臨床検体における全トランスクリプトーム解読によって新規の融合遺伝子を複数同定した。EML4-ALK 融合遺伝子を持つ肺がんの臨床病理学的特徴を見出した。

## 6. 諸臓器がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析

独自開発の高精度ゲノムアレイと応用技術に加えて高スループット miRNA 機能アッセイにより難治がんのゲノム・エピゲノム解析を実施して、がん関連マイクロ RNA を含む複数のがん関連遺伝子を同定した。miRNA の 456 種において UCSC ゲノムデータベース検索から CpG island 近傍に存在している 43 個の miRNA に着目した。COBRA 法でメチル化解析を行い、正常肝と比して HCC 細胞株で過剰 DNA メチル化されている 11 個の miRNA を特定した。これらのうち、miR-124 と miR-203 が、腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化で機能を喪失させる肝がん抑制型 miRNA であることを明らかにした。さらに、同様のアプローチで子宮体がん抑制遺伝子型 miRNA を同定した。

## D. 考察

### 1. 肺がんの診断と治療の標的分子の同定

第 8 染色体長腕に位置する MYC 遺伝子の過増幅を呈する小型肺腺がん及び病理学的病期 I 期の肺腺がんが有意に予後不良であったことから、このような症例に対しては術後化学療法等の併用による予後の改善を検討する必要性が示唆された。早期肺腺がんの予後との関連を示した miR-21 の発現は、患者の予後を推測できるバイオマーカーであるだけでなく、治療の標的分子ともなり得るもので

ある。

・肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の失活は EMT を誘導してがん細胞の悪性を増強させる一因と考えられた。肺がんにおける PTEN 遺伝子の失活は PI3K/AKT/NFκB の分子経路を活性化してがん細胞の浸潤能を亢進すると考えられた。LKB1 も PTEN も EMT の誘導やがん幹細胞化との関連が強く示唆されたので、更なる解析を続けている。

## 2. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

SFN 発現はメチル化により制御されており、正常組織、および上皮内がんにおいてはメチル化されていたプロモーター領域が進行がんになると何らかの理由で一部脱メチル化し、発現上昇を起こすことが明らかになった。

## 3. 腎細胞がんの網羅的ゲノム解析

今回の SNP アレイの結果から、腎がんにおけるゲノム異常の検索が、診断や分類、予後予測に有用と考えられた。また、次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスは多くの変異を検出でき、遺伝子異常を解明するうえで、非常に high throughput で強力なツールであると考えられた。

## 4. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

ATL 発症に伴う多段階発がんに関わる ZEB1、NDRG2、CDKN1A の機能解析により、TGFβ に対する不応性、PI3K/AKT 情報伝達系の恒常的活性化、CDKN1A の不活化が ATL 発症のステップとして重要であることが明らかになった。

## 5. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

胃がんの新規がん遺伝子 GLO1 はすでに阻害剤が存在しており、治療標的としても有望と考えられる。NRF2 変異がんに対する新たな分子標的治療の可能性や、既存の放射線化学療法の奏功性に対するバイオマーカーの可能性について期待される。高速シーケンサーを用いた固形がんにおける新規融合遺伝子同定については今後更に検索を広げる予定である。

6. 諸臓器がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析  
miRNA 研究が飛躍的に進展し、発がんの新たな分子メカニズムの解明のみならず、がんの個別診断法や予後予測法の開発、あるいは新規抗がん剤としてのアンチセンス核酸医薬などへの臨床応用も期待される。

## E. 結論

### 1. 肺がんの診断と治療の標的分子の同定

我が国における肺がんの診断法や治療法の改善を目指す上で貴重な情報が集積しつつある。即ち、今年度の結果から、MYC 遺伝子増幅や miR-21 発現は肺腺がんの予後因子であること、LKB1 や PTEN の失活は肺がんの上皮間葉転換や浸潤に関与していることが分かった。

### 2. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

SFN はプロモーター領域が脱メチル化を起こすことで発現亢進し、その結果、肺腺がんの初期悪性を促していた。

今後は SFN の下流の遺伝子を探索し、SFN による増殖促進機構を解明していく。

## 3. 腎細胞がんの網羅的ゲノム解析

腎細胞がんに対し、SNP アレイを用いた網羅的なゲノム解析を行い、染色体の多倍体化と 14q の LOH は独立した予後不良因子であることを見出した。さらに、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスを行い、多数の体細胞変異を検出した。

## 4. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

ATL における遺伝子発現異常は DNA メチル化の異常によるものが主であり、ゲノム欠失や転座は全体の 30%以下である。それはゲノム異常が多様にもかかわらず、ATL が疾患として類似性を有する説明の一つとして考えられる。

## 5. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

ゲノム異常解析を起点とした新規がん関連遺伝子の同定と診断治療への応用について研究を進めた。更に新型シーケンサーを用いた全トランスクリプトーム解読並びに全エクソン解読に着手した。

## 6. 諸臓器がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解

独自開発の高精度ゲノムアレイと応用技術、高スループット miRNA 機能アッセイにより、がん関連マイクロ RNA を含む複数のがん関連遺伝子を同定した。がん個別化医療のバイオマーカーや分子標的治療のシーズとして期待できる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kohno T, Otsuka A, Girard L, Sato M, Iwakawa R, Ogiwara H, Sanchez-Cespedes M, Minna JD, Yokota J. A catalog of genes homozygously deleted in human lung cancer and the candidacy of PTPRD as a tumor suppressor gene. *Genes, Chromosomes, Cancer*, 49:342-352, 2010.
- 2) Kodama M, Otsubo C, Hirota T, Yokota J, Enari M, Taya Y. Requirement of ATM for Rapid p53 Phosphorylation at Ser46 without Ser/Thr-Gln Sequences. *Mol Cell Biol*, 30:1620-1633, 2010.
- 3) Kohno T, Kunitoh H, Shimada Y, Shiraishi K, Ishii Y, Goto K, Ohe Y, Nishiwaki Y, Kuchiba A, Yamamoto S, Hirose H, Oka A, Yanagitani N, Saito R, Inoko H, Yokota J. Individuals susceptible to lung adenocarcinoma defined by combined HLA-DQA1 and TERT genotypes. *Carcinogenesis*, 31:834-841, 2010.
- 4) Roy BC, Kohno T, Iwakawa R, Moriguchi T, Kiyono T, Morishita K, Sanchez-Cespedes M, Akiyama T, and Yokota J. Involvement of LKB1 in

