

20118018A

別紙 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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横田 淳

平成24(2012)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. 腎細胞癌におけるクロマチン制御・ヒストン修飾に関連する遺伝子の変異解析に関する研究

小川 誠司

4. 難治性白血病の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 讓治

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き、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

我が国における肺腺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様々なゲノム網羅的解析によって得られた。即ち、EGFR/KRAS/ALK に変異のない腺がんの中に極めて予後不良な一群が存在すること、PARK2 遺伝子は肺腺がんの抑制遺伝子としては機能していないこと、KIF5B-RET 融合遺伝子が肺腺がんの約2%に存在し、それらの症例はチロシンキナーゼ阻害剤を用いた分子標的療法によって予後の改善が期待できることである。また、肺腺がんの上皮内がんに見られず、進行すると現れてくる 3q26 領域の増幅を明らかにし、領域内の7つの遺伝子を同定した。ヒト腫瘍の収集保存のモデルシステムとして「つくばヒト組織バイオバンク(TIB)」を立ち上げた。腎細胞がん242例に対し、次世代シーケンサーを用いてクロマチン制御ならびにヒストン修飾に関する82遺伝子の変異解析を行い、予後や転移と関連する遺伝子変異を見出した。EVI1 高発現難治性白血病の骨髄ニッチ接着性に関与する CD52、Integrin a6、GPR56 を、細胞周期を停止させる Angiopoietin 1 を同定した。眼付属器 MALT リンパ腫 19 症例の全エクソン解析を進め、2 症例以上で変異を認めた遺伝子とし A20/TNFAIP3 に加えて NFκB 活性化に関与する遺伝子並びにエピゲノム関連遺伝子を同定した。独自開発の高精度ゲノムアレイと高スループット 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。

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 譲治 | 東京医科歯科大学 | 教授 |

A. 研究目的

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。本研究の目的は、多段階発がん過程でがん細胞内に蓄積するゲノム異常を明らかにし、その分子基盤を解明して、個々のがんにも最適な治療法を提供する個別医療・予知医療の実現へ向けて、がんの診断や分子標的療法に有用な新たな情報を集約することである。

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、ヒトゲノムの情報も充実してきており、ゲノム網羅的な遺伝子の解析技術が急速に進歩している。そんな背景の中、ヒトがんにおけるゲノム異常に関して、全ゲノムに互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きた。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積でき、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ある。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、ゲノム解析で独自の研究歴を持つ構成研究者による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、肝がん、腎臓がん、白血病などのゲノム異常に関して網羅的な解析を行い、がん細胞の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、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。第四に、網羅的なゲノム異常解析を行うための高品質な検体を採取保存しておくヒト組織バイオバンクを構築し、本研究に利用できる体制を整えるとともに、今後のがん研究に供するヒト組織の収集配布の体制を整える。がんのゲノム解析に基づいて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

ヒトゲノム上の 38,500 遺伝子に対するプローブを搭載する Affymetrix U133Plus2.0 アレイを用いて、226 例の I-II 期肺腺がんを対象として、ゲノム網羅的な発現プロファイル解析を行った。すべての症例に関して EGFR/KRAS/ALK の変異・融合の有無を解析し、それらの遺伝子に変異・融合のない肺腺がんをトリプルネガティブ腺がんとして分類した。

267 例の肺腺がんの手術組織と 39 例の肺腺がん細胞株から DNA を抽出して 250K Nsp SNP アレイ解析を行い、PARK2 遺伝子領域に存在する 187 SNP 部位のゲノムコピー数変化を解析した。さらに、定量的ゲノム PCR 法で PARK2 遺伝子内の様々な領域のゲノムコピー数を算出した。PARK2 遺伝子の発現量に関しては定量的な RT-PCR 法で算出し、変異に関してはサイクロシーケンシングで検出した。

30 例の肺腺がんを対象として mRNA-Seq Sample Prep Kit を用いて cDNA ライブラリーを作製し、Genome Analyzer IIX (GAIIX) (Illumina) を用いてその両端の配列を決定した。検出された KIF5B-RET 融合遺伝子のスクリーニングは、319 例の日本人肺腺がん、80 例のアメリカ人肺腺がん、34 例のノルウェー人肺腺がんの検体を用いて行った。

2. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

筑波大学附属病院病理部内につくばヒト組織バイオバンク (THB) を設置するための検討委員会を立ち上げ、THB の細則を作成して、その運用を組織化した。また、第三者への資料提供を可能にするために必要十分な患者へのインフォームドコンセント (IC) の作成と検体処理のためのプロトコルの作成、また組織維持のための受益者負担額の設定などを行った。

gCGH を用いて上皮内腺がんと小型進行がんのゲノム異常を網羅的に解析した。その結果 3q26 領域の 7 遺伝子が進行がんで有意に増幅していた。この結果を検証するために上皮内腺がん 15 例、小型進行がん 86 例を用いて qPCR を行った。対象とした遺伝子は PIK3CA, ECT2, EIF5A2, TNFSF10, EVI-1, SKIL, MUC4 である。

3. 腎細胞がんの網羅的ゲノム解析

242 例の腎細胞がんおよび正常腎組織を手術時に採取し、DNA を抽出した。SureSelect (Agilent Technologies) を用いて、目的とする遺伝子領域を濃縮し、次世代シーケンサ HiSeq (Illumina) で大量並列シーケンスを行った。変異解析の対象とする遺伝子には、PBRM1, BAP1, SETD2, KDM5C を含め、クロマチン制御ならびにヒストン修飾に関

する 82 の遺伝子を選択した。

4. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

3q26 と 7 番染色体異常を有する AML 患者検体 24 例、AML 細胞株 18 株を用いて 7 番染色体を中心とした SNP アレイ解析、網羅的遺伝子発現解析を行った。7 番染色体においてゲノム欠失領域から候補遺伝子として Saito1 を単離し、その情報伝達解析から GPR56 を同定したので、その発現解析と機能解析を行った。また、口腔がんのゲノム解析で単離した遺伝子群 (IFI 遺伝子群) の機能解析を行った。

5. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

エクソンキャプチャー法により、ゲノムの全エクソン領域を濃縮し、新型シーケンサーを用いてゲノム異常を広く検出した。がん検体の全トランスクリプトーム解析を行ない、融合遺伝子を検出した。解析に使用する新型シーケンサーは Genome Analyzer IIX を使用した。シーケンサーデータ解析に関しては、専門の生物統計家を 3 名確保して進めた。

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の応用技術を確立し、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蓄積した。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。新規に見出された病型特異的な増幅や欠失、さらにはがん特異的 DNA メチル化などをランドマークに、新規がん関連遺伝子、特にがん抑制性マイクロ RNA を同定し、がん悪性度診断のバイオマーカーや治療分子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析した。

(倫理面への配慮)

手術検体を用いた研究は、各施設の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。病理診断・検査の残余を研究に用いるため、提供者に新たに侵襲を与えず、また診断への影響や治療への介入はない。臨床検体の提供者には、臨床検体が医学研究に使われることについて文書および口頭で説明し、同意を得た。

C. 研究結果

1. 肺がんの診断と治療の標的分子の同定

肺腺がん 226 例の発現プロファイル解析により、ALK 変異型腺がんでは ALK 遺伝子自身に加えて GRIN2A 遺伝子が有意に発現上昇していることを見出した。また、EGFR/KRS/ALK に変異のない腺がんは 2 群に大別され、極めて予後の悪い群は DEPDC1 遺伝子を含む 9 つの遺伝子の発現で識別できることを明らかにした。

PARK2 遺伝子の両アレルの異常はパーキンソン病の一因であり、片アレルの異常は健康人の数%に存在する。そこで、肺腺がん患者の非がん細胞における PARK2 遺伝子領域

の詳細なゲノムコピー数解析を行った。その結果、以前からがん抑制遺伝子として報告されていた PARK2 遺伝子は胚細胞レベルで1段階目のゲノム内欠失がしばしば起こっており、細胞株でしばしば見られる2段階変異は臨床検体では全く起こっていないことが分かった。

