

2013/3003A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河野 隆志

平成26（2014）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に基づく多段階発がん過程並びに臨床病態の分子
基盤の解明とその臨床応用に関する研究

河野 隆志

II. 分担研究報告

1. 肺腺がん高危険度群の診断・予防法開発

河野 隆志

2. 肺がんの診断と治療の標的分子の同定

横田 淳

3. 肺がんの治療時期や治療法の選択に有用な分子病理学的分類法の確立

野口 雅之

4. 腎細胞癌の網羅的なゲノム異常解析

小川 誠司

5. 難治性白血病を基礎とした多段階発癌機構の解明

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

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 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

全エクソーム解析により、RET, ALK, ROS1 がん遺伝子の転座陽性、かつ、EGFR, KRAS, HER2, BRAF 陰性の肺腺がんでは、他と比して、P53 遺伝子等のがん関連遺伝子の変異頻度が低く、専ら遺伝子融合高いことに依存して発がんしていること、よって融合が治療標的に適していることを明らかにした。肺小細胞がんでは10%以上の頻度で変異し、且つ、発現している治療標的候補遺伝子として10 遺伝子を同定した。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。VHL 複合体の異常は腎細胞癌の発生においてほぼ必須のイベントであり、HIF の蓄積という観点からはVHL およびTCEB1 のどちらかが変異しても同様の結果が生じることを示した。Monosomy 7 の原因遺伝子候補 mono 7 同定した。EVI1 高発現と mono 7 の発現低下により有意に白血病発症が早まり、機能的にEVI1 と協調して働くことから原因遺伝子であることが強く示唆された。低分化胃がんにおいて高頻度に観察される6p21 領域増幅から、体系的な機能解析により glycolysis に必要な解毒代謝酵素であるGLO1 を新たながん遺伝子として同定した。新規腫瘍抑制型-microRNA 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 を同定した。

研究分担者

- | | | |
|----------|------------|-------|
| 1. 河野 隆志 | 国立がん研究センター | 分野長 |
| 2. 横田 淳 | 国立がん研究センター | 客員研究員 |
| 3. 野口 雅之 | 筑波大学大学院 | 教授 |
| 4. 小川 誠司 | 京都大学大学院 | 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 謙治 | 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・予知医療の実現に向けて、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関して解析を進め、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も進める。第二に、高頻度にゲノム異常を起こしている遺伝子に関しては、整備された臨床検体を用いた解析から臨床病理学的所見との関連性を明らかにし、診断法の開発に結び付ける。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. 肺がんのゲノム情報に基づく治療標的分子の探索

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、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。

2. 肺がんの診断と治療の標的分子の同定

肺小細胞がんを対象に全エクソームシーケンシングと全トランスクリプトームシーケンスを行ない、それらの結果を組み合わせ、肺小細胞がんの発生・進展に関与する遺伝子、治療標的となり得る遺伝子を抽出した。

3. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

①解析に用いる小型肺腺癌は筑波大学附属病院で切除された症例で、結果の検証の一部に用いる検体は国立がんセンター中央病院で切除された症例である。すべての検体について研究使用の同意がとれており、かつ2つの施設における倫理委員会での承認をうけている。連結可能匿名化して、検体を扱った。

肺上皮内腺癌 (Noguchi Type A, B) と初期浸潤癌 (Noguchi Type D, E) で Array-CGH 解析を行い、qPCR と免疫染色の結果が最も相関する ECT2 を見いだした。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) や予後の関係を解析した。得られた結果の Validation のために、国立がんセンターの早期肺腺癌を用い SNP 解析、遺伝子増幅と RNA の発現解析、cDNA microarray、Prognoscan の解析を行った。

②筑波大学附属病院内で「つくばヒト組織バイオバンク」を試験的に稼働させた。ヒトゲノム指針に則った細則、申請書、等の作成を行った。また外科系各臨床グループの協力を得て、実際の試料のバンキングを開始した。

4. 腎細胞がんの網羅的ゲノム解析

240 例の腎細胞癌に対し、手術時に腫瘍および正常腎組織を採取し、DNA を抽出した。このうち 106 例について、SureSelect (Agilent Technologies) により全エクソーム領域を濃縮し大量並列シーケンサ HiSeq2000 (Illumina) にて全エクソームシーケンシングを行った。また、メチル化アレイ (Infinium Human Methylation450) による網羅的な DNA メチル化解析を行いメチル化のプロファイリングを行った。

5. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

Monosomy 7 を有する AML を中心として 7 番染色体にゲノム異常のある 24 症例について統合的ゲノム解析を行いその原因遺伝子単離と in vitro 及び in vivo 機能解析を行う。すでにホモ欠領域を同定し、領域より候補遺伝子として mono7 を特定した。Mono7 遺伝子の細胞株及び患者検体での遺伝子発現様式、エピゲノム異常の探索、in vitro 細胞系への過剰発現、発現抑制による細胞増殖、分化、アポトーシス、造血因子反応性を検討する。特に cAMP 反応性、GM-CSF hypersensitivity 等の検討は、さらに EVI1 TG マウスと mono7 欠損マウスを作製し、掛け合わせにより白血病発症機構を検討する。また EVI1TG マウス造血幹細胞に shmono7 発現させ、NOG 免疫不全マウスに移植し白血病発症を検討する。

6. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

163 例の胃がん臨床検体を用いて、全ゲノムにおけるコピー数異常を検出する。同じ検体について遺伝子発現解析を行ない、ゲノムコピー数変化と遺伝子発現量の関連を調べ、標的となる遺伝子を絞り込む。更に細胞株を用いて、候補遺伝子の過剰発現やノックダウン実験、動物移植実験を行い、機能的スクリーニングから新たながん遺伝子の同定を行なう。更に得られた遺伝子の機能推定に関連してメタボローム解析も行った。

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. 肺がんのゲノム情報に基づく治療標的分子の探索

全エクソーム解析により、RET, ALK, ROS1 がん遺伝子融合陽性、及び陰性の肺腺がんの変異遺伝子の比較解析を

行った。その結果、陽性症例では、TP53 遺伝子をはじめとするがん関連遺伝子の変異頻度が小さいことが分かった ($P < 0.001$ by t-test)。また、総遺伝子の変異頻度についても同様であった ($P < 0.001$ by t-test)。以上の結果から、がん遺伝子融合陽性がんでは、融合に強く依存して発がんするという発がん経路、また、がん遺伝子異常陰性がんではクロマチン制御遺伝子群の失活を一つの原因とする発がん経路が構築された。

BPTF 遺伝子に関してはタンパク質短縮変異2例を含む7例 (7/200; 3.5%) で変異が見られた。この遺伝子は、全ゲノム関連解析で、肺腺がん感受性遺伝子として同定された遺伝子であり、正常肺組織では危険リスクからの mRNA 発現量が低いことが昨年までの分担研究者の報告で明らかにされている。今回の結果は BPTF 遺伝子が、がん抑制的に機能することを示している。