- epithelial-mesenchymal transition of human lung cancer cells. *Lung Cancer*, 70:136-145, 2010.
- 5) Iwakawa R, Kohno T, Enari M, Kiyono T, Yokota J. Prevalence of human papilloma virus 16/18/33 infection and p53 mutation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*, 101:1891-1896, 2010.
  - 6) Kohno T, Kakinuma R, Iwasaki M, Yamaji T, Kunitoh H, Suzuki K, Shimada Y, Shiraishi K, Kasuga Y, Hamada GS, Furuta K, Tsuta K, Sakamoto H, Kuchiba A, Yamamoto S, Kanai Y, Tsugane S, Yokota J. Association of CYP19A1 polymorphisms with risks for atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma in the lung. *Carcinogenesis*, 31:1794-1799, 2010.
  - 7) Shiraishi K, Kohno T, Tanai C, Goto Y, Kuchiba A, Yamamoto S, Tsuta K, Nokihara H, Yamamoto N, Sekine I, Ohe Y, Tamura T, Yokota J, Kunitoh H. Association of DNA repair gene polymorphisms with response to Platinum-based doublet chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 28:4945-4952, 2010.
  - 8) Yokota J, Shiraishi K, Kohno T. Genetic basis for susceptibility to lung cancer: Recent progress and future directions. *Adv Cancer Res*, 109:51-72, 2010.
  - 9) Saito M, Kumamoto K, Robles AI, Horikawa I, Furusato B, Okamura S, Goto A, Yamashita T, Nagashima M, Lee T-L, Baxendale VJ, Rennert OM, Takenoshita S, Yokota J, Sesterhenn IA, Trivers GE, Hussain SP, Harris C C. Targeted disruption of *ing2* results in defective spermatogenesis and development of soft-tissue sarcomas. *PLoS One*, 5:e15541, 2010.
  - 10) Iwakawa R, Kohno T, Kato M, Shiraishi K, Tsuta K, Noguchi M, Ogawa S, Yokota J. *MYC* amplification as a prognostic marker of early stage lung adenocarcinoma identified by whole genome copy number analysis. *Clin Cancer Res*, 17:1481-1489, 2011.
  - 11) Kohno T, Kunitoh H, Mimaki S, Shiraishi K, Kuchiba A, Yamamoto S, Yokota J. Contribution of the TP53, OGG1, CHRNA3 and HLA-DQA1 genes to the risk for lung squamous cell carcinoma. *J Thoracic Oncol*, 6:813-817, 2011.
  - 12) Kozy Y, Tsuta K, Kohno T, Sekine I, Yoshida A, Watanabe S, Tamura T, Yokota J, Suzuki K, Asamura H, Furuta K, Tsuda H. The usefulness of mutation-specific antibodies in detecting epidermal growth factor receptor mutations and in predicting response to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*, 2010 Dec 1. [Epub ahead of print]
  - 13) Akca H, Demiray A, Tokgun O, Yokota J. Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through PI3K/AKT/NFkB pathway in lung cancer cells. *Lung Cancer*, 2011 Feb 16. [Epub ahead of print]
  - 14) Saito M, Schetter AJ, Mollerup SDR, Kohno T, Skaug V, Bowman ED, Mathe E, Takenoshita S, Yokota J, Haugen A, Harris CC. The association of microRNA expression with prognosis and progression in early stage, non-small cell lung adenocarcinoma: a retrospective analysis of three cohorts. *Clin Cancer Res*, 17:1875-1882, 2011.
  - 15) Ogiwara H, Ui A, Otsuka A, Satoh H, Yokomi I, Nakajima S, Yasui A, Yokota J, Kohno T. Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. *Oncogene*, 30:2135-2146, 2011.
  - 16) Shiba-Ishii A, Kano J, Morishita Y, Sato Y, Minami Y, Noguchi M. High expression of Stratifin is a universal abnormality during the course of malignant progression of early-stage lung adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 2011(in press).
  - 17) Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riey GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thoracic Oncol*, 6:244-285, 2011.
  - 18) Behjati R, Kawai K, Inadome Y, Kano J, Akaza H, Noguchi M. *APAF-1* is related to an undifferentiated state in the testicular germ cell tumor pathway. *Cancer Sci*, 102:267-274, 2011.
  - 19) Sakashita S, Li D, Nashima N, Minami M, Furuya S, Morishita Y, Tachibana K, Sato Y, Noguchi M. Overexpression of immunoglobulin (CD79a) binding protein1 (IGBP-1) in small lung adenocarcinomas and its clinicopathological significance. *Pathol Int*, 61:130-137, 2011.
  - 20) Li D, Sakashita S, Morishita Y, Kano J, Shiba-Ishii A, Sato T, Noguchi M. Binding of lactoferrin to IGBP1 triggers apoptosis in a lung adenocarcinoma cell line. *Anticancer Res*, 31:529-534, 2011.
  - 21) Nakazato Y, Minami Y, Kobayashi H, Satomi K, Anami Y, Tsuta K, Tanaka R, Okada M, Goya T, Noguchi M. Nuclear Grading of Primary Pulmonary Adenocarcinomas -Correlation of nuclear size with

- prognosis-. *Cancer*, 116:2011-2019, 2010.
- 22) Kobayashi H, Minami Y, Anami Y, Kondou Y, Iijima T, Kano J, Morishita Y, Tsuta K, Hayashi S, Noguchi M. Expression of the GA733 gene family and its relationship to prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Virchows Arch*. 457:69-76, 2010.
  - 23) Noguchi M. Stepwise progression of pulmonary adenocarcinoma — clinical and molecular implications. *Cancer Metastasis Rev*, 29:15-21, 2010.
  - 24) Sakata-Yanagimoto M, Sakai T, Miyake Y, Saito T, Maruyama M, Morishita Y, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Yagita Y, Fukayama M, Ogawa S, Kurokawa M, Yasutomo K, Chiba S. Notch2 signaling is required for proper mast cell distribution and mucosal immunity in the intestine. *Blood*, in press.
  - 25) Yoshida K, Sanada M, Kato M, Kawahata R, Matsubara A, Takita J, Shih LY, Mori H, Koeffler HP, Ogawa S. A nonsense mutation of IDH1 in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Leukemia*, 25:184-186, 2011.
  - 26) Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia*, 25:382-384, 2011.
  - 27) Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Sci*. 2011;102:302-308, 2011.
  - 28) Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, Gooley TA, Brown ML, Koo KK, Rosinski KV, Ogawa S, Matsubara A, Appelbaum FR, Riddell SR. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood*, 115:3869-3878, 2010.
  - 29) Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 115:3158-3161, 2010.
  - 30) Thoennissen NH, Krug UO, Lee DH, Kawamata N, Iwanski GB, Lasho T, Weiss T, Nowak D, Koren-Michowitz M, Kato M, Sanada M, Shih LY, Nagler A, Raynaud SD, Muller-Tidow C, Mesa R, Haferlach T, Gilliland DG, Tefferi A, Ogawa S, Koeffler HP. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 115:2882-2890, 2010.
  - 31) Tada M, Kanai F, Tanaka Y, Sanada M, Nannya Y, Tateishi K, Ohta M, Asaoka Y, Seto M, Imazeki F, Yoshida H, Ogawa S, Yokosuka O, Omata M. Prognostic significance of genetic alterations detected by high-density single nucleotide polymorphism array in gastric cancer. *Cancer Sci*, 101:1261-1269, 2010.
  - 32) Shiba N, Kato M, Park MJ, Sanada M, Ito E, Fukushima K, Sako M, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in juvenile myelomonocytic leukemia and pediatric myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, 24:1090-1092, 2010.
  - 33) Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijaykrishnan J, Papaemmanuil E, Bartram CR, Stanulla M, Schrappe M, Gast A, Dobbins SE, Ma Y, Sheridan E, Taylor M, Kinsey SE, Lightfoot T, Roman E, Irving JA, Allan JM, Moorman AV, Harrison CJ, Tomlinson IP, Richards S, Zimmermann M, Szalai C, Sensei AF, Erdelyi DJ, Krajcinovic M, Sinnett D, Healy J, Neira AG, Kawamata N, Ogawa S, Koeffler HP, Hemminki K, Greaves M, Houlston RS. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet*, 42:492-494, 2010.
  - 34) Okamoto R, Ogawa S, Nowak D, Kawamata N, Akagi T, Kato M, Sanada M, Weiss T, Haferlach C, Dugas M, Ruckert C, Haferlach T, Koeffler HP. Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 95:1481-1488, 2010.
  - 35) Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M. Deregulated Intracellular Signaling by Mutated c-CBL in Myeloid Neoplasms. *Clin Cancer Res*, 16:3825-3831, 2010.
  - 36) Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle*, 9, 2010.
  - 37) Nowak D, Ogawa S, Muschen M, Kato M, Kawamata N, Meixel A, Nowak V, Kim HS, Kang S, Paquette R, Chang MS, Thoennissen NH, Mossner M, Hofmann WK, Kohlmann A, Weiss T, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP. SNP array analysis of tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemia identifies heterogeneous secondary genomic alterations. *Blood*, 115:1049-1053, 2010.
  - 38) Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 115:2872-2881, 2010.
  - 39) Morishima S, Ogawa S, Matsubara A, Kawase T, Nannya Y, Kashiwase K, Satake M, Saji H, Inoko H, Kato S, Kodera Y, Sasazuki T, Morishima Y. Impact



