

肺癌においてがんの悪性化(転移・浸潤)に関与する遺伝子が含まれているのではないかと推測される。

3q26 領域に存在する ECT2 (epithelial cell transforming sequence 2) はグアニンヌクレオチド交換因子をコードし、GTP加水分解酵素である RhoA を活性化し、細胞分裂を制御しているがん原遺伝子である。ECT2 は細胞分裂に関与する遺伝子である。ECT2 は PKC α -Par6 複合体と結合し、Rac1 を活性化し、腫瘍の浸潤や増殖に関与するという報告もある。今回の検討でも ECT2 の免疫染色において、N 因子、静脈浸襲、病理病期、組織亜型において有意差が認められ、これらはすなわち浸潤に関与する因子において有意差が認められたと考えられる。ECT2 は肺腺癌において予後に関与するバイオマーカーといえる。

array-CGH でのデータで Type A, B と Type D, E において有意差が認められたが、浸潤癌においても免疫染色で有意差が認められたことで、ゲノムの増幅異常は、腫瘍発生時点にすでに起こっていることが示唆された。

国立がんセンター中央病院症例を用いた SNP 解析、cDNA microarray での結果でも ECT2 の増幅は浸潤癌にみられ、高発現群は予後不良の結果もでており、筑波大学附属病院症例を用いた解析結果を確認した。

E: 結論

小型肺腺癌の中で上皮内腺癌(野口分類 Type A, B) と早期の浸潤癌(野口分類 Type D, E) に対して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 解析を行い、有意な増幅領域として 3q26 領域を明らかにした。さらに 3q26 領域に存在する遺伝子群について免疫染色、qPCR を行い、また病理学的因子や予後の関連を検討した結果、3q26 領域に存在する遺伝子の中でも ECT2 の発現亢進は予後に関するバイオマーカーであることを見いだした。

Fig. 1

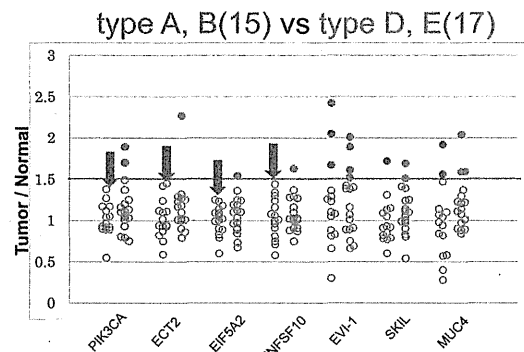


Figure 1. Genomic real-time quantitative PCR for 3q26 and 3q29 (type A, B15 cases, type D, E17 cases)

