

201220008A

別紙1

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横田 淳

平成25(2013)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. 肺がんのゲノム情報に基づく治療標的分子の探索
河野 隆志
3. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究
野口 雅之
4. 白血病の網羅的ゲノム解析
小川 誠司
5. 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
6. 難治がんにおける包括的ゲノム解析
柴田 龍弘
7. 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

肺小細胞がんにおいて *MYC* ファミリー遺伝子群と相互排他的に増幅している *K14A1432* 遺伝子を新規治療標的分子候補として同定した。変異については、先行論文の結果と合わせて 20 遺伝子を肺小細胞がんの高頻度変異遺伝子として同定した。全トランスクリプトーム解析により肺腺がんの 2% に存在する *RET* 融合遺伝子を新規治療標的として同定し、肺腺がん個別化治療への橋渡し研究が進行中である。ECT2 の増幅、発現亢進は初期の肺腺がんにおける予後推測のための有用なバイオマーカーであることを見出した。肺腺がんの新規融合遺伝子として同定した *EZR-ROS1* のマウスモデル作製は、肺がん発症の分子機構の解明と共に今後の創薬開発において重要な基盤となる。肺腺がん感受性遺伝子については感受性遺伝子群の同定研究が開始した段階であり、発症高危険群の捕捉のため、さらなる遺伝子の同定を行う必要がある。骨髄系腫瘍 563 例を対象として、次世代シーケンサーを用いてコヒーシ複合体遺伝子の変異解析を行い、コヒーシ変異は骨髄系腫瘍において頻発することを見出した。さらに、機能解析によりコヒーシ変異はがん抑制遺伝子として機能することを示した。また、白血病幹細胞の維持に細胞接着並びに G タンパク質情報伝達系異常が重要であることを見出した。本邦において重要な難治がんである低分化胃がんや成人 T 細胞性リンパ腫についてもゲノム解析から新たな治療標的を同定した。統合的ゲノム・エピゲノム解析と高スループット miRNA 機能アッセイにより、種々の新規がん抑制マイクロ RNA 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。

研究分担者

- | | | |
|----------|------------|-------|
| 1. 横田 淳 | 国立がん研究センター | 分野長 |
| 2. 河野 隆志 | 国立がん研究センター | 分野長 |
| 3. 野口 雅之 | 筑波大学大学院 | 教授 |
| 4. 小川 誠司 | 東京大学医学部 | 特任准教授 |
| 5. 森下 和広 | 宮崎大学医学部 | 教授 |
| 6. 柴田 龍弘 | 国立がん研究センター | 分野長 |
| 7. 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様々なゲノム網羅的解析法を用いて明らかにし、更にその分子基盤を解明して、個々のがんにも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画により、がんの臨床病理学的な所見との関連性についても解析を進め、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、様々なゲノム解析で独自の研究歴を持つ構成研究者が相補的な共同研究を積極的に進めることによって飛躍的な研究の発展を目指すものである。

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に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、白血病、低分化胃がん、口腔がん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を進める。第二に、高頻度にゲノム異常を起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。また、生物学的機能解析を進めることによってその発がんにおける意義を明らかにする。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

SNP-Chips for human 250K SNP arrays (Affymetrix) を用いてゲノム網羅的なコピー数解析を行なった。データは Copy Number Analyzer of Affymetrix GeneChip Human Mapping Array (CNAG) ソフトウェアを用いて解析した。

全トランスクリプトームシーケンシングは mRNA-Seq Sample Prep Kit (Illumina) を用いて cDNA ライブラリーを調整し、GAIIx (Illumina) でペアエンドリードシーケンスを行った。融合遺伝子の検出はリードが異なる RNA にマッピングされたものを抽出し、MapSplice (version 1.14.1) を用いて融合遺伝子の切断点を含むジャンクションリード配列を取得し、候補融合遺伝子を抽出した。

全エクソームシーケンシングは TruSeq DNA Sample Prep Kit v2 (Illumina) を用いてライブラリーを調整し、GAIIx (Illumina) でペアエンドリードシーケンスを行った。変異遺伝子の検出は、読まれた配列をヒトゲノム (hg19) 上にマッピングし、塩基置換、挿入・欠失、スプライスサイト変異を含む情報を得た。更に全トランスクリプトームシーケンシングで得られた変異データと比較した。

2. 肺がんのゲノム情報に基づく治療標的分子の探索

肺腺がんを対象として、全トランスクリプトーム解読により融合遺伝子を、また、全エクソーム解析により変異遺伝子を、ゲノム網羅的に同定した。有望な治療標的分子に対しては、個別化治療のための分子病理学的診断法を確立した。また、全ゲノム 100 万多型の関連解析 (GWAS) を行うことにより、肺腺がん感受性遺伝子座を同定した。

3. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

肺上皮内腺がんと初期浸潤がんを Array-CGH 解析を行い、qPCR と免疫染色の結果が最も相関する ECT2 を同定した。そこで、ECT2 および Ki-67 の免疫染色結果と病理学的因子 (術前転移巣、TNM 因子、病理病期、静脈浸潤、リンパ管浸襲、胸膜浸潤、組織亜型、mitotic index) や予後との関連を解析した。得られた結果の再現性を確認する

ために、国立がん研究センターの早期肺腺がんを用いて SNP アレイ解析、遺伝子増幅と RNA 発現の関連解析、発現と予後の関連解析を行った。

4. 骨髄系腫瘍の網羅的ゲノム解析

563 例の骨髄系腫瘍検体を対象として、コヒーシオン関連遺伝子 9 個に関して、次世代シーケンサー HiSeq (Illumina) を用いた大量並列シーケンスを行った。また、SNP アレイ (Affymetrix) を用いたコピー数解析、および Human Methylation450 BeadChip (Illumina) を用いた網羅的なメチル化解析を行った。骨髄系腫瘍の発症におけるコヒーシオン変異の果たす機能的側面を調べるために、複数の白血病細胞株におけるコヒーシオン発現およびクロマチン分画でのコヒーシオン量をウェスタンブロット法により解析し、変異の有無により比較した。さらに、コヒーシオンの構成要素の一つである RAD21 の変異を有する細胞株に正常 RAD21 を発現させ、細胞増殖の評価と発現アレイ (GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array) を用いた発現解析を行った。

5. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

3q26 並びに 7 番染色体に異常を有する AML 患者検体 24 例、AML 細胞株 18 株を用いて SNP アレイ解析、網羅的遺伝子発現解析を行い、EVI1 高発現白血病細胞の細胞特性の同定と、その原因遺伝子群の単離を行なった。さらに AML に伴う Monosomy7 番染色体を中心としたゲノム解析、並びに遺伝子発現解析を行った。その結果、がん抑制遺伝子候補として Mono7 遺伝子を単離したので、その機能解析を行った。これまでの情報伝達解析から 7 回膜貫通 G タンパク質結合レセプター-CRLR 及び GPR56 が Mono7 遺伝子機能に関わっていることが示唆されるため、遺伝子発現解析、ならびに情報伝達系を中心とした機能解析を行った。比較として口腔がんの統合的ゲノム解析と原因遺伝子単離並びに機能解析を行った。

6. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

がん臨床検体から RNA を抽出し、高速シーケンサーを用いた全トランスクリプトーム解析を行ない、融合遺伝子等のがん遺伝子候補を探索した。解析に使用する新型シーケンサーについては、国立がん研究センター研究所に設置された HiSeq2000 を使用した。シーケンスデータ解析に関しては、専門の生物統計家を 5 名確保して進めた。

7. 諸臓器がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析

高精度ゲノム一次構造解析、エピゲノム解析、網羅的発現解析とそれらの応用技術を用いて、増殖、浸潤、転移、がん幹細胞性、さらに、上皮間葉転換 (EMT) などの悪性度と密接に関わるがん特異的オミックス異常を明らかにした。特に悪性度の高い小児神経芽腫、甲状腺未分化がん、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、さらにはがん特異的 DNA メチル化などをランダムに、がん抑制性マイクロ RNA を含む新規がん関連遺伝子を同定し、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

1) ゲノム網羅的コピー数解析

58 例の肺小細胞がんを対象に、ゲノム網羅的コピー数解析を行い、5 SNPs 以上の範囲で6 コピー以上に増幅している領域を探索した。0.03–0.77 Mb の共通増幅領域が染色体 1p, 2p, 8q, 9p に計8 領域同定され、34 種類の遺伝子が位置していた。8 領域中3 領域は、肺小細胞がんが増幅に伴い高発現していることが報告されている、*MYCL1*, *MYCN*, *MYC* が位置する領域であった。1p34.3 と 8q12.2 の共通増幅領域は、それぞれ *MYCL1*, *MYC* と共に増幅していたため、*MYCL1*, *MYC* の増幅の過程で生じた変化であることが示唆された。