- of highly conserved HLA haplotype on acute graft-versus-host disease. *Blood*, 115:4664-4670, 2010.
- 40) Lilljebjorn H, Sonesson C, Andersson A, Heldrup J, Behrendtz M, Kawamata N, Ogawa S, Koefler HP, Mitelman F, Johansson B, Fontes M, Fioretos T. The correlation pattern of acquired copy number changes in 164 ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemias. *Hum Mol Genet*, 19:3150-3158, 2010.
  - 41) Asaoka Y, Tada M, Ikenoue T, Seto M, Imai M, Miyabayashi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Kudo Y, Mohri D, Isomura Y, Ijichi H, Tateishi K, Kanai F, Ogawa S, Omata M, Koike K. Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion. *Biochem Biophys Res Commun*, 394:1042-1046, 2010.
  - 42) Shimahara A, Yamakawa N, Nishikata I, Morishita K. Acetylation of lysine 564 adjacent to the C-terminal binding protein-binding motif in EVI1 is crucial for transcriptional activation of GATA2. *J Biol Chem*, 285:16967-16977 2010, 2010.
  - 43) Watanabe M, Nakahata S, Hamasaki M, Saito Y, Kawano Y, Hidaka T, Yamashita K, Umeki K, Taki T, Taniwaki M, Okayama A, Morishita K. Downregulation of CDKN1A in adult T-cell leukemia/lymphoma despite overexpression of CDKN1A in human T-lymphotropic virus 1-infected cell lines. *J Virol*, 84:6966-6977 2010.
  - 44) Nakahata S, Yamazaki S, Nakauchi H, Morishita K. Downregulation of ZEB1 and overexpression of Smad7 contribute to resistance to TGF-beta1-mediated growth suppression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncogene*, 29:4157-4169 2010.
  - 45) H. Furuta, Y. Kondo, S. Nakahata, M. Hamasaki, S. Sakoda, K. Morishita. NDRG2 is a candidate tumor-suppressor for oral squamous-cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 391:1785-1791 2010.
  - 46) Yamasaki M, Mukai A, Ohba M, Mine Y, Sakakibara Y, Suiko M, Morishita K, Nishiyama K. Genistein Induced Apoptotic Cell Death in Adult T-Cell Leukemia Cells through Estrogen Receptors. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010 Oct 7. [Epub ahead of print]
  - 47) Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umekita K, Kamihira S, Morishita K, Okayama A. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *Int J Cancer*, 2010 May 12. [Epub ahead of print]
  - 48) Yamamoto I, Takajo I, Umeki K, Morishita K, Hatakeyama K, Kataoka H, Nomura H, Okayama A. Multiple integrations of human T-lymphotropic virus type 1 proviruses in the engrafted cells from the asymptomatic carriers in NOD/SCID/gammacnull mice. *Intervirology*. 53:229-239 2010
  - 49) Shibata T, Saito S, Kokubu A, Suzuki T, Yamamoto M, Hirohashi S. Global downstream pathway analysis reveals a dependence of oncogenic NRF2 mutation on the mTOR growth signaling pathway. *Cancer Res*, 70:9095-9105, 2010.
  - 50) Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Sasajima Y, Yamazaki Y. Mutant IDH1 confers an in vivo growth in a melanoma cell line with BRAF mutation. *Am J Pathol*, 178:1395-1402, 2010.
  - 51) Shibata T., Kokubu A, Miyamoto M, Hosoda F, Gotoh M, Tsuta K, Asamura H, Matsuno Y, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S. DEK oncoprotein regulates transcriptional modifiers and sustains tumor initiation activity in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung. *Oncogene*, 29:4671-4681, 2010.
  - 52) Yoshida A, Tsuta K, Watanabe S, Fukayama M, Furuta K, Shibata T. Frequent ALK Rearrangement and TTF-1/p63 Coexpression in Lung Adenocarcinoma with Signet-ring Cell Component. *Lung Cancer*, 2010, in press.
  - 53) Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Totoki Y, Toyoda A, Hoki Y, Fujiyama A, Shibata T, Sado T, Noce T, Nakatsuji N, Lin H, Sasaki H. MotoPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. *Dev Cell*, 2011, in press.
  - 54) Shitashige M, Satow R, Jigami T, Aoki K, Honda K, Shibata T, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Traf2- and Nck-interacting kinase TNIK is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. *Cancer Res*, 70:5024-33, 2010.
  - 55) Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, Ehata S, Shibata T, Morita I, Miyazono K, Saitoh M. TGF-beta regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J*, 30:783-795, 2011.
  - 56) Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi Y, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. *Carcinogenesis*, 32:462-469. 2011.
  - 57) Arai E, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. *Pathobiology*, 78:1-9, 2011.
  - 58) Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Diagnosis and

prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *J Biomed Biotechnol*, 2011:780836, 2011.

- 59) Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Haruki S, Sudol M, Shimada Y, Tsuda H, Kawano T, Inazawa J: YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 32:389-398. 2010.
- 60) Miki D, Kubo M, Takahashi A, Yoon KA, Kim J, Lee GK, Zo JI, Lee JS, Hosono N, Morizono T, Tsunoda T, Kamatani N, Chayama K, Takahashi T, Inazawa J, Nakamura Y, Daigo Y. Variation in TP63 is associated with lung adenocarcinoma susceptibility in Japanese and Korean populations. *Nat Genet*, 42:893-896. 2010.
- 61) Takata R, Akamatsu S, Kubo M, Takahashi A, Hosono N, Kawaguchi T, Tsunoda T, Inazawa J, Kamatani N, Ogawa O, Fujioka T, Nakamura Y, Nakagawa H. Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for prostate cancer in the Japanese population. *Nat Genet*, 42:751-754. 2010.
- 62) Tagi T, Matsui T, Kikuchi S, Hoshi S, Ochiai T, Kokuba Y, Kinoshita-Ida Y, Kisumi-Hayashi F, Morimoto K, Imai T, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E. Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer. *J Gastroenterol*, 45:1201-11, 2010.
- 63) Saitoh Y, Martínez Bruyn VJ, Uota S, Hasegawa A, Yamamoto N, Imoto I, Inazawa J, Yamaoka S. Overexpression of NF-kappaB inducing kinase underlies constitutive NF-kappaB activation in lung cancer cells. *Lung Cancer*, 70:263-270. 2010.
- 64) Haruki S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J. Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 31:1027-36. 2010.
- 65) Prapinjumrune C, Morita KI, Kuribayashi Y, Hanabata Y, Shi Q, Nakajima Y, Inazawa J, Omura K. DNA amplification and expression of FADD in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 39:525-532, 2010.