Fig. 2

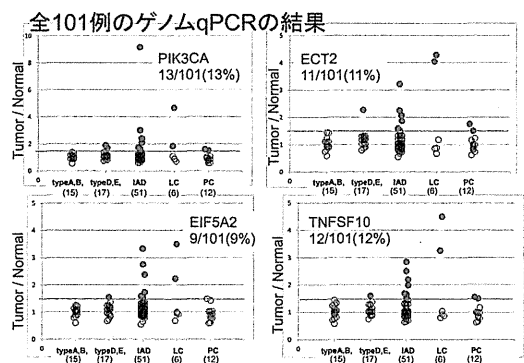


Figure 2. Genomic real-time quantitative PCR for 3q26 candidate genes

Fig. 3

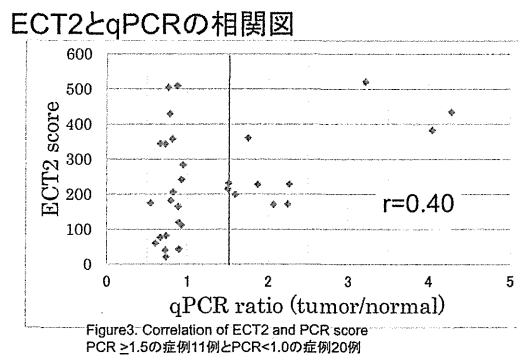


Figure3: Correlation of ECT2 and PCR score
PCR ≥ 1.5 の症例11例とPCR<1.0の症例20例

Fig. 6

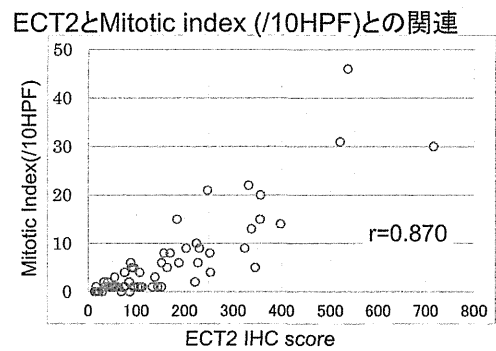


Figure 6. Relationship of IHC score of ECT2 and Mitotic index

Fig. 4

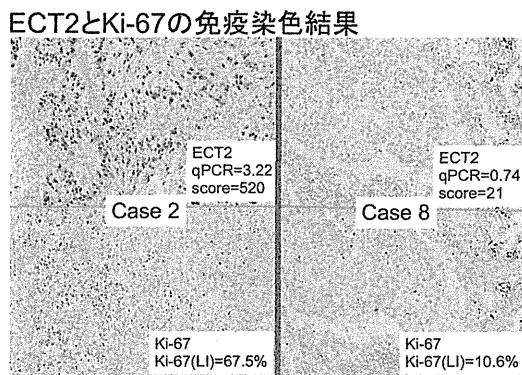


Figure 4. Immunohistochemistry for ECT2 and Ki-67

Fig. 7

ECT2 IHC scoreにおける無再発生存期間の検討

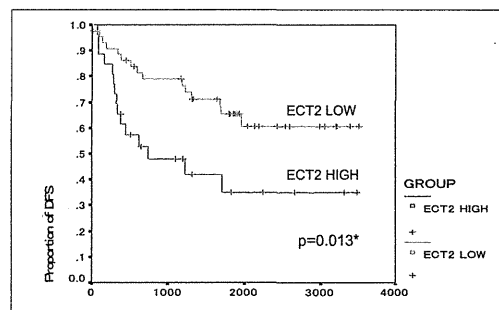


Figure 7. DFS in high score and low score ECT2

Fig. 5

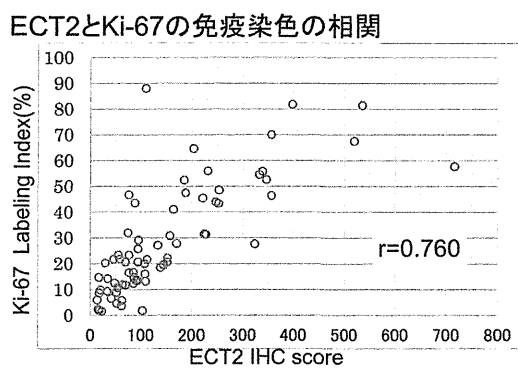


Figure 5. Relationship of IHC score of ECT2 and Ki-67

Fig. 8

早期肺癌がん198例における遺伝子増幅とRNA発現との関連

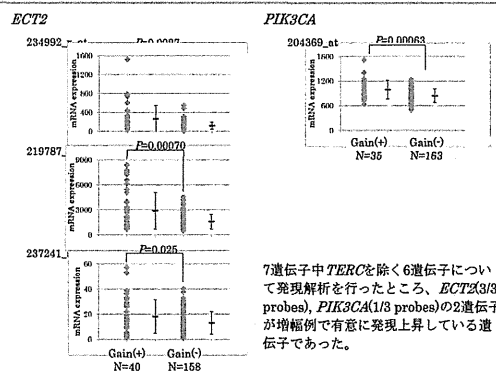


Fig. 9

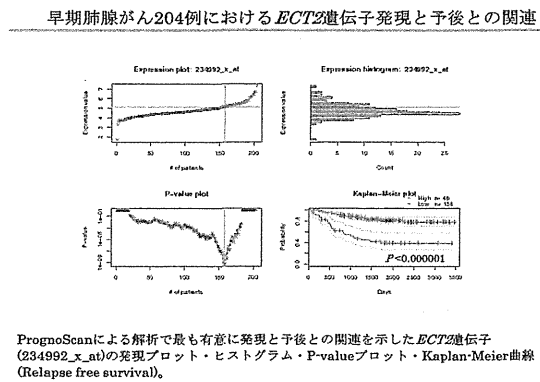


Table 1

ECT2の免疫染色スコアと病理学的因子との関係

Table 4. Relationship of ECT2 IHC score and clinicopathological data

	ECT2 LOW	ECT2 HIGH	p
n=70	44	26	
metastasis	1(2.3%)	1(3.8%)	0.7
N (0/1/2)	36/3/5	11/7/8	0.003*
T (1a/1b/2a/2b/3/4)	1/15/19/1/7/1	1/3/12/1/9/0/1	0.25
pStage (IA/IB/IIA/IIIB/IIIA/IIIB/IV)	15/17/2/3/6/0/1	2/6/4/3/1/0/0/1	0.022*
V	16(36.4%)	19(73.1%)	0.003*
Ly	23(52.2%)	18(69.2%)	0.16
pi (0/1/2/3)	31/7/3/3	13/7/2/4	0.35
Subtype (lepidic/solid/acinar/papillary)	23/1/11/9	3/11/8/3	0.0001*

ECT2 IHC score cut off = 140

Table 2

野口分類	Gain(+)	Gain(-)	Total
Types A,B	0	14	14
Types C,D	18	33	51
Total	18	47	65

Fisher's P=0.00070

Table 3

早期肺腺がん204例における遺伝子発現と予後との関連

Gene Symbol	Probe ID	Endpoint	Corrected P-value	COX P-value	HR [95%CI(low)-CI(high)]
ECT2	234992_x_at	Relapse Free Survival	<0.000001	0.000020	2.30 (1.63 - 3.25)
ECT2	219787_s_at	Relapse Free Survival	0.000036	0.00026	2.14 (1.42 - 3.23)
ECT2	234992_s_at	Overall Survival	0.00023	0.0011	2.23 (1.36 - 3.60)
ECT2	219787_s_at	Overall Survival	0.00053	0.0026	2.35 (1.34 - 4.12)
EIF6A2	235295_at	Relapse Free Survival	0.0082	0.0055	2.42 (1.30 - 4.52)
EIF6A2	220195_s_at	Relapse Free Survival	0.012	0.0064	2.20 (1.25 - 3.90)
EIF6A2	235295_at	Overall Survival	0.023	0.014	2.84 (1.23 - 6.54)
SKIL	206676_s_at	Overall Survival	0.029	0.0034	3.93 (1.57 - 9.83)
EIF6A2	220195_s_at	Overall Survival	0.044	0.0020	2.84 (1.30 - 6.23)

PrognScanで発現と予後に関連する遺伝子を解析したところ、ECT2, EIF6A2, SKILの3遺伝子が、高発現群症例で有意に予後不良となる遺伝子であることが明らかになった。これらの中で、最も有意な値を示したのは、ECT2であった。

G. 研究発表

- 論文発表
 - 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.
 - 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.
 - 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 p primary pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* (in press)

