

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

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

胃がん検体における統合ゲノム解析の結果、新規代謝関連がん遺伝子として GLO1 遺伝子を同定した。メタボローム解析の結果から、がん細胞において GLO1 遺伝子は解糖系・ペントースリン酸経路・TCA 回路に影響を与えることが分かり、新たながん代謝標的分子候補と考えられる。EGFR/KRAS/ALK 異常全て陰性症例の解析から新たに EZR-ROS1 融合遺伝子の同定に成功した。EZR-ROS1 融合遺伝子はがん遺伝子としての能力を有し、それは低分子 ROS1 阻害剤によって抑制された。更に ROS1 融合遺伝子による世界で初めてのモデル動物の作製にも成功した。低分化胃がん検体における RNA シークエンス解析を行い、治療標的の可能性のあるキナーゼ融合遺伝子を複数同定した。成人 T 細胞性リンパ腫 10 症例について、全ゲノム解読によるゲノム異常探索を進め、HTLV 遺伝子の挿入部位等について検索を行った。

A. 研究目的

多段階発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、新型シークエ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網羅的な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

1) 胃がんにおける統合的ゲノム解析に関する研究

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。

2) 肺がん・胃がんにおける新規融合遺伝子探索と臨床応用に関する研究

難治固形がんである進行肺がん、低分化胃がん検体から RNA を抽出し、高速シークエンサーを用いて全トランスクリプトーム解読を行なう。更に当研究室で独自に開発し、すでに KIF5B-RET 融合遺伝子同定に実績のあるアルゴリズムを用いて、これらのがんにおける新規融合遺伝子の同定

を行なう。同定した遺伝子については RTPCR による確認後、NIH3T3 細胞へ導入し、軟寒天コロニーアッセイや免疫不全動物への移植実験、モデル動物作製によってがん遺伝子としての活性について検討した。更に未承認薬を含めた阻害剤を用いた増殖抑制実験を施行し、新たな分子標的治療への応用について検討した。

3) 成人 T 細胞性リンパ腫におけるゲノム異常の探索に関する研究

国立がん研究センターにて治療された成人 T 細胞性リンパ腫について、全ゲノム解読による体細胞ゲノム異常探索を進めた。

（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) 胃がんにおける統合的ゲノム解析

163 例の胃がん検体におけるコピー数解析の結果 ERBB2 に続いて増幅頻度の多い 6p21 領域に焦点を絞り、遺伝子発現、機能解析等から 6 つの遺伝子まで絞り込む事ができた。中でも GLO1 遺伝子は最も強い造腫瘍能を示し、また近傍の遺伝子発現増加と協調的な作用を示した。メタボローム解析の結果から、がん細胞において GLO1 遺伝子は解糖系・ペントースリン酸経路・TCA 回路に影響を与えることが分かった。

2) 肺がん・胃がんにおける新規融合遺伝子探索

これまでの国立がん研究センターの肺がん症例の検討から EGFR/KRAS 変異, ALK 融合遺伝子はお互い相互排他的であることが判明している。更に新たな融合遺伝子探索を目指し、既知のドライバー異常を持たない症例を濃縮し、RNA シークエンス解析を施行した。7 例の EGFR/KRAS/ALK 異常全て陰性症例の解析から EZR-ROS1 という新規融合遺伝子の同定に成功した。EZR-ROS1 融合遺伝子は NIH3T3 細胞に導入することで軟寒天コロニー形成、免疫不全動物皮下移植での腫瘍形成を示し、がん遺伝子としての能力を有し、これらの形質は低分子 ROS1 阻害剤によって抑制された。更に肺がんの発生への寄与について検討するために、肺胞上皮特異的プロモーターの発現制御下で EZR-ROS1 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製した所、無数の肺腺がんの発生を認め、ROS1 融合遺伝子による世界で初めてのモデル動物の作製にも成功した。

低分化胃がん検体 30 症例について同様に RNA シークエンス解析を行い、治療標的の可能性があるキナーゼ融合遺伝子を複数同定した。

3) 成人 T 細胞性リンパ腫におけるゲノム異常探索

国立がん研究センターにて治療された成人 T 細胞性リンパ腫 10 症例について、全ゲノム解読によるゲノム異常探索を進め、HTLV 遺伝子の挿入部位や新規突然変異について検索を行った。

D. 考察

1) 難治がん臨床検体における新たなゲノム異常・分子マーカー探索

GLO1 遺伝子は解糖系の有害な副産物であるメチルグルコサールの分解に必須であり、GLO1 の活性上昇はがん細胞における特徴的な代謝形式として知られるワールブルグ効果の必要条件であると考えられる。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 GLO1 遺伝子は、代謝経路を標的とした有望な治療標的となりうる可能性がある。肺がんでは新たに同定した EZR-ROS1 融合遺伝子は、低分子 ROS1 阻害剤に対する反応が観察されることから、分子治療の標的として有望であり、分子診断による肺がん個別化医療への貢献が期待される。

2) 高速シークエンサー技術を導入したがんゲノム

解析

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。本研究では、新型シークエンサー等の新技术を積極的に導入し、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、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して、症例の集積並びに解析を進めた。これまでの解析の結果、胃がん並びに肺がんにおいて治療標的となりうるゲノム異常やバイオマーカー候補が同定できた。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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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 GLO1 in Human Gastric Cancer. *Oncogene*, 2014, in press.
- Yoshida A, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Asamura H, **Shibata T**, Furuta K, Kohno T, Kushima R. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol*, 2013, in press.
- 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, Chromosome and Cancer*, 2013, 52:802-16.
- Suzuki T, **Shibata T**, Takaya K, Shiraiishi 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. *Molecular and Cellular Biology*, 2013, 33:2402-12.
- 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.

- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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(2):e56010.
- 9) 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.

2 . 学会発表

H . 知的財産権の出願・登録情報
なし