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

##### 1. 特許取得

1. 「核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・氏原大・稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010. 5. 26、12/787, 953 特願 2009-128162
2. 「食道癌の検出方法及び抑制剤」、稲澤譲治・井本逸勢・

小松周平・小崎健一・津田均、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010. 3. 24、12/730, 919、特願 2009-073998

3. 「核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・氏原大・稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010. 5. 27、10164051. 4 特願 2009-128162
4. 「核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・氏原大・稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010. 5. 27、201010193364. 8 特願 2009-128162

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

肺がんの診断と治療の標的分子の同定

研究分担者 横田淳 国立がん研究センター研究所多段階発がん研究分野・分野長

研究要旨

ヒトパピローマウイルスは我が国の肺腺がんの発症には関与していないこと、PTPRD は肺がんの新規がん抑制遺伝子の候補であることを示した。MYC 遺伝子の増幅やマイクロ RNA である miR-21 の発現は肺腺がんの予後因子であることを明らかにした。LKB1 の失活は肺腺がん細胞に上皮間葉転換を誘導して運動能や浸潤能を増強し、PTEN の失活は PI3K/AKT/NFκB の経路を活性化して、共に肺がんの悪性化に関与していることを明らかにした。

A. 研究目的

我が国で最も死亡率の高い肺がんを対象に、ゲノム網羅的な解析に基づいて異常を起こしている遺伝子を同定し、その異常の臨床病理学的意義を明らかにし、さらにその産物の生物学的機能解析を行うことによって、肺がん細胞の生物学的特性をゲノム異常の蓄積との関連で明らかにし、その結果を肺がんの診断・治療に役立てることを目的として研究を進めている。また、肺がんの外的要因としてのパピローマウイルス感染や肺がんの特性を規定しているマイクロ RNA の発現についても検討し、診断と治療の新たな標的分子を探索している。今年度は、1)ゲノム網羅的なホモ欠失解析による新規肺がん抑制遺伝子の同定パピローマウイルス(HPV)感染の検索、2)ゲノム網羅的な遺伝子増幅領域の解析やマイクロ RNA の発現解析による肺腺がんの予後因子の探索、3)肺がんゲノム異常を起こしている LKB1、PTEN 遺伝子産物の機能解析、の3課題について結果が得られたので、それぞれの課題について研究方法とその結果を列記する。

B. 研究方法

1)肺がん細胞におけるホモ欠失のゲノム網羅的解析とパピローマウイルス(HPV)感染の検索

DNA アレイを用いて 52 例の肺がん細胞株におけるホモ欠失領域を探索し、74 例の細胞株を用いてホモ欠失領域内に存在する遺伝子のホモ欠失をゲノム PCR 法で確認し、その頻度を算出した。

アジア人の肺腺がん感染が報告されている HPV16/18/33 の DNA が肺がん細胞に存在するか否かを明らかにするため、タイプ特異的プライマーを用いた Multiplex PCR 法と Nested PCR 法を用いて、297 例の肺腺がん症例と 91 例の肺がん細胞株における HPV 感染の頻度と特異性を検討した。また、細胞株については p53 変異について包括的に解析した。

2)早期肺腺がんの予後因子となり得る遺伝子増幅、高発現マイクロ RNA の同定

最大径 2cm 以下の小型肺腺がんの手術組織標本 65 例からマイクロダイセクション法による腫瘍細胞の採取及び DNA の抽出を行い、10K SNP アレイを用いて遺伝子過増幅(>5 copies)領域の全ゲノム網羅的解析を行った。また、40 例の肺腺がん細胞株について 250K SNP アレイ解析を行い、小型腺がんにおける 10K SNP アレイのデータと併せて解析し、共通して過増幅している領域と遺伝子を同定した。定量的ゲノム PCR 法で MYC 遺伝子のゲノムコピー数を算出した。162 例の病理学的病期 I 期の肺腺がんにおける MYC 遺伝子過増幅と臨床病理学的所見、他の遺伝子異常との関連性を解析した。

これまでの研究で肺腺がんの予後との関連を示した 3 つのマイクロ RNA、miR-21、miR-17、miR-155 の発現と予後との関連性を確認するために、アメリカ、ノルウェー、日本の計 317 例の腺がん検体を用いて、定量的な RT-PCR 法で調べた。

3)肺がんゲノム異常を起こしているがん抑制遺伝子 LKB1 と PTEN の機能解析

不死化肺上皮細胞や肺腺がん細胞株に siRNA やベクターを用いて LKB1 遺伝子の発現が低下した細胞を作製し、細胞の運動能、浸潤能の変化を調べるとともに、上皮間葉移行に関わる様々な分子の変動をウェスタンブロット法や RT-PCR 法で検討した。

PTEN に関しては、正常型と失活型のテトラサイクリン誘導発現ベクターを作製し、内在性の PTEN が発現していない肺がん細胞に導入して、浸潤能等の生物学的変化と PI3K/ALK/NFκB 経路の活性との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

手術検体を用いた研究は、倫理委員会での承認を得て、臨床病理学的診断の後に残った組織を対象として、検体をコード化し、患者に不利益がないよう、プライバシーを厳守して行なった。

C. 研究結果

1)肺がん細胞におけるホモ欠失のゲノム網羅的解

## 析とパピローマウイルス感染の検索

肺がん細胞株でホモ欠失している 176 遺伝子を同定した。これらの遺伝子群には、CDKN2A/p16、RB1、SMAD4 など、既知のがん抑制遺伝子も含まれており、高頻度に欠失している新規遺伝子としては染色体 9p21 に存在する PTPRD を同定した。PTPRD は点突然変異や発現低下も見られ、肺がんの新規がん抑制遺伝子の有力な候補と考えられた。

HPV の DNA は肺腺がん検体 297 例、肺がん細胞株 91 例のいずれにも全く検出されなかった。一方、p53 の変異は細胞株 91 例中 81 例に検出された。

2) 早期肺腺がんの予後因子となり得る遺伝子増幅、高発現マイクロ RNA の同定

小型肺腺がんでは第 5, 7, 8, 14 染色体上の 11 領域が高頻度 (>10%) に過増幅を起こしていた。一方、細胞株における 250K SNP アレイのデータでも、やはり第 5, 7, 8, 14 染色体上の 13 領域に高頻度の過増幅が認められた。そこで、両者の結果を併せて解析した結果、第 8 染色体の 5 領域が共通領域として同定され、それらの領域内では MYC 遺伝子のみが蛋白質をコードする遺伝子であった。そこで、臨床所見や遺伝子変異との関連性を検討したところ、MYC 遺伝子の過増幅は年齢、性別、喫煙歴に関連なく、小型肺腺がん患者の予後と有意に関連することが分かった。次に、他の簡便な手法で MYC 過増幅を検出することができるかを検討するために、市販の定量的リアルタイム PCR 法キットを用いて過増幅の確認を行った結果、CNAG software の解析結果と PCR 法の結果がよく一致した。そこで、SNP アレイ解析に用いた 33 例を含む 60 例に対して定量的リアルタイム PCR 法を用いて検討したところ、MYC 過増幅は有意に予後と関連することが確認された。さらに、I 期の肺腺がん 162 症例でも MYC 過増幅は術後の再発予後と有意に相関し、早期肺腺がんの予後予測因子として有用であることが示された。

miR-21 の発現だけが、3 つの異なるコホートで予後との有意な相関を示した。即ち、アメリカとノルウェーの症例ではがん特異的な死亡率との相関を、日本の症例では再発予後との相関を示した。miR-21 の発現は進行がんで高く、ステージ I の患者においても発現量と予後との相関があった。