2. 学会発表

- 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、日本教育会館
- 倉田美由紀、深沢政勝、藤原広美、松本光司、高屋敷典生、森下由紀雄、野口雅之。内膜細胞診で腺癌と診断したポリリーブ状異型腺筋腫(APAM)の一例。第27回日本臨床細胞学会茨城県支部学術集会、2012年3月31日、茨城県医師会
- 藤原広美、深沢政勝、森下由紀雄、野口雅之。尿細胞診におけるLBC(TACAS法)と従来法との比較検討。第27回日本臨床細胞学会茨城県支部学術集会、2012年3月3日、茨城県医師会
- 野口雅之。病理診断をしながら病理学研究をするということ—肺腺癌の場合—。第100回日本病理学会総会、2012年4月26日、京王プラザホテル
- 里見介史、森下由紀雄、野口雅之。神経ロゼットの形態形成に関与するタンパクの網羅的解析。第100回日本病理学会総会、2012年4月26日、京王プラザホテル
- 糸口直江、森下由紀雄、野口雅之。胃ランゲルハンス細胞組織球症を背景とした胃癌の1例。第100回日本病理学会総会、2012年4月26日、京王プラザホテル
- 坂下信悟、里見介史、鈴木恵子、柴綾、南優子、森下由紀雄、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100回日本病理学会総会、2012年4月27日、京王プラザホテル
8. 坂田晃子、戸嶋章太郎、薄井真悟、永田千草、稲留征典、野口雅之. 胎児抗原を利用したヒト腫瘍特異的発現マーカーの探索. 第100回日本病理学会総会、2012年4月27日、京王プラザホテル
9. 河合瞳、里見介史、森下由紀雄、野口雅之. 腸管神経叢における神経節細胞成熟マーカーの探索. 第100回日本病理学会総会、2012年4月28日、京王プラザホテル
10. チュウシュワン、加野准子、森下由紀雄、野口雅之. Dkk3発現肝癌細胞においてDkk3抑制が引き起こすアポトーシス機序の解析. 第19回幹細胞癌研究会、2012年6月29日、札幌医科大学
11. 柴綾、森下由紀雄、野口雅之. Stratifinの異常発現は初期肺腺癌の進展を促す. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日、ロイトン札幌
12. 大原玲奈、柴綾、里見介史、坂下信悟、加野准子、西田正人、吉川裕之、野口雅之. moesinの活性化はPKCに依存し子宮腺筋症の浸潤に関与する. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日、ロイトン札幌
13. 村田佳彦、南優子、野口雅之. 肺癌における3p26領域の遺伝子増幅. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月20日、ロイトン札幌
14. 佐藤泰樹、坂下信悟、李冬平、野口雅之. 肺腺癌の進行におけるIGB1の発現と局在についての検討. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月20日、ロイトン札幌
15. 平尾嘉利、松崎英樹、岩城隼、安倍美奈子、榎谷内晶、久野敦、大倉隆司、梶裕之、野村将春、野口雅之、池原譲、成松久. グライコプロテオミクス技術を基盤とした肺癌マーカー探索. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月20日、ロイトン札幌
16. チュウシュワン、加野准子、森下由紀雄、野口雅之. Dkk3発現肝がん細胞においてDkk3抑制が引き起こすアポトーシス機序の解明. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月21日、ロイトン札幌
17. 薄井真悟、里見介史、坂下信悟、南優子、佐藤幸夫、野口雅之. 腺癌、扁平上皮癌における、血液浸潤 (VI) の予後因子としての役割. 第53回日本肺癌学会総会、2012年11月9日、岡山コンベンションセンター
18. 村田佳彦、南優子、薄井真悟、野口雅之. 肺癌における3p26領域の遺伝子増幅. 第53回日本肺癌学会総会、2012年11月9日、岡山コンベンションセンター
19. 柿沼龍太郎、芦澤和人、大松広伸、岡見次郎、栗山啓子、古泉直也、近藤哲郎、末久弘、野口雅之、前島亜希子、松隈治久、松野吉宏、村田喜代史、村山貞之、楠本昌彦. 肺野限局性すりガラス様陰影の自然史解明のための前向き研究. 第53回日本肺癌学会総会、2012年11月8日、岡山コンベンションセンター
20. 後藤行延、菊池慎二、小林敬祐、小林尚寛、薄井真悟、井口けさ人、鈴木久史、酒井光昭、鬼塚正孝、佐藤幸夫、南優子、野口雅之. 非定型カルチノイドと混在した肺大細胞神経内分泌癌の1例. 第53回日本肺癌学会総会、2012年11月8日、岡山コンベンションセンター
21. 小林敬祐、山岡賢俊、北沢伸祐、井口けさ人、菊池慎二、後藤行延、酒井光昭、鬼塚正孝、佐藤幸夫、南優子、野口雅之. 術前の気管支鏡にて原発性肺癌を疑われ手術を施行した、術後20年目晩期再発乳がんの1例. 第53回日本肺癌学会総会、2012年11月8日、岡山コンベンションセンター
22. 中村優子、道上大雄、大原玲奈、里見介史、坂下信悟、深沢正勝、南優子、森下由紀雄、吉川裕之、野口雅之. 液状化検体細胞診 (LBC) を用いた子宮内膜病変の悪性度判定マーカーの検討. 第51回日本臨床細胞学会秋季大会、2012年11月9日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター
23. Usui S., Minami Y., Noguchi M., Prognostic Implications of Vascular Invasion Differ Between Lung Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma. 5th Asia Pacific Lung Cancer Conference and 3rd International Thymic Malignancy Interest Group Annual Meeting. 25-28 November 2012, Fukuoka.
24. Sato T., Sakashita S, Li D., Minami Y., Noguchi M. IGBP1 is an Indicator of the malignant Progression of Lung Adenocarcinoma. 5th Asia Pacific Lung Cancer Conference and 3rd International Thymic Malignancy Interest Group Annual Meeting. 25-28 November 2012, Fukuoka
25. Shiba-Ishii A., Morishita Y., Noguchi M. Aberrant Stratifin Overexpression Enhances Tumor Progression of Early Invasive Lung Adenocarcinoma. 5th Asia Pacific Lung Cancer Conference and 3rd International Thymic Malignancy Interest Group Annual Meeting. 25-28 November 2012, Fukuoka

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究要旨

骨髄異形成症候群を対象とした全エキソン解析により我々が同定した新規遺伝子変異であるコヒーシン複合体遺伝子に関して、骨髄系腫瘍における変異の全貌と機能的側面を明らかにするために、563例を対象として、次世代シーケンサーを用いた網羅的な変異解析を行った。その結果、コヒーシン変異は様々な病型の骨髄系腫瘍において頻発し、互いに排他的に生じていることが明らかになった。今回の結果は、骨髄系腫瘍の発症にコヒーシンのパスウェイ変異が関与することを明らかにしたとともに、新規治療標的の可能性を示唆する研究である。