一方、9 番染色体では、9p23, 9p24.1 に新たな共通増幅領域が同定された。これら2 領域は *MYC* ファミリー遺伝子と相互排他的に増幅している傾向が認められたため、*MYC* ファミリー遺伝子の増幅とは異なる独立したゲノム異常であることが示唆された。さらに、染色体9p で増幅により高発現している遺伝子を同定するため、Real-time genomic-RT-PCR 法を行なった結果、9p23 では *NF1B*, 9p24.1 では *KIAA1432* が最も強く相関し、これらの遺伝子は肺小細胞がんにおいて、増幅によって高発現している遺伝子であると考えられた。

2) 全トランスクリプトームシーケンシング

42 例の肺小細胞がんを対象とした全トランスクリプトームシーケンシング解析を行い、95 の遺伝子から成る60 の融合遺伝子を検出した。複数の症例で発現する融合遺伝子はなかったが、*PVT1* と *RLF* が5' 側のパートナー遺伝子として2 例以上の症例で融合遺伝子を形成していた。

3) 全エクソームシーケンシング

18 例の肺小細胞がんを対象とした全エクソームシーケンシング解析の結果、体細胞変異は2,982 遺伝子上に総計4,183 個検出された(平均232 個/症例、平均3.7 個/Mb)。最も高頻度に変異が検出されたのは従来の報告通り *TP53*, *RBI* 遺伝子であり、コピー数解析の結果を合わせると、*TP53*, *RBI* 遺伝子の変異あるいは LOH はそれぞれ94%, 100%で検出された。さらに全トランスクリプトームシーケンシング解析の結果、2 リード以上で変異が確認されたのはこのうち539 遺伝子上の580 個で、このうち2 例以上の症例で変異が検出された遺伝子は22 個であった。そこで、本研究で同定した発現している高頻度変異遺伝子22 個と先行論文で同定された遺伝子合計66 遺伝子について、69 例の臨床検体(先行論文1:27 例、先行論文1:30 例、本研究:12 例)で変異の頻度を検討した。その結果、*TP53*, *RBI* 遺伝子を

含む20 遺伝子が肺小細胞がんを高頻度(≥10%)に変異している遺伝子であることが分かった。

2. 肺がんのゲノム情報に基づく治療標的分子の探索

全トランスクリプトーム解析により、肺腺がんの2%に存在する RET 融合遺伝子を新規治療標的として同定した。RET 融合陽性肺がんに対する RET キナーゼ阻害剤バンデタニブを用いた医師主導治験を行うため、Break-apart/Fusion FISH および multiplex RT-PCR による RET 融合肺がんの診断法を開発した。これまでに同定された RET 融合陽性例10 例の臨床背景因子では、性差はなく(男女比=1:1)で、非喫煙者が多い(8/10: 80%)傾向が見られた。また、別の肺がん治療標的である ROS1 融合遺伝子についても Break-apart/Fusion FISH および multiplex RT-PCR による RET 融合肺がんの診断法の開発に着手した。

日本人肺腺がん6,000 例、非がん対照13,000 例を対象とした全ゲノム100 万多型の関連解析(GWAS)を行った。その結果、日本人の肺腺がんリスクを規定する新規遺伝子座として、既知座 TERT 及び TP63 を確認するとともに、新規座として BPTF 及び BTNL2 座を同定した。新規座に関しては、一つの危険アレルを持つことによるオッズ比は1.20 (rs7216064, $P=7.4 \times 10^{-11}$)、1.18(rs3817963, $P=2.7 \times 10^{-10}$)であった。

3. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

Array-CGH 解析で肺上皮内腺がんと初期浸潤がんの間で、有意に増幅を認める領域として3q26 を同定した。この領域にコードされる27 遺伝子中、qPCR でその増幅が確認された ECT2 に着目した。ECT2 は qPCR の結果と免疫染色による発現解析の結果が弱いながら相関関係が見られた(相関係数0.40)。また Ki-67 標識率及び mitotic index とは0.76, 0.87 と高い相関を認めた。免疫染色結果と予後、N 因子、静脈浸襲、病理病期、組織亜型で有意差を認めた。国立がん研究センター中央病院症例を用いた検証解析では、SNP アレイ解析において初期浸潤がんのみに増幅(CN>3)を認め、cDNA microarray でも初期浸潤がんが発現亢進が確認されるとともに、ECT2 の高発現群は有意に予後不良であった。

4. 骨髄系腫瘍の網羅的ゲノム解析

コヒーシン複合体の構成要素である STAG2, RAD21, SMC1A および SMC3 の変異および欠失は、AML 9.9% (13/131), MDS 7.8% (16/205), CMML 10.5% (9/86), CML 6.2% (4/65) に互いに排他的に生じていた。コヒーシン変異を有する症例の半数は正常核型であり、コヒーシン変異の有無により核型の差は見られなかった。コヒーシン変異を有する白血病細胞株では、クロマチンに結合しているコヒーシン量の有意な低下を認めた。また、RAD21 の変異を有する細胞株 (Kasumi-1) に正常 RAD21 を発現させることにより、細胞増殖の抑制が認められ、また63 個の遺伝子は有意に発現の変化を伴っていた。

5. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

EVI1 高発現白血球細胞の難治性に関わる遺伝子群を単離し、Integrin $\alpha 6$ (ITGA6)、及び GPR56 を骨髄ニッチ細胞接着因子として、Quiescence 関連として ANG1 を同定した。また、Monosomy 7 ゲノム解析より責任遺伝子候補 Mono7 遺伝子を同定し、その情報伝達系として CGRP (caltitonin gene-related peptide)・CRLR (caltitonin receptor like receptor) の関与を見出した。さらに Mono7 遺伝子はこの CRLR からの情報伝達を細胞内において負に制御しており、情報伝達系異常として過剰な細胞増殖やアポトーシス抑制が起こると推定された。

6. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

肺がんにおける全トランスクリプトーム解析から EZR-Ros1 並びに新規キナーゼ融合遺伝子を同定した。EZR-Ros1 融合遺伝子トランスジェニックマウスの作製によって、この融合遺伝子が肺がんの発症の原因となるドライバー変異であることが検証できたと同時に、治療薬開発に向けた貴重なモデル動物が樹立できた。低分化胃がんでは高分化胃がんに比べ融合遺伝子の数が多く、その中には治療標的としての可能性があるキナーゼやそのリガンド遺伝子が含まれていることを見出した。

7. 諸臓器がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析

高精度ゲノム一次構造解析、エピゲノム解析、網羅的発現解析とそれらの応用技術に加えて、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、がん抑制性マイクロ RNA (TS-miRNA) を複数同定した。具体的には、新規 TS-miRNA として、肝がんの miR-124, miR-203, miR-497, miR-195、子宮体がんの miR-152、口腔癌の miR-218 など同定した。また、400 種類の miRNA ライブラリーを用いた機能アッセイより、EMT 抑制性 miRNA として miR-655 を同定した。また、がん抑制遺伝子候補としてオートファジー関連分子 LC3A1 を明らかにした。

D. 考察

1. 肺がんの診断と治療の標的分子の同定

ゲノム網羅的コピー数解析では、過去の報告と同様に、本研究においても、MYC ファミリー遺伝子群は肺小細胞がんにおいて高頻度に増幅していることが示された。特に近年、MYC の阻害薬に関する報告が散見され、今後、肺小細胞がんの治療標的としての検討が必要である。また、KIAA1432 遺伝子が肺小細胞がんにおいて増幅により高発現していることを新たに見出し、さらに KIAA1432 の増幅は MYC ファミリー遺伝子増幅と相互排他的に生じていることを明らかにした。したがって、KIAA1432 は MYC ファミリー遺伝子非増幅肺小細胞がんの治療標的となり得ることが示唆された。KIAA1432 を含むゲノム領域の増幅は悪性リンパ腫や乳がんにおいても報告されているが、増幅がん細胞における機能については不明である。したがって、がん細胞における KIAA1432 遺伝子増幅の意義を明らかにするために、更なる機能解析が必要である。

全トランスクリプトームシーケンシングの結果、肺小細胞がんにおける遺伝子融合の多くは、MYC 遺伝子や MYCL1 遺伝子の増幅過程で形成され、遺伝子融合よりも増

幅のほうが肺小細胞がんの発生・進展には重要であると考えられた。

全エクソームシーケンシングで検出された変異については、先行論文の結果と合わせて 20 遺伝子が肺小細胞がんの高頻度変異遺伝子として同定された。現在、これらの遺伝子変異についての更に詳細な検討と原発巣・転移巣症例や術前無治療症例など、更に症例を追加して全エクソームシーケンシングも進めている。来年度中には、これらの結果を統合して新規高頻度変異遺伝子や転移・薬剤感受性に重要な遺伝子変異をゲノム網羅的に同定し、肺小細胞がんの新規標的治療法の開発に有用な遺伝子群のリストとして提示したい。