3) 肺がんでゲノム異常を起こしているがん抑制遺伝子 LKB1 と PTEN の機能解析

LKB1 の発現低下によって不死化肺上皮細胞と肺腺がん細胞株 H358 の運動能、浸潤能が増強し、E-cadherin などの上皮細胞のマーカーの発現が低下して間葉細胞のマーカーの発現が亢進した。また、EMT 誘導転写因子である ZEB1 の発現が亢進し、miR-200a/c の発現は低下した。

PTEN が発現していない肺腺がん細胞株 PC14、PC9、PC3 を用いて、正常あるいは脱リン酸化酵素活性のない PTEN の発現誘導を行うと、正常型の PTEN を誘導したときのみ AKT のリン酸化が低下して NFκB の転写活性も低下した。さらに、足場非依存性増殖や浸潤能も低下した。

## D. 考察

3 課題の結果について、それぞれ個別に考察する。

1) 肺がん細胞におけるホモ欠失のゲノム網羅的解析とパピローマウイルス感染の検索

肺がん細胞株のゲノム網羅的解析により、ホモ欠失で失活している候補がん抑制遺伝子のカタログを作製した。このカタログは今後のがん抑制遺伝子研究の足掛かりとなる。

HPV の DNA は日本人の肺腺がん細胞では全く検出されず、アジア人に多いと言われている HPV の感染による肺腺がんの発生は日本人では全く（少なくとも、ほとんど）ないと考えられた。

2) 早期肺腺がんの予後因子となり得る遺伝子増幅、高発現マイクロ RNA の同定

本研究では、第 8 染色体長腕に位置する MYC 遺伝子の過増幅を呈する小型肺腺がん及び病理学的病期 I 期の肺腺がんが有意に予後不良であったことから、このような症例に対しては術後化学療法等の併用による予後の改善を検討する必要性が示唆された。

早期肺腺がんの予後との関連を示した miR-21 の発現は、患者の予後を推測できるバイオマーカーであるだけでなく、治療の標的分子ともなり得るものである。

3) 肺がんでゲノム異常を起こしているがん抑制遺伝子 LKB1 と PTEN の機能解析

肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の失活は EMT を誘導してがん細胞の悪性度を増強させる一因と考えられた。がん幹細胞化との関連も考えられ、現在、更なる解析を行っている。

肺がんにおける PTEN 遺伝子の失活は PI3K/AKT/NFκB の分子経路を活性化してがん細胞の浸潤能を亢進すると考えられた。EMT の誘導やがん幹細胞化との関連もあるようなので、更なる解析を続けている。

## E. 結論

我が国における肺がんの診断法や治療法の改善を目指す上で貴重な情報が集積しつつある。即ち、今年度の結果から、ヒトパピローマウイルスは我が国の肺腺がんの発症には関与していないこと、PTPRD は新規がん抑制遺伝子であることが分かり、MYC 遺伝子増幅や miR-21 発現は肺腺がんの予後因子であること、LKB1 や PTEN の失活は肺がんの悪性化に関与していることが分かった。

## F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kohno, T., Otsuka, A., Girard, L., Sato, M., Iwakawa, R., Ogiwara, H., Sanchez-Cespedes, M., Minna, J. D., and Yokota, J. A catalog of genes homozygously deleted in human lung cancer and the candidacy of PTPRD as a tumor suppressor gene. *Genes, Chromosomes, Cancer*, 49:342-352, 2010.
- 2) Kodama, M., Otsubo, C., Hirota, T., Yokota, J., Enari, M., and Taya, Y. Requirement of



- ATM for Rapid p53 Phosphorylation at Ser46 without Ser/Thr-Gln Sequences. *Mol. Cell Biol.*, 30:1620-1633, 2010.
- 3) Kohno, T., Kunitoh, H., Shimada, Y., Shiraishi, K., Ishii, Y., Goto, K., Ohe, Y., Nishiwaki, Y., Kuchiba, A., Yamamoto, S., Hirose, H., Oka, A., Yanagitani, N., Saito, R., Inoko, H., and Yokota, J. Individuals susceptible to lung adenocarcinoma defined by combined HLA-DQA1 and TERT genotypes. *Carcinogenesis*, 31:834-841, 2010.
  - 4) Roy, B. C., Kohno, T., Iwakawa, R., Moriguchi, T., Kiyono, T., Morishita, K., Sanchez-Cespedes, M., Akiyama, T., and Yokota, J. Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition of human lung cancer cells. *Lung Cancer*, 70:136-145, 2010.
  - 5) Iwakawa, R., Kohno, T., Enari, M., Kiyono, T. and Yokota, J. Prevalence of human papilloma virus 16/18/33 infection and p53 mutation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.*, 101:1891-1896, 2010.
  - 6) Kohno, T., Kakinuma, R., Iwasaki, M., Yamaji, T., Kunitoh, H., Suzuki, K., Shimada, Y., Shiraishi, K., Kasuga, Y., Hamada, G. S., Furuta, K., Tsuta, K., Sakamoto, H., Kuchiba, A., Yamamoto, S., Kanai, Y., Tsugane, S., and Yokota, J. Association of CYP19A1 polymorphisms with risks for atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma in the lung. *Carcinogenesis*, 31:1794-1799, 2010.
  - 7) Shiraishi, K., Kohno, T., Tanai, C., Goto, Y., Kuchiba, A., Yamamoto, S., Tsuta, K., Nokihara, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Ohe, Y., Tamura, T., Yokota, J., and Kunitoh, H. Association of DNA repair gene polymorphisms with response to Platinum-based doublet chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 28:4945-4952, 2010.
  - 8) Yokota, J., Shiraishi, K., and Kohno, T. Genetic basis for susceptibility to lung cancer: Recent progress and future directions. *Adv Cancer Res.*, 109:51-72, 2010.
  - 9) Saito, M., Kumamoto, K., Robles, A. I., Horikawa, I., Furusato, B., Okamura, S., Goto, A., Yamashita, T., Nagashima, M., Lee, T.-L., Baxendale, V. J., Rennert, O. M., Takenoshita, S., Yokota, J., Sesterhenn, I. A., Trivers, G. E., Hussain, S. P., and Harris, C. C. Targeted disruption of *ing2* results in defective spermatogenesis and development of soft-tissue sarcomas. *PLoS One*, 5:e15541, 2010.
  - 10) Iwakawa, R., Kohno, T., Kato, M., Shiraishi, K., Tsuta, K., Noguchi, M., Ogawa, S., and Yokota, J. MYC amplification as a prognostic marker of early stage lung adenocarcinoma identified by whole genome copy number analysis. *Clin. Cancer Res.*, 17:1481-1489, 2011.
  - 11) Kohno, T., Kunitoh, H., Mimaki, S., Shiraishi, K., Kuchiba, A., Yamamoto, S., and Yokota, J. Contribution of the TP53, OGG1, CHRNA3 and HLA-DQA1 genes to the risk for lung squamous cell carcinoma. *J. Thoracic Oncol.*, 6:813-817, 2011.
  - 12) Kozu, Y., Tsuta, K., Kohno, T., Sekine, I., Yoshida, A., Watanabe, S., Tamura, T., Yokota, J., Suzuki, K., Asamura, H., Furuta, K., and Tsuda, H. The usefulness of mutation-specific antibodies in detecting epidermal growth factor receptor mutations and in predicting response to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2010 Dec 1. [Epub ahead of print]
  - 13) Akca, H., Demiray, A., Tokgun, O., and Yokota, J. Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through PI1K/AKT/NFkB pathway in lung cancer cells. *Lung Cancer*. 2011 Feb 16. [Epub ahead of print]
  - 14) Saito, M., Schetter, A. J., Mollerup, S., Dr. Kohno, T., Skaug, V., Bowman, E. D., Mathe, E., Takenoshita, S., Yokota, J., Haugen, A., and Harris, C. C. The association of microRNA expression with prognosis and progression in early stage, non-small cell lung adenocarcinoma: a retrospective analysis of three cohorts. *Clin. Cancer Res.*, 17:1875-1882, 2011.
  - 15) Ogiwara, H., Ui, A., Otsuka, A., Satoh, H., Yokomi, I., Nakajima, S., Yasui, A., Yokota, J., and Kohno, T. Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. *Oncogene*, 30:2135-2146, 2011.
- G. 知的財産権の出願・登録情報  
特になし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん研究事業）