2. 肺がんの診断と治療の標的分子の同定

38 例の肺小細胞がん患者から得られた 44 腫瘍細胞を対象とした全エクソームシーケンシング解析を行い、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が 5,669 遺伝子上に総計 9,729 個検出された (平均 244.2 個/症例、平均 7.4 個/Mb)。塩基置換は G/C>T/A の頻度が最も高く、喫煙によって惹起される変異が多いことが確認された。それらのうち 38 例で 10%以上の頻度で変異が検出されたのは 263 遺伝子であった。一方、2 報の先行論文 (Peifer et al. Nat Genet 2012, Rudin et al. Nat Genet 2012) においては、それぞれ 331 個、230 個の遺伝子が 10%以上の頻度で変異している遺伝子として同定されている。そこで、次に 3 つの研究を合わせた 95 症例で共通に 10%以上の頻度で変異している遺伝子を探索した結果、38 遺伝子が同定された。これらの遺伝子は解析法や解析した検体の地理的な違いを考慮しても共通に変異が検出されており、肺小細胞がんが高頻度に変異している遺伝子と考えられた。

そこで、これら 38 遺伝子を中心に臨床病理学的因子との関連性を検討した。その結果、38 遺伝子中 22 遺伝子の変異は早期がん (I 期) でも進行がん (II~IV 期) でも、原発腫瘍、転移巣のいずれにおいても、治療前症例においても検出され、肺小細胞がんの発生および悪性形質の維持に必須と考えられた。また、38 遺伝子のうち 10 遺伝子は変異アレルの発現が RNA sequencing で確認され、最も有力な治療標的遺伝子の候補と考えられた。最も高頻度に発現している変異が検出されたのは、従来の報告通り、TP53 と RB 1 であった。一方、COL11A1 と PLXNA4 の 2 遺伝子は原発腫瘍より転移巣で高頻度に変異が検出され、発がんではなく、がんの悪性化、がん細胞における転移能の獲得に寄与している可能性が強く示唆された。

3. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

① Array-CGH 解析を行うと肺上皮内腺癌と初期浸潤癌の間で、有意に増幅を認める領域として 3q26 が抽出された。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。国立がんセンター病院症例を用いた validation では SNP 解析において初期浸潤癌にのみ増幅 (CN3) を認め、cDNA microarray でも初期浸潤癌で発現亢進が確認されるとともに、Prognoscan の解析では、ECT2 の高発現群は有意に予後不良であった。

② 現在まで「つくばヒト組織バイオバンクセンター」を筑波大学附属病院内の一つの部局として立ち上げる事に成功し、平成 25 年 11 月に対外的にも運用を開始する発表を行った。現在までに 1200 例を越える症例が集積されている。

4. 腎細胞がんの網羅的ゲノム解析

全エクソームシーケンシングを行った 106 例のうち、70 例に VHL の変異を、22 例に VHL のプロモーター領域のメチル化を認めた。残りの 14 例には VHL の異常が検出されなかった。これらのうち、5 例に TCEB1 の変異を認めた。全 240 例について TCEB1 の変異解析を行ったところ、8 例 (3.3%) に変異を認めた。TCEB1 は Elongin C タンパクをコードしており、VHL とともに VHL 複合体を形成し、HIF のユビキチン化を促している。TCEB1 変異は常に対側アレルの欠失を伴っており、VHL の不活化とは完全に排他的に生じていた。合計で 240 例中 229 例 (95%) に VHL 複合体の異常を認めた。TCEB1 変異は Tyr79 および Ala100 の 2 か所のアミノ酸における塩基置換のみが見られた。これらのアミノ酸は、VHL との結合部位付近に位置しており、変異により VHL との相互作用が失われ VHL 複合体の機能が喪失するものと考えられた。そこで HEK293T 細胞に野生型または変異型 Elongin C を発現させ免疫沈降を行ったところ、野生型 Elongin C は VHL との結合が確認されたものの、変異型 Elongin C は結合が阻害されていた。また、Hela 細胞において、内因性に発現している Elongin C をノックダウンし、変異型 Elongin C を発現させたところ、HIF の蓄積が観察された。これらの結果から、TCEB1 の変異と対側アレルの欠失により VHL 複合体が形成されず、HIF が蓄積して腎細胞癌が発生すると考えられた。

5. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

Mosomy 7 を有する AML ゲノム解析により 7 番染色体上にホモ欠失領域を同定、原因遺伝子候補 mono7 遺伝子を選定した。遺伝子発現は、monosomy7 を含み、7 番染色体異常に伴い減少し、かつエピゲノム異常においても転写の低下が見られていた。この遺伝子は cAMP 情報伝達系を負に制御する細胞質内タンパク質で有り、その情報伝達系は EVI1 によるレセプター発現に依存していた。また GM-CSF 非依存性に細胞株が育つことが判り、レセプターの半減期が有意に延長していた。さらに遺伝子発現低下は in vitro、in vivo 実験により白血病発症に関わる事が示唆された。

6. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

低分化胃がんにおいて高頻度に観察される 6p21 領域増幅において、体系的な機能解析の結果から、glycolysis に必要な解毒代謝酵素である GLO1 を新たながん遺伝子として同定した。低分子 GLO1 酵素阻害剤により、胃がん細胞株の増殖抑制を認め、難治胃がんにおける新たな治療標的として期待される。

7. 諸臓器がんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析

ゲノム・エピゲノム解析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オミックス解析を実施することで、複数のがん抑制性マイクロ RNA (TS-miRNA) 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 や、がん関連転写因子 NRF2 を標的とする 4 種の miRNA (miR-507, -634, -450a, -129-5p) を同定した。miR-507 は NRF2 がん化パスイを抑制することで TS-miRNA として機能することを明らかにした。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

1. 肺がんのゲノム情報に基づく治療標的分子の探索

RET 等のがん遺伝子融合陽性がんは、融合に強く依存して発がんしていることが示唆されたことから、特異的なキナーゼ阻害薬を用いた治療が有効であると考えられる。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 年より開始され有望な治療効果がみられはじめている。

2. 肺がんの診断と治療の標的分子の同定

先行論文の結果と合わせて肺小細胞がんの高頻度変異遺伝子として 38 遺伝子を同定した。更に早期がんと進行がん、原発腫瘍と転移巣の比較解析や術前無治療症例など解析により、これらの 38 遺伝子のうち 22 遺伝子の変異はがんの発生や悪性形質の維持に重要であると考えられた。従来の報告通り、TP53 と RB 1 の変異頻度は顕著に高く、これら 2 遺伝子の失活が肺小細胞がんの発生に必須であるという考え方が強く支持された。肺小細胞がんは診断時に転移が高頻度に検出される極めて悪性度の高いがんであるが、転移能の獲得に関与する可能性がある遺伝子として COL11A1 と PLXNA4 が新たに同定された。特に 38 遺伝子のうち 10 遺伝子に関しては変異遺伝子の発現も検出されたので、今後はこれらの遺伝子を中心に生物学的機能解析を行ない、発がん機構の解明を進めるとともに新たな治療法の開発研究も展開して行きたい。

3. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

① ECT2 遺伝子の増幅は初期の肺腺癌の悪性化の段階で起こることが推測される。また ECT2 遺伝子の発現亢進は遺伝子の増幅と関係があり、発現亢進は種々の予後不良因子と相関していた。ECT2 遺伝子は初期浸潤肺腺癌の診断バイオマーカーとして有用であり、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も分子標的治療においても有望なターゲット遺伝子である可能性がある。
② 「つくばヒト組織バイオバンクセンター」は県レベルでのヒトがん試料のバンキングシステムとして最も有効な方法であると考えられる。今後、県内の他のがん診療拠点病院と共同して県レベルでのバンキングシステムの拡大構築を目指す。

4. 腎細胞がんの網羅的ゲノム解析

本研究により、VHL 複合体の機能喪失と HIF の蓄積に関する新しいメカニズムが明らかとなった。VHL 複合体の異常は腎細胞癌の発生においてほぼ必須のイベントであることが分かり、HIF の蓄積という観点からは、VHL および TCEB1 のどちらが変異しても同様の結果が生じることが示された。

5. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

Monosomy 7 の原因遺伝子候補を同定した。EVI1 高発現と mono 7 の発現低下は、有意に白血病発症が早まり、機能的に EVI1 と協調して働くことから、monosomy 7 の原因遺伝子候補であることが示唆される。

6. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

低分化胃がんについては未だ有効な治療法がなく、本研究で同定した GL01 遺伝子は、有望な治療標的となりうる可能性がある。ATL は本邦で重要な疾患であり、ゲノム異常の全体像を解析することで、発症機構や治療法開発に結びつく可能性がある。

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成功しつつある。今後、遺伝子異常で規定される肺発がん経路に基づいた個別化治療が肺腺がんの治療の向上に役立つと考える。

2. 肺がんの診断と治療の標的分子の同定

肺小細胞がん 10%以上の頻度で変異し、且つ、発現している治療標的候補遺伝子として 10 遺伝子を同定した。

3. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

① ECT2 の増幅、発現亢進は初期の肺腺癌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。さらに今後、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ターゲットとした、初期肺腺癌に対する分指標的治療の可能性が期待される。
② 県レベルのがん試料収集活用拠点として「つくばヒト組織バイオバンクセンター」の設立に成功した。

4. 腎細胞がんの網羅的ゲノム解析

VHL に異常を認めない腎細胞癌の一部に、TCEB1 変異を認めた。VHL の不活化と TCEB1 変異は完全に排他的に生じており、両者を合わせると 95%の腎細胞癌に VHL complex の異常を認めた。TCEB1 変異により、VHL complex の機能が喪失し、HIF が蓄積することが明らかとなった。

5. 難治性白血病の多段階発がん機構の解明

難治性 AML の中で Monosomy 7 は重要な白血病の一つである。今回同定した遺伝子の機能解析が進めば、難治性白血病の原因究明と新規治療法の開発に繋がる重要な研究である。

6. 難治がんにおける包括的ゲノム解析

肺がん、胃がんといった難治がんにおける包括的なコピー数解析や RNA シークエンス解析によって、新たな治療標的を含めて、その分子病態の解明に貢献できた。ATL は本邦で重要なウイルス関連腫瘍であり、ゲノム異常の全体像から新たな治療法開発のシーズとなるような分子の同定が期待される。

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) Mizukami T, Shiraishi K, Shimada Y, Ogiwara H, Tsuta K, Ichikawa H, Sakamoto H, Kato M, Shibata T, Nakano T, Kohno T. Molecular mechanisms underlying oncogenic RET fusion in lung adenocarcinoma. *J Thoracic Oncol* 2014, 9(5):622-630.
- 2) Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, Shiraishi K, Sakamoto H, Enari M, Furuta K, Shimada Y, Ogiwara H, Watanabe SI, Nokihara H, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Ishigame T, Schetter AJ, Okayama H, Harris CC, Kim YH, Mishima M, Yokota J, Yoshida T, Kohno T. Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2014, in press.
- 3) Romero OA, Torres-Diz M, Pros E, Savola S, Gomez A, Moran S, Saez C, Iwakawa R, Villanueva A, Montuenga LM, Kohno T, Yokota J, Sanchez-Céspedes M. MAX inactivation in small cell lung cancer disrupts MYC-SWI/SNF programs and is synthetic lethal with BRG1. *Cancer Discov* 2014;4:292-303.
- 4) Kohno T, Tsuta K, Tsuchihara K, Nakaoku T, Yoh K, Goto K. RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy. *Cancer Sci* 2013;104:1396-400.
- 5) Oike T, Ogiwara H, Tominaga Y, Ito K, Ando O, Tsuta K, Mizukami T, Shimada Y, Isomura H, Komachi M, Furuta K, Watanabe S, Nakano T, Yokota J, Kohno T. A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. *Cancer Res* 2013;73:5508-18.
- 6) Akagi I, Okayama H, Schetter AJ, Robles AI, Kohno T, Bowman ED, Kazandjian D, Welsh JA, Oue N, Saito M, Miyashita M, Uchida E, Takizawa T, Takenoshita S, Skaug V, Mollerup S, Haugen A, Yokota J, Harris CC. Combination of protein coding and noncoding gene expression as a robust prognostic classifier in stage I lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2013;73:3821-32.
- 7) 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* 2013;52:802-16.
- 8) 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;37:554-62.
- 9) Otsubo C, Otomo R, Miyazaki M, Matsushima-Hibiya Y, Kohno T, Iwakawa R, Takeshita F, Okayama H, Ichikawa H, Saya H, Kiyono T, Ochiya T, Tashiro F, Nakagama H, Yokota J, Enari M. TSPAN2 Is Involved in Cell Invasion and Motility during Lung Cancer Progression. *Cell Rep* 2014 Apr 9. [Epub ahead of print]
- 10) Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Watanabe M, Nakagama H, Yokota J, Kohno T, Tsuchiya N. Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer. *PLoS One* 2014;9:e92921.
- 11) Ragin C, Obikoya-Malomo M, Kim S, Chen Z, Flores-Obando R, Gibbs D, Koriyama C, Aguayo F, Koshiol J, Caporaso NE, Carpagnano GE, Ciotti M, Dosaka-Akita H, Fukayama M, Goto A, Spandidos DA, Gorgoulis V, Heideman DA, van Boerdonk RA, Hiroshima K, Iwakawa R, Kastrinakis NG, Kinoshita I, Akiba S, Landi MT, Eugene Liu H, Wang JL, Mehra R, Khuri FR, Lim WT, Owonikoko TK, Ramalingam S, Sarchianaki E, Syrjanen K, Tsao MS, Sykes J, Hee SW, Yokota J, Zaravinos A, Taioli E. HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. *Carcinogenesis* 2014 Feb 26. [Epub ahead of print]
- 12) Murata Y, Minami Y, Iwakawa R, Yokota J, Usui S, Tsuta K, Shiraishi K, Sakashita S, Satomi K, Iijima T, Noguchi M. ECT2 amplification and overexpression as a new prognostic biomarker for early-stage lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2014;105:490-7.
- 13) Oike T, Ogiwara H, Nakano T, Yokota J, Kohno T. Inactivating mutations in SWI/SNF chromatin