2. 肺がんのゲノム情報に基づく治療標的分子の探索

RET がん遺伝子、ROS1 がん遺伝子ともに、遺伝子産物のチロシンキナーゼに対する阻害薬が存在することから、これらの融合遺伝子は有用な治療標的分子となると期待できる。実際、RET 遺伝子融合陽性肺腺がんに関しては、Vandetanib を用いた医師主導第二相試験が 2013 年 2 月より開始された。今後、遺伝子融合の診断のルーティーン化が個別化医療の実現に重要である。また、ROS1 遺伝子融合陽性肺腺がんについても阻害剤を用いた臨床試験の施行を試みたい。

肺腺がんの易罹患性に関わる遺伝子座の同定は、肺腺がん高危険度群の抽出や個別化予防のための重要な基盤情報となる。例えば、今回同定した 4 つの肺腺がん感受性遺伝子座に関しすべての危険アレルを持つ人は全体の 1% であるが、一つも持たない人と比べて約 6 倍肺腺がん発症のリスクが高いことが推察される。今後、肺腺がんの発がん経路別の解析や、他施設症例を含めた国内・国際 GWAS に参画することで、肺腺がんの遺伝的要因の解明を目指すとともに、個別化予防の実現へ向け、研究を進ませたい。

3. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

ECT2 遺伝子の発現亢進は遺伝子の増幅と相関し、種々の予後不良因子とも相関していたので初期浸潤肺腺がんの診断バイオマーカーとして有望である。また、ECT2 遺伝子が核分裂時に核膜の折れ込みに関係することから、分子標的治療においても有望な標的遺伝子である可能性がある。

4. 骨髄系腫瘍の網羅的ゲノム解析

コヒーシ構成要素の変異は骨髄系腫瘍において広く頻発する遺伝子変異であり、排他的に生じていることから、これらの変異はコヒーシンの機能を共通の標的として生じていることが示唆された。コヒーシン変異の有無により核型の差は見られず、異数性以外の機序を通じて白血球発症を招くと考えられた。

5. 難治性白血球の多段階発がん機構の解明

難治性白血球の白血球幹細胞が骨髄ニッチにおいて細胞維持に関わる因子群を複数個単離し、Monosomy 7 の候補遺伝子を同定した。また、口腔がんからは IFN 誘導遺伝子群を単離し、それぞれ多段階発がんの分子機構を検討中である。

6. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

我々が樹立したモデルマウスは ROS1 融合遺伝子に対する分子標的薬の治療効果検証に活用できる。胃がんで同定された新規融合遺伝子にはキナーゼあるいはそのリガンドが含まれており、低分化胃がんにおける新たな分子標的治療開発に結びつくことが期待される。

7. 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

肺小細胞がんにおいて MYC ファミリー遺伝子群と相互排他的に増幅している KIAA1432 遺伝子を新規治療標的分子候補として同定した。変異については、先行論文の結果と合わせて 20 遺伝子を肺小細胞がんの高頻度変異遺伝子として同定した。

2. 肺がんのゲノム情報に基づく治療標的分子の探索

本研究によって同定された新規治療標的 RET 融合遺伝子に関して肺腺がん個別化治療への橋渡しが進行中である。肺腺がん感受性遺伝子については感受性遺伝子群の同定が開始した段階であり、発症高危険群の捕捉のため、さらなる遺伝子の同定を行う必要がある。

3. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

ECT2 の増幅、発現亢進は初期の肺腺がんにおける予後推測のための有用なバイオマーカーであることがわかった。今後、ECT2 あるいは関連遺伝子の機能解析が詳細に行われればこれら遺伝子を標的とした初期肺腺がんに対する分子標的治療の可能性が期待される。

4. 骨髄系腫瘍の網羅的ゲノム解析

コヒーシオン変異は骨髄系腫瘍で頻発していることを見出した。また、機能解析の結果、コヒーシオン変異はがん抑制遺伝子として機能することを示した。

5. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

難治性白血病の多段階発がんは白血病幹細胞の維持機構に細胞接着並びに G タンパク質情報伝達系異常が重要であり、口腔がんは感染症による刺激ががん発症に重要であることを示唆する結果が得られた。

6. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

同定した新規融合遺伝子のマウスモデル作製は、肺がん発症の分子機構の解明と共に今後の創薬開発において重要な基盤となる。本邦において重要な難治がんである低分化胃がんや成人 T 細胞性リンパ腫についてもゲノム解析から新たな治療標的が同定されることが期待される。

7. 諸臓器がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析

統合的ゲノム・エピゲノム解析と高スループット miRNA 機能アッセイにより、種々の新規がん抑制マイクロ RNA 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, Takenaka M, Kohno T, Shimada Y, Totoki Y, Shibata T, Tsuta K, Nishikawa R, Noguchi M, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Yokota J. Genome-wide identification of genes with amplification and/or fusion in small cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, in press.
- 2) Ohata H, Miyazaki M, Otomo R, Matsushima-Hibiya Y, Otsubo C, Nagase T, Arakawa H, Yokota J, Nakagama H, Taya Y, and Enari M. NuMA Is Required for the Selective Induction of p53-Target Genes. *Mol Cell Biol*, in press.
- 3) Ui A, Ogiwara H, Nakajima S, Kanno S, Watanabe R, Harata M, Okayama H, Harris CC, Yokota J, Yasui A, Kohno T. Possible involvement of LKB1-AMPK signaling in non-homologous end joining. *Oncogene*, in press.
- 4) Akca H, Demiray A, Yaren A, Bir F, Koseler A, Iwakawa R, Bagci G, Yokota J. Utility of serum DNA and pyrosequencing for the detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet* 2013;206:73-80.
- 5) 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* 2012;18:375-377.
- 6) 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, Kardia 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 populations of European, Asian, and African American ancestry—a meta-analysis of