A. 研究目的

骨髄系腫瘍では、近年の次世代シーケンサーを用いたゲノム解析により、ヒストン修飾やDNAメチル化に関わる遺伝子の変異が広く共通してみられることが明らかになってきた。しかし、骨髄系腫瘍における遺伝子変異の全貌は未だに明らかになってはいない。そこで、骨髄異形成症候群を対象にした我々の全エキソン解析から明らかになった新規遺伝子変異であるコヒーシン複合体遺伝子に関して、様々な病型の骨髄系腫瘍における変異の全体像とその機能的側面を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いた大規模な変異解析および機能解析を行った。

B. 研究方法・倫理面への配慮

当研究室および共同研究施設にて集積した563例の骨髄系腫瘍検体を対象として、コヒーシン関連遺伝子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HumanMethylation450 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ン発現およびクロマチン分画でのコヒーシン量をウェスタンブロットにより解析し、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。本研究は東京大学および共同研究施設の倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

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。

D. 考察

コヒーシン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病発症を招くと考えられた。

E. 結論

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、コヒーシン複合体遺伝子の変異解析を行った。その結果、コヒーシン変異は骨髄系腫瘍において頻発することを見出した。また、機能解析の結果、コヒーシン変異は癌抑制遺伝子として機能することを示した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. 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*, 21(1),21-135,2012

2. 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*, 120(6), 1299-1308, 2012

3. 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*, 26(8),1879-1881,2012

4. 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 SI, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nature Medicine*, 18(3), 375-377, 2012

学会発表

1. Ayana Kon, Lee-Yung Shih, Masashi Sanada, Yuichi Shiraishi, Yasunobu Nagata, Kenichi Yoshida, Yusuke Okuno, Shunpei Ishikawa, Aiko Sato-Otsubo, Aiko Nishimoto, Haferlach, Daniel Nowak, Yusuke Sato, Hiroko Tanaka, Kenichi Chiba, Naoshi Obara, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Ken Ishiyama, Florian Nolte, Wolf-Karsten Hofmann, Shuichi Miyawaki, Shigeru Chiba, Hiraku Mori,

H. Phillip Koeffler, Torsten Haferlach, Satoru Miyano and Seishi Ogawa. "Recurrent mutations of multiple components of cohesin complex in myeloid neoplasms." 17th Congress of EHA, 2012/6/16

2. Ayana Kon, Lee-Yung Shih, Masashi Minamino, Masashi Sanada, Yuichi Shiraishi, Yasunobu Nagata, Kenichi Yoshida, Yusuke Okuno, Masashige Bando, Shunpei Ishikawa, Aiko Sato-Otsubo, Genta Nagae, Aiko Nishimoto, Haferlach, Daniel Nowak, Yusuke Sato, Tamara Alpermann, Masao Nagasaki, Teppei Shimamura, Hiroko Tanaka, Kenichi Chiba, Ryo Yamamoto, Tomoyuki Yamaguchi, Makoto Otsu, Naoshi Obara, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Tsuyoshi Nakamaki, Ken Ishiyama, Florian Nolte, Wolf-Karsten Hofmann, Shuichi Miyawaki, Shigeru Chiba, Hiraku Mori, Hiromitsu Nakauchi, H. Phillip Koeffler, Hiroyuki Aburatani, Torsten Haferlach, Katsuhiko Shirahige, Satoru Miyano and Seishi Ogawa. "Recurrent mutations of multiple components of cohesin complex in myeloid neoplasms." 54th ASH Annual Meeting and Exposition. 2012/12/10

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

難治性白血病に対する多段階発癌機構の解明
分担研究者 森下 和広 宮崎大学・医学部・教授

研究要旨

難治性急性骨髄性白血病(AML)の新規治療法の開発のため、網羅的遺伝子発現解析並びに統合的ゲノム解析を行い、白血病原因遺伝子の単離と分子標的遺伝子群の単離を行っている。Monosomy 7 の原因遺伝子候補を単離し、その機能解析を行っている。EVI1 高発現難治性白血病は高率に Monosomy 7 を併発しそのゲノム解析からホモ欠失領域を単離、癌抑制候補遺伝子として Mono7 遺伝子を同定し機能解析を行っている。EVI1 遺伝子は G タンパク質結合細胞表面抗原 GPR56 や CRLR の転写を促進し、G タンパク質情報伝達系を活性化し、それは白血病細胞が骨髄ニッチにて生存するために必須の因子として働く。Mono7 遺伝子はこの情報伝達系を負に制御する働きを有すが、Monosomy 7 によるゲノム欠失等により発現低下し、最終的に EVI1 転写制御との協調作用で白血病化に関連する可能性を示唆した。

A. 研究目的

難治性白血病はゲノム異常の蓄積が著しく、固形癌に近い複雑核型を示す。この難治性を凌駕する新規治療法の開発のためには、その原因となる遺伝子群を複数個同定する必要がある。我々は難治性急性骨髄性白血病に対する統合的ゲノム解析を行い、EVI1 高発現白血病に伴う 7 番染色体欠失に対して候補遺伝子群の単離を行っている。また比較のため、口腔癌を対象として同様にゲノム解析を行っている。これらの遺伝子群の機能異常の一つの特徴として白血病細胞の骨髄ニッチジャックが上げられる。その特徴に関連する遺伝子群を単離し、in vitro 並びに in vivo 実験により解析し、その結果に基づいた疾患特異的診断治療法の開発につなげる。

B. 研究方法

染色体 3q26 並びに 7 番染色体異常を有する AML 検体 42 症例を用いて統合的ゲノム解析を行った。7 番染色体においてゲノム欠失領域から Mono7 候補遺伝子を単離し、その情報伝達解析から G タンパク質情報伝達系(GPR56, CRLR)を同定し機能解析を行う。また EVI1 高発現白血病細胞の特徴として、高細胞接着能に関係する因子群を同定し機能解析を行う。さらにこの GPR56 欠損マウスの解析をいくつか、Mono7 欠損マウスの作製と、EVI1 高発現 TG マウスを作製し、in vivo 白血病発症機構の解析に繋げる。また口腔癌の統合的ゲノム解析により責任遺伝子候補の単離と機能解析を行う。

(倫理面への配慮)

患者検体の使用に関しては、宮崎大学医学部医の倫理審査会の承認(承認番号 606、540)をうけ、同意(インフォームドコンセント)の上で使用を行っている。実験動物に関しては宮崎大学動物実験委員会の