EGFR/KRS/ALK に変異のない腺がんを中心に30例の肺腺がん検体を用いて全トランスクリプトームシーケンシングを行い、1例でKIF5B-RET 融合遺伝子が存在することを見出した。そこで、国内外の300例以上に及ぶ肺腺がん検体をスクリーニングし、10番染色体の再構成によって形成されたKIF5B-RET 融合遺伝子が全腺がんの約2%に存在することを明らかにした。この融合遺伝子を持つ細胞の増殖はRET チロシンキナーゼの阻害剤によって抑制され、この融合遺伝子を持つ肺腺がんはチロシンキナーゼ阻害剤による分子標的治療の対象になる可能性を示した。

2. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

2011年10月1日に筑波大学附属病院内に「つくばヒト組織バイオバンク」を設立した。作成したICを用いて患者の了解を得ながら現在までに肺癌250例、大腸癌120例、肝癌80例、乳癌10例程度の検体収集が終わった。

上皮内腺がん15例と直径2cm以下の小型進行がん17例の間でqPCR法にて7つの遺伝子においてゲノム増幅を解析するとすべての遺伝子において小型進行がんが増幅傾向が認められた。さらに2cm以上の大きさの進行肺腺がんについて解析を行なったところ、7遺伝子のうち1つでも増幅が認められた症例は全101例中15例で、内訳はPIK3CAが13例、ECT2が10例、EIF5A2が8例、TNFSF10が11例であった。また、2つ以上の遺伝子増幅があった症例は11例認められ、増幅が認められる症例は複数の遺伝子領域での増幅が認められる傾向にあった。

3. 腎細胞がんの網羅的ゲノム解析

合計で281のsomatic変異を検出した。このうちPBRM1は103例(43%)、BAP1は29例(12%)、SETD2は25例(10%)、KDM5Cは14例(6%)に変異を認めた。変異の有無と癌特異予後を比較したところ、BAP1の変異がある群では生存率が有意に不良であった。また、SETD2の変異がある群では無病生存率が有意に不良であったが、癌特異生存率には有意差を認めなかった。一方、PBRM1の変異の有無は、予後との関連を認めなかった。

4. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

EVI1 高発現白血病の網羅的遺伝子発現解析により治療標的分子として、CD52、Integrin a6、GPR56、Angiopoietin I (AngI) を同定した。CD52はEVI1高発現白血病に対してADCC活性、CDC活性を有し、治療抗体として使用可能であり、Integrin a6は白血病細胞の間質接着性の亢進と骨髄での細胞保持に重要であり、白血病幹細胞(LSC)のマーカーとしても意味があることを明らかにした。また、AngIは白血病細胞をG0期に止め、白血病幹細胞維持に重要な役割を有することを見出した。また、口腔がんのゲノム解析から1p21ゲノム増幅領域よりIFI16/AIM2遺伝子群の高発現を同定、p53不活化に伴いNf-κB活性化による増殖促進を行うことが分かった。

5. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

非B型非C型肝炎細胞がん50症例を集積し、網羅的発現解析並びにarray CGH解析を行い、非ウイルス性肝がんの特徴的な遺伝子発現並びに染色体コピー数異常プロファイルを取得した。mRNAに加えて長鎖非翻訳RNA (long intergenic non-coding RNA:linc RNA) の解析を行い、血中診断マーカーの候補に加えて非B型非C型で特異的に発現上昇するlinc RNAも同定した。同一検体で全エクソン解読による変異解析を進めた。低分化胃がんにおける新規融合遺伝子探索のため、長鎖RNAシーケンシングによる検討を行った。悪性リンパ腫における新たなゲノム異常探索のため眼付臓器MALTリンパ腫臨床検体19症例について全エクソン解読を進め、2症例以上で変異を認めた遺伝子としてA20/TNFAIP3に加えてNFκB活性化に関与すると考えられる遺伝子並びにエピゲノム関連遺伝子を同定した。

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機能アッセイ法を確立し、難治がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析を実施することでmiR-124とmiR-203は腫瘍特異的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、高スループット機能アッセイ法により327種類のmiRNAの中からがん関連遺伝子を探索する方法を構築し、子宮体がん(EC)抑制型miRNAとしてmiR-152を同定した。miR-152はCOPZ2遺伝子(17q21.32)のintron 1に座位し、標的遺伝子としてE2F3、MET、Rictorを新規に同定した。ECの症例解析でもmiR-152はDNA過剰メチル化により高頻度に発現抑制されており、また、EC細胞株移植SCIDマウスへのmiR-152投与実験からmiR-152の補充療法が新規がん治療法となる可能性が示された。

D. 考察

1. 肺がんの診断と治療の標的分子の同定

KIF5B-RET融合遺伝子は肺腺がんにおける新規のドライバー変異遺伝子であり、現存するチロシンキナーゼ阻害剤を用いた分子標的療法の対象となる一群と考えられる。EGFR/ALK/RET変異肺腺がんはチロシンキナーゼ阻害剤による分子標的療法が可能だが、トリプルネガティブ腺がんの特徴は全く分かっていなかった。この群に極めて予後不良な症例が多く存在することは、今後の更なるゲノム解析の重要性を強く示す貴重な所見である。

パーキンソン病の原因遺伝子のひとつであるPARK2遺伝子は様々なヒトがんで2段階変異が検出されており、がん抑制遺伝子としても機能すると考えられていた。しかし、本研究により、肺腺がん患者におけるPARK2遺伝子の変異はパーキンソン病の患者と同様に杯細胞に存在するものであり、他のがん抑制遺伝子のような体細胞における2段階変異は全く起こっていなかった。従って、PARK2遺伝子の失活は少なくとも肺腺がんの発症には関与していないと結論した。

2. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

「つくばヒト組織バイオバンク」はヒト腫瘍資料収集保存の一つのモデルシステムである。これを全国レベルで行

えば全国ネットの研究サポートができる。

上皮内肺腺がんに見られず、進行すると現れてくる3q26領域の遺伝子増幅を見出し、その領域内の7つの遺伝子を同定した。今後、肺がんの生検材料の悪性度診断などにこの結果を応用することが期待できる。

3. 腎細胞がんの網羅的ゲノム解析

BAP1 および SETD2 の変異は生命予後や転移と関連し、腎細胞がんの分類や予後予測、あるいは遠隔転移に対する治療方針の検討に有用であることが示唆される。

4. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

EVI1 高発現白血病のゲノム並びに網羅的遺伝子発現解析により、白血病幹細胞異常の原因となる遺伝子群を複数個単離し、その機能解析を行った結果、抗がん剤耐性は骨髄ニッチでの細胞接着性や遊走能、G0 期での細胞保持機構に特徴があることがわかった。

5. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

悪性リンパ腫の新規変異は NFκB 阻害剤の有効性バイオマーカーとなる可能性がある。これまで非ウイルス性肝がんを検出するスクリーニングマーカーは存在していないことから、本研究で同定した血中バイオマーカーはその有望な候補と考えられる。

6. 諸臓器がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析

今後、miRNA 研究が飛躍的に進展し、発がん・進展過程の新たな分子メカニズムの解明のみならず、miRNA の発現プロファイルやメチル化プロファイルによる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

我が国における肺腺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様々なゲノム網羅的解析によって得られた。即ち、EGFR/KRAS/ALK に変異のない腺がんの中に極めて予後不良な一群が存在すること、PARK2 遺伝子は肺腺がんの抑制遺伝子としては機能していないこと、KIF5B-RET 融合遺伝子が肺腺がんの約2%に存在し、それらの症例はチロシンキナーゼ阻害剤を用いた分子標的療法によって予後の改善が期待できることの3点である。

2. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

ヒト腫瘍資料の収集保存の一つのモデルシステムとして「つくばヒト組織バイオバンク (THB)」を立ち上げることに成功した。肺腺がんの上皮内腺がんに見られず、進行すると現れてくる3q26領域の遺伝子増幅を見出し、その領域内の7つの遺伝子を同定した。

3. 腎細胞がんの網羅的ゲノム解析

腎細胞がん242例に対し、次世代シーケンサーを用いて、クロマチン制御ならびにヒストン修飾に関する82遺伝子の変異解析を行い、予後や転移と関連する遺伝子変異を見出した。

4. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

EVI1 高発現難治性白血病の骨髄ニッチ接着性に関係する CD52、Integrin α6、GPR56 を、細胞周期を停止させる Angiopoietin 1 を同定し、それぞれ難治性に関わる因子群としての機能が分かってきた。

5. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

新型シーケンサー等の新技術を積極的に導入し、とりわけ有効な治療標的の同定が強く望まれている難治がんにおけるゲノム異常や診断バイオマーカーの同定を進めた。

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・エピゲノム解析を行い、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法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) 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.
- 2) Akca H, Demiray A, Tokgun O, Yokota J. Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through PI3K/AKT/NFκB pathway in lung cancer cells. Lung Cancer, 73:302-309, 2011.
- 3) Saito M, Schetter AJ, Mollerup S, 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.
- 4) Yamauchi M, Yoshino I, Yamaguchi R, Shimamura T, Nagasaki M, Imoto S, Niida A, Koizumi F, Kohno T, Yokota J, Miyano S, Goto N. N-cadherin expression is a potential survival mechanism of gefitinib-resistant lung cancer cells. Am J Cancer Res, 1:823-833, 2011.
- 5) Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Nokihara H, Ohe Y, Yokota J, Uramoto H, Yasumoto K, Kiura K, Higashiyama M, Oda M, Saito H, Yoshida J, Kondoh K, Noguchi M. Hepatocyte growth factor

- expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J Thorac Oncol*, 6:2011-2017, 2011.
- 6) Okayama H, Kohno T, Ishii Y, Shimada Y, Shiraiishi K, Iwakawa R, Furuta K, Tsuta K, Shibata T, Yamamoto S, Watanabe S, Sakamoto H, Kumamoto K, Takenoshita S, Gotoh N, Mizuno H, Sarai A, Kawano S, Yamaguchi R, Miyano S, Yokota J. Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. *Cancer Res*, 72:100-111, 2012.
 - 7) Iwakawa R, Okayama H, Kohno T, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Yokota J. Contribution of germline mutations to PARK2 gene inactivation in lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 51:462-472, 2012.
 - 8) Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nature Med*, 18:375-377, 2012.
 - 9) Kondo Y, Nagai K, Nakahata S, Saito Y, Ichikawa T, Suekane A, Taki T, Iwakawa R, Enari M, Taniwaki M, Yokota J, Sakoda S, Morishita K. Overexpression of the DNA sensor proteins, absent in melanoma 2 and interferon-inducible 16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation. *Cancer Sci.*, 103:782-90, 2012.
 - 10) Chen LS, Saccone NL, Culverhouse RC, Bracci PM, Chen CH, Dueker N, Han Y, Huang H, Jin G, Kohno T, Ma JZ, Przybeck TR, Sanders AR, Smith JA, Sung YJ, Wenzlaff AS, Wu C, Yoon D, Chen YT, Cheng YC, Cho YS, David SP, Duan J, Eaton CB, Furberg H, Goate AM, Gu D, Hansen HM, Hartz S, Hu Z, Kim YJ, Kittner SJ, Levinson DF, Mosley TH, Payne TJ, Rao DC, Rice JP, Rice TK, Schwantes-An TH, Shete SS, Shi J, Spitz MR, Sun YV, Tsai FJ, Wang JC, Wrensch MR, Xian H, Gejman PV, He J, Hunt SC, Kardina SL, Li MD, Lin D, Mitchell BD, Park T, Schwartz AG, Shen H, Wiencke JK, Wu JY, Yokota J, Amos CI, Bierut LJ. Smoking and genetic risk variation across population of European, Asian, and African American ancestry - A meta-analysis of chromosome 15q25. *Genet Epidemiol*, 36:340-351, 2012.
 - 11) Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely 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 Thorac Oncol*, 6:244-285, 2011.
 - 12) 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*, 129:2445-2453, 2011.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) Sugita S, Morishita Y, Kano J, Furuya S, Shiba-Ishii A, Noguchi M. IGFBP-1 is expressed specifically in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Histopathol*, 58:729-738, 2011.
 - 17) Satomi K, Morishita Y, Sakashita S, Kondou Y, Furuya S, Minami Y, Noguchi M. Specific expression of ZO-1 and N-cadherin in rosette structures of various tumors: possible recapitulation of neural tube formation in embryogenesis and utility as a potentially novel immunohistochemical marker of rosette formation in pulmonary neuroendocrine tumors. *Virchows Arch*, 459:399-407, 2011.
 - 18) Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, Powell CA, Beer D, Riely G, Garg K, Austin JH, Rusch VW, Hirsch FR, Jett J, Yang PC, Gould M. International association for the study of lung cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proc Am Thorac Soc*, 8:381-385, 2011 Sep.
 - 19) Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Mitsuoka S, Watanabe T, Suzumura T, Tachibana K, Noguchi M, Yano S,

- Hirata K. Reaction of plasma hepatocyte growth factor levels in non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. *Int J Cancer*, 129:1410-1416, 2011.
- 20) Nishikii H, Nakamura N, Kondo Y, Okoshi Y, Suzukawa K, Hasegawa Y, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Noguchi M, Chiba S. Treatment outcome of adult burkitt lymphoma in Japanese patients with modified LMB protocol: a signal center retrospective analysis. *J Clin Exp Hematopathol*, 51:109-114, 2011.
 - 21) Tachibana K, Minami Y, Shiba-Ishii A, Kano J, Nakazato Y, Sato Y, Goya T, Noguchi M. Abnormality of the hepatocyte growth factor/MET pathway in pulmonary adenocarcinogenesis. *Lung Cancer*, 75:181-188, 2012.
 - 22) Shiba-Ishii A, Noguchi M. Aberrant stratifin overexpression is regulated by tumor-associated CpG demethylation in lung adenocarcinoma. *Am J Pathol*, in press.
 - 23) Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koefler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 478:64-69, 2011.
 - 24) Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, Sanada M, Hiwatari M, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S. Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene*, in press.
 - 25) Takita J, Chen Y, Okubo J, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. *Cancer Sci*, in press.
 - 26) Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, Yamakawa N, Morishita K. A ngiopoietin1 contributes to the maintenance of cell quiescence in EVI1(high) leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 416:239-245. 2011.
 - 27) Nishikata I, Nakahata S, Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, Yamakawa N, Morishita K. Sumoylation of MEL1S at lysine 568 and its interaction with CtBP facilitates its repressor activity and the blockade of G-CSF-induced myeloid differentiation. *Oncogene*, 30:4194-4207, 2011.
 - 28) Saito Y, Nakahata S, Yamakawa N, Kaneda K, Ichihara E, Suekane A, Morishita K. CD52 as a molecular target for immunotherapy to treat acute myeloid leukemia with high EVI1 expression. *Leukemia*, 25:921-931, 2011.
 - 29) Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Sakakibara Y, Suiko M, Morishita K, Kataoka H, Matsuno K. Inhibition of proliferation by agricultural plant extracts in seven human adult T-cell leukaemia (ATL)-related cell lines. *J Nat Med*, 65:651-655, 2011.
 - 30) 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*. 128:1335-1343. 2011
 - 31) Shibata T, Kokubu A, Saito S, Narisawa-Saito N, Sasaki H, Aoyagi K, Yoshimatsu Y, Tachimori Y, Kushima R, Kiyono T, Yamamoto M. NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer. *Neoplasia*, 13:864-873, 2011.
 - 32) 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, 2011.
 - 33) Miyamoto M, Ojima H, Iwasaki M, Shimizu H, Kokubu A, Hiraoka N, Kosuge T, Yoshikawa D, Kono T, Furukawa H, Shibata T. Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*, 105:131-138, 2011.
 - 34) Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Hiroki U, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T, Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. *Genome Res*, 22:208-219, 2012.
 - 35) Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Kasim V, Maida Y, Possemato R, Shibata T, Ligon K, Fukami K, Hahn W, Masutomi K. Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by a complex composed of nucleostemin, hTERT and BRG1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108:20388-20393, 2011.
 - 36) Yoshida A, Tsuta K, Nakamura H, Kohno T, Takahashi F, Asamura H, Sekine I, Fukayama M, Shibata T, Furuta K, Tsuda H. Comprehensive histological analysis of ALK-rearranged lung carcinomas. *Am J Surg Pathol*, 35:1226-1234, 2011.
 - 37) 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.
 - 38) Arima Y, Hayashi H, Sasaki M, Hosonaga M, Goto TM, Chiyoda T, Kuninaka S, Shibata T, Ohata H,