- chromosome 15q25. *Genet Epidemiol* 2012;36:340-351.
- 7) Shiraishi K, Kunitoh H, Daigo Y, Takahashi A, Goto K, Sakamoto H, Ohnami S, Shimada Y, Ashikawa K, Saito A, Watanabe S, Tsuta K, Kamatani N, Yoshida T, Nakamura Y, Yokota J, Kubo M, Kohno T. A genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for lung adenocarcinoma in the Japanese population. *Nat Genet* 2012;44:900-903.
 - 8) Oike T, Ogiwara H, Torikai K, Nakano T, Yokota J, Kohno T. Garcinol, a histone acetyltransferase inhibitor, radiosensitizes cancer cells by inhibiting non-homologous end joining. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;84:815-821.
 - 9) 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, Yokota J. Identification of genes up-regulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 2012;72:100-111.
 - 10) 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* 2012;51:462-472.
 - 11) Yamauchi M, Yamaguchi R, Nakata A, Kohno T, Nagasaki M, Shimamura T, Imoto S, Saito A, Ueno K, Hatanaka Y, Yoshida R, Higuchi T, Nomura M, Beer DG, Yokota J, Miyano S, Gotoh N. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase defines critical prognostic genes of stage I lung adenocarcinoma. *PLoS One* 2012;7:e43923.
 - 12) Lan Q, Hsiung CA, Matsuo K, Hong YC, Seow A, Wang Z, Hosgood HD 3rd, Chen K, Wang JC, Chatterjee N, Hu W, Wong MP, Zheng W, Caporaso N, Park JY, Chen CJ, Kim YH, Kim YT, Landi MT, Shen H, Lawrence C, Burdett L, Yeager M, Yuenger J, Jacobs KB, Chang IS, Mitsudomi T, Kim HN, Chang GC, Bassig BA, Tucker M, Wei F, Yin Z, Wu C, An SJ, Qian B, Lee VH, Lu D, Liu J, Jeon HS, Hsiao CF, Sung JS, Kim JH, Gao YT, Tsai YH, Jung YJ, Guo H, Hu Z, Hutchinson A, Wang WC, Klein R, Chung CC, Oh IJ, Chen KY, Berndt SI, He X, Wu W, Chang J, Zhang XC, Huang MS, Zheng H, Wang J, Zhao X, Li Y, Choi JE, Su WC, Park KH, Sung SW, Shu XO, Chen YM, Liu L, Kang CH, Hu L, Chen CH, Pao W, Kim YC, Yang TY, Xu J, Guan P, Tan W, Su J, Wang CL, Li H, Sihoe AD, Zhao Z, Chen Y, Choi YY, Hung JY, Kim JS, Yoon HI, Cai Q, Lin CC, Park IK, Xu P, Dong J, Kim C, He Q, Perng RP, Kohno T, Kweon SS, Chen CY, Vermeulen R, Wu J, Lim WY, Chen KC, Chow WH, Ji BT, Chan JK, Chu M, Li YJ, Yokota J, Li J, Chen H, Xiang YB, Yu CJ, Kunitoh H, Wu G, Jin L, Lo YL, Shiraishi K, Chen YH, Lin HC, Wu T, Wu YL, Yang PC, Zhou B, Shin MH, Fraumeni JF. Jr, Lin D, Chanock SJ, Rothman N. Genome-wide association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci in never-smoking women in Asia. *Nat Genet* 2012;44:1330-1335.
 - 13) Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, Wakai S, Shimada Y, Arai Y, Asamura H, Furuta K, Shibata T, Tsuda H. ROS1-Rearranged Lung Cancer: Clinicopathologic and Molecular Study of 15 Surgical Cases. *Am J Surg Pathol* 2013;37:554-562.
 - 14) Kohno T, Shiraishi K. Genetic polymorphisms underlying lung cancer susceptibility and therapeutic Response. *Genes and Environment* 2012;34:94-100.
 - 15) Shiba-Ishii A, Noguchi M. Aberrant stratifin overexpression is regulated by tumor-associated CpG demethylation in lung adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2012;180:1653-1662.
 - 16) 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* 2012;75:181-188.
 - 17) Nakazato Y, Maeshima MA, Ishikawa Y, Yatabe Y, Fukuoka J, Yokose T, Tomita Y, Minami Y, Asamura Y, Tachibana K, Goya T, Noguchi M. Inter observer agreement in the nuclear grading of primary pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, in press.
 - 18) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell* 2012;21:121-135.
 - 19) Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuser JE, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito MK. Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood* 2012;120:1299-1308.
 - 20) Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Novel splicing-factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2012;26:1879-1881.
 - 21) 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* 2012;103:782-790.
- 22) Yamakawa N, Kaneda K, Saito Y, Ichihara E, Morishita K. The Increased Expression of Integrin $\alpha 6$ (ITGA6) Enhances Drug Resistance in EVI1 Leukemia. *PLoS One* 2012;7:e30706.
 - 23) Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, Hidaka T, Maeda K, Hatakeyama K, Shiraga T, Goto A, Takamatsu N, Asada Y, Utsunomiya A, Okayama A, Kubuki Y, Shimoda K, Ukai Y, Kurosawa G, Morishita K. Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia* 2012;26:1238-1246.
 - 24) Nakahata S, Morishita K. CADM1/TSLC1 is a novel cell surface marker for adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 2012;52:17-22.
 - 25) Saito Y, Kaneda K, Suekane A, Ichihara E, Nakahata S, Yamakawa N, Nagai K, Mizuno N, Kogawa K, Miura I, Itoh H, Morishita K. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1- regulated GPR56, *Leukemia*, in press.
 - 26) Arai Y, Totoki Y, Takahashi H, Nakamura H, Hama N, Kohno T, Tsuta K, Yoshida A, Asamura H, Mutoh M, Hosoda F, Tsuda H, Shibata T. Mouse model for ROS1-rearranged lung cancer. *PLoS One*, in press.
 - 27) Kitagawa N, Ojima H, Shirakihara T, Shimizu H, Kokubu A, Urushidate T, Totoki Y, Kosuge T, Miyagawa S, Shibata T. Downregulation of the microRNA biogenesis components and its association with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, in press.
 - 28) Yoshida A, Shibata T, Wakai S, Ushiku T, Tsuta K, Fukayama M, Makimoto A, Furuta K, Tsuda H. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) status in rhabdomyosarcoma. *Modern Pathology*, in press.
 - 29) Nakagawa H, Shibata T. Comprehensive genome sequencing of liver cancer (Review). *Cancer Letters*, in press.
 - 30) Shibata T. Cancer genomics and pathology: All Together Now (Review). *Patho Int* 2012;62:647-659.
 - 31) Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M, Motohashi H. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 2012;22:66-79.
 - 32) Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, Aoki M, Hoshono N, Kubo M, Miya F, Arai Y, Takahashi H, Shirakihara T, Nagasaki M, Shibuya T, Nakao K, Watanabe-Makino K, Tanaka H, Nakamura H, Kusuda J, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Ueno M, Shigekawa Y, Kawakami Y, Arihiro K, Ohdan H, Gotoh K, Ishikawa O, Ariizumi S, Yamamoto M, Yamada T, Chayama K, Kosuge T, Yamae H, Kamatani N, Miyano S, Nakagama H, Nakamura Y, Tsunoda T, Shibata T, Nakagawa H. Whole Genome Sequencing of Liver Cancers Identifies Etiological Influences on Mutation Patterns and Recurrent Mutations in Chromatin Regulators. *Nature Genet* 2012;44:760-764.
 - 33) 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;287:7896-7906.
 - 34) Yoshida A, Ushiku T, Motoi T, Beppu Y, Fukayama M, Tsuda H, Shibata T. MDM2 and CDK4 Immunohistochemical Coexpression in High-Grade Osteosarcoma: Correlation with a Dedifferentiated Subtype. *Am J Surg Pathol* 2012;36:423-431.
 - 35) Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Hirono S, Yamae 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* 2012;22:208-219.
 - 36) Harazono Y, Kozaki K, Muramatsu T, Endo H, Uzawa N, Kawano T, Harada K, Inazawa J. miR-655 is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFBR2. *PLOS ONE*, in press.
 - 37) Furuta M, Kozaki K, Tanimoto K, Tanaka S, Arii S, Shimamura T, Niida A, Miyano S, Inazawa J. The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma. *PLOS ONE*, in press.
 - 38) Endo H, Muramatsu T, Furuta M, Uzawa N, Pimkhaokham A, Amagasa T, Inazawa J, Kozaki K. Potential of tumor-suppressive miR-596 targeting LGALS3BP as a therapeutic agent in oral cancer. *Carcinogenesis* 2013;34:560-569.
 - 39) Miyawaki Y, Imoto I, Tokairin Y, Kawada K, Nakajima Y, Nishikage T, Nagai K, Kajiwara M, Inazawa J, Kawano T. Esophageal Squamous Cell Carcinoma Developed 11 Years After Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Acute Lymphatic Leukemia. *Jpn J Clin Oncol* 2013;43:69-73.
 - 40) Gaffney CJ, Oka T, Mazack V, Hilman D, Gat U, Muramatsu T, Inazawa J, Golden A, Carey DJ, Farooq A, Tromp G, Sudol M. Identification, basic characterization and evolutionary analysis of differentially spliced mRNA isoforms of human YAP1 gene. *Gene* 2012;509:215-222.
 - 41) Dobashi Y, Kimura M, Matsubara H, Endo S, Inazawa J, Ooi A. Molecular alterations in AKT and its protein activation in human lung carcinomas. *Hum*

- Pathol 2012;43:2229-2240.
- 42) Miyawaki Y, Kawachi H, Ooi A, Eishi Y, Kawano T, Inazawa J, Imoto I. Genomic copy-number alterations of MYC and FHIT genes are associated with survival in esophageal squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci* 2012;103:1558-1566.
- 43) Matsumura S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Muramatsu T, Furuta M, Tanaka S, Sakamoto M, Arie S, Inazawa J. Integrative array-based approach identifies MZB1 as a frequently methylated putative tumor-suppressor in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012;18:3541-3551.
- 44) 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;44:426-429.
- 45) 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;60:1073-1083.
- 46) 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;31:4923-4934.
- 47) 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;31:4397-4408.
- 48) Ooi A, Inokuchi M, Harada S, Inazawa J, Tajiri R, Sawada-Kitamura S, Ikeda H, Kawashima H, Dobashi Y. Gene amplification of ESRI in breast cancers - Fact or fiction? A fluorescence in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification study. *J Pathol* 2012;227:8-16.
- 49) 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* 2012;31:1963-1974.

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得

- 1) 「K I F 5 B 遺伝子と R E T 遺伝子との融合遺伝子、並びに該融合遺伝子を標的としたがん治療の有効性を判定する方法」出願番号：特願 2011-171256
- 2) 「胃がんにおける新規融合遺伝子」（申請中）
- 3) 「癌の検出方法および癌抑制剤」、稲澤譲治・小崎健一・井本逸勢、東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特願 2008-012256
- 4) 「食道癌の検出方法」、稲澤譲治、井本逸勢、田中浩司、津田 均、東京医科歯科大学・株式会社ビー・エム・エル、特願 2006-303331
- 5) 「癌抑制剤」、稲澤譲治・井本逸勢・和泉宏幸・横井左奈、東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特願 2006-078786
- 6) 「卵巣癌の検出方法、及び抑制方法」、稲澤譲治・井本逸勢・菊池良子、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、特願 2007-143111

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

肺小細胞がんのゲノム網羅的コピー数解析により、*MYC* ファミリー遺伝子群と相互排他的に増幅している *KIAA1432* 遺伝子を治療の標的分子として同定した。全トランスクリプトームシーケンシングの結果とゲノム網羅的コピー数解析の結果を統合し、肺小細胞がんにおける遺伝子融合の多くは、*MYC* 遺伝子や *MYCL1* 遺伝子の増幅過程で形成され、遺伝子融合よりも増幅のほうが重要であることを明らかにした。全エクソームシーケンシングでは、先行論文の結果と統合して肺小細胞がんでは高頻度に変異している 20 遺伝子を診断・治療の標的分子候補として同定した。

