

201438091A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

国際連携を基盤とした日本人難治固形がんゲノム統合
解析による新たな治療標的の同定と予防戦略への展開
研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 柴田 龍弘

平成27年（2015） 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、独立行政法人国立がん研究センターが実施した平成26年度「国際連携を基盤とした日本人難治固形がんゲノム統合解析による新たな治療標的の同定と予防戦略への展開研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

国際連携を基盤とした日本人難治固形がんゲノム統合解析による新たな治療標的の
同定と予防戦略への展開研究

柴田 龍弘 _____ 1

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 肝臓がん・胆道がんゲノム・トランスクリプトーム解読

柴田 龍弘 _____ 7

2. エピゲノム解析・情報解析技術開発・データ統合解析に関する研究

油谷 浩幸 _____ 11

3. 胃がんゲノム・トランスクリプトーム解読に関する研究

谷内田 真一 _____ 15

III. 学会等発表実績

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究委託費(革新的がん医療実用化研究事業)

委託業務成果報告(業務報告)

国際連携を基盤とした日本人難治固形がんゲノム統合解析による新たな治療標的の同定と予
防戦略への展開研究

業務主任者 柴田 龍弘 国立がん研究センター がんゲノミクス研究分野 分野長

研究要旨

本研究事業は日本を含めたアジアで罹患率が高い難治がんに焦点を絞り、有効な治療標的の同定と共に戦略的にがんゲノム解読を進め、国際貢献と同時に革新的な治療・予防法の開発と臨床導出を目指すものである。今年度の主な研究成果は、1. 世界最大規模の肝臓がんゲノム解読研究を行い、高頻度なTERT遺伝子の活性化異常、PI3K/mTOR経路の異常など有望な治療標的を含めた、全体像を描出することができた。2. 胆道がんにて同定したFGFR2融合遺伝子については、*in vitro* モデルにおいて複数のFGFR阻害剤が有効性を示したことから、胆道癌における最初の有効な分子標的薬となる可能性が期待される。3. 胃がんにおける新たな癌遺伝子RHOA遺伝子の発見、であり、順調に研究が進んでいる。来年度は更に胃がん・胆道がんの包括的な解析、並びに、ゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノムデータの統合解析についても研究を進める。

A. 研究目的

がんは我が国の死因の1位であり、保健医療上その治療や予防の重要性は極めて高い。がんはゲノムの病気であり、がんゲノムの包括的解明は診断・治療・予防法の開発にとって必須である。申請者グループはすでに国際がんゲノムコンソーシアム (ICGC)において日本の代表研究機関として参加し、国際貢献を果たしている。本研究事業はその規模を拡大し、日本を含めたアジアで罹患率が高い難治がんに焦点を絞り、有効な治療標的の同定と共に戦略的にがんゲノム解読を進め、以下の目的達成を目指す。

1. 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、低分化胃がん)におけるがんゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノム異常を包括

的・統合的に解析し、個別化医療に繋がる新規診断・治療標的の同定を進める。

2. 欧米並びにアジアの研究機関との連携によって大規模な変異データと臨床情報を収集し、疫学背景・人種間における発がんの差異の解明に繋がる基礎データ集積と新たな予防介入に資する発がん要因の推定研究を進める。

B. 研究方法

1. がんゲノム・トランスクリプトーム・メチローム解読

ICGC では各がん種について 200(希少がん)-500(高頻度がん)症例の解析が必要とされている。本研究では、各所属機関並びに協力機関において集積された凍結検体を中心としてゲノム解析を進める。

胆道がん 200 症例、低分化胃がんを含めた胃がん 500 症例について、正常部並びにがん

組織から DNA を抽出し、エクソン領域並びに非コード RNA 領域を濃縮し、高速シーケンサーにて解読し、正常とがん部の結果を比較することで、がん細胞特異的な体細胞変異を同定する。その際独自に構築したアルゴリズムを用いて、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ることで、正常細胞の混入が多い検体でも高精度にゲノム異常を検出する。一部の症例では全ゲノム解読も施行し、染色体構造異常の同定や非コード領域の変異についても検討を行う。

肝臓がん 200 例、胆道がん 100 症例、胃がん 200 症例について、正常部並びにがん組織から RNA を抽出し、同様に高速シーケンサーにて解読を行う。センス・アンチセンスを区別する鎖特異的シーケンス解析を行い、両鎖の発現比についても解析する。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、融合遺伝子並びに体細胞変異の検出、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する。