- Nakagama H, Taya Y, Sata H. Induction of ZEB by inactivation of RB is a key determinant of the mesenchymal phenotype of breast cancer. *J Biol Chem*, 2012, in press.
- 39) Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, Ehata S, Shibata T, Morita I, Miyazono K, Saitoh M. TGF- β regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J*, 30:783-795, 2011.
- 40) Akamatsu S, Takata R, Haiman CA, Takahashi A, Inoue T, Kubo M, Furihata M, Kamatani N, Inazawa J, Chen GK, Le Marchand L, Kolonel LN, Katoh T, Yamano Y, Yamakado M, Takahashi H, Yamada H, Egawa S, Fujioka T, Henderson BE, Habuchi T, Ogawa O, Nakamura Y, Nakagawa H. Common variants at 11q12, 10q26 and 3p11.2 are associated with prostate cancer susceptibility in Japanese. *Nat Genet*, 2012 [Epub ahead of print]
- 41) Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Takano M, Tamai S, Imoto I, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O. ACTN4 gene amplification and actinin-4 protein overexpression drive tumour development and histological progression in a high-grade subset of ovarian clear-cell adenocarcinomas. *Histopathology*. 2012 [Epub ahead of print]
- 42) Kozaki K, Inazawa J. Tumor-suppressive microRNAs silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in cancer cells. *Cancer Sci*, 2012 [Epub ahead of print]
- 43) Ono H, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Matsui T, Kurasawa Y, Muramatsu T, Sugihara K, Inazawa J. SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation. *Oncogene*, 2012 [Epub ahead of print]
- 44) Bai H, Inoue J, Kawano T, Inazawa J. A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. *Oncogene*, 2012 [Epub ahead of print]
- 45) Ooi A, Inokuchi M, Harada S, Inazawa J, Tajiri R, Sawada-Kitamura S, Ikeda H, Kawashima H, Dobashi Y. Gene amplification of ESR1 in breast cancers - Fact or fiction? A fluorescence in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification study. *J Pathol*, 2011 [Epub ahead of print]
- 46) Ishihara T, Inoue J, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J. The HECT-type ubiquitin ligase ITCH targets lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5 (LAPTM5) and prevents LAPTM5-mediated cell death. *J Biol Chem*, 286:44086-44094. 2011.
- 47) Kurasawa Y, Kozaki K, Pimkhaokham A, Muramatsu T, Ono H, Ishihara T, Uzawa N, Imoto I, Amagasa T, Inazawa J. Stabilization of phenotypic plasticity through mesenchymal-specific DNA hypermethylation in cancer cells. *Oncogene*, 2011 [Epub ahead of print]
- 48) Tsuruta T, Kozaki K, Uesugi A, Furuta M, Hirasawa A, Imoto I, Susumu N, Aoki D, Inazawa J. miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res*, 71:6450-6462. 2011.
- 49) Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, Omura K, Inazawa J. The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer Res*, 71:5765-5778, 2011
- 50) 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.
- 51) 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*, 780836, 2011.
- 52) 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. 2011.

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得

- 1) 細胞接着阻害剤、細胞増殖阻害剤、並びに癌の検査方法および検査用キット、特許申請 2011-108685
- 2) 特許第 4740621 号「食道癌の検出方法、および、抗食道癌物質のスクリーニング法。稲澤義治、井本逸勢、平成 23 年 5 月 13 日

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

肺がんの発現プロファイル解析により、ALK 変異型腺がんでは ALK 遺伝子に加えて GRIN2A 遺伝子が発現上昇していることを見出した。また、EGFR/KRS/ALK に変異のない腺がんは 2 群に大別され、極めて予後の悪い群は DEPDC1 遺伝子を含む 9 つの遺伝子の発現で識別できることを明らかにした。詳細な非がん細胞のゲノムコピー数解析を行うことにより、以前からがん抑制遺伝子として報告されていた PARK2 遺伝子は胚細胞レベルで 1 段階目のゲノム内欠失が起こっており、細胞株でしばしば見られる 2 段階の変異は臨床検体では全く起こっていないことを明らかにした。EGFR/KRS/ALK に変異のない腺がんの全 RNA シークエンシング解析により、KIF5B-RET 融合遺伝子が全腺がんの約 2% に存在し、この融合遺伝子を持つ細胞の増殖は RET チロシンキナーゼの阻害剤によって抑制されることを見出した。

A. 研究目的

我が国で最も死亡率の高い肺がんを対象として様々なゲノム網羅的な解析を行い、ゲノム異常あるいは発現異常を起こしている遺伝子を網羅的に同定する。さらに、同定された異常と臨床病理学的所見との関連を検討し、また、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。今年度は肺腺がんを対象として、1)ゲノム網羅的発現プロファイル解析、2) PARK2 候補がん抑制遺伝子のゲノム異常解析、3)全トランスクリプトームシークエンシングを行い、それぞれ結果が得られたので、課題ごとに研究方法と結果を列記する。

B. 研究方法

- 1) 肺腺がんのゲノム網羅的発現プロファイル解析
ヒトゲノム上の 38,500 遺伝子に対するプローブを搭載する Affymetrix U133Plus2.0 アレイを用いて、226 例の I-II 期肺腺がんを対象として、ゲノム網羅的な発現プロファイル解析を行った。すべての症例に関して EGFR/KRAS/ALK の変異・融合の有無を解析し、それらの遺伝子に変異・融合のない肺腺がんをトリプルネガティブ腺がんとして分類した。EGFR/KRAS 変異腺がんが発現が低い 174 遺伝子を抽出して全症例のクラスター解析を行った。さらに、トリプルネガティブ腺がんの予後を規定している 9 遺伝子を抽出してクラスター解析を行った。
- 2) 肺腺がんにおける PARK2 遺伝子のゲノム異常解析
267 例の肺腺がんの手術組織と 39 例の肺腺がん細胞株から DNA を抽出して 250K Nsp SNP アレイ解析を行い、6 番染色体長腕にマップされる PARK2 遺伝子領

域に存在する 187 SNP 部位のゲノムコピー数変化を解析した。さらに、定量的ゲノム PCR 法で PARK2 遺伝子内の様々な領域のゲノムコピー数を算出した。PARK2 遺伝子の発現量に関しては定量的な RT-PCR 法で算出し、変異に関してはサイクロシークエンシングで検出した。

3) 肺腺がんの全トランスクリプトームシークエンシング

30 例の肺腺がんを対象として、mRNA-Seq Sample Prep Kit を用いて長さが 250-300 bp の cDNA ライブラリーを作製し、Genome Analyzer IIX (GAIIX) (Illumina) を用いてその両端 50 bp の配列を決定した。検出された KIF5B-RET 融合遺伝子のスクリーニングは、319 例の日本人肺腺がん、80 例のアメリカ人肺腺がん、34 例のノルウェー人肺腺がんの検体お用いて行った。融合遺伝子産物の機能解析はマウス NIH3T3 細胞あるいはヒト肺がん細胞株 H1299 を用いて行った。

(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) 肺腺がんのゲノム網羅的発現プロファイル解析
肺腺がん 226 例の発現プロファイル解析により、ALK 変異型腺がんでは ALK 遺伝子自身に加えて GRIN2A 遺伝子が有意に発現上昇していることを見出した。また、EGFR/KRS/ALK に変異のない腺がんは 2 群に大別され、極めて予後の悪い群は DEPDC1 遺伝子を含む 9 つの遺伝子の発現で識別できることを明らかにした。

2) 肺腺がんにおける PARK2 遺伝子のゲノム異常解析

PARK2 遺伝子の両アレルの異常はパーキンソン病の一因であり、片アレルの異常は健常人の数%に存在する。そこで、肺腺がん患者の非がん細胞における PARK2 遺伝子領域の詳細なゲノムコピー数解析を行った。その結果、以前からがん抑制遺伝子として報告されていた PARK2 遺伝子は胚細胞レベルで1段階目のゲノム内欠失がしばしば起こっており、細胞株でしばしば見られる2段階変異は臨床検体では全く起こっていないことが分かった。