- remodeling genes in human cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2013;43:849-55.
- 14) 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* 2013;33:2447-57.
 - 15) 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* 2014;33:1640-8.
 - 16) 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.
 - 17) Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Nakatani Y, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M. Diagnosis of Lung Adenocarcinoma in Resected Specimens: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/AmericanThoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137:685-705.
 - 18) Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M. Diagnosis of Lung Cancer in Small Biopsies and Cytology: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137:668-84.
 - 19) 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 Onco* 2013;8:736-43.
 - 20) Kawamura T, Usui J, Kaseda K, Takeda K, Ebihara I, Ishizu T, Iitsuka T, Sakai K, Takemura K, Kobayashi M, Koyama A, Kanemoto K, Sumazaki R, Uesugi N, Noguchi M, Nagata M, Suka M, Yamagata K. Primary membranoproliferative glomerulonephritis on the decline: decreased rate from the 1970s to the 2000s Japan. *Clin Exp Nephrol* 2013;17:248-54.
 - 21) Usui S, Minami Y, Shiosawa T, Iyama S, Sato Y, Noguchi M. Differences in the prognostic implications of vascular invasion between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Lung Cancer* 2013;82:407-12.
 - 22) Thunnissen E, Beliën JA, Kerr KM, Chung JH, Flieder DB, Noguchi M, Yatabe Y, Hwang DM, Lely RJ, Hartemink KJ, Meijer-Jorna LB, Ysao MS. In compressed lung tissue microscopic sections of adenocarcinoma in situ may mimic papillary adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137:1792-7.
 - 23) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet* 2013;45:1293-9.
 - 24) Yoshida K, Sanada M, Ogawa S. Deep sequencing in cancer research. *Jpn J Clin Oncol* 2013;43:110-5.
 - 25) Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shiba N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, Ogawa S, Miyano S. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2013;41:e89.
 - 26) Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, Shimamura T, Sato-Otsubo A, Nagae G, Suzuki H, Nagata Y, Yoshida K, Kon A, Suzuki Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Fujimoto A, Tsunoda T, Morikawa T, Maeda D, Kume H, Sugano S, Fukayama M, Aburatani H, Sanada M, Miyano S, Homma Y, Ogawa S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* 2013;45:860-7.
 - 27) Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet* 2013;45:937-41.
 - 28) Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramoto H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T. Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood* 2013;121:4377-87.
 - 29) Nishimura R, Takita J, Sato-Otsubo A, Kato M, Koh K, Hanada R, Tanaka Y, Kato K, Maeda D, Fukayama M, Sanada M, Hayashi Y, Ogawa S. Characterization of genetic lesions in rhabdomyosarcoma using a high-density single nucleotide polymorphism array. *Cancer Sci* 2013;104:856-64.

- 30) Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Sauntharajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet* 2013;45:942-6.
- 31) Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet* 2013;92:431-8.
- 32) Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koefler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet* 2013;45:1232-7.
- 33) Nakahata S, Ichikawa T, Maneesaay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, Manachai N, Yamakawa N, Hamasaki M, Kitabayashi I, Arai Y, Kanai Y, Taki T, Abe T, Kiyonari H, Shimoda K, Ohshima K, Horii A, Shima H, Taniwaki M, Yamaguchi R, Morishita K. Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. *Nature Comm* 2014;5:3393.
- 34) Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Akagi I, Ino H, Sakakibara Y, Suiko M, Yamamoto I, Okayama A, Morishita K, Kataoka H, Matsuno K: Identification of a bioactive compound against adult T-cell leukemia from bitter melon seeds. *Plants* 2014;3:18-26.
- 35) Yamamura A, Miura K, Karasawa H, Morishita K, Abe K, Mizuguchi Y, Saiki Y, Fukushige S, Kaneko N, Sase T, Nagase H, Sunamura M, Motoi F, Egawa S, Shibata C, Unno M, Sasaki I, Horii A. Suppressed expression of NDRG2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;441:102-7.
- 36) Ikebe E, Kawaguchi A, Tezuka K, Taguchi S, Hirose S, Matsumoto T, Mitsui T, Senba K, Nishizono A, Hori M, Hasegawa H, Yamada Y, Ueno T, Tanaka Y, Sawa H, Hall W, Minami Y, Jeang KT, Ogata M, Morishita K, Hasegawa H, Fujisawa J, Iha H. Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice. *Blood Cancer J* 2013;3:e132.
- 37) Sugie S, Mukai S, Tsukino H, Toda Y, Yamauchi T, Nishikata I, Kuroda Y, Morishita K, Kamoto T. Increased plasma caveolin-1 levels are associated with progression of prostate cancer among Japanese men. *Anticancer Res* 2013;33:1893-7.
- 38) Yamasaki M, Mine Y, Nishimura M, Fujita S, Sakakibara Y, Suiko M, Morishita K, Nishiyama K. Genistein induces apoptotic cell death associated with inhibition of the NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia cells. *Cell Biol Int* 2013;37:742-7.
- 39) 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* 2013;27:1637-49.
- 40) Hosoda F, Arai Y, Okada N, Shimizu H, Miyamoto M, Kitagawa N, Katai H, Taniguchi H, Yanagihara K, Imoto I, Inazawa J, Ohki M, Shibata T. Integrated Genomic and Functional Analyses Reveal Glyoxalase I as a Novel Metabolic Oncogene in Human Gastric Cancer. *Oncogene* 2013, in press.
- 41) Okusaka T, Ojima H, Morizane C, Ikeda M, Shibata T. Emerging drugs for biliary cancer. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2013 Dec 20. [Epub ahead of print]
- 42) Noro R, Honda K, Tsuta K, Ishii G, Maeshima AM, Miura N, Furuta K, Shibata T, Tsuda H, Ochiai A, Sakuma T, Nishijima N, Gemma A, Asamura H, Nagai K, Yamada T. Distinct outcome of stage I lung adenocarcinoma with ACTN4 cell motility gene amplification. *Ann Oncol* 2013;24:2594-600.
- 43) Yoshida A, Shibata T, Tsuta K, Watanabe S, Tsuda H. Inflammatory myofibroblastic tumor of the lung with a novel isoform of PPF1BP1-ALK fusion gene. *Histopathology* 2013;63:881-3.
- 44) Murakami S, Chisima S, Uemoto H, Sakamoto E, Sato T, Kurabe N, Kawasaki Y, Shibata T, Akiyama H, Tashiro F. The male-specific factor Sry harbors an oncogenic function. *Oncogene* 2013 Jul 29. [Epub ahead of print]
- 45) Nakamura H, Tsuta K, Yoshida A, Shibata T, Wakai S, Asamura H, Furuta K, Tsuda H. Aberrant anaplastic lymphoma kinase expression in high-grade pulmonary neuroendocrine carcinoma. *J Clin Pathol*. 2013, 66:705-7
- 46) Suzuki T, Shibata T, Takaya K, Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, Tsuta K, Furuta K, Goto K, Hosoda F, Sakamoto H, Motohashi H, Yamamoto M. Regulatory Nexus of Synthesis and Degradation Deciphers Cellular Nrf2 Expression Levels. *Mol Cell Biol* 2013;33:2402-12.
- 47) Suzuki M, Makinoshima H, Matsumoto S, Suzuki A,