肝臓がん 500 例、胆道がん 100 症例、胃がん 500 症例について、正常部並びにがん組織から DNA を抽出し、アレイにて約 45 万箇所の CpG メチル化の変化について解析を行う。

2. 統合データ解析

先行して解析が進んでいる肝がんのデータセットを用いて、分子経路解析等も加えながら、新たな分子分類の検討など統合データ解析手法について開発を進める(柴田・油谷・谷内田)。更にデータが揃い次第開発した解析手法を適用し、胆道がん・低分化胃がんの発生・進展において重要な分子経路の同定・臨床病理像との関連等について検討を進める。

3. がんゲノムビッグデータ疫学解析

欧米並びにアジアの研究機関と連携し、大規模な変異データと臨床情報を集積し、変異パターン・染色体構造異常・ドライバー変異・分子経

路等について比較解析を行い、人種や疫学的背景による相違点や特徴の抽出を行なう。すでに肝がんについては先行研究を進めており、同様に胆道がん、胃がんについてもデータ集積後に解析を開始する。

3. 倫理的遵守事項

本研究は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、個別に同意を取得し、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. がんゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノム包括的・統合的解析と個別化医療に繋がる新規診断・治療標的の同定(計画進捗率 100%)

当初の研究計画通り、胆道がん 200 症例のゲノム解読、肝臓がん 200 例のトランスクリプトーム解読、肝臓がん 500 例メチローム解読を終了予定である。

日米共同研究による世界最大規模の肝細胞がんゲノム解読から高頻度な TERT 遺伝子の活性化異常、PI3K/mTOR 経路の異常など有望な治療標的を含めた、全体像を描出することができ

た(Nature Genetics 誌に報告)。胆道がんのゲノム解析から、ドライバー変異の全体像を描出し、約 50%の症例で治療標的の可能性となりうる何らかのゲノム異常が存在することを突き止めた(manuscript under review)。また並行して進めた低分化胃癌ゲノム解読の結果から新規治療標的となる RHOA 遺伝子の高頻度変異を発見し、先行して Nature Genetics 誌に報告した。肝臓がんについては、米国 TCGA 肝臓グループとも連携しながらゲノムデータに発現・メチル化データを統合した解析を進めている。

2. 疫学背景・人種間における発がんの差異の解明に繋がる基礎データ集積と新たな予防介入に資する発がん要因の推定研究(計画進捗度 100%)

肝臓がん 600 例の解読データを用いて、疫学背景・人種間の異なる症例の変異シグネチャー解析を行い、肝炎ウイルスとは異なり日本人に特徴的な発がん要因の存在を推定し、その成果を Nature Genetics 誌に報告した(日経新聞・毎日新聞等でも報道)。胆道がんのゲノム解読データについても同様に変異刻印解析を行い、肝臓がんとは異なった特徴的なシグネチャーの同定と発生部位との関連を発見した(manuscript under review)。

3. 早期臨床探索拠点との協調等による日本発創薬開発の加速

胆道がんにおける FGFR2 融合遺伝子のパートナーを更に同定し(Hepatology, 2014, 特許取得・各国移行準備中、論文準備中)、本邦製薬会社との共同研究を通して臨床試験の推進並びに早期臨床探索拠点による全国規模スクリーニング体制(BT-SCRUM)の推進にも貢献した。

D. 考察

本研究事業は日本を含めたアジアで罹患率が高い難治がんに焦点を絞り、有効な治療標的の同定と共に戦略的にがんゲノム解読を進め、国際貢献と同時に革新的な治療・予防法の開発と臨床導出を目指すものである。今年度の成果として、1. 世界最大規模の肝臓がんゲノム解読研究を行い、高頻度な TERT 遺伝子の活性化異常、PI3K/mTOR 経路の異常など有望な治療標的を含

めた、全体像を描出することができた。TERT 遺伝子は、プロモーター変異、遺伝子増幅、HBVゲノム挿入による活性化といった複数の活性化異常を起こす分子機構が寄与し、全体の70%の症例で何らかの異常を認め、肝細胞がんにおける最も高頻度な癌遺伝子として今後の臨床開発が大いに期待される。