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。今年度は肺小細胞がんを対象として、1)ゲノム網羅的コピー数解析、2) 全トランスクリプトームシーケンシング、3)全エクソームシーケンシングを行い、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) ゲノム網羅的コピー数解析

SNP-Chips for human 250K SNP arrays (Affymetrix) を用いてゲノム網羅的なコピー数解析を行なった。得られたデータは Copy Number Analyzer of Affymetrix GeneChip Human Mapping Array (CNAG) ソフトウェアを用いて解析した。mRNA 発現量とコピー数の確認は、TaqMan Gene Expression Assay および TaqMan Copy Number Assay (Applied Biosystems) を行ない、ABI 7900HT real-time PCR system (Applied Biosystems)を用いてリアルタイムPCRを施行した。mRNA 発現量とコピー数のデータ解析は、ABI RQ Manager v1.2 及び ABI Prism 7900HT Sequence Detection Software v2.3 を用いて行なった。

2) 全トランスクリプトームシーケンシング

臨床検体の total RNA あるいは細胞株の mRNA を鋳型に mRNA-Seq Sample Prep Kit (Illumina)を用いて cDNA ライブラリーの調整を行った。キット付属の fragmentation buffer を用いて RNA を切断し、逆転写反応で cDNA を合成した後、ペアエンドアダプター

を付加し、アガロースゲル電気泳動で 350 bp の生成物を回収し、PCR を 15 サイクル行った。cBot Cluster Generation Kit (Illumina)を用いてクラスター形成を行い、GAIIx (Illumina)で 50 bp のペアエンドリードシーケンスを行った。

融合遺伝子の検出はペアエンドリードを BOWTIE program (version 0.12.5)を用いて RefSeq データベースにマッピングし、リードが異なる RNA にマッピングされたものについて解析を行った。ペアエンドリード 10 以上で検出され、3 つの正常肺組織で検出されなかった候補融合遺伝子を抽出した。次に融合遺伝子のそれぞれのストランドが同一方向で、かつ遺伝子間距離が 100 kb 以下のものについては、スプライス異常やリードスルーの可能性があるため除外した。次に MapSplice (version 1.14.1)を用いて融合遺伝子の切断点を含むジャンクションリード配列を取得し、ジャンクションリード 10 以上で検出された候補融合遺伝子を抽出した。

3) 全エクソームシーケンシング

1 ug の DNA をもとに TruSeq DNA Sample Prep Kit v2 (Illumina)を用いてライブラリーを調整した。Covaris (Covaris, Woburn, MA, USA)を用いて 200-300 bp がピークとなるよう断片化を行い、インデックス付きのアダプターを付加後、アガロースゲル電気泳動で 350bp のプロダクトを回収し、PCR を 10 サイクル行った。6 種の異なるインデックスを付加した 6 サンプル溶液を各 0.5 ug 分混合し、TruSeq Exome Enrichment Kit (Illumina)を用いてエクソンを濃縮した。cBot Cluster Generation Kit (Illumina)を用いてクラスター形成を行い、GAIIx (Illumina)で 101 bp のペアエンドリードシーケンスを行った。

変異遺伝子の検出は、Raw data を Genomon パイプラインを用いてヒトゲノム (hg19) 上にマッピングし、それぞれの対応する正常組織サンプルから検出されたコールを除去し、塩基置換、挿入・欠失、スプラ

イスサイト変異を含む Mutation call list を得た。さらに、サイレント変異であるもの、1000 Genomes, dbSNP131 に登録されているもの、正常サンプルでの mismatch rate が 0.2 を超えるもの、正常サンプルと比較した際の塩基割合のフィッシャー検定で $P > 0.01$ であるものを除外した。全トランスクリプトームシーケンス解析の Row data についても、ヒトゲノム (hg19) 上にマッピングし、samtools mpileup ソフトウェアを用いて変異コールを取得後、エクソームシーケンス解析で検出された変異とのマッチングを行った。

(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) ゲノム網羅的コピー数解析

58 例の肺小細胞がん (臨床検体 33 例、細胞株 25 例) を対象に、ゲノム網羅的コピー数解析を行い、5 SNPs 以上の範囲で 6 コピー以上に増幅している領域を探索した。0.03-0.77 Mb (mean \pm SD = 0.25 \pm 0.23 Mb) の共通増幅領域 (2 例以上のサンプルで共通に増幅している領域) が染色体 1p, 2p, 8q, 9p に計 8 領域同定され、34 種類の遺伝子が位置していた。8 領域中 3 領域は、肺小細胞がんが増幅に伴い高発現していることが報告されている、*MYCL1*, *MYCN*, *MYC* が位置する領域であった。次に各共通増幅領域と増幅サンプルとの関係に注目した。1p34.3 と 8q12.2 の共通増幅領域は、それぞれ *MYCL1*, *MYC* と共に増幅していたため、*MYCL1*, *MYC* の増幅の過程で生じた変化である可能性が示唆された。一方、9 番染色体では、9p23, 9p24.1 に新たな共通増幅領域が同定された。これら 2 領域は *MYC* ファミリー遺伝子と相互排他的に増幅している傾向が認められたため、*MYC* ファミリー遺伝子の増幅とは異なる独立したゲノム異常であることが示唆された。9p23 と 9p24.1 ではそれぞれ *NF1B* と *JAK2* が増幅に伴って高発現していることが報告されている。しかし、本研究では、これらの遺伝子の増幅が認められた症例はそれぞれ 1 例のみであったため、我々が同定した共通増幅領域には含まれなかった。

次に肺小細胞がんにおける遺伝子増幅の頻度と特異性を明らかにするため、62 例の臨床検体と 25 例の細胞株に対して、*MYC* ファミリー遺伝子と染色体 9p に位置する 6 つの候補遺伝子の Real-time genomic PCR を施行した。250K SNP array の結果と同様に、*MYC* ファミリー遺伝子、9p23, 9p24.1 の増幅は、相互排他的に生じている傾向がみられた。

さらに、染色体 9p で増幅により高発現している遺伝子を同定するため、Real-time genomic-RT-PCR 法を用いてコピー数と mRNA 発現の関連解析を行なった。9p23 では *NF1B*、9p24.1 では *KIAA1432* が最も強く相関し、これらの遺伝子は肺小細胞がんにおいて、増幅によって高発現している遺伝子であると考えら

れた。

2) 全トランスクリプトームシーケンス解析

42 例の肺小細胞がんを対象とした全トランスクリプトームシーケンス解析を行い、95 の遺伝子から成る 60 の融合遺伝子を検出した。複数の症例で発現する融合遺伝子はなかったが、*PVT1* と *RLF* が 5' 側のパートナー遺伝子として 2 例以上の症例で融合遺伝子を形成していた。最も多くの融合遺伝子が検出されたのは H1963 細胞株で、15 遺伝子から成る 16 の融合遺伝子が発現していた。この 15 遺伝子のうち *MYCL1* を含む 12 遺伝子は染色体 1p34.2 の増幅領域に位置し、残りの 3 遺伝子は染色体 20q11.21 の増幅領域に位置していた。したがって、この H1963 細胞株における遺伝子融合は *MYCL1* 遺伝子の増幅に伴った染色体再構成に起因していることが示唆された。

3) 全エクソームシーケンス解析

18 例の肺小細胞がんを対象とした全エクソームシーケンス解析の結果、タンパク質に異常を起こさせると予測される体細胞変異は 2,982 遺伝子上に総計 4,183 個検出された (平均 232 個/症例、平均 3.7 個/Mb)。変異数において、細胞株と手術検体との間に有意差はみられなかった ($P=0.38$, Fisher's exact test)。塩基置換は G/C>T/A の塩基置換の頻度が最も高く (40%)、喫煙によって惹起される変異が多いことが確認された。最も高頻度に変異が検出されたのは従来の報告通り *TP53*, *RBI* 遺伝子であり、コピー数解析の結果を合わせると、*TP53*, *RBI* 遺伝子の変異あるいは LOH はそれぞれ 94%, 100% で検出されたが、変異と LOH、あるいは両方のアレルの変異によって 2 段階変異が起こっている症例はそれぞれ 67%, 72% であった。