承認(2009-520、2009-515-2)を受け使用を行っている。利益相反に関しては、宮崎大学利益相反委員会が設置され適切に処理されている。

C. 研究成果

EVI1 高発現白血病細胞の特徴として細胞接着能の亢進と細胞周期 G0 期分画の増加を同定しているが、それぞれ骨髄ニッチジャックし白血病幹細胞維持に重要な要因として考えられた。これまでに Integrin $\alpha 6$ (ITGA6) (PLOS One 2012)、及び GPR56 (Leukemia 2013)を骨髄ニッチ細胞接着能に関与する因子として同定し、また EVI1 白血病細胞の G0 細胞周期の亢進については ANG1 の関係を同定した (BBRC 2011)。これらの分子を標的とした治療法として特異抗体の開発を行い IGTA6 については抗がん剤の併用療法を、GPR56 については EVI1 結合部位を標的とした小分子物質の開発を、ANG1 については、中和ペプチドボディ AM386 を用いて in vitro 実験を進めている。さらに Monosomy 7 ゲノム解析より責任遺伝子候補 Mono7 遺伝子を同定、その情報伝達系は GPR56 に加えて CGRP(caltitonin gene-related peptide)・CRLR(caltitonin receptor like receptor)の関与を同定した。EVI1 高発現白血病細胞は CRLR が高発現しており EVI1 による転写制御されている。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いる可能性が有り、その転写がゲノム欠失やプロモーターメチル化により低下することで情報伝達系の制御がうまくいかず、過剰な細胞増殖やアポトーシス抑制機構が働く事が示唆される。一方口腔内扁平上皮癌(OSCC)では多数の Interferon 誘導遺伝子の高発現が見られた。その中でゲノム増幅領域 1q22 に存在する HIN200 遺伝子群中隣り合った AIM2 と IFI16 の高発現を同定した。AIM2/IFI16 は両者が高発現し、かつ p53 の機能異常が高率に見られた。AIM2/IFI16 は単独では

p53 依存的に癌抑制遺伝子として働くが、p53 機能異常により NF- κ B 活性化を含む癌遺伝子として働くことがわかった(Cancer Science 2012)。その分子機構について検討中である。

D. 考察

EV11 高発現白血病の抗がん剤耐性は白血病細胞が骨髄ニッチへの浸潤維持機構が重要でありその関係分子として、GPR56、ITGA6、ANG1 を同定してきた。さらにそれぞれの分子に対する治療法開発に繋がっている。さらに Monosomy 7 の原因候補遺伝子を単離し、その情報伝達系での役割、EV11 高発現との関わり合い、最終的には白血病発症機構の解明を目指している。現在 Mono 7 遺伝子欠損マウスの作製、EV11 高発現 T G マウスの作製を行っており、近日中に in vivo 白血病発症機構の解明を目指す。一方口腔癌では IFN 誘導遺伝子群として AIM2/IFI16 を同定した。P53 機能異常が伴うことで細胞増殖促進、アポトーシス抑制等癌遺伝子として働くことがわかった。口腔癌発症進展において感染症による刺激とその防御機構、さらにゲノム以上の蓄積による多段階発がんが示唆される。

E. 結論

EV11 高発現難治性白血病の分子機構の解明として、骨髄ニッチでの白血病幹細胞維持に関わる複数の分子を単離し、それを分子標的とした治療法の開発を進めている。さらに EV11 高発現白血病に関わる Monosomy 7 より原因遺伝子候補として Mono 7 遺伝子を同定しさらなる多段階発症機構を解明に繋げる。また OSCC において IFN 誘導遺伝子群の高発現は他の扁平上皮癌でも同じ傾向が見られるため、同じ分子機構が働いていることが示唆される。さらなる機能解析並びに遺伝子活性化機構の解明を進める。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamakawa N, Kaneda K, Saito Y, Ichihara E, Morishita K. : The Increased Expression of Integrin α 6 (ITGA6) Enhances Drug Resistance in EV11 Leukemia. PLoS One. 7(1): e30706, 2012.

2) 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(4): 782-790, 2012.

3) Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, Hidaka T, Mameda K, Hatakeyama K, Shiraga T, Goto A, Takamats

u 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 26, 1238-1246, 2012.

4) Nakahata S, Morishita K. CADM1/TSLC1 is a novel cell surface marker for adult T-cell leukemia/lymphoma. J Clin Exp Hematop. 52, 17-22. 2012

5) Y Saito, K Kaneda, A Suekane, E Ichihara, S Nakahata, N Yamakawa, K Nagai, N Mizuno, K Kogawa, I Miura, H Itoh, K Morishita, Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EV11-regulated GPR56, Leukemia accepted article preview 12 March 2013;

2. 学会発表

1) 中畑新吾, 市川朝永, 斎藤祐介, 新井康仁, 滝智彦, 谷脇雅史, 森下和広 : NDRG2 は成人 T 細胞白血病リンパ腫においてがん抑制遺伝子として働く. 平成 24 年度日本生化学会九州支部例会

2) Saito Y, Kaneda K, Ishihara E, Mizuno N, Itho H, Morishita K. : Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by GPR56 signaling in bone marrow stromal cell niches. 第 10 回幹細胞シンポジウム.

3) 市川朝永, 中畑新吾, 森下和広 : 癌抑制遺伝子 NDRG2 は炎症反応によって発現が調節される. 第 33 回日本炎症・再生医学会.

4) Kazuhiro Morishita, Inactivation of NDRG2, a novel regulator for PTEN, contributes to development of Adult-T cell leukemia/lymphoma 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム : 第 1 部 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム

5) 中畑新吾. ATL における NDRG2 発現低下は PTEN 不活性化に伴う恒常的な PI3K 情報伝達系活性化を導く. 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム : 一般演題口演 III ATL (2) (病態)

6) 市川朝永. がん抑制遺伝子 NDRG2 による HTLV-1/Tax 誘導性 NF κ B 活性抑制機構の解析. 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム

7) 市川朝永. がん抑制遺伝子 NDRG2 による HTLV-1/Tax 誘導性 NF κ B 活性抑制機構の解析. 第 23 回宮崎造血因子研究会.