3) 肺腺がんの全トランスクリプトームシーケンシング

EGFR/KRS/ALK に変異のない腺がんを中心に30例の肺腺がん検体を用いて全トランスクリプトームシーケンシングを行い、1例で KIF5B-RET 融合遺伝子が存在することを見出した。そこで、国内外の300例以上に及ぶ肺腺がん検体をスクリーニングし、10番染色体の再構成によって形成された KIF5B-RET 融合遺伝子が全腺がんの約2%に存在することを明らかにした。この融合遺伝子を持つ細胞の増殖は RET チロシンキナーゼの阻害剤によって抑制され、この融合遺伝子を持つ肺腺がんはチロシンキナーゼ阻害剤による分子標的治療の対象になる可能性を示した。

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) 肺腺がんのゲノム網羅的発現プロファイル解析

EGFR/ALK/RET 変異肺腺がんはチロシンキナーゼ阻害剤による分子標的療法が可能だが、トリプルネガティブ腺がんの特徴は全く分かっていなかった。この群に極めて予後不良な症例が多く存在することは、今後の更なるゲノム解析の重要性を強く示す貴重な所見である。

2) 肺腺がんにおける PARK2 遺伝子のゲノム異常解析

パーキンソン病の原因遺伝子のひとつである PARK2 遺伝子は様々なヒトがんで2段階変異が検出されており、がん抑制遺伝子としても機能すると考えられていた。しかし、本研究により、肺腺がん患者における PARK2 遺伝子の変異はパーキンソン病の患者と同様に杯細胞に存在するものであり、他のがん抑制遺伝子のような体細胞における2段階変異は全く起こっていなかった。従って、PARK2 遺伝子の失活は少なくとも肺腺がんの発症には関与していないと結論した。

3) 肺腺がんの全トランスクリプトームシーケンシング

KIF5B-RET 融合遺伝子は肺腺がんにおける新規のドライバー変異遺伝子であり、現存するチロシンキナーゼ阻害剤を用いた分子標的療法の対象となる一群と考えられる。近年、注目されているがんの分子標的治療の適応範囲を広げる重要な知見である。

E. 結論

我が国における肺腺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様々なゲノム網羅的解析によって得られた。即ち、EGFR/KRAS/ALK に変異のない腺がんの中に極めて予後不良な一群が存在すること、PARK2 遺伝子は肺腺がんの抑制遺伝子としては機能していないこと、KIF5B-RET 融合遺伝子が肺腺がんの約2%に存在し、それらの症例はチロシンキナーゼ阻害剤を用いた分子標的療法によって予後の改善が期待できることの3点である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Akca, H., Demiray, A., Tokgun, O., and Yokota, J. Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through PI3K/AKT/NFκB pathway in lung cancer cells. *Lung Cancer*, 73:302-309, 2011.
- 3) 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.
- 4) Yamauchi, M., Yoshino, I., Yamaguchi, R., Shimamura, T., Nagasaki, M., Imoto, S., Niida, A., Koizumi, F., Kohno, T., Yokota, J., Miyano, S., and Goto, N. N-cadherin expression is a potential survival mechanism of gefitinib-resistant lung cancer cells. *Am. J. Cancer Res.*, 1:823-833, 2011.
- 5) Yano, S., Yamada, T., Takeuchi, S., Tachibana, K., Minami, Y., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., Tanaka, H., Kimura, T., Kudoh, S., Nokihara, H., Ohe, Y., Yokota, J., Uramoto, H., Yasumoto, K., Kiura, K., Higashiyama, M., Oda, M., Saito, H., Yoshida, J., Kondoh, K., and Noguchi, M. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J. Thorac. Oncol.*, 6:2011-2017, 2011.
- 6) Okayama, H., Kohno, T., Ishii, Y., Shimada, Y., Shiraishi, K., Iwakawa, R., Furuta, K., Tsuta, K., Shibata, T., Yamamoto, S., Watanabe, S., Sakamoto, H., Kumamoto, K.,

- Takenoshita, S., Gotoh, N., Mizuno, H., Sarai, A., Kawano, S., Yamaguchi, R., Miyano, S., and Yokota, J. Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 72:100-111, 2012.
- 7) Iwakawa, R., Okayama, H., Kohno, T., Sato-Otsubo, A., Ogawa, S., and Yokota, J. Contribution of germline mutations to PARK2 gene inactivation in lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 51:462-472, 2012.
- 8) Kohno, T., Ichikawa, H., Totoki, Y., Yasuda, K., Hiramoto, M., Nammo, T., Sakamoto, H., Tsuta, K., Furuta, K., Shimada, Y., Iwakawa, R., Ogiwara, H., Oike, T., Enari, M., Schetter, A. J., Okayama, H., Haugen, A., Skaug, V., Chiku, S., Yamanaka, I., Arai, Y., Watanabe, S., Sekine, I., Ogawa, S., Harris, C. C., Tsuda, H., Yoshida, T., Yokota, J., and Shibata, T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nature Med.*, 18:375-377, 2012.
- 9) Kondo, Y., Nagai, K., Nakahata, S., Saito, Y., Ichikawa, T., Suekane, A., Taki, T., Iwakawa, R., Enari, M., Taniwaki, M., Yokota, J., Sakoda, S., and Morishita K. Overexpression of the DNA sensor proteins, absent in melanoma 2 and interferon-inducible 16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation. *Cancer Sci.*, 103:782-90, 2012.
- 10) Chen, L. S., Saccone, N. L., Culverhouse, R. C., Bracci, P. M., Chen, C. H., Dueker, N., Han, Y., Huang, H., Jin, G., Kohno, T., Ma, J. Z., Przybeck, T. R., Sanders, A. R., Smith, J. A., Sung, Y. J., Wenzlaff, A. S., Wu, C., Yoon, D., Chen, Y. T., Cheng, Y. C., Cho, Y. S., David, S. P., Duan, J., Eaton, C. B., Furberg, H., Goate, A. M., Gu, D., Hansen, H. M., Hartz, S., Hu, Z., Kim, Y. J., Kittner, S. J., Levinson, D. F., Mosley, T. H., Payne, T. J., Rao, D. C., Rice, J. P., Rice, T. K., Schwantes-An, T. H., Shete, S. S., Shi, J., Spitz, M. R., Sun, Y. V., Tsai, F. J., Wang, J. C., Wrensch, M. R., Xian, H., Gejman, P. V., He, J., Hunt, S. C., Kardia, S. L., Li, M. D., Lin, D., Mitchell, B. D., Park, T., Schwartz, A. G., Shen, H., Wiencke, J. K., Wu, J. Y., Yokota, J., Amos, C. I., and Bierut, L. J. Smoking and genetic risk variation across population of European, Asian, and African American ancestry - A meta-analysis of chromosome 15q25. *Genet Epidemiol.*, 36:340-351, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況
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

①筑波大学附属病院内に「つくばヒト組織バイオバンク (THB)」と「トランスレーショナル・リサーチ・アンド・リソース・コア (TRRC)」を設立し、大学附属病院の外科切除材料を保存管理するシステムを確立した。

②ゲノム CGH 解析を行って、小型浸潤がんで明らかに特異的に増幅の見られる領域である 3q26.3 から 3q29 を同定した。多数例で検証を行ったが、同部に位置するがん関連遺伝子群 4 つが複数組高増幅する症例が 101 例中 6 例 (5.9%) 見つかった。これらはいずれも大型異型核を有する腺がん、大細胞がん、多形がんであった。

A. 研究目的

本研究班の研究遂行に必要なヒト生体資料のバンキングおよびサポート基盤を作ることと、②ヒト肺腺がんの初期病変におけるゲノム異常や発現遺伝子異常の網羅的解析を目的に研究を遂行した。

B. 研究方法

①まず筑波大学附属病院に、病理部内に設置されたつくばヒト組織バイオバンク (Tsukuba Human Tissue Bio-Bank, THB) を拡充し、さらに病理部と並列して組織されているつくばヒト組織診断センター (Tsukuba Human Tissue Diagnostic Center, THDC) 内にトランスレーショナルリサーチ・アンド・リソース・コア (Translational Research and Resource Core, TRRC) を設置する。筑波大学附属病院にて切除された標本を THB が各科同一の組織標本の研究使用のための同意書でインフォームドコンセント (IC) を得、総合的に、かつ高品質