- Mimaki S, Matsushima K, Yoh K, Goto K, Suzuki Y, Ishii G, Ochiai A, Tsuta K, Shibata T, Kohno T, Esumi H, Tsuchihara K. Identification of a lung adenocarcinoma cell line with CCDC6-RET fusion gene and the effect of RET inhibitors in vitro and in vivo. *Cancer Sci* 2013;104:896-903.
- 48) 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;104:543-51.
- 49) Gailhouste L, Gomez-Santos L, Kitagawa N, Kawaharada K, Thirion M, Kosaka N, Takahashi R, Shibata T, Miyajima A, Ochiya T. MiR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells. *Hepatology* 2013;58:1153-65.
- 50) 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;8:e56010.
- 51) Uno M, Saitoh Y, Mochida K, Tsuruyama E, Kiyono T, Imoto I, Inazawa J, Yuasa Y, Kubota T, Yamaoka S. NF- κ B Inducing Kinase, a Central Signaling Component of the Non-Canonical Pathway of NF- κ B, Contributes to Ovarian Cancer Progression. *PLoS One* 2014;9:e88347.
- 52) Takemura K, Kawachi H, Eishi Y, Kitagaki K, Negi M, Kobayashi M, Uchida K, Inoue J, Inazawa J, Kawano T, Board PG. γ -Glutamylcyclotransferase as a novel immunohistochemical biomarker for the malignancy of esophageal squamous tumors. *Hum Pathol* 2014;45:331-41.
- 53) Dobashi Y, Sato E, Oda Y, Inazawa J, Ooi A: Significance of Akt activation and AKT gene increases in soft tissue tumors. *Hum Pathol* 2014;45:127-36.
- 54) Yamamoto S, Inoue J, Kawano T, Kozaki K, Omura K, Inazawa J. The impact of miRNA-based molecular diagnostics and treatment of NRF2-stabilized tumors. *Mol Cancer Res* 2014;12:58-68.
- 55) Low SK, Takahashi A, Ashikawa K, Inazawa J, Miki Y, Kubo M, Nakamura Y, Katagiri T. Genome-wide association study of breast cancer in the Japanese population. *PLoS One* 2013;8:e76463.
- 56) Harazono Y, Muramatsu T, Endo H, Uzawa N, Kawano T, Harada K, Inazawa J, Kozaki K. miR-655 is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFBR2. *PLoS One* 2013;8:e62757.
- 57) Furuta M, Kozaki K, Tanimoto K, Tanaka S, Arie 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;8:e60155.
2. 学会発表
- 1) Kohno T, Tsuta K, Tsuchihara K, Mizukami T, Yoh K, Goto K. RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy. Third AACR-IASLC Joint Conference on the Molecular Origins of Lung Cancer, 2014, January, San Diego, USA.
- 2) Kohno T, Ichikawa H, Tsuta K, Mizukami T, Shimada Y, Kato M, Sakamoto H, Tsuchihara K, Watanabe S, Nokihara H, Goto K, Yokota J, Yoshida T, Shibata T. RET fusion gene: translation to the therapy of lung adenocarcinoma. AACR Annual Meeting 2013, April, Washington DC, USA.
- 3) Yokota J, Iwakawa R, Takenaka M, Tsuta K, Noguchi M, Kohno T. Genome-wide Identification of Genes with Amplification and/or fusion in small cell lung cancer. 15th World Conference on Lung Cancer, 2013, October, Sydney, Australia.
- 4) Minami Y, Murata Y, Iwakawa R, Yokota J, Noguchi M. ECT2 over-expression and gene alteration are associated with the outcome of patients with early-stage lung adenocarcinoma. 15th World Conference on Lung Cancer, 2013, October, Sydney, Australia.
- 5) Sato Y, Maekawa S, Okuno Y, Shiraishi Y, Sato A, Nagae G, Shimamura T, Nagata Y, Yosida K, Sanada M, Kume H, Aburatani H, Miyano S, Homma Y, Ogawa S. Integrative analysis of clear cell renal cell carcinoma, AACR 104th Annual Meeting, 2013.
- 6) Sato Y, Maekawa S, Okuno Y, Shiraishi Y, Sato A, Nagae G, Shimamura T, Nagata Y, Yosida K, Sanada M, Kume H, Aburatani H, Miyano S, Ogawa S, Yukio Homma Y. Integrative analysis of clear cell renal cell carcinoma, 28th Annual EAU Congress, 2013.
- 7) Nakahata S, Morishita K. 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. 2013, June, Montreal, Canada.
- 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) 2013/6/14 特許第 5288456 号；発明者、稲澤譲治、井本逸勢、中村恵理奈、津田均；特許名、口腔扁平上皮癌の検出方法；2008/8/8 特願 2008-205138；出願人、東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社；特許公開 2010-035525
- 3) 2013/8/2 特許第 5331404 号；発明者、稲澤譲治、井本逸勢、林深、会津善紀；特許名、先天性異常症の染色

体欠失の検出方法 ; 2008/8/1 特願 2008-199541 ; 出願人、東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エル、富士フイルム株式会社 ; 特許公開 2010-035447