次に、臨床検体における変異に着目して更に詳細な検討を行った。本研究で解析した 12 例の臨床検体において、タンパク質に異常を起こさせると予測される体細胞変異は 2,055 遺伝子上に 2,594 個検出された。さらに全トランスクリプトームシーケンス解析の結果、2 リード以上で変異が確認されたのはこのうち 539 遺伝子上の 580 個で、このうち 2 例以上の症例で変異が検出された遺伝子は 22 個であった。一方、2 報の先行論文 [Peifer et al. Nat Genet 2012 (先行論文 1), Rudin et al. Nat Genet 2012 (先行論文 2)] においてもそれぞれ 22 個の遺伝子を有意に変異している遺伝子として同定しており、うち先行論文 1 ではさらに 9 つの候補ドライバー遺伝子を同定していた。そこで、本研究で同定した発現している高頻度変異遺伝子 22 個と先行論文で同定された遺伝子合計 66 遺伝子について、69 例の臨床検体 (先行論文 1:27 例、先行論文 1:30 例、本研究:12 例) で変異の頻度を検討した。その結果、*TP53*, *RBI* 遺伝子を含む 20 遺伝子が肺小細胞がんを高頻度 ($\geq 10\%$) に変異している遺伝子であることが分かった。

D. 考察

3 課題の結果について、それぞれ考察する。

1) ゲノム網羅的コピー数解析

過去の報告と同様に、本研究においても、*MYC* フ

ファミリー遺伝子群は肺小細胞がんにおいて高頻度に増幅していることが示された。特に近年、*MYC* の阻害薬に関する報告が散見され、今後、肺小細胞がんの治療標的としての検討が必要である。また、*KIAA1432* 遺伝子が肺小細胞がんにおいて増幅により高発現していることを新たに見出し、さらに *KIAA1432* の増幅は *MYC* ファミリー遺伝子増幅と相互排他的に生じていることを明らかにした。したがって、*KIAA1432* は *MYC* ファミリー遺伝子非増幅肺小細胞がんの治療標的となり得ることが示唆された。*KIAA1432* を含むゲノム領域の増幅は悪性リンパ腫や乳がんにおいても報告されているが、増幅がん細胞における機能については不明である。したがって、がん細胞における *KIAA1432* 遺伝子増幅の意義を明らかにするために、更なる機能解析が必要である。

2) 全トランスクリプトームシーケンシング

肺小細胞がんにおける遺伝子融合の多くは、*MYC* 遺伝子や *MYCL1* 遺伝子の増幅過程で形成され、遺伝子融合よりも増幅のほうが肺小細胞がんの発生・進展には重要であると考えられた。

3) 全エクソームシーケンシング

変異については、先行論文の結果と合わせて 20 遺伝子が肺小細胞がんの高頻度変異遺伝子として同定された。現在、これらの遺伝子変異について更に詳細な検討を行っている。特に全エクソームシーケンスは原発巣・転移巣症例や術前無治療症例など、更に症例を追加して行う予定である。来年度中には、これらの結果を統合して新規高頻度変異遺伝子や転移・薬剤感受性に重要な遺伝子変異をゲノム網羅的に同定し、肺小細胞がんの新規標的治療法の開発に有用な遺伝子群のリストとして提示したい。

E. 結論

肺小細胞がんにおいて *MYC* ファミリー遺伝子群と相互排他的に増幅している *KIAA1432* 遺伝子を新規治療標的分子候補として同定した。変異については、先行論文の結果と合わせて 20 遺伝子を肺小細胞がんの高頻度変異遺伝子として同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwakawa R, Takenaka M, Kohno T, Shimada Y, Totoki Y, Shibata T, Tsuta K, Nishikawa R, Noguchi M, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Yokota J. Genome-wide identification of genes with amplification and/or fusion in small cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, in press.
- 2) Ohata H, Miyazaki M, Otomo R, Matsushima-Hibiya Y, Otsubo C, Nagase T, Arakawa H, Yokota J, Nakagama H, Taya Y, Enari M. NuMA Is Required for the Selective Induction of p53-Target Genes. *Mol Cell Biol*, in press.
- 3) Ui A, Ogiwara H, Nakajima S, Kanno S, Watanabe R, Harata M, Okayama H, Harris CC,

Yokota J, Yasui A, Kohno T. Possible involvement of LKB1-AMPK signaling in non-homologous end joining. *Oncogene*, in press.

- 4) Akca H, Demiray A, Yaren A, Bir F, Koseler A, Iwakawa R, Bagci G, Yokota J. Utility of serum DNA and pyrosequencing for the detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet* 2013;206:73-80.
- 5) 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, Yokota J. Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 2012;72:100-111.
- 6) 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* 2012;51:462-472.
- 7) 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* 2012;18:375-377.
- 8) 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* 2012;103:782-790.
- 9) 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* 2012;36:340-351.
- 10) Shiraishi K, Kunitoh H, Daigo Y, Takahashi A, Goto K, Sakamoto H, Ohnami S, Shimada Y, Ashikawa K, Saito A, Watanabe S, Tsuta K, Kamatani N, Yoshida T, Nakamura Y, Yokota J, Kubo M, Kohno T. A genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for lung adenocarcinoma in the Japanese population. *Nat Genet* 2012;44:900-903.
 - 11) Yamauchi M, Yamaguchi R, Nakata A, Kohno T, Nagasaki M, Shimamura T, Imoto S, Saito A, Ueno K, Hatanaka Y, Yoshida R, Higuchi T, Nomura M, Beer DG, Yokota J, Miyano S, Gotoh N. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase defines critical prognostic genes of stage I lung adenocarcinoma. *PLoS One* 2012;7:e43923.
 - 12) Lan Q, Hsiung CA, Matsuo K, Hong YC, Seow A, Wang Z, Hosgood HD 3rd, Chen K, Wang JC, Chatterjee N, Hu W, Wong MP, Zheng W, Caporaso N, Park JY, Chen CJ, Kim YH, Kim YT, Landi MT, Shen H, Lawrence C, Burdett L, Yeager M, Yuenger J, Jacobs KB, Chang IS, Mitsudomi T, Kim HN, Chang GC, Bassig BA, Tucker M, Wei F, Yin Z, Wu C, An SJ, Qian B, Lee VH, Lu D, Liu J, Jeon HS, Hsiao CF, Sung JS, Kim JH, Gao YT, Tsai YH, Jung YJ, Guo H, Hu Z, Hutchinson A, Wang WC, Klein R, Chung CC, Oh IJ, Chen KY, Berndt SI, He X, Wu W, Chang J, Zhang XC, Huang MS, Zheng H, Wang J, Zhao X, Li Y, Choi JE, Su WC, Park KH, Sung SW, Shu XO, Chen YM, Liu L, Kang CH, Hu L, Chen CH, Pao W, Kim YC, Yang TY, Xu J, Guan P, Tan W, Su J, Wang CL, Li H, Sihoe AD, Zhao Z, Chen Y, Choi YY, Hung JY, Kim JS, Yoon HI, Cai Q, Lin CC, Park IK, Xu P, Dong J, Kim C, He Q, Perng RP, Kohno T, Kweon SS, Chen CY, Vermeulen R, Wu J, Lim WY, Chen KC, Chow WH, Ji BT, Chan JK, Chu M, Li YJ, Yokota J, Li J, Chen H, Xiang YB, Yu CJ, Kunitoh H, Wu G, Jin L, Lo YL, Shiraishi K, Chen YH, Lin HC, Wu T, Wu YL, Yang PC, Zhou B, Shin MH, Fraumeni JF Jr, Lin D, Chanock SJ, Rothman N. Genome-wide association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci in never-smoking women in Asia. *Nat Genet* 2012;4:1330-1335.

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次対がん総合戦略研究事業）
（総括・分担）研究報告書

肺がんのゲノム情報に基づく治療標的分子の探索

研究分担者 河野 隆志 国立がん研究センター研究所
ゲノム生物学研究分野 分野長

研究要旨

全トランスクリプトーム解析により、肺腺がんの2%に存在するRET融合遺伝子を見出し、新規治療標的として同定した。RETキナーゼ阻害剤バンデタニブを用いた医師主導治験を行うため、FISHおよびRT-PCRによるRET融合肺がんの診断法を開発した。また、別の肺がん治療標的であるROS1融合遺伝子についても診断法の開発に着手した。日本人肺腺がん6,000例、非がん対照13,000例を対象とした全ゲノム100万多型の関連解析(GWAS)を行った。その結果、日本人の肺腺がんリスクを規定する新規遺伝子座として、既知座TERT及びTP63を確認するとともに、新規座としてBPTF及びBTNL2座を同定した。

A. 研究目的

本研究の目的は、肺がんの網羅的ゲノム解析を行ない、その情報を臨床の場に導入して、実際に予防法・診断法・治療法を改善していくことである。新たな治療・予防標的分子を同定し、同定された分子を用いてがん予防・診断・治療法の確立を目指す。

B. 研究方法

難治がんである肺がんのうち、特に発生頻度の高い肺腺がんを対象として、全トランスクリプトーム解析により融合遺伝子を同定する。有望な治療標的分子に対しては、個別化治療のための分子病理学的診断法を確立する。また、全ゲノム100万多型の関連解析(GWAS)を行うことにより、肺腺がん感受性遺伝子座を同定する。