の状態でマイナス 80°C 保存する。また TRRC は研究のサポート組織として、主に組織アレイの作成や免疫組織染色を受益者負担で行えるシステムを整備する。

②ヒト肺腺がんの初期病変におけるゲノム異常の変化についてアレイ CGH 法を用いて解析した。まず上皮内腺がん (野口タイプ A, B) と小型であっても予後の悪い低分化浸潤がん (タイプ D) についてアレイ CGH の検討を行った。用いた症例数はタイプ A, B が 10 例、タイプ D が 10 例でアレイ CGH は東京医科歯科大学の稲澤譲治博士が開発した Cancer Array 800 (Inazawa J et al. Cancer Science, 2004) で 800 種類の既知の癌関連遺伝子座の BAC クローンを搭載した DNA アレイでヒトゲノムに対するカバー率は約 4% である。

得られた増幅部位の検証のために定量的リアルタイム PCR を行った。用いた症例は上皮内腺がん (タイプ A, B) 15 例、小型低分化腺がん (タイプ D, E) 17 例、進行腺がん 51 例、

大細胞がん 6 例、多形がん 12 例の計 101 症例である。定量的リアルタイム PCR 解析を行った遺伝子は 3q26 領域に位置する MUC4, PIK3CA, TNFSF10, ECT2, EIF5A2, EVI-1, SKIL の 7 遺伝子である。特異的プライマーセットは primer3 で設計し、primer blast で特異性を検証した。定量的リアルタイム PCR 法はインターカレーター法による SYBR Premix Ex Taq II(Takara)を用いて行い、ABI PRISM 7300 にて比較検討した。増幅の判定は、腫瘍部分と正常部分でそれぞれ定量的リアルタイム PCR を行い、GAPDH で補正する。補正した値を腫瘍/正常比で増幅の幅を算出した。

(倫理面への配慮)

ヒト組織のバンキングに関しては筑波大学医の倫理審査委員会で承認を受けた。またゲノム指針に配慮した患者同意書を作成し、インフォームドコンセント(IC)の得られた材料のみを採取保存した。採取し、保存して研究に用いたヒト組織は病理学的最終診断、あるいは細胞学的診断の後に残った材料(組織あるいは洗浄細胞診)を対象に行い、か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した。小型腺がんのゲノム異常に関する研究遂行にあたっては筑波大学医の倫理審査委員会で承認を受けた。

C. 研究結果

①筑波大学附属病院病理部に設置したつくばヒト組織バイオバンク(THB)に専任の助教 1 名、非常勤職員 2 名を配置し、患者用同意書を作成するとともに、臨床各科と交渉を行って参加を勧誘した。現在呼吸器外科、消化器外科、泌尿器科、乳腺科などが参加協力していただいている。検体は手術室まで出向いて検体を受け取る場合もあれば病理部に提出された検体が

ら標本を採取する場合もあり、各科の事情に合わせた。表 1 に示すように、現在肺組織を中心に 551 例の検体が収集されている。また早期肺がん診断の向上を目的に気管支洗浄液の残余の検体も収集を始め、現在肺がん、非がん症例合わせて 200 例を収集した。また、トランスレーショナル・リサーチ・アンド・リソース・コア(TRRC)を組織して、保存された材料から高品質の核酸を抽出するための技術補佐員(非常勤)や研究のサポートのために免疫組織染色を行うための技術補佐員(非常勤)を雇用した。現在組織アレイの作製依頼を数件受け、免疫染色については延べ 1000 枚程度の染色をサポートした。

表 1

つくばヒト組織バイオバンクで管理しているヒト組織検体数

(H21.4.1~H23.3.31)

	肺がん	大腸がん	肝臓がん	膵臓がん	乳がん
肺がん	90	107	124		321
大腸がん	57	43	17		117
肝臓がん	40	27	22		89
膵臓がん	0	8	1		9
乳がん	0	14	1		15

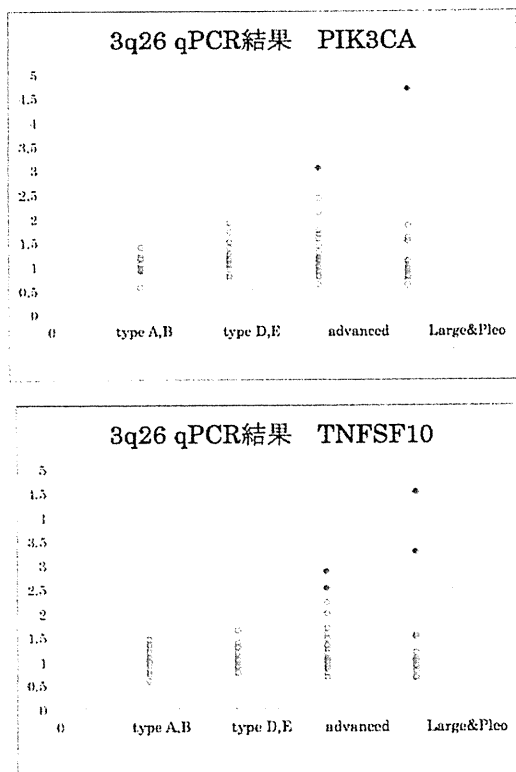
計 551 例

*この他に気管支洗浄液が 200 症例(H22.10.29~H.23.3.31)

②ゲノム CGH の結果、上皮内がんに比べて小型低分化腺がんではゲノム異常の数は少ない傾向にあることが明らかになった。特に chromosome 3q 領域の 3q21.3 から 29 に小型低分化腺がんでは有意に増幅が見られる領域があった。この領域に含まれる 7 つのがん関連遺伝子 MUC4, PIK3CA, TNFSF10, ECT2, EIF5A2, EVI-1, SKIL について定量的リアルタイム PCR を用いて多数症例で検証を行った。まず上皮内腺がん(野口タイプ A, B)と小型浸潤肺腺がん(野口タイプ D, E)を比較するとす

すべての遺伝子において野口タイプ D, E で増幅傾向が見られた。さらに 2cm 以上の大きさの浸潤性肺腺がん 51 例、大細胞がん 9 例、多形がん 12 例について増幅が多く観察された遺伝子 4 つ (PIK3CA, TNFSF10, ECT2, EIF5A2) の解析を追加すると、1 つの遺伝子でも 1.5 倍以上の増幅が見られる症例は全 101 例中 15 例で、内訳は PIK3CA が 13 例、ECT2 が 10 例、EIF5A2 が 8 例、TNFSF10 が 11 例であった。また 2 つ以上の遺伝子増幅があった症例は 11 例であった。さらに 2.5 倍以上の高増幅があった症例は 6 例 (5.9%) あり、これらは表 2 に示すように腺がん 4 例、大細胞がん 1 例、多形がん 1 例であり、すべて大型核を有し (核グレード 1)、核異型が高度であった (核異型度 3) (図 1)。