- 4) 2013/11/27 特許第 2253720 号 ; 発明者、稲澤譲治、井本逸勢、小松周平、小崎健一、津田均 ; 特許名、食道癌の検出方法及び抑制方法 ; 2010/3/25 出願番号 10157735.1 ; 出願人、東京医科歯科大学、富士フイルム株式会社 ; 特許公開 EP2253720
- 5) 2013/7/17 ZL200980130226.0 ; 発明者、稲澤譲治、井本逸勢、林深、会津善紀 ; 特許名、先天性異常症の染色体欠失の検出方法 ; 2009/7/30 出願番号 PCT/JP2009/063900 ; 出願人、東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エル、富士フイルム株式会社 ; 特許公開 W02010/013842

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）
（総括・分担）研究報告書

肺腺がん高危険度群の診断・予防法開発

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

全エクソーム解析により、RET, ALK, ROS1 がん遺伝子融合陽性、及び陰性の肺腺がんの変異遺伝子の比較解析を行った。その結果、陽性症例では、TP53 遺伝子をはじめとするがん関連遺伝子の異常の頻度や総遺伝子の変異頻度が少ないことが分かった ($P < 0.001$ by t-test)。この結果は、遺伝子異常で規定される肺発がん経路に基づいた個別化治療が、肺腺がんの治療の向上に役立つことを示している。全ゲノム関連解析で、肺腺がん感受性遺伝子として同定された遺伝子 BPTF に関し、タンパク質短縮変異 2 例を含む 7 例 (7/200; 3.5%) で変異が見られた。今回の結果は BPTF 遺伝子が、がん抑制的に機能することを示している。

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。

（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。

C. 研究結果

全エクソーム解析により、RET, ALK, ROS1 がん遺伝子融合陽性、及び陰性の肺腺がんの変異遺伝子の比較解析を行った。その結果、陽性症例では、TP53 遺伝子をはじめとするがん関連遺伝子の変異頻度が小さいことが分かった ($P < 0.001$ by t-test)。また、総遺伝子の変異頻度についても同様であった ($P < 0.001$ by t-test)。以上の結果から、がん遺伝子融合陽性がんでは、融合に強く依存して発がんするという発がん経路、また、がん遺伝子異常陰性がんではクロマチン制御遺伝子群の失活を一つの原因とする発がん経路が構築された。

BPTF 遺伝子に関してはタンパク質短縮変異 2 例を含む 7 例 (7/200; 3.5%) で変異が見られた。この遺伝子は、全ゲノム関連解析で、肺腺がん感受性遺伝子として同定された遺伝子であり、正常肺組織では危険リスクからの mRNA 発現量が低いことが昨年までの分担研究者の報告で明らかにされている。今回の結果は BPTF 遺伝子が、がん抑制的に機能することを示している。

D. 考察

RET 等のがん遺伝子融合陽性がんは、融合に強く依存して発がんしていることが示唆されたことから、特異的なキナーゼ阻害薬を用いた治療が有効であると考えられる。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 年より開始され有望な治療効果がみられはじめています。今後、阻害剤に対する治療耐性の問題が浮上してくると考えられ、EGFR, ALK 阻害剤に対する耐性ととも、耐性獲得の分子機序の解明や耐性克服手法の開発を目指した研究が必要である。現在、国内外の研究者とともに当該研究の準備を進めている。

がん遺伝子異常陰性がんでは、SWI/SNF クロマチン制御遺伝子の失活変異を利用した合成致死治療法の開発が有望であると考えます。そこで、製薬企業との共同研究により、SWI/SNF クロマチン制御遺伝子失活がんに対する治療法の開発を開始した。

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可能となつてきた。今後、遺伝子異常で規定される肺発がん経路に基づいた個別化治療が肺腺がんの治療の向上に役立つと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

○ Mizukami T, Shiraishi K, Shimada Y, Ogiwara H, Tsuta K, Ichikawa H, Sakamoto H, Kato M, Shibata T, Nakano T, Kohno T. Molecular mechanisms underlying oncogenic RET fusion in lung adenocarcinoma. *J Thoracic Oncol.* 2014, 9(5):622-630.

Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, Shiraishi K, Sakamoto H, Enari M, Furuta K, Shimada Y, Ogiwara H, Watanabe SI, Nokihara H, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Ishigame T, Schetter AJ, Okayama H, Harris CC, Kim YH, Mishima M, Yokota J, Yoshida T, Kohno T. Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2014, in press.

Romero OA, Torres-Diz M, Pros E, Savola S, Gomez A, Moran S, Saez C, Iwakawa R, Villanueva A, Montuenga LM, Kohno T, Yokota J, Sanchez-Cespedes M. MAX inactivation in small-cell lung cancer disrupts the MYC-SWI/SNF programs and is synthetic lethal with BRG1. *Cancer Discovery*, 4(3):292-303, 2014.

○ Kohno T, Tsuta K, Tsuchihara K, Nakaoku T, Yoh K, Goto K. RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy. *Cancer Sci.* 2013, 104 (11): 1396-1400.

Oike T, Ogiwara H, Tominaga Y, Ito K, Ando O, Tsuta K, Mizukami T, Shimada Y, Isomura H, Komachi M, Furuta K, Watanabe SI, Nakano T, Yokota J, Kohno T. A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. *Cancer Res.* 2013, 73(17):5508-5518.

Akagi I, Okayama H, Schetter AJ, Robles AI, Kohno T, Bowman ED, Kazandjian D, Welsh JA, Oue N, Saito M, Miyashita M, Uchida E, Takizawa T, Takenoshita S, Skaug V, Mollerup S, Haugen A, Yokota J, Harris CC. Combination of Protein Coding and Noncoding Gene Expression as a Robust Prognostic Classifier in Stage I Lung Adenocarcinoma.

Cancer Res. 2013, 73(13):3821-3832.

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.* 2013, 52(9):802-16.

○ 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.

2. 学会発表

Kohno T, Tsuta K, Tsuchihara K, Mizukami T, Yoh K, Goto K. RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy. *17th AACR-IASLC Joint Conference on the Molecular Origins of Lung Cancer*, 2014, Jan, San Diego

Kohno T, Ichikawa H, Tsuta K, Mizukami T, Shimada Y, Kato M, Sakamoto H, Tsuchihara K, Watanabe S, Nokihara H, Goto K, Yokota J, Yoshida T, Shibata T. RET fusion gene: translation to the therapy of lung adenocarcinoma. *AACR Annual Meeting 2013*, April, Washington DC, 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：PCT/JP2012/069799

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・ゲノム生物学研究分野・客員研究員

研究要旨

肺小細胞がんでは10%以上の頻度で変異し、且つ、発現している治療標的候補遺伝子としてTP53とRB1を含む10遺伝子を同定した。肺小細胞がんの転移に関与する遺伝子としてCOL11A1とPLXNA4の2遺伝子を同定した。3つのMYC family 遺伝子を共通に抑制できる Omomyc 蛋白質の発現誘導による肺小細胞がん細胞の増殖抑制法を開発した。