8) Iha H, Ikebe E, Tezuka K, Fujisawa J, Tanaka Y, Sueoka E, Morishita K, Hori M : Lectin array profiling on the glycans expressed in ATL cells. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Sapporo. レクチャーを用いた ATL 細胞に発現するグリカンのプロファイリング. 伊波英克, 池辺詠美, 手塚健太, 藤澤順一, 田中勇悦, 末岡榮三朗, 森下和広, 堀光雄. 第 71 回日本癌学会学術総会.

9) Ichikawa T, Nakahata S, Morishita K : Chronic inflammation induces DNA promoter methylation of tumor suppressor gene NDRG2. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 慢性炎症ががん抑制遺伝子 NDRG2 の NDA プロモーターメチル化を誘導する. 市川朝永, 中畑新吾, 森下和広. 第 71 回日本癌学会学術総会.

10) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K : NDRG2,

a novel regulator of phosphorylation of PTEN at S380/T383, works as a tumor suppressor. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. NDRG2 は PTEN のリン酸化を負に制御し、がん抑制遺伝子として機能する。中畑新吾, 市川朝永, 齋藤雄介, 新井泰仁, 滝智彦, 谷脇雅史, 森下和広. 第 71 回日本癌学会学術総会.

- 11) Saito Y, Kaneda K, Ichikara E, Nakahata S, Yamakawa N, Suekane A, Mizuno N, Kogawa K, Miura I, Itoh H, Morishita K : Maintenance of the the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1-regulated GPR56. 第 74 回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology.
- 12) Jun Lu, Oba S, Yoshimi A, Ando K, Morishita K, Kurokawa M, Kotani A : Identification of microRNAs targeting Evi-1. 第 74 回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology.
- 13) Kaneda K, Yamakawa N, Ichihara E, Saito Y, Morishita K : Cell adhesion dependent drug-resistance by high ITGA6/ITGB4 expression in EVI1^{high} AML. 第 74 回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology.
- 14) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K : NDRG2, a novel regulator of phosphorylation of PTEN at S380/T382/T383, works as a tumor suppressor. 第 74 回日本血液学会学術集会 The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology.
- 15) Kanade K, Igawa K, Ichikawa T, Kurogi S, Sekimoto T, Chosa E, Sakota S, Morishita S : Mechanisms of bone differentiation regulated by MEL1/PRDM16. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. MEL1/PRDM16 による骨分化制御機構の解明. 兼田(中島)加珠子, 井川加織, 市川朝永, 黒木修司, 関本朝久, 帖佐悦男, 迫田澄男, 森下和広. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡市博多区. 2012.12.11.
- 16) Nakahata S, Ichikawa T, Sato Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita S : Down-regulation of NDRG2 expression induces the constitutive activation of the P13K pathway through the inactivation of PTEN in ATL. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. ATL における NDRG2 発現低下は PTEN 不活性化に伴う恒常的な P13K 情報伝達系活性化を導く. 中畑新吾, 市川朝永, 齋藤雄介, 新井泰仁, 滝智彦, 谷脇雅史, 森下和広. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡市博多区. 2012.12.14.
- 17) 市川朝永, 中畑新吾, 森下和広 : HTLV-1/Tax によるがん抑制遺伝子 NDRG2 発現低下機構の解析. 第 85 回日本生化学会大会.
- 18) 中畑新吾. ATL における NDRG2 発現低下は PTEN 不活性化に伴う恒常的な P13K 情報伝達系活性化を導く. 第 17 回造血器腫瘍研究会 (兼、がん研究開発費「がん幹細胞に

対する新規分子標的治療薬の開発を目指した
基盤研究」班会議. 宮崎市 2013.2.1.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

難治がんにおける包括的ゲノム解析

分担研究者 柴田 龍弘 国立がん研究センター研究所
がんゲノミクス研究分野 分野長

研究要旨

本研究では、高速シーケンサー等の新技術を導入し、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の同定をすすめ、有効な分子診断や新しい治療法の実現を加速させることを目的とする。疫学研究の指針に基づき、臨床検体は連結可能匿名化を行い、個人を特定することができるような情報はいっさい付加されずに研究を進めた。肺がんにおける全トランスクリプトーム解析からEZR-RS1並びに新規キナーゼ融合遺伝子を同定できた。EZR-RS1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が明らかになった。

A. 研究目的

多段階がん過程においてがん細胞に蓄積するゲノム異常プロファイルは、多様な病態や臨床像を規定するのみならず、がん細胞が強く依存している特定のゲノム異常を遮断する分子標的薬の感受性と強く相関している。本研究では、高速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の同定をすすめ、有効な分子診断や新しい治療法の実現を加速させることを目的とする。

B. 研究方法

難治がん臨床検体並びに細胞株からRNAを抽出し、高速シーケンサーを用いて全トランスクリプトーム解析解析を行う。独自に開発した情報解析アルゴリズム（すでに肺がんのKIF5B-RET融合遺伝子同定の実績がある）を用いて、各検体における融合遺伝子等のがん遺伝子検出を進める。同定した融合遺伝子については、

更に多数検体における発現頻度を検索すると同時に、細胞株に導入して腫瘍形成能を調べ、また場合によっては動物モデルの作製を進め、in viro並びにin vivoにおける機能解析を行い、がん細胞にとって重要な異常の選別を開始する。更にこれらのモデルを用いて、分子標的治療薬の開発や治療抵抗性獲得機構の解析も試みる。

解析の対象となる腫瘍検体については、これまでの研究において十分な症例数についてDNAやRNAを抽出してある。国立がん研究センター研究所に新たに設置されたHiSeq2000を使用する。シーケンスデータ解析に関しては、専門の生物統計家が5名常駐して解析を行なう体制を構築している。