図 1-1

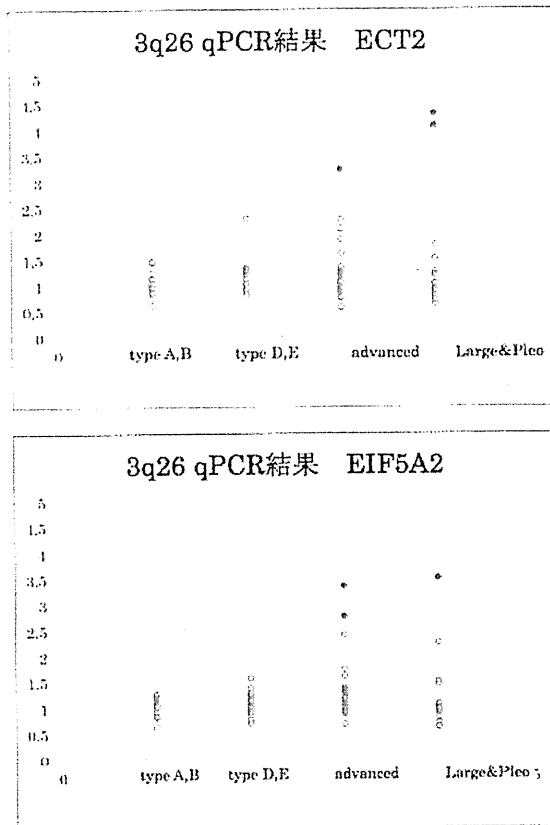


PIK3CA と TNFSF10 の増幅状態

赤丸：2.5 倍以上の増幅を認める症例

advanced：浸潤性腺がん Large & Pleo：大細胞がん、多形がん

図 1-2



ECT2 と EIF5A2 の増幅状態

赤丸：2.5 倍以上の増幅を認める症例

advanced：浸潤性腺がん Large & Pleo：大細胞がん、多形がん

表 2

高増幅の認められた肺がん 6 例の特徴

症例	1	2	3	4	5	6
増幅の程度						
PIK3CA	2.4	9.16	1.73	1.84	3.02	4.67
ECT2	2.25	1.4	3.22	4.05	1.21	4.29
EIF5A2	2.75	1.1	3.33	2.23	1.17	3.48
TNFSF10	2.85	1.3	2.51	3.26	0.85	4.5
組織型	腺がん	腺がん	腺がん	多形がん	腺がん	大細胞がん
nuclear grade	1	1	1	1	1	1
nuclear atypia	3	2	3	3	3	3

Nuclear grade: 1: 核の大きさがリンパ球の 3 倍を超える, 0: 核の大きさがリンパ球の 3 倍以下
Nuclear atypia: 3: 巨核を含み核異型高度 2: 核異型中等度から高度 1: 核異型軽度

D. 考察

①網羅的なゲノム異常解析を行う場合、十分な数でかつ高品質な核酸が必要である。また、明らかになった異常の検証を行うためにはホルマリン固定であっても十分な数の解析材料が必要である。網羅的ゲノム解析に用いる材料供

給のための恒常的なパイプラインは全国的にはなく、プロジェクト別に必要症例を蓄積しているのが現状である。つまり材料供給システムとして独立して採算性を考慮したうえで稼働している施設、部局はない。そこで我々は筑波大学附属病院を例にとりて上記のような材料保存、供給システムの構築を試みた。具体的には筑波大学附属病院病理部内に「つくばヒト組織バイオバンク」(THB)を設立し、これと合わせて「トランスレーショナル・リサーチ・アンド・リソース・コア」(TRRC)を立ち上げる事によって、材料の保存と同時に、発現蛋白質の変化の網羅的解析に用いる組織アレイの作製や免疫染色サービスを行うシステムを設置できた。現在 THB では肺腺がんを中心に 551 例が凍結保存されており、本研究班でも自由に利用可能である。さらに広く他施設(製薬企業を含む)からの要望にも答えられるように準備中である。TRRC は組織アレイの作製や免疫染色のサービスを開始しており順調にその数を増加させている。今後、茨城県、全県レベルでの標本収集を目指しており、県内の基幹病院とは協力体制の確立のための話し合いを始めた。茨城県は人口約 300 万人であり、本計画が順調に進めば都道府県レベルでのバンキングのモデルシステムになることを期待している。

②肺腺がんの増悪に伴って増幅する染色体領域として 3q26.3 から 3q29 領域を同定し、この領域に含まれるがん関連遺伝子のゲノム異常(増幅)について定量的リアルタイム PCR を行い、多数例の肺がんを用いて検証した。その結果 MUC4, PIK3CA, TNFSF10, ECT2, EIF5A2, EVI-1, SKIL の 7 つの遺伝子はいずれも低分化腺がんが増幅症例が確認された。またさらに多数例の検討によれば PIK3CA, TNFSF10, ECT2, EIF5A2 について 2.5 倍以上

の高増幅例は 6 例(5.9%)存在し、内容は腺がんの他に大細胞がんや多形がんが含まれたが、いずれも大型核を持ち、また核異型も高度であることがわかった。今後、これらの 6 症例がどのような臨床病理学的性格を持つのかなどを詳細に検討し、これらの遺伝子の増幅する生物学的意義を明らかにしていきたい。

E. 結論

①筑波大学附属病院内に「つくばヒト組織バイオバンク(THB)」と「トランスレーショナル・リサーチ・アンド・リソース・コア(TRRC)」を設立し、大学附属病院の外科切除材料を保存管理するシステムを確立した。また 2 つの部局は標本の管理、あるいは免疫染色サービスを開始した。

②上皮内腺がんや小型浸潤がんを対象にゲノム CGH 解析を行って、小型浸潤がんでは明らかに特異的に増幅の見られる領域である 3q26.3 から 3q29 を同定した。多数例の検証を行ったが、同部に位置するがん関連遺伝子群 4 つが複数組高増幅する症例が 101 例中 6 例(5.9%)見つかった。これらはいずれも大型異型核を有する腺がん、大細胞がん、多形がんであった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shiba-Ishii A, Noguchi M. Aberrant stratifin overexpression is regulated by tumor-associated CpG demethylation in lung adenocarcinoma. *Am J Pathol* 180(4):1653-1662, 2012.

2) Tachibana K, Minami Y, Shiba-Ishii A, Kano J, Nakazato Y, Sato Y, Goya T, Noguchi M. Abnormality of the hepatocyte growth factor/MET pathway in pulmonary adenocarcinogenesis. *Lang Cancer* 75(2):181-188, 2012.

3) Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Nokihara H, Ohe Y, Yokota J, Uramoto H, Yasumoto K, Kiura K, Higashiyama M, Oda M, Saito H,

Yoshida J, Kondoh K, Noguchi M. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J Thorac Oncol.* 6(12):2011-2017, 2011.

4)Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, Powell CA, Beer D, Riely G, Garg K, Austin JH, Rusch VW, Hirsch FR, Jett J, Yang PC, Gould M. International association for the study of lung cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proc Am Thorac Soc.* 8(5):381-385, 2011.

5)Nishikii H, Nakamura N, Kondo Y, Okoshi Y, Suzukawa K, Hasegawa Y, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Noguchi M, Chiba S. Treatment outcome of adult burkitt lymphoma in Japanese patients with modified LMB protocol: a signal center retrospective analysis. *J Clin Exp Hematopathol* 51(2):109-114, 2011.

6)Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Mitsuoka S, Watanabe T, Suzumura T, Tachibana K, Noguchi M, Yano S, Hirata K. Reaction of plasma hepatocyte growth factor levels in non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. *Int J Cancer* 129(6):1410-1416, 2011.

7)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(6):1481-1489, 2011.

8)Satomi K, Morishita Y, Sakashita S, Kondo Y, Furuya S, Minami Y, Noguchi M. Specific expression of ZO-1 and N-cadherin in rosette structures of various tumors: possible recapitulation of neural tube formation in embryogenesis and utility as a potentially novel immunohistochemical marker of rosette formation in pulmonary neuroendocrine tumors. *Virchows Arch* 459:399-407, 2011.

9)Sugita S, Morishita Y, Kano J, Furuya S, Shiba-Ishii A, Noguchi M. IGFBP-1 is expressed specifically in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Histopathology*, 58(5):729-738, 2011.

10)Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely 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. *JTO* 6(2):244-285, 2011.

11)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.

12)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.

13)Sakashita S, Li D, Nashima N, Minami Y, 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.

14)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* 129(10):2445-2453, 2011.