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。今年度は肺がんの中で最も予後不良な肺小細胞がんを対象として、1)全エクソームシーケンス解析、2)MYC family 遺伝子群 (MYC, MYCL1, MYCN) の生物学的機能解析を行い、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)全エクソームシーケンス解析

1 µg の DNA をもとに TruSeq DNA Sample Prep Kit v2 (Illumina) を用いて DNA 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に断片化を行い、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 DNA 断片を回収し、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 µg 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、Row data を Genomon パイプラインによってヒトゲノム (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置換割合が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ピングを行った。

2)MYC family 遺伝子群 (MYC, MYCL1, MYCN) の生物学的機能解析

MYC family 遺伝子群の増幅及び過剰発現している肺小細胞がん細胞株と増幅していない細胞株を合わせて 14 株準備し、まず MYC family 遺伝子群の発現を Western blot 法で確認した。次に、3つの MYC の機能を dominant negative に抑制できる Omomyc lentivirus inducible vector を感染させて Pueromycin 耐性細胞を選別した。次に Tetracyclin による Omomyc 発現誘導の有無による細胞の増殖動態、形態変化について観察した。増殖抑制が得られた細胞株に関しては、さらにその機能を明らかにするため、FACS を用いた細胞周期解析、Western blot 法を用いた様々な蛋白質の発現変動解析を行なった。

(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)全エクソームシーケンス解析

38 例の肺小細胞がん患者から得られた 44 腫瘍細胞を対象とした全エクソームシーケンス解析を行い、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が 5,669 遺伝子上に総計 9,729 個検出された (平均 244.2 個/症例、平均 7.4 個/Mb)。塩基置換は G/C>T/A の頻度が最も高く、喫煙によって惹起される変異が多いことが確認された。それらのうち 38 例で 10%以上の頻度で変異が検出されたのは 263 遺

伝子であった。一方、2報の先行論文 (Peifer et al. Nat Genet 2012, Rudin et al. Nat Genet 2012) においては、それぞれ 331 個、230 個の遺伝子が 10% 以上の頻度で変異している遺伝子として同定されている。そこで、次に3つの研究を合わせた 95 症例で共通に 10%以上の頻度で変異している遺伝子を探索した結果、38 遺伝子が同定された。これらの遺伝子は解析法や解析した検体の地理的な違いを考慮しても共通に変異が検出されており、肺小細胞がんが高頻度に変異している遺伝子と考えられた。

そこで、これら 38 遺伝子を中心に臨床病理学的因子との関連性を検討した。その結果、38 遺伝子中 22 遺伝子の変異は早期がん (I 期) でも進行がん (II~IV 期) でも、原発腫瘍、転移巣のいずれにおいても、治療前症例においても検出され、肺小細胞がんの発生および悪性形質の維持に必須と考えられた。また、38 遺伝子のうち 10 遺伝子は変異アレルの発現が RNA sequencing で確認され、最も有力な治療標的遺伝子の候補と考えられた。最も高頻度に発現している変異が検出されたのは、従来の報告通り、TP53 と RB 1 であった。一方、COL11A1 と PLXNA4 の 2 遺伝子は原発腫瘍より転移巣で高頻度に変異が検出され、発がんではなく、がんの悪性化、がん細胞における転移能の獲得に寄与している可能性が強く示唆された。

2) MYC family 遺伝子群 (MYC, MYCL1, MYCN) の生物学的機能解析

昨年度までの全ゲノムコピー数解析では MYC family 遺伝子群 (MYC, MYCL1, MYCN) の増幅が相互排他的に約 20%の頻度で起こっていることを確認した。現在までに同定されている活性的な遺伝子異常としては最も頻度が高く、治療標的の最有力候補遺伝子群である。そこで、これらの遺伝子増幅の生物学的意義を明らかにするため、遺伝子産物の活性阻害による肺小細胞がん細胞株の増殖や形質の変化を検討した。Omyc 蛋白質の発現を誘導すると、MYC 遺伝子増幅細胞株では増殖抑制に加えて形態変化が生じた。一方、MYCL1 遺伝子増幅細胞株では増殖抑制は同様に起こるものの形態変化は起こらなかった。増殖抑制の機構としてはアポトーシスの誘導ではなく、G1 期における細胞周期の停止が観察された。MYC 遺伝子増幅細胞株では形態変化も伴っており、細胞老化あるいは分化も起こっている可能性があり、更なる解析を進めている。

D. 考察

2 課題の結果について、それぞれ考察する。

1) 全エクソームシーケンズ解析

先行論文の結果と合わせて肺小細胞がんの高頻度変異遺伝子として 38 遺伝子を同定した。更に早期がんと進行がん、原発腫瘍と転移巣の比較解析や術前無治療症例など解析により、これらの 38 遺伝子のうち 22 遺伝子の変異はがんの発生や悪性形質の維持に重要であると考えられた。従来の報告通り、TP53 と RB 1 の変異頻度は顕著に高く、これら 2 遺伝子の失活が肺小細胞がんの発生に必須であるという考え

方が強く支持された。肺小細胞がんは診断時に転移が高頻度に検出される極めて悪性度の高いがんであるが、転移能の獲得に関与する可能性がある遺伝子として COL11A1 と PLXNA4 が新たに同定された。特に 38 遺伝子のうち 10 遺伝子に関しては変異遺伝子の発現も検出されたので、今後はこれらの遺伝子を中心に生物学的機能解析を行ない、発がん機構の解明を進めるとともに新たな治療法の開発研究も展開して行きたい。

2) MYC family 遺伝子群 (MYC, MYCL1, MYCN) の生物学的機能解析

肺小細胞がんは 3 つの MYC family 遺伝子群が相互排他的に増幅しているユニークながんであり、MYC family の機能抑制は有力な治療法の候補である。そこで、3 つの遺伝子産物に対して共通の抑制効果を有すると考えられる Omyc 蛋白質の発現誘導による肺小細胞がん細胞株の増殖や形態の変化を検討した。その結果、G1 期における細胞周期停止を伴った増殖抑制が観察され、治療法になり得ることが確認された。今後はその特異性を明確にするとともに、増殖抑制に必須な下流遺伝子を同定し、最も有効な増殖制御法を確立していきたい。