（倫理面への配慮）

本研究は疫学研究の指針に基づき国立がんセンター倫理審査委員会にてすでに承認が得られている。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、臨床検体は連結可能匿名化を行い、個人を特定することができるような情報はいっさい付加されずに実験に使用する。本研究所は国立がんセンターの実験動物倫理委員会の指針およびカルタヘナ法のもと、動物の愛護および管理に関する法律、実験動物の飼養および保管等に関する基準にしたがって行う。実験動物に使用に際しては、研究上の目的を達するに必要な最小限の数の実験動物を使用し、その苦痛の軽減には最大限の配慮を払う。

C. 研究結果

1. 肺がんにおけるEZR-ROS1融合遺伝子の同定とマウスモデルの作製

ALK肺がんと類似した病理組織像（印環細胞型）を呈する肺腺がん臨床検体9症例について全トランスクリプトーム解読と融合遺伝子探索を進めた。その結果、既知のEML4-ALK融合遺伝子（3例）に加えて、EZR-ROS1（2例）、CCDC6-RET（1例）、新規キナーゼ融合遺伝子（1例）を同定した。本年度はEZR-ROS1の解析を中心として進めた。

EZR-ROS1融合遺伝子を発現するNIH3T3細胞を樹立したところ、軟寒天培地において足場非依存的にコロニーを形成し、またヌードマウスにおいて皮下腫瘍を形成したことから肺がんにおける新規ドライバー遺伝子と考えた。更にEZR-ROS1遺伝子が肺がんの原因遺伝子であることを検証するために肺胞上皮細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製したところ、100%で多発肺がんを発症した。EZR-ROS1融合遺伝子は肺がんの原因遺伝子であることを*in vivo*で検証すると共に、独自の肺がん発症マウスモデルを樹立できた。現在更に新規キナーゼ融合遺伝子についても機能解析が進行中である。

2. 低分化胃がんにおける新規融合遺伝子の同定

これまでに行ったゲノム解析から、低分化胃がんにおいては遺伝子増幅といったコピー数異常や既知のがん遺伝子の突然変異はあまり検出されないことから、融合遺伝子による発がんの可能性があると考え、低分化胃がん31症例と対照として高分化胃がん7症例について全トランスクリプトーム解析を施行した。全部で544個の融合遺伝子候補が同定されたが、そのうち読み枠の解析から融合タンパクを形成しうるものとして91個の新規融合遺伝子が同定され、全てについてRT-PCRによる検証を行った結果、24個の新規融合遺伝子の発現が確認できた。予想されたように、高分化型胃がん（平均0.1個）に比べて低分化胃がん（平均0.74個）の方に多く融合遺伝子が検出された。これらの融合遺伝子にはキナーゼあるいはそのリガンドの遺伝子が機能ドメインを保持したまま融合している例も見られた。それらには肺がんと同様に治療標的となるドライバー変異が含まれていることが期待され、臨床検体における頻度の検証と機能解析を進めた。

3. 成人T細胞性リンパ腫のゲノム解析

成人T細胞白血病・リンパ腫はHTLV感染が原因として発症する疾患であり、世界的にも本邦における発症率が高く、また非常に予後不良（5年生存率が15%）であることが知られている。本疾患発症の分子機構の解明並びに新規治療標的の同定を目指して、包括的なゲノム解析を進めた。

D. 考察

1. EZR-ROS1を含めたROS1融合遺伝子は、ALK, RETに続いて肺がんにおける新たな治療標的となることが期待されている。我々が樹立した独自のモデルマウスを使うことで、ROS1融合遺伝子を標的とした薬剤の治療効果を検討できる。

2. 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、今後多数検体における頻度と生物学的活性を検証し、各種の阻害剤に対する反応性について検討を加えることで、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。

3. 成人T細胞性リンパ腫についてはゲノム異常の全体像についての報告がなく、その発症は謎に包まれている。本解析は、発症機構の解明、分子標的薬候補の同定、ゲノムバイオマーカーによる疾患の層別化など本疾患の新たな診断や治療に向けて重要な基盤を構築するものとして期待される。

E. 結論

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できた。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が明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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*, 2013, in press.

2. 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*, 2013, in press.

3. 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*, 2012, in press.

4. 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*. 2012 in press..

5. Nakagawa H, Shibata T. Comprehensive genome sequencing of liver cancer. *Review. Cancer Letters*, 2012, in press.

6. Shibata T. Cancer genomics and pathology: All Together Now. *Review. Pathol Int*, 2012, Oct;62(10):647-59.

7. 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, Jul 10;22(1):66-79..

8. Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, Aoki M, Hosono 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 May 27;44(7):760-4..

9. 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. Bio Chem.*, 2012 Mar 9;287(11):7896-906.

10. 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, 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 Feb 12;18(3):375-7.

11. 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 Jan 1;72(1):100-11.

12. 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 Mar;36(3):423-31.

13. 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.*, 2012 Feb;22(2):208-19.

2. 学会発表

1. Discovery of oncogenic fusion genes by whole transcriptome sequencing
The 2nd Japan-China Symposium on Cancer Research, 2012.5.10

2. 酸化ストレス分子とがん病態の分子基盤
第101回日本病理学会総会 シンポジウム
1 2012.4.26

3. 肝炎ウイルス関連肝がんの全ゲノム解読
第112回日本外科学会 2012.4.13

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

3. 特許取得

「胃がんにおける新規融合遺伝子」
(申請中)

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次対がん総合戦略研究事業）

(分担)研究報告書

諸臓器がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析

研究分担者 稲澤譲治（東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授）

研究要旨

各種がんにおける微細ゲノム構造異常やエピゲノム変化をゲノムワイドに検出し、これを網羅的発現解析データや特定の表現型と比較することで、新規のがん関連遺伝子を同定するとともに病態形成機構を解明し、個別化がん医療に資する診断、治療、予防の開発に資する成果を上げる。

A. 研究目的

各種がんにおける微細ゲノム構造異常やエピゲノム変化をゲノムワイドに検出し、これを網羅的発現解析や特定の表現型（臨床情報、病理組織、各種がん細胞の特性など）と比較することで新規のがん関連遺伝子を同定し、さらに病態形成機構を明らかにすることにより、がんの診断、治療、予防の個別化に資する成果を上げることを目的とする。

B. 研究方法

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、がん肝細胞性、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する。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する。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ドマークに、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する。同定