分担研究報告書

肺がんの治療時期や治療法の選択に有用な分子病理学的分類法の確立

研究分担者 野口 雅之

研究要旨

本研究は班員の研究成果を実際の肺がん切除材料を用いて検証し、有用な分子病理学的分類法を確立することにある。本年は初年でもあるので、以前より我々が研究して来た stratifin(SFN) 遺伝子異常と肺腺がん発生との関係について研究を行った。SFN は前癌病変や上皮内腫瘍での発現は押し並べて低いものの、増悪にともなってほぼ 100% の腫瘍で発現が異常上昇する特徴的遺伝子があるが、この発現上昇が脱メチル化によって引き起こされる事を明らかにした。

A. 研究目的

本研究は班員の研究成果を実際の肺がん切除材料を用いて検証し、有用な分子病理学的分類法を確立することにある。本年は初年でもあるので、以前より我々が研究して来た肺腺がんの増悪に伴って発現亢進の見られる遺伝子 stratifin(SFN) について、その発現亢進の分子機序を解析した。

B. 研究方法

SFN のゲノム増幅を検討するために初期肺腺がん、進行肺腺がん、および周囲の正常肺組織の新鮮材料から抽出した DNA をサンプルとしてゲノム PCR 法を用いた解析を行った。さらにメチル化の異常を検出するために、bisulfite sequencing 法とメチル化特異的 PCR (MSP) 法を用いた。ゲノム PCR 同様、新鮮肺腺がん組織から DNA を抽出し、bisulfite 処理にて非メチル化チミジンをウラシルへと変換した。その DNA をサンプルとして bisulfite sequencing および real time MSP を実施した

(倫理面への配慮)

研究に用いるヒト癌組織は病理学的最終診断の後に残った材料を対象に行い、且つ包括同意の得られた症例に限り、患者のプライバシーを厳守する。また研究遂行に当たっては筑波大学医の倫理委員会で承認を受ける。

C. 研究結果

我々は以前初期肺腺がんにおいて上皮内がんから浸潤がんへ増悪する際に SFN 発現亢進が起こり、さらに in vitro の実験系で SFN 蛋白は肺腺がんの増殖能を亢進させることを見いだしたが、その発現亢進が起こる機序は未だ明らかではない。その原因としては、ゲノム上の遺伝子増幅、遺伝子突然変異、メチル化異常などが考えられるが、SFN の遺伝子変異についてはこれまでに報告がなく、肺腺がんにのみ特異的に起こっているということは考えにくい。そこでゲノム上の遺伝子増幅を検出するために、ゲノム PCR 法を用いた解析を行った。しかし、肺腺がんにおいて SFN をコードする領域の増幅は認めなかった。

次にメチル化の異常を解析した結果、正常肺組



Yankelewitz D. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *JTO*, 6(2):244-285, 2011.

3)Behjati R, Kawai K, Inadome Y, Kano J, Akaza H, Noguchi M. *APAF-1* is related to an undifferentiated state in the testicular germ cell tumor pathway. *Cancer Science* 102(1):267-274, 2011.

4)Sakashita S, Li D, Nashima N, Minami M, Furuya S, Morishita Y, Tachibana K, Sato Y, Noguchi M. Overexpression of immunoglobulin (CD79a) binding protein1 (IGBP-1) in small lung adenocarcinomas and its clinicopathological significance. *Pathol Int*. 61(3):130-137, 2011.

5)Li D, Sakashita S, Morishita Y, Kano J, Shiba-Ishii A, Sato T, Noguchi M. Binding of lactoferrin to IGBP1 triggers apoptosis in a lung adenocarcinoma cell line. *Anticancer Res* 31:529-534, 2011.

6)Nakazato Y, Minami Y, Kobayashi H, Satomi K, Anami Y, Tsuta K, Tanaka R, Okada M, Goya T, Noguchi M. Nuclear Grading of Primary Pulmonary Adenocarcinomas -Correlation of nuclear size with prognosis-. *Cancer* 116:2011-2019, 2010.

7)Kobayashi H, Minami Y, Anami Y, Kondou Y, Iijima T, Kano J, Morishita Y, Tsuta K, Hayashi S, Noguchi M. Expression of the GA733 gene family and its relationship to prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Virchows Arch*. 457(1):69-76, 2010.

8)Noguchi M. Stepwise progression of pulmonary adenocarcinoma—clinical and molecular implications. *Cancer Metastasis Rev* 29:15-21, 2010.

## 2. 学会発表

1)Noguchi Masayuki. Histological and immunohistochemical identification of minimally invasive adenocarcinoma. 22<sup>nd</sup> International Conference on Screening for Lung Cancer. (第22回国際肺癌CT検診会議) 2010年3月19日

2)坂下信悟、森下由紀雄、柴綾、菅野雅人、里見介史、野口雅之. Epithelial to mesenchymal transitionによって発生したと考えられる胃の癌肉腫の1例. 第99回日本病理学会総会、2010年4月29日

3)飯嶋達生、近藤譲、斉藤仁昭、野上達也、内田好明、常松一恵、阿部香織、新発田雅晴、土井幹雄、野口雅之. 免疫染色結果判定の精度管理に対するバーチャルスライド活用の有用性についての検討. 第99回日本病理学会総会、

2010年4月29日

4)里見介史、松岡健太郎、大喜多肇、森下由紀雄、野口雅之、吉田眞理、中川温子. 急性リンパ性白血病再発後、亜急性連合変性症を合併したダウン症候群の1剖検例. 第99回日本病理学会総会、2010年4月29日

5)野口雅之. WHO病理組織分類の改訂について(主に腺癌). 第25回日本肺癌学会ワークショップ、2010年7月3日

6)柴綾、野口雅之. Stratifinの発現上昇は早期肺腺癌の悪性化に関与する. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日

7)李冬平、森下由紀雄、佐藤泰樹、野口雅之. 肺腺癌細胞におけるラクトフェリンとIGBP1の結合によるアポトーシスの誘導. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月23日

8)里見介史、森下由紀雄、南優子、野口雅之. 肺神経内分泌腫瘍のロゼット構造におけるZO-1発現の検討. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月24日

9)Reza Behjati, Koji Kawai, Yukinori Inadome, Junko Kano, Aya Shiba-Ishii, Toru Shimazui, Masayuki Noguchi. Effect of APAF-1 down-regulation on the cell morphology and proliferation rate of testicular germ cell tumor cell lines. 69<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, September 24, 2010.

