

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

肺小細胞がんが 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關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チングを行った。

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、肺小細胞がんを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。最も高頻度で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。Omomyc 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ス解析

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、転移能の獲得に關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 Omomyc 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行きたい。

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 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。

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, 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]

- 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, Que 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