（倫理面への配慮）

生検・手術標本を用いる研究は、病理学的検索の後に残った組織を対象として行い、研究対象者から包括的同意を得た上で、検体は匿名・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っている。更に、研究成果は個人情報公開されないように配慮して発表・報告している。遺伝子多型に関する研究は、研究計画に関して当該研究施設の倫理委員会の承認を得た後に、個人々人に対して詳細な研究内容の説明を行い、本人からの同意を得た上で行っている。

C. 研究結果

全トランスクリプトーム解析により、肺腺がんの2%に存在するRET融合遺伝子を見出し、新規治療標的として同定した。RET融合陽性肺がんに対するRETキナーゼ阻害剤バンデタニブを用いた医師主導治験を行うため、Break-apart/Fusion FISH

およびmultiplex RT-PCRによるRET融合肺がんの診断法を開発した。これまでに同定されたRET融合陽性例10例の臨床背景因子では、性差はなく(男女比=1:1)で、非喫煙者が多い(8/10: 80%)傾向が見られた。また、別の肺がん治療標的であるROS1融合遺伝子についてもBreak-apart/Fusion FISHおよびmultiplex RT-PCRによるRET融合肺がんの診断法を開発に着手した。

日本人肺腺がん6,000例、非がん対照13,000例を対象とした全ゲノム100万多型の関連解析(GWAS)を行った。その結果、日本人の肺腺がんリスクを規定する新規遺伝子座として、既知座TERT及びTP63を確認するとともに、新規座としてBPTF及びBTNL2座を同定した。新規座に関し、一つの危険アレルを持つことによるオッズ比は1.20 (rs7216064, $P=7.4 \times 10^{-11}$)、1.18(rs3817963, $P=2.7 \times 10^{-10}$)であった。

D. 考察

RETがん遺伝子、ROS1がん遺伝子ともに、遺伝子産物のチロシンキナーゼに対する阻害薬が存在することから、これらの融合遺伝子は有用な治療標的分子となると期待できる。実際、RET遺伝子融合陽性肺腺がんに関しては、Vandetanibを用いた医師主導第二相試験が2013年2月より開始された。今後、遺伝子融合の診断のルーティーン化が個別化医療の実現に重要である。また、ROS1遺伝子融合陽性肺腺がんについても阻害剤を用いた臨床試験の施行を試みたい。

肺腺がんの易罹患性に関わる遺伝子座の同定は、肺腺がん高危険度群の抽出や個別化予防のための重要な基盤情報となる。例えば、今回同定した4つの肺腺がん感受性遺伝子座に関しすべての危険アレルを持つ人は全体の1%であるが、

一つも持たない人と比べて約6倍肺腺がん発症のリスクが高いことが推察される。今後、肺腺がんの発がん経路別の解析や、他施設症例を含めた国内・国際GWASに参画することで、肺腺がんの遺伝的要因の解明を目指すとともに、個別化予防の実現へ向け、研究を進展させたい。

E. 結論

本研究によって同定された新規治療標的RET融合遺伝子に関して肺腺がん個別化治療への橋渡しが進行中である。肺腺がん感受性遺伝子については感受性遺伝子群の同定が開始した段階であり、発症高危険群の捕捉のため、さらなる遺伝子の同定を行う必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, Wakai S, Shimada Y, Arai Y, Asamura H, Furuta K, Shibata T, Tsuda H. ROS1-Rearranged Lung Cancer: Clinicopathologic and Molecular Study of 15 Surgical Cases. *Am J Surg Pathol*, 2013, 37, 554-562.
- Kohno T, Shiraishi K. Genetic polymorphisms underlying lung cancer susceptibility and therapeutic Response. *Genes and Environment*, 2012, 34 (2), 94-100.
- Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nanno 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* 2012;18:375-377.
- 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, Kardia 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 populations of European, Asian, and African American ancestry—a meta-analysis of chromosome 15q25. *Genet Epidemiol* 2012;36:340-351.
- Shiraishi K, Kunitoh H, Daigo Y, Takahashi A, Goto K, Sakamoto H, Ohnami S, Shimada Y, Ashikawa K, Saito A, Watanabe S, Tsuta K, Kamatani N, Yoshida T, Nakamura Y, Yokota J, Kubo M, Kohno T. A genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for lung adenocarcinoma in the Japanese population. *Nat Genet* 2012;44:900-903.
- Oike T, Ogiwara H, Torikai K, Nakano T, Yokota J, Kohno T. Garcinol, a histone acetyltransferase inhibitor, radiosensitizes cancer cells by inhibiting non-homologous end joining. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;84(3):815-21.
- 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, Yokota J. Identification of genes up-regulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 2012;72:100-111.
- 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* 2012;51:462-472.
- Yamauchi M, Yamaguchi R, Nakata A, Kohno T, Nagasaki M, Shimamura T, Imoto S, Saito A, Ueno K, Hatanaka Y, Yoshida R, Higuchi T, Nomura M, Beer DG, Yokota J, Miyano S, Gotoh N. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase defines critical prognostic genes of stage I lung adenocarcinoma. *PLoS One* 2012;7(9):e43923.

10. Lan Q, Hsiung CA, Matsuo K, Hong YC, Seow A, Wang Z, Hosgood HD 3rd, Chen K, Wang JC, Chatterjee N, Hu W, Wong MP, Zheng W, Caporaso N, Park JY, Chen CJ, Kim YH, Kim YT, Landi MT, Shen H, Lawrence C, Burdett L, Yeager M, Yuenger J, Jacobs KB, Chang IS, Mitsudomi T, Kim HN, Chang GC, Bassig BA, Tucker M, Wei F, Yin Z, Wu C, An SJ, Qian B, Lee VH, Lu D, Liu J, Jeon HS, Hsiao CF, Sung JS, Kim JH, Gao YT, Tsai YH, Jung YJ, Guo H, Hu Z, Hutchinson A, Wang WC, Klein R, Chung CC, Oh IJ, Chen KY, Berndt SI, He X, Wu W, Chang J, Zhang XC, Huang MS, Zheng H, Wang J, Zhao X, Li Y, Choi JE, Su WC, Park KH, Sung SW, Shu XO, Chen YM, Liu L, Kang CH, Hu L, Chen CH, Pao W, Kim YC, Yang TY, Xu J, Guan P, Tan W, Su J, Wang CL, Li H, Sihoe AD, Zhao Z, Chen Y, Choi YY, Hung JY, Kim JS, Yoon HI, Cai Q, Lin CC, Park IK, Xu P, Dong J, Kim C, He Q, Perng RP, Kohno T, Kweon SS, Chen CY, Vermeulen R, Wu J, Lim WY, Chen KC, Chow WH, Ji BT, Chan JK, Chu M, Li YJ, Yokota J, Li J, Chen H, Xiang YB, Yu CJ, Kunitoh H, Wu G, Jin L, Lo YL, Shiraishi K, Chen YH, Lin HC, Wu T, Wu YL, Yang PC, Zhou B, Shin MH, Fraumeni JF. Jr, Lin D, Chanock SJ, Rothman N. Genome-wide association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci in never-smoking women in Asia. *Nat Genet* 2012;44:1330-1335.
11. Ogiwara H, Kohno T. Essential factors for incompatible DNA end joining at chromosomal DNA double strand breaks in vivo. *PLoS One* 2011, 2011;6(12):e28756.
12. Li S, Kanno S, Watanabe R, Ogiwara H, Kohno T, Watanabe G, Yasui A, Lieber MR. PALF acts as both a single-stranded DNA endonuclease and a single-stranded DNA 3'-exonuclease and can participate in DNA end joining in a biochemical system. *J Biol Chem* 2011;286:36368-36377.
13. 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* 2011;35:1226-1234.
14. Yoshida A, Tsuta K, Nitta H, Hatanaka Y, Asamura H, Sekine I, Grogan TM, Fukayama M, Shibata T, Furuta K, Kohno T, Tsuda H. Bright-field dual color chromogenic insitu hybridization for diagnosing EML4-ALK-positive lung adenocarcinomas. *J Thoracic Oncol* 2011;6:1677-1686.
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* 2011;30:2135-2146.
2. 学会発表
1. Kohno T. RET fusion gene: A novel therapeutic target for lung adenocarcinoma. The 17th Japan - Korea Cancer Research Workshop (2012. 11. 30-12. 2, Busan, Korea)
2. Kohno T. The KIF5B-RET fusion gene. 5th Asia Pacific Lung Cancer Conference (2012. 11. 28, Fukuoka)
3. Kohno T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. 53rd Japan Lung Cancer Society (JLCS)/ Korean Association for the Study of Lung Cancer (KASLC) Joint Symposium (2012. 11. 09, Okayama)
4. Kohno T, et al. RET fusion gene: translation to the therapy of lung adenocarcinoma. Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, February 21-25, 2013, HI, USA.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
「KIF5B遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子、並びに該融合遺伝子を標的としたがん治療の有効性を判定する方法」出願番号：特願2011-171256
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