10)南優子、中里宜正、石川雄一、谷田部恭、柿沼龍太郎、野口雅之. 微小浸潤肺腺癌診断の再現性の検証. 第51回日本肺癌学会総会、2010年11月3日

11)橘啓盛、南優子、柴綾、吉田勤、中里宜正、佐藤幸夫、呉屋朝幸、野口雅之. 小型肺腺癌におけるMET遺伝子コピー数とHepatocyte growth factor, MET発現解析. 第51回日本肺癌学会総会、2010年11月3日

12)坂下信悟、李冬平、南優子、野口雅之. 小型肺腺癌におけるIGBP1発現と組織学的特徴. 第51回日本肺癌学会総会、2010年11月3日

13)中里宜正、前島亜希子、谷田部恭、富田裕彦、横瀬智之、石川雄一、福岡順也、浅村尚生、呉屋朝幸、橘啓盛、南優子、野口雅之. 核グレードを利用した小型肺腺癌の悪性度評価における観察者間変動の検討. 第51回日本肺癌学会総会、2010年11月3日

14)里見介史、森下由紀雄、南優子、野口雅之. 肺神経内分泌腫瘍のロゼット構造におけるZO-1の特異的発現. 第51回日本肺癌学会総会、2010年11月3日

15)李冬平、森下由紀雄、佐藤泰樹、坂下信悟、柴綾、南優子、野口雅之. 肺腺癌におけるLfのanti-apoptotic機能. 第51回日本肺癌学会総会、2010年11月4日

16)Noguchi M. Pulmonary adenocarcinoma: current concepts and updates. 4<sup>th</sup> Asia Pacific Lung Cancer Conference (第4回アジア



ア・太平洋肺癌学会) 2010年12月3日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

### 研究要旨

腎細胞癌は腎原発の悪性腫瘍の85%を占め、転移を有する症例では極めて治療に難渋する腫瘍である。我々はSNPアレイを用いた網羅的なゲノム解析を行うことにより、腎細胞癌の発生や進展に関与するゲノム異常の同定や、新規の治療ターゲットとなりうる分子標的の探索を試みた。解析の結果をもとに、ゲノム異常に基づいた症例のクラスタリングを行い、臨床情報と比較することによって、染色体の多倍体化と14qのLOHが独立した予後不良因子であることを明らかにした。また、腎細胞癌における遺伝子変異を詳細に解析するために、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスを行ったところ、様々なsomatic変異を同定することができた。

### A. 研究目的

腎細胞癌は腎原発の悪性腫瘍のうち85%を占め、その発生や進展には種々のゲノム異常が関わっていると考えられている。VHL遺伝子の異常は、腎細胞癌の大多数を占める淡明細胞癌において高頻度に観察されるが、その他の分子病態の解明は進んでいない。進行例に対するサイトカイン療法の奏効率は低く、近年では分子標的薬が用いられるようになったが、その効果は限られたものである。有転移症例の予後はいまだ不良であり、治療成績の向上にはより詳細な分子病態の解明が必要と考えられる。

本年度の研究で、われわれはSNPアレイを用いた網羅的なゲノム解析を行うことにより、腎細胞癌において、ゲノム異常に基づいた分類、予後と関連する因子の同定、治療標的となり得る新規の分子標的の探索を試みた。

### B. 研究方法

(1) SNPアレイによる網羅的なゲノム解析  
腎細胞癌と診断された200例について、手術時に切除された腫瘍および正常腎組織からDNAを抽出、Affimetrix社の高密度SNPアレイを用いてコピー数およびLOHの網羅的な解析を行った。

また、解析によって得られたゲノム異常と臨床情報を比較し、予後と関連する因子の同定を試みた。

(2) 次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンス

腎細胞癌における遺伝子変異をより詳細に解析するために、次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスを行った。腫瘍ゲノムおよびそれに対応する正常ゲ

ノムに対し、Agilent社のSure Selectを用いて全エクソンをキャプチャーした後、Genome Analyzer (Illumina社)、SOLiD4 (Applied Biosystems社)にてリシーケンスを行った。

### C. 結果

(1) SNPアレイによる網羅的なゲノム解析  
解析した200例のうち96%の症例において何らかのゲノム異常が観察された。淡明細胞癌においてはVHL遺伝子を含む3pの欠失を68%に、aUPDを23%に認めただけ、5qの増幅(63%)、7qの増幅(41%)、9pの欠失(17%)、14qの欠失(27%)を高頻度に認めた。また、約4分の1の症例では染色体の多倍体化が見られた。これら多倍体化した症例では、ploidyの変化を除くと近2倍体の症例と類似したコピー数変化のパターンを示していた。

嫌色素性腎癌では1, 2, 6, 9, 10, 13, 17, 21の欠失を、乳頭状腎癌では2q, 8, 17の増幅を高頻度に認め、組織型に特徴的なゲノム異常のパターンが観察された。これら、腎細胞癌におけるコピー数異常のほとんどは染色体腕全体にわたるような広い領域での変化であり、狭い領域での高度増幅やホモ欠失は頻度が少なく、特定の領域への重複も見られなかった。ゲノム異常と臨床情報を比較したところ、多倍体化したケースでは遠隔転移をきたした症例が有意に多く(Odds ratio: 6.2)、生存率の低下が認められた。また、多変量解析を行った結果、多倍体化と14qのLOHは独立した予後不良因子であった。

(3) 次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンス

4例の淡明細胞癌に対して全エクソンシーケンスを行ったところ、VHL遺伝子の

他にも多数の somatic な遺伝子変異が認められた。1 症例あたり 20~30 の遺伝子変異を検出することができ、その一部は癌の発生や進展に寄与している可能性が高いと考えられた。

#### D. 考察

腎細胞癌において VHL の不活化と 3p の LOH は最も高頻度に見られるゲノム異常であり、発生の初期の段階に起こる変化であると考えられている。VHL の pathway が解明されたことにより分子標的薬の開発につながった一方で、腎癌の進展・転移に関わるゲノム異常についてはほとんど明らかにされていない。

今回の SNP アレイによるコピー数解析の結果、淡明細胞癌・嫌色素性腎癌・乳頭状腎癌の各組織型でそれぞれ特徴的なコピー数変化のパターンを示していた。このことはそれぞれの組織型によって発生の機序が全く異なることを示唆している。淡明細胞癌においては、大多数の症例で 3p の LOH が共通して見られたが、それに次いで高頻度で生じる 5q・7q の増幅、9p・14q の欠失に着目することで、ゲノム異常に基づいたクラスタリングをすることが可能であった。また、ゲノム異常と臨床情報と比較することにより、染色体の多倍体化と 14q の LOH が独立した予後不良因子であることが明らかとなった。これらのことから、腎細胞癌の症例においてゲノム異常を検索することが、診断や分類、予後の予測に有用となりうるものと考えられた。しかしながら、狭い領域でのゲノム異常の集積を見出すことができず、遺伝子レベルでの治療標的の同定には至らなかった。

そこで、腎細胞癌で生じる遺伝子変異の詳細を明らかにするために、次世代シーケンサーによる全エクソシーケンスを行ったところ、数多くの somatic 変異を同定することができた。この手法は遺伝子異常を解明するうえで、非常に high throughput で強力なツールであると考えられた。ただし、現時点では複数例に共通して見られる遺伝子変異は少なく、今後症例数を増やしたうえでの詳細な検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Sakata-Yanagimoto M, Sakai T, Miyake Y, Saito T, Maruyama M, Morishita Y,

Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Yagita Y, Fukayama M, Ogawa S, Kurokawa M, Yasutomo K, Chiba S. Notch2 signaling is required for proper mast cell distribution and mucosal immunity in the intestine. *Blood*. In press.