E. 結論

肺小細胞がんでは 10%以上の頻度で変異し、且つ、発現している治療標的候補遺伝子として 10 遺伝子を同定した。3 つの MYC family 遺伝子を共通に抑制できる Omyc 蛋白質の発現誘導による肺小細胞がん細胞の増殖抑制法を開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, Shiraishi K, Sakamoto H, Enari M, Furuta K, Shimada Y, Ogiwara H, Watanabe SI, Nokihara H, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Ishigame T, Schetter AJ, Okayama H, Harris CC, Kim YH, Mishima M, Yokota J, Yoshida T, Kohno T. Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. Clin Cancer Res 2014 Apr 11. [Epub ahead of print]
- 2) Otsubo C, Otomo R, Miyazaki M, Matsushima-Hibiya Y, Kohno T, Iwakawa R, Takeshita F, Okayama H, Ichikawa H, Saya H, Kiyono T, Ochiya T, Tashiro F, Nakagama H, Yokota J, Enari M. TSPAN2 Is Involved in Cell Invasion and Motility during Lung Cancer Progression. Cell Rep 2014 Apr 9. [Epub ahead of print]
- 3) Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Watanabe M, Nakagama H, Yokota J, Kohno T, Tsuchiya N. Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer. PLoS One 2014;9:e92921.
- 4) Ragin C, Obikoya-Malomo M, Kim S, Chen Z,

- Flores-Obando R, Gibbs D, Koriyama C, Aguayo F, Koshiol J, Caporaso NE, Carpagnano GE, Ciotti M, Dosaka-Akita H, Fukayama M, Goto A, Spandidos DA, Gorgoulis V, Heideman DA, van Boerdonk RA, Hiroshima K, Iwakawa R, Kastrinakakis NG, Kinoshita I, Akiba S, Landi MT, Eugene Liu H, Wang JL, Mehra R, Khuri FR, Lim WT, Owonikoko TK, Ramalingam S, Sarchianaki E, Syrjanen K, Tsao MS, Sykes J, Hee SW, Yokota J, Zaravinos A, Taioli E. HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. *Carcinogenesis* 2014 Feb 26. [Epub ahead of print]
- 5) Murata Y, Minami Y, Iwakawa R, Yokota J, Usui S, Tsuta K, Shiraishi K, Sakashita S, Satomi K, Iijima T, Noguchi M. ECT2 amplification and overexpression as a new prognostic biomarker for early-stage lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2014;105:490-7.
- 6) Romero OA, Torres-Diz M, Pros E, Savola S, Gomez A, Moran S, Saez C, Iwakawa R, Villanueva A, Montuenga LM, Kohno T, Yokota J, Sanchez-Cespedes M. MAX inactivation in small cell lung cancer disrupts MYC-SWI/SNF programs and is synthetic lethal with BRG1. *Cancer Discov* 2014;4:292-303.
- 7) Oike T, Ogiwara H, Nakano T, Yokota J, Kohno T. Inactivating mutations in SWI/SNF chromatin remodeling genes in human cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2013;43:849-55.
- 8) Oike T, Ogiwara H, Tominaga Y, Ito K, Ando O, Tsuta K, Mizukami T, Shimada Y, Isomura H, Komachi M, Furuta K, Watanabe S, Nakano T, Yokota J, Kohno T. A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. *Cancer Res* 2013;73:5508-18.
- 9) 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* 2013;52:802-16.
- 10) Akagi I, Okayama H, Schetter AJ, Robles AI, Kohno T, Bowman ED, Kazandjian D, Welsh JA, Oue N, Saito M, Miyashita M, Uchida E, Takizawa T, Takenoshita S, Skaug V, Mollerup S, Haugen A, Yokota J, Harris CC. Combination of protein coding and noncoding gene expression as a robust prognostic classifier in stage I lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2013;73:3821-32.
- 11) 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* 2013;33:2447-57.
- 12) 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* 2014;33:1640-8.
- 13) 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.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん研究事業）
分担研究報告書

肺がんの治療時期や治療法の選択に有用な分子病理学的分類法の確立

研究分担者 野口雅之 筑波大学大学院 基礎医学系病理学 教授

研究要旨：

① 3q26 領域における遺伝子増幅に関する研究

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 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を規定する予後因子であることを明らかにした。

② ヒト組織研究における試料提供体制の確立

ヒト組織を用いた研究の活性化のためにどのような材料保存、供給体制が必要かを検証し、最終的に『つくばヒト組織バイオバンクセンター』を筑波大学附属病院内部局として立ち上げる事に成功した。

A. 研究目的

①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し、肺腺癌の発生と増悪に関与する遺伝子異常を探索した。

②一方で上記のようなヒトがんの発生悪性を研究するにはヒト試料を用いた研究が必須である。しかし現在日本においてはヒト組織の利用は研究機関単位で行われており、自由に研究利用する事の出来る機関もシステムも存在しない。そこで県レベルでの組織バンキングシステムを構築すること

を目的に研究を行った。

それぞれ①、②について分けて報告する。

①3q26領域における遺伝子増幅に関する研究

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で承認を受けた。

筑波大学附属病院症例で上皮内肺腺癌（野口分類 TypeA, 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謙治博士が開発した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。

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。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、発現を免疫染色にて比較検討した。抗体はECT2(1946562, MILLIPORE), EIF5A2(HPA029090, SIGMA), PIK3CA(C73F8, Cell Signaling Technology), TNFSF10(k-18, Santa Cruz)を用いた。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。

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2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。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。

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。

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 U133Plus2.0 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

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。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。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。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。免疫染色結果と病理学的因子や予後について関連を調べたところ、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。ECT2 遺伝子発現は腺癌細胞においては通常存在する核内のみならず細胞質内にも認められ、この発現陽性症例も同様に肺腺癌の予後などに関係していた。

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。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。さらに早期肺腺癌 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。

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、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、通常は核内に存在し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。一方、遺伝子短縮したoncogenicなECT2は細胞質に移行し、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、核内染色性以外にも細胞質染色性を評価しても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の、特に細胞質内発現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。

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、3q26領域に存在する遺伝子の中でもECT2の核内および細胞質内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。

② ヒト組織研究における試料提供体制の確立

ヒトがん研究を推進させるためにはヒト組織を用いた研究が自由に行える環境を整

える事が必須である。そこで本研究ではヒト組織バイオバンクシステムの構築を行った。しかし国レベルでのバンキングシステムの構築は現時点では極めて困難であると考え、本研究では『県』レベルでのバンキングシステムの構築を目指した。筑波大学の位置する茨城県においてバンキングシステムを構築するためにまず、別図に示すような「つくばヒト組織バイオバンク」組織を構築した。試料の提供は筑波大学附属病院の外科系各診療グループに依頼して手術、生検の残余検体をバンキングした。また、ゲノム指針に則って試料を収集するための必要細則、書類などを整備した。現在呼吸器外科、消化器外科、泌尿器科、乳腺甲状腺外科などの協力を得て1200例以上の症例がバンキングされている。平成25年11月に正式に筑波大学附属病院の一つの部局として独立した。

今後、茨城県における地域医療貢献のための病理診断システム（つくばヒト組織診断センター）の協力を得て、茨城県下のがん診療拠点病院を中心に検体の収集病院を拡大し、将来的には茨城県におけるがん組織を網羅的に保存できるバンクを目指していきたい。さらにこのシステムを全国に拡張できれば国レベルでのバンキングシステムがスムーズに構築できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson