

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）  
総括研究報告書

国際協調に基づく日本人難治がんゲノムデータベースの構築  
（国際がんゲノムコンソーシアム研究）

研究代表者 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

本研究グループが主体となった国際共同研究により 600 例を超える肝がんゲノム解読データを集積・解析することで、世界最大の肝がんゲノム解析研究を達成し、新たな治療標的を含めた包括的な肝がんゲノム解読研究を進めた。とりわけ TERT 遺伝子の活性化が 70%以上の症例で観察されたことから、TERT 遺伝子の異常を標的とした早期診断や治療開発が肝がんにおいて極めて重要であることが明らかとなった。希少かつ難治がんである胆道がんにおいて治療標的として有望な FGFR2 融合遺伝子、びまん性胃癌において高頻度に変異が生じている分子を新たに発見した。国際がんゲノムコンソーシアムにおける共同研究として、30 種類のがん、7000 症例における体細胞変異ピックデータを解析することで、20 種類を超える特徴的な変異パターンの存在を発見し、発がん要因との関連について同定した。

A. 研究目的

最新のゲノムシーケンス解析技術を駆使し、日本人に特徴的かつ健康対策上重要な固形がん（肝がん・胆道がん・低分化胃癌）におけるがんゲノム・エピゲノム異常を包括的・統合的に解析し、疫学的因子との関連や新たな治療標的の同定を進める。国際がんゲノム解析共同体に参加し、その標準化手順に従ってがんゲノム解析データを公開し、国際貢献を目指す。微小検体解析技術等の新技術開発を進め、新たな分子診断・治療法開発・実用化を目指す。

B. 研究方法

1. がん全エクソンシーケンス

413 例の肝がん症例並びに同一患者の非腫瘍肝臓から DNA を抽出し、SureSelectXT Human All Exon V4 Kit を用いて、エクソン領域を濃縮後、Illumina HiSeq2000 によって、少なくとも x100 以上のカバー率でシーケンス解読を行った。独自に構築したアルゴリズムを用いて、体細胞変異の同定、コピー数変化・腫瘍含有率を算出し、腫瘍量に応じた補正を加え、腫瘍内における変異アレル頻度の算出を行った。体細胞変異データは、国際がんゲノムコンソーシアムのデータベースに登録し、その情報を公開した。

2. がんトランスクリプトーム解読

KRAS/BRAF 変異を有しない胆道がん臨床検体（8 例）から RNA を抽出し cDNA を合成後、同様に Illumina HiSeq2000 を用いて全転写産物のシーケンス解読を行った。肺がん融合遺伝子同定で実績のあるアルゴリズムを用いて、融合遺伝子の検出、mRNA 並びに非コード RNA の発現変化、異常スプライシングなどを網羅的に検出した。

更に発見した FGFR2 融合遺伝子を NIH3T3 細胞に導入し、軟寒天内コロニー形成や免疫不全マウスへの

移植実験によってがん遺伝子としての活性を測定した。樹立した細胞株を用いて、低分子 FGFR2 阻害剤添加による in vitro における増殖抑制を測定した。

3. がんゲノム情報解析

6 種類の体細胞塩基置換 (T>G/A>C, T>C/A>G, T>A/A>T, C>T/G>A, C>A/G>T, C>G/G>C) を、更にその前後の塩基 (T, C, G, A) の情報を加味することで、96 (=4x6x4) 種類のマトリックスに分類し、主成分解析、非負値行列因子分解等によって解析し、変異パターンの抽出や、臨床情報との相関について検討を行った。変異・コピー数異常データを統合し、分子経路ごとの濃縮といった pathway 解析を行い、重要な分子経路の同定を進めた。

（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承認を得た上で研究を進めた。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した。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った。

C. 研究結果

1) 600 例を超える肝がんのゲノム解析

日本人肝がん症例 413 例並びに米国人肝がん症例 90 例（米国ペイラー医科大学との共同研究）の合計 503 例について全エクソーム解読を行い、体細胞突然変異、コピー数異常、B 型肝炎ウイルスゲノム挿入部位を包括的に同定した。その結果、TERT 遺伝子異常

(プロモーター変異、遺伝子増幅、TERT 遺伝子座への B 型肝炎ウイルスゲノム挿入)を 70%以上の症例で認めた。既知の TP53, WNT 経路、クロマチンリモデリング分子群に加えて、mTOR 阻害剤の標的として有望な TSC1/2, HGF 経路の活性化を制御するプロテアーゼである Tmprss13、更に全く新しい機能グループとして代謝経路制御分子群 (G6PC, ADH1B 等)の異常を発見した。

更に米国がんゲノムプロジェクト(TCGA)と共同研究を進め、米国肝がん 105 例のデータを追加し、合計 608 例の肝がんゲノムデータを集積・解析することで、特徴的な体細胞塩基置換パターンが、ウイルスの種類ではなく、人種の違い(日本人、白人、米国在住アジア系)と強く相関することを世界で初めて発見した。

## 2) 胆道がんにおける新規キナーゼ融合遺伝子の発見と臨床開発の促進

希少がんでありかつ難治がんであるため、これまで有効な治療法の開発が進んでいなかった胆道がんについて、RNA シークエンスを行ない、網羅的な融合遺伝子探索を行った。その結果、治療標的として有望な FGFR2-AHCYL1, FGFR2-BICC1 という新たなキナーゼ融合遺伝子を肝内胆管がんの約 15%の症例で同定した。これらの融合遺伝子は in vitro 並びに in vivo において、がん遺伝子としての活性を示し、更に低分子 FGFR 阻害剤によって増殖抑制を認めた。現在複数の製薬会社が FGFR 阻害剤の臨床試験を進めており、胆道がんにおける臨床開発を促進するために、国立がん研究センター中央病院肝胆膵内科と共に全国レベルの多施設スクリーニング体制 (BT-SCRUM) の構築を進めた。

## 3) 低分化胃がんにおける新規ゲノム異常の同定

低分化胃がんのゲノム解析に関する予備的検討として 30 例のエクソーム解析を実施し、更に追加の低分化胃がん 57 症例についてターゲットシーケンス解析を実施したところ、高頻度 (22/87)で変異を来す新規治療標的分子を同定した。本遺伝子変異は高分化型の腸型胃癌 51 症例には検出されず、びまん性胃癌に特徴的な変異であると思われた。変異を有する細胞株に対して当該分子 siRNA によるノックダウンを行なった結果、コントロール群と比較して約 75%の細胞増殖抑制効果が認められた。

## 4) 横断的がんゲノム変異パターンの解析

国際がんゲノムコンソーシアムにおける共同研究として、30 種類のがん、7000 症例における体細胞変異ビックデータを解析することで、20 種類を超える特徴的な変異パターンの存在を発見した。これらの約半数は、加齢、喫煙、DNA ミスマッチ異常、BRCA1 異常といった発がん要因と相関することが明らかとなり、がんゲノム解析と発がん因子との密接な関連を解明した。残りの置換パターンは原因が未知であるため、こうした解析から新たな発がん要因の同定と予防研究への展開が期待される。

## D. 考察

### 1) 包括的な肝がんゲノム異常解析

本研究グループが主体となった国際共同研究により 600 例を超える肝がんゲノム解読データを集積・解析することで、現時点で最大の肝がんゲノム解析研究を達成し、新たな治療標的を含めた包括的な肝がんゲノム解読研究を進めた。とりわけ TERT 遺伝子の活性化が 70%以上の症例で観察されたことから、TERT 遺伝子の異常を標的とした早期診断や治療開発が肝がんにおいて極めて重要であることが明らかとなった。

### 2) 胆道がんにおける新規治療標的の同定

希少かつ難治がんである胆道がんにおいて FGFR2 融合遺伝子を新たに発見した。FGFR2 融合遺伝子はがん遺伝子としての活性を呈し、かつ低分子 FGFR2 阻害剤による増殖抑制を示すことから、治療標的として有望と考えられる。現在 FGFR2 融合遺伝子を対象とした分子診断並びに臨床試験を目指した臨床研究を開始している。

### 3) 低分化胃がんにおける新規ゲノム異常の同定

予後不良とされるびまん性胃癌において高頻度に変異が生じている分子が同定されたことにより、関与する増殖シグナルを標的とする治療薬の開発が期待されると共に、変異の有無と既存治療法の奏功性との関連についても研究の展開が期待される。

### 4) がん種横断的な塩基置換解析と発がん研究への展開

がんゲノムビックデータを解析することで、体細胞塩基置換における主要なパターンの同定と発がん要因との関連について研究を進める事ができた。今後こうしたデータと、様々な臨床背景との解析によって、新たな発がん要因の同定や効果的ながん予防研究を推進するための重要な情報基盤が出来上がっていくと期待される。

## E. 結論

600 例を超える肝がんゲノム解読データから TERT 遺伝子を含み、診断・治療法の開発において有望な遺伝子を網羅的に同定することができた。更に分子経路解析等新たな手法によって、肝がんにおける分子ネットワークの解明に一步近づく事ができた。今後、ゲノム変異・発現データに加え、エピゲノム異常データを追加することで、より統合的な分子解析を進める。TERT 遺伝子の異常を標的とした早期診断や治療開発が肝がんにおいて極めて重要であり、臨床開発に乗り出す。

難治がんである胆道がんにおける FGFR2 融合遺伝子並びに低分化胃がんにおける高頻度新規ゲノム異常の発見は、今後の該当疾患の治療体系を大きく変える可能性がある。これらの疾患は、日本を始め東アジアで頻度の高いがんであることから、今回の発見を起点として臨床開発においてもアジアにおいて主導的

な役割を担うように継続的な研究が望まれる。すでに FGFR2 融合遺伝子を対象とした分子診断並びに臨床試験を目指した臨床研究を開始している。

#### F . 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1 . 論文発表

1) Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio S, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Borresen-Dale A, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Elis R, Eyfjoro JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Huter B, Ilicic T, Imbeaud S, Imielinski M, Jager N, Jones DTW, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, Lopez-Otin C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlessner M, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt A, Valdes-Mas R, van't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR, Zucman-Rossi J, Futreal AP, McDermott U, Lichter P, Meyerson M, Grimmond S, Siebert R, Campo E, **Shibata T**, Pfister SM, Campbell P, Stratton MR. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500:415-421, 2013

2) **Shibata T**, Aburatani H. Exploration of liver cancer genomes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 2014 doi: 10.1038/nrgastro.2014.6. [Epub ahead of print]

3) Arai Y, Totoki Y, Hosoda F, Shirota T, Hama N, Nakamura H, Ojima H, Furuta K, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, **Shibata T**. FGFR2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma. *Hepatology* 59:1427-1434, 2014.

##### 2 . 学会発表

1. がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動公開シンポジウム講演 (平成 25 年 8 月 22 日) 「シーケンス解読によって明らかになった新たながんゲノム像」

2. 第 24 回 日本消化器癌発生学会総会 (平成 25 年 9 月 6 日) 講演 「胆道がんにおける新規融合遺伝子の同定」

3. 日本癌学会 International Session 3 講演 「Evaluation of cancer genome sequencing towards personalized molecular diagnosis」(平成 25 年 10 月 5 日)

4. がん新薬開発合同シンポジウム講演 (平成 25 年 11 月 29 日) 「国際がんゲノムコンソーシアムでのゲノム解析の成果と今後の方向性」

4.

#### H . 知的財産権の出願・登録情報

FGFR2 融合遺伝子 (特願 2012-151352)