2. 学会発表

1)倉持雅己、山岡賢俊、小林敬祐、井口けさ人、菊池慎二、酒井光昭、後藤行延、鬼塚正孝、佐藤幸夫、薄井真悟、南優子、野口雅之。術前気管支鏡、術中針生検で確定診断に至らなかった肺腺癌の1例。第163回日本肺癌学会関東支部会、2012年3月10日

2)薄井真悟、山田健二、坂田晃子、南優子、佐藤幸夫、野口雅之。ヒト肺腺癌間質における Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2(DDAH2)発現の検討。第52回日本肺癌学会総会、2011年11月4日

3)南優子、村田佳彦、野口雅之。小型肺腺癌の Array CGH解析。第52回日本肺癌学会総会、2011年11月4日

4)山岡賢俊、小林尚寛、薄井真悟、菊池慎二、酒井光昭、後藤行延、鬼塚正孝、佐藤幸夫、南優子、野口雅之。Stiff person症候群を合併した胸腺腫の1切除例。第52回日本肺癌学会総会、

2011年11月3日

5)坂下信悟、里見介史、鈴木恵子、南優子、野口雅之. 肺の異型腺腫様過形成をターゲットとしたプロテオミクス解析. 第52回日本肺癌学会総会、2011年11月3日

6)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の特異的局在と診断への応用. 第52回日本肺癌学会総会、2011年11月3日

7)後藤行延、山岡賢俊、小林敬祐、薄井真悟、井口けさ人、倉持雅己、菊池慎二、酒井光昭、鬼塚正孝、佐藤幸夫、南優子、野口雅之. 悪性胸膜中皮腫に対する生検時胸腔鏡下狭帯域光(NBI:Narrow Band Imaging)観察. 第52回日本肺癌学会総会、2011年11月3日

8)野口雅之. 肺腺がんのWHO新分類. 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日

9)大原玲奈、柴綾、里見介史、坂下信悟、加野准子、吉川裕之、野口雅之. Moesinは子宮腺筋症の浸潤に関与する. 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日

10)柴綾、野口雅之、加野准子. 肺腺癌におけるstratifinの発現上昇はプロモーター領域の脱メチル化によって引き起こされる. 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日

11)Sakashita S, Li D, Tachibana K, Minami Y, Yoshida T, Sato T, Morishita Y, Noguchi M. Immunoglobulin binding protein 1(IGBP1) is a key protein related to anti-apoptotic activity in lung adenocarcinoma. 14th World Conference on Lung Cancer, 7 July 2011, Amsterdam, The Netherlands

12)Minami Y, Murata Y, Noguchi M. Array CGH analysis of small-sized adenocarcinoma of the lung. 14th World Conference on Lung Cancer, 5 July 2011, Amsterdam, The Netherlands

13)Yoshida T, Minami Y, Shiba-Ishii A, Sakashita S, Tachibana K, Nakazato Y, Goya T, Noguchi M. Abnormal golm1 gene expression in adenocarcinoma of the lung. 14th World Conference on Lung Cancer, 4 July 2011, Amsterdam, The Netherlands

14)Savic S, Glatz K, Kerr KM, Nicholson AG, Noguchi M, Popper HH, Yatabe Y, Travis WD, Bubendorf. Accuracy of histological non-small cell lung carcinoma subtyping in diagnostic lung. 14th World Conference on Lung Cancer, 5 July 2011, Amsterdam, The Netherlands

15)Nakazato Y, Maeshima AM, Ishikawa Y, Yatabe Y, Fukuoka J, Yokose T, Tomita Y, Minami Y, Asamura H, Tachibana K, Goya T, Noguchi M. Interobserver agreement in the nuclear grading of primary pulmonary adenocarcinoma: a collaborative microscopy project. 14th World Conference on Lung

Cancer, 4 July 2011, Amsterdam, The Netherlands

16)Thunnissen E, Beasley M, Borczuk A, Brambilla E, Chirieac LR, Dacic S, Flieder D, Gazdar AF, Geisinger K, Ishikawa Y, Kerr KM, Minami Y, Lantejoul S, Matsuno Y, Moreira AL, Motoi N, Nicholson AG, Noguchi M, Nonaka D, Pelosi G, Peterson I, Rekhtman N, Roggli VL, Travis WD, Tsao MS, Wistuba I, Xu H, Yatabe Y, Kuik DJ. Reproducibility of invasion in pulmonary adenocarcinoma. An international interobserver study. 14th World Conference on Lung Cancer, 4 July 2011, Amsterdam, The Netherlands

17)Shiba-Ishii A, Kano J, Noguchi M. Demethylation-induced overexpression of stratifin is a universal abnormality during the progression of lung adenocarcinoma. 14th World Conference on Lung Cancer, 6 July 2011, Amsterdam, The Netherlands

18)Noguchi M. Molecular pathogenesis of adenocarcinoma and its precursor lesions. 14th World Conference on Lung Cancer, 4 July 2011, Amsterdam, The Netherlands

19)小林敬祐、山岡賢俊、井口けさ人、菊池慎二、倉持雅己、後藤行延、酒井光昭、鬼塚正孝、佐藤幸夫、薄井真悟、南優子、野口雅之. 左S6過分葉肺の臓側胸膜から発生した孤立性繊維性腫瘍の1例. 第161回日本肺癌学会関東支部会、2011年6月18日

20)里見介史、柴綾、村田佳彦、森下由紀雄、南優子、野口雅之. Atypical teratoid / rhabdoid tumor における上皮成長因子受容体の検討. 第100回日本病理学会総会、2011年4月30日

21)山田健二、戸嶋章太郎、坂田晃子、稲留征典、野口雅之. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2)のヒト肺腺癌間質における発現の特徴. 第100回日本病理学会総会、2011年4月28日

22)坂下信悟、南優子、村田佳彦、古屋周一郎、永田千草、森下由紀雄、鈴木恵子、野口雅之. 肺腺癌初期悪性化過程における抗アポトーシス蛋白質の発現. 第100回日本病理学会総会、2011年4月28日

23)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、石井愛美、土井幹雄、野口雅之. 乳癌HER2過剰発現判定の個人差の検討—特に病理経験年数との関係について—. 第100回日本病理学会総会、2011年4月28日

24)吉田勤、南優子、柴綾、中里宜正、野口雅之. 肺腺癌症例におけるGOLM1遺伝子発現の特徴. 第100回日本病理学会総会、2011年4月28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

腎細胞癌におけるクロマチン制御・ヒストン修飾に関連する遺伝子の変異解析に関する研究

研究分担者 小川 誠司 東京大学医学部附属病院 Cancer Board 特任准教授

研究要旨

腎細胞癌における遺伝子変異と予後との関連を明らかにするために、242例を対象としてクロマチン制御およびヒストン修飾に関連する82遺伝子の変異解析を行った。その結果、BAP1の変異は生命予後と、SETD2の変異は転移の発生と関連することが明らかとなった。今回の結果は予後の予測や転移リスクの予測に利用可能と考えられる。

A. 研究目的

腎細胞癌では、VHL遺伝子の不活化が高頻度に生じることが知られている。また、PBRM1遺伝子をはじめとしてクロマチン修飾に関する遺伝子の変異が重要であることが明らかとされてきているが、予後予測や治療方針の検討に有用な遺伝子変異は知られていない。そこで、腎細胞癌における遺伝子変異の全体像と臨床情報との関連を明らかにするために、次世代シーケンサを用いた大規模な変異解析を行った。

B. 研究方法

242例の腎細胞癌に対し、手術時に腫瘍および正常腎組織を採取し、DNAを抽出した。SureSelect (Agilent Technologies)を用いて、目的とする遺伝子領域を濃縮し、次世代シーケンサHiSeq (Illumina)にて大量並列シーケンスを行った。変異解析の対象とする遺伝子には、PBRM1, BAP1, SETD2, KDM5Cを含め、クロマチン制御ならびにヒストン修飾に関する82の遺伝子を選択した。

（倫理面への配慮）

本研究は東京大学倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

合計で281のsomatic変異を検出した。このうちPBRM1は103例(43%)、BAP1は29例(12%)、SETD2は25例(10%)、KDM5Cは14例(6%)に変異を認めた。変異の有無と予後を比較したところ、BAP1の変異がある群では、癌特異生存率が有意に不良であった。また、SETD2の変異がある群では、無病生存率が有意に不良であったが、癌特異生存率には有意差を認めなかった。一方、PBRM1の変異の有無は、予後との関連を認めなかった。

D. 考察

BAP1およびSETD2の変異は生命予後や転移と関連し、腎細胞癌の分類や予後予測、あるいは遠隔転移に対する治療方針の検討に有用であることが示唆される。

E. 結論

腎細胞癌242例に対し、次世代シーケンサを用いて、クロマチン制御ならびにヒストン修飾に関する82遺伝子の変異解析を行った。その結果、予後や転移と関連する遺伝子変異を見出した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011;478:64-69.

2. Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, Sanada M, Hiwatari M, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S. Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene* 2012.

3. Takita J, Chen Y, Okubo J, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in