2. Yoshida K, Sanada M, Kato M, Kawahata R, Matsubara A, Takita J, Shih LY, Mori H, Koeffler HP, Ogawa S. A nonsense mutation of IDH1 in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Leukemia*. 2011;25:184-186.

3. Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia*. 2011;25:382-384.

4. Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Sci*. 2011;102:302-308.

5. Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, Gooley TA, Brown ML, Koo KK, Rosinski KV, Ogawa S, Matsubara A, Appelbaum FR, Riddell SR. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood*. 2010;115:3869-3878.

6. Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010;115:3158-3161.

7. Thoennissen NH, Krug UO, Lee DH, Kawamata N, Iwanski GB, Lasho T, Weiss T, Nowak D, Koren-Michowitz M, Kato M, Sanada M, Shih LY, Nagler A, Raynaud SD, Muller-Tidow C, Mesa R, Haferlach T, Gilliland DG, Tefferi A, Ogawa S, Koeffler HP. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115:2882-2890.

8. Tada M, Kanai F, Tanaka Y, Sanada M, Nannya Y, Tateishi K, Ohta M, Asaoka Y, Seto M, Imazeki F, Yoshida H, Ogawa S, Yokosuka O, Omata M. Prognostic significance of genetic alterations detected by high-density single nucleotide polymorphism array in gastric cancer. *Cancer Sci*. 2010;101:1261-1269.

9. Shiba N, Kato M, Park MJ, Sanada M, Ito E, Fukushima K, Sako M, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in juvenile myelomonocytic leukemia and pediatric myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2010;24:1090-1092.

10. Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijaykrishnan J, Papaemmanuil E, Bartram CR, Stanulla M, Schrappe M, Gast A, Dobbins SE, Ma Y, Sheridan E, Taylor M, Kinsey SE, Lightfoot T, Roman E, Irving JA, Allan JM, Moorman AV, Harrison CJ, Tomlinson IP, Richards S, Zimmermann M, Szalai C, Semsei AF, Erdelyi DJ, Krajcinovic M, Sinnett D, Healy J, Neira AG, Kawamata N, Ogawa S, Koeffler HP, Hemminki K, Greaves M, Houlston RS. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet.* 2010;42:492-494.
11. Okamoto R, Ogawa S, Nowak D, Kawamata N, Akagi T, Kato M, Sanada M, Weiss T, Haferlach C, Dugas M, Ruckert C, Haferlach T, Koeffler HP. Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2010;95:1481-1488.
12. Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M. Deregulated Intracellular Signaling by Mutated c-CBL in Myeloid Neoplasms. *Clin Cancer Res.* 2010;16:3825-3831.
13. Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle.* 2010;9.
14. Nowak D, Ogawa S, Muschen M, Kato M, Kawamata N, Meixel A, Nowak V, Kim HS, Kang S, Paquette R, Chang MS, Thoenissen NH, Mossner M, Hofmann WK, Kohlmann A, Weiss T, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP. SNP array analysis of tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemia identifies heterogeneous secondary genomic alterations. *Blood.* 2010;115:1049-1053.
15. Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 2010;115:2872-2881.
16. Morishima S, Ogawa S, Matsubara A, Kawase T, Nannya Y, Kashiwase K, Satake M, Saji H, Inoko H, Kato S, Kodaera Y, Sasazuki T, Morishima Y. Impact of highly conserved HLA haplotype on acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2010;115:4664-4670.
17. Lilljebjorn H, Sonesson C, Andersson A, Heldrup J, Behrendtz M, Kawamata N, Ogawa S, Koeffler HP, Mitelman F, Johansson B, Fontes M, Fioretos T. The correlation pattern of acquired copy number changes in 16q ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemias. *Hum Mol Genet.* 2010;19:3150-3158.
18. Asaoka Y, Tada M, Ikenoue T, Seto M, Imai M, Miyabayashi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Kudo Y, Mohri D, Isomura Y, Ijichi H, Tateishi K, Kanai F, Ogawa S, Omata M, Koike K. Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394:1042-1046.

#### 学会発表

1. Yasunobu Nagata MS, Kenichi Yoshida, Takeo Nakaya, Aiko Matsubara, Naoshi Obara, Ken Ishiyama, Shuichi Miyawaki, Jyunko Takita, Shigeru Chiba, Lee-Yung Shih, H. Phillip Koeffler, Seishi Ogawa. Profiling of Multiple Gene Mutations In Myelodysplastic Syndromes Using High-Throughput Resequencing Combined with Barcode Labeling. The 52 st annual meeting of American Society of Hematology. 2010.
2. Takamasa Katagiri AM, Koichi Kashiwase, Motohiro Kato, Yasuo Morishima, Kohei Hosokawa, Shigeki Ohtake, Seishi Ogawa, Shinji Nakao. Immunologically-Selected Hematopoiesis Caused by HLA Allelic Loss In Patients with Aplastic Anemia. The 52 st annual meeting of American Society of Hematology. 2010.
3. Sanada M. Molecular Mechanisms of c-CBL Mutations in Myeloid Neoplasms (poster). 15th Congress of the European Hematology Association (EHA). 2010.
4. Riki Nishimura, Junko Takita, Kentaro Ohki, Motohiro Kato, Yuyan Chen, Masashi Sanada, Akira Kikuchi, Takashi Igarashi, Yasuhide Hayashi, Seishi Ogawa. High resolution copy number analysis of Ewing sarcoma family of tumors using high-density SNP-genotyping microarrays (poster). The 6th Congress of Asian society of pediatric research. 2010.
5. Naoya Takayama SS, Takafumi Shimizu, Ryoichiro Kawahata, Hiroshi Endo, Sou Nakamura, Seishi Ogawa, Hiromitsu Nakauchi, Koji Eto. Epigenetic Memory Enables the Dominant Generation of Adult-Type Erythrocytes From Human Induced Pluripotent Stem Cells. The 52 st annual meeting of American Society of Hematology. 2010.
6. Maya koren-Michowitz SG, Daniel Nowak, Arnon Nagler, Aiko Matsubara, Takayuki Tabayashi, Seishi Ogawa, H. Phillip Koeffler. Adaptor Protein LNK Binds to and Is Phosphorylated by JAK3 and May Serve as a Scaffold for JAK3 Autophosphorylation In the Absence of An Appropriate Cytokine Receptor.