研究分担者 野口雅之

研究要旨：

腫瘍の発生増悪のメカニズムを解明するにはより早期の遺伝子異常を解明することが必須である。小型肺腺癌の上皮内腺癌と初期浸潤癌に対してArray-CGH解析を行って、浸潤癌で明らかに増幅のみられる遺伝子を同定した。これら増幅の認められる遺伝子は3q領域に多く、特に3q26領域に多く含まれていた。3q26領域で同定できた遺伝子に対して、多数例で検証を行い、ECT2遺伝子の異常が肺腺癌の予後に関与する増悪因子であることを明らかにした。

A. 研究目的

腫瘍の発生増悪のメカニズムを解明するには、前臨床がん状態の非常に早期病変に起こる異常を研究することが必須である。そこで我々は肺腺癌において、発生初期の非浸潤がんと初期浸潤がんにおける染色体異常を網羅的に検出することで腫瘍の発生と増悪のメカニズムの一端を解明することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

小型肺腺癌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承認を受けた。

1：筑波大学附属病院症例で上皮内肺腺癌（野口分類 Type A, B）6例と早期の浸潤癌（野口分類 Type D, E）9例について、メタノール固定検体の正常部と腫瘍部からそれぞれDNAを抽出し、Whole genome amplificationを行い、正常部と腫瘍部の差次で得られ

た遺伝子を標的としArray-CGH解析を行った。array-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のBACクローンを搭載したDNA arrayで、786の既知の癌関連遺伝子が含まれている。

2：有意に増幅が見られた3q26領域6遺伝子PIK3CA、ECT2、EIF5A2、TNFSF10、EVI-1、SKILと3q29に含まれ、粘液産生に関わるMUC4に対して、さらに症例を追加し増幅の検証のためにQuantitative Real-Time genomic PCRを行った。特異的プライマーセットはprimer 3で設計し、primer blastで特異性を検証した。PCRはインターカレーター法でSYBR Premix Ex Taq II (Takara)を使用し、ABI PRISM 7300を用いて比較検討した。用いた症例はType A, B 15例、Type D, E 17例、進行浸潤腺癌 51例、大細胞癌 6例、多形癌 12例である。それぞれ、腫瘍と正常部でQuantitative Real-Time genomic PCR

を行い、GAPDHで補正し、腫瘍／正常比の増幅を算出した。

3 : 2の結果を元に 3q 領域の遺伝子の中で type A, B で >1.5 (tumor/normal) の増幅が認められず、types D, E (tumor/normal) でのみ >1.5 の増幅が認められた遺伝子 ECT2, EIF5A2, PIK3CA, TNFSF10 を選び出し、さらに進行肺腺癌を追加し免疫染色を行い、発現を確認した。抗体は ECT2 (1946562, MILLIPORE), EIF5A2 (HPA029090, SIGMA), PIK3CA (C73F8, Cell Signaling Technology), TNFSF10 (k-18, Santa Cruz) を用いた。Tris-EDTA buffer (pH9.0) で 105°C 15 分賦活を行い、その後、内因性ペルオキシダーゼの除去の為に REAL Peroxidase-Blocking Solution (Dako) を 5 分反応させ、それぞれの一次抗体を 30 分、二次抗体 (PIK3CA、ECT2、EIF5A2、KI-67 は EnVision+ Dual Link System-HRP, Dako、TNFSF10 は Histofine simple stain MAX-PO(G), Nichirei) を 30 分反応させた後、DAB (Dako) で 5 分発色させた。ヘマトキシリンで核染色を行った。

陰性コントロールは、PIK3CA、ECT2、TNFSF10 は肺胞上皮、EIF5A2 は成熟リンパ球をそれぞれコントロールとした。評価方法は、PIK3CA、EIF5A2、TNFSF10 は切片中の染色されている腫瘍細胞の割合 (%) と染色強度 (0:negative, 1:weak, 2:strong) を掛け合わせて算出した。ECT2 は、x400 の視野で 1000 個の細胞のうち染色されている細胞の数をカウントした。

4 : qPCR と免疫染色の結果が最も関連する

ECT2 についてさらに検討した。ECT2 (epithelial cell transforming sequence 2) は細胞分裂をに関与したがん原遺伝子と考えられているので、日常頻用されている細胞分裂像のマーカーである Ki-67 の免疫染色も行い、比較検討した。

症例は 3 で使用した進行肺腺癌 70 例を用いた。抗体は Ki-67 (MIB1, DAKO) を用いた。Citrate buffer (pH6.0) で 121°C 10 分賦活を行った。その後、内因性ペルオキシダーゼの除去の為に REAL Peroxidase-Blocking Solution (Dako) を 5 分反応させ、それぞれの一次抗体を 30 分、二次抗体は EnVision+ Dual Link System-HRP, Dako を 30 分反応させた後、DAB (Dako) で 5 分発色させた。ヘマトキシリンで核染色を行った。Mitotic index (MI) は高倍率視野 (400 倍) で 10 視野の細胞を数えて、値を算出した。

5 : ECT2 および Ki-67 の免疫染色結果と病理学的因子 (術前転移巣、TNM 因子、病理病期、静脈浸潤、リンパ管浸襲、胸膜浸潤、組織亜型、MI) や予後の関係を解析した。統計解析は無再発生存率は Kaplan-Meyer Method を用いた。

6 : 筑波大学附属病院症例を用いた解析の Validation のために、国立がんセンター中央病院の早期肺腺癌 200 例において、3q26 上の遺伝子の増幅と発現と予後の関連を Copy number assay (GeneChip Human Mapping 250K-SNP array, Affymetrix) と同じく 198 例の早期肺腺癌に対して mRNA expression profile (Affymetrix

UI33Plus2.0 array)を行った。3q26領域のゲノムのECT2の増幅について、国立がんセンターにおいて切除された小型肺腺癌65例を用いてGeneChip Human Mapping 10K-SNP array (Affymetrix)と早期肺腺癌204例を用いてcDNA microarrayを行い、Prognoscan (<http://www.prognoscan.org/> , Dataset:GSE31210)で解析を行った。

C: 研究結果

1: 筑波大学附属病院病理を用いたArray-CGH解析でTypes A, Bとtypes D, Eを比較すると、types D, Eにおいて解析対象の786遺伝子中33遺伝子に有意に増幅が認められ、そのうちの22遺伝子が3q領域に認められ、7遺伝子が3q26領域に認められた。

2: 3q26領域で増幅がみられた7遺伝子中6遺伝子、ECT2, EIF5A2, EVI-1, PIK3CA, TNFSF10, SKILを対象にし、101例の肺癌症例に対してqPCRを行って検証した結果、ECT2, EIF5A2, PIK3CA, TNFSF10では、types A, Bで1.5未満の増幅かつtypes D, Eで1.5以上の増幅が認められた。(Fig 1, 2)

3: ECT2, EIF5A2, PIK3CA, TNFSF10について免疫染色を行い、qPCRとの相関を調べた結果、ECT2がIHCとqPCRで相関係数0.40と相関が認められた。(Fig. 3)

4: ECT2とKi-67およびMIはそれぞれ0.760, 0.870の相関係数を示し、高い相関が認められた。(Fig. 4, 5, 6)

5: 免疫染色結果と病理学的因子や予後に

ついて相関を調べたところ、予後やN因子、静脈浸襲、病理病期、組織亜型について有意差が認められた。(Table 1, Fig. 7)

6: これまでの結果のvalidationのために国立がんセンター中央病院症例を用いてECT2のSNP解析を行ったところ、types C, Dにのみ増幅(CN>3)が18例に認められた。(Table 2)また早期肺腺癌200例のcopy number assayでは3q26上に47例(24%)で増幅が検出された。さらに早期肺腺癌198例での遺伝子増幅とRNAの発現解析では、ECT2, PIK3CAに2遺伝子が有意に発現上昇していた。(Fig. 8)

また、早期肺腺癌204例を用いてcDNA microarrayを行い、Prognoscanで解析を行ったところ、ECT2の高発現群は有意に予後不良であった。(Table 3, Fig. 9)

D: 考察

遺伝子異常の多数症例解析はほとんどが進行癌についてであり、非小細胞肺癌では、3q26領域(PIK3CAやEVI-1など)については、遺伝子異常が予後に関連しているという報告があるが、小型肺腺癌に特化した検討はあまり報告されていない。

3p領域ではすでに小細胞肺癌で欠失が認められ、肺腺癌においてもWhole-genome/exome sequence analysisによって、新たなmutationが発見されているが3qについての解析は少ない。

今回我々は、array-CGHを用いた解析で上皮内肺腺癌(Types A, B)に比べ、早期の浸潤癌(Types D, E)において有意に3q領域に増幅が認められた。今回の結果は3q領域には、