したがん関連遺伝子の機能を解析し、その破綻によって起きるがん病態を解明し、がん個性化医療の実現に資するものとする。

（倫理面への配慮）研究は、「ヒトゲノム研究に関する基本原則」（科学技術会議生命倫理委員会）ならびに「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」（厚生科学審議会先端医療技術評価部会）を遵守して遂行すると共に、東京医科歯科大学をはじめ共同研究施設の各機関に設置された倫理委員会の承認を得て実施されている。

C. 研究結果

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）の複数を同定した。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などを同定した。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 LC3Av1 を明らかにした。今回見出された TS-miRNA の補充療法を確立することで、新規がん治療法の開発が見込める。

D. 考察

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

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. 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. 2013 (in press)
2. 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. 2013 (in press)
3. 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. 34:560-9. 2013
4. 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. 43:69-73. 2013
5. 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. 509:215-22. 2012
6. 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. 43:2229-40. 2012
7. 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. 103:1558-66. 2012
8. Matsumura S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Muramatsu T, Furuta M, Tanaka S, Sakamoto M, Arii S, Inazawa J: Integrative array-based approach identifies MZB1 as a frequently methylated putative

- tumor-suppressor in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 18:3541-3551. 2012
9. 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.* 44:426-9. 2012
 10. 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.* 60:1073-1083. 2012
 11. 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.* 31:4923-34. 2012
 12. 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.* 31:4397-408. 2012
 13. 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.* 227:8-16. 2012
 14. 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.* 31:1963-74. 2012
2. 学会発表
1. Harazono Y, Kozaki K, Muramatsu T, Kurasawa Y, Teruo A, Inazawa J: Exploration of EMT-related microRNAs using function-based screening with expression analysis of E-cadherin in Panc1 line. American Association for Cancer Research, 103rd Annual Meeting 2012. Chicago, USA, 2012.
 2. Inoue J, Ishihara T, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J: HECT-type ubiquitin ligase ITCH targets lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5 (LAPTM5) and prevents LAPTM5-mediated cell death. American Association for Cancer Research, 103rd Annual Meeting 2012. Chicago, USA, 2012.
 3. Kozaki K, Kurasawa Y, Muramatsu T, Ono H, Ishihara T, Uzawa N, Pimkhaokham A, Imoto I, Teruo A, Inazawa J: Phenotypic stabilization of mesenchymal-like cancer cells through mesenchymal-specific DNA hypermethylation. American Association for Cancer Research, 103rd Annual Meeting 2012. Chicago, USA, 2012.

4. Yamamoto S, Inoue J, Bai H, Kawano T, Inazawa J: A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. American Association for Cancer Research, 103rd Annual Meeting 2012. Chicago, USA, 2012.
 5. 稲澤譲治: 新世代ゲノム解析技術によって浮上するがんのバックシートドライバー. 第16回日本がん分子標的治療学会. 西日本総合展示場. 福岡. 2012年6月29日.
 6. 原園陽介、小崎健一、村松智輝、河野辰幸、原田清、稲澤譲治: E-cadherin の発現変化を指標とした機能的スクリーニングによる MET 誘導生 microRNA の探索. 第71回日本癌学会学術総会. さっぽろ芸文館. 北海道. 2012年9月19日.
 7. 古田繭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤譲治: Argonute2 免疫沈降と統合的情報解析による肝細胞癌抑制性 miRNA クラスターの標的遺伝子群の同定. 第71回日本癌学会学術総会. さっぽろ芸文館. 北海道. 2012年9月20日.
 8. 山本信祐、井上純、小村健、小崎健一、稲澤譲治: NRF2 pathway を負に制御する microRNA の同定. 第71回日本癌学会学術総会. さっぽろ芸文館. 北海道. 2012年9月20日.
 9. 宮脇豊、河内洋、江石義信、大井章史、河野辰幸、稲澤譲治、井本逸勢: 食道扁平上皮癌の術後予後因子として遺伝子 MYC および FHIT におけるゲノムコピー数異常の意義. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌市教育文化会館. 北海道. 2012年9月20日.
 10. 永田啓明、小崎健一、谷本幸介、古田繭子、井元清哉、宮野悟、市川大輔、大辻英吾、稲澤譲治: 食道扁平上皮癌における DNA メチル化関連遺伝子の統合的スクリーニング. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌教育文化会館. 北海道. 2012年9月20日.
 11. 村松智輝、小崎健一、井元清哉、山口類、宮野悟、稲澤譲治: ヒト口腔癌細胞株を用いた癌転移分子メカニズムの解析. 第71回日本癌学会学術総会. ロイトン札幌. 北海道. 2012年9月21日.
 12. 西山直隆、新井恵吏、長塩亮、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、金井弥栄: 尿路上皮がんにおけるゲノム構造異常: 臨床病理学的意義ならびに DNA メチル化異常との関係. 第71回日本癌学会学術総会. ロイトン札幌. 北海道. 2012年9月20日.
 13. 細田文恵、十時泰、新井康仁、津田均、井本逸勢、稲澤譲治、大木操、柴田龍弘: 乳がん原発巣とリンパ節転移巣における遺伝的変異の解析. 第71回日本癌学会学術総会. ロイトン札幌. 北海道. 2012年9月21日.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - 国内出願
 1. 2012年10月26日、特許第5116026号、「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
 2. 2012年7月27日、特許第5044837号、「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

3. 2012年6月1日、特許第5002749号、「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
1. 2012年11月27日、登録番号8218431、「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. 2012年7月10日、登録番号8216785、「神経芽腫の検出方法」、稲澤譲治・井本逸勢・井上 純、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2008-275176
3. 2012年5月22日、登録番号8183223、「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、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2008-275176

海外出願

1. 2012年11月27日、登録番号8218431、「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 [US]
2. 2012年7月10日、登録番号8216785、「神経芽腫の検出方法」、稲澤譲治・井本逸勢・井上 純、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2008-275176 [US]
3. 2012年5月22日、登録番号8183223、「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、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2008-275176 [US]
4. 2012年8月15日、登録番号1997910、「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 [EP]

2. 実用新案登録
3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

- 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, 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 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,