胆道がんと同定した FGFR2 融合遺伝子については、肝内胆管がんの10%以上の症例で陽性であり、かつ in vitro モデルにおいて複数の FGFR 阻害剤が有効性を示したことから、胆道癌における最初の有効な分子標的薬となる可能性が期待される。本研究成果は迅速に臨床開発へ導出され、前臨床研究やフェーズ1臨床試験のための分子診断などのTR研究へと進んでいる。

胃がんにおける新たな癌遺伝子 RHOA 遺伝子の発見により、病理組織分類を超えた新たな分子分類や治療薬開発を加速できると期待される。一方で胃がんは多彩な組織像、病態を示すことが知られていることから、RHOA 遺伝子以外にも重要でかつ未発見のがん関連遺伝子が存在していることが考えられ、更に来年度症例数を増やし、より包括的な解析を進める。

E. 結論

今年度の成果として、1. 肝細胞がんの大規模ゲノム解析による新たな治療標的の同定と変異シグネチャー解析による新たな日本人発がん要因の推定、2. 胃がんにおける新たな癌遺伝子 RHOA の発見、3. 胆道がんにおける FGFR2 融合遺伝子の発見と診断・治療へ向けた臨床開発、が挙げられる。来年度は更に胃がん・胆道がんの包括的な解析、並びに、ゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノムデータの統合解析についても研究を進める。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1、論文発表

(英文原著)

- 1) Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet.* 2014 46(12):1267-73.
- 2) Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet.* 2014 46(6):583-7.
- 3) Fujimoto A, Furuta M, Shiraishi Y, Gotoh K, Kawakami Y, Arihiro K, Nakamura T, Ueno M, Ariizumi S, Nguyen HH, Shigemizu D, Abe T, Boroevich KA, Nakano K, Sasaki A, Kitada R, Maejima K, Yamamoto Y, Tanaka H, Shibuya T, Shibata T, Ojima H, Shimada K, Hayami S, Shigekawa Y, Aikata H, Ohdan H, Marubashi S, Yamada T, Kubo M, Hirano S, Ishikawa O, Yamamoto M, Yamaue H, Chayama K, Miyano S, Tsunoda T, Nakagawa H. *Nat Commun.* 2015 Jan 30;6:6120.
- 4) 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*, 2014 59:1427-1434.
- 5) Shibata T, Aburatani H. Exploration of liver cancer genomes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 2014, 11:340-9.
- 6) van Thuijl HF, Mazor T, Johnson BE, Fouse SD, Aihara K, Hong C, Malmström A, Hallbeck M, Heimans JJ, Kloezeman JJ, Stenmark-Askmal M, Lamfers ML, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Söderkvist P, Taylor BS, Molinaro AM, Wesseling P, Reijneveld JC, Chang SM, Ylstra B, Costello JF. Evolution of DNA repair defects during malignant progression of low-grade gliomas after temozolomide treatment. *Acta Neuropathol.* 2015 Feb 28. [Epub ahead of print]
- 7) 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*, 2014, Mar 24. doi: 10.1038/onc.2014.57.

(和文業績)

なし

2、学会発表

- 1) 日本癌学会総会(横浜 9/25/2014)
Mutation in chromatin remodeling complex genes and cancer.
- 2) The 4th Japan-France Cancer Workshop

(Kyoto 11/19/2014) Chromatin remodeling complex gene mutations in cancer
3) 第 59 回人類遺伝学会(東京 11/22/2014) 大規模がんゲノム解析
4) 第 37 回日本分子生物学会(横浜 11/27/2014) Chromatin remodeling complex gene mutations in cancer
5) Systems Biology of Liver Cancer (RIKEN Yokohama 1/21/2015) Integrative genomic analysis of human hepatocellular carcinoma.

**H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)**

- 1、特許取得
 - a. FGFR2 融合遺伝子
(PCT/JP2013/068505(2012-09WO;LP0068;FA4009-14176)(各国移行準備中)
 - b. 胆道がんにおける新規治療標的融合遺伝子(明細書作成中 LP0065)
 - c. 胃がんの責任因子としての新規融合遺伝子 (LP0051PCT)
- 2、実用新案登録
なし
- 3、その他
なし

厚生労働科学研究委託費(革新的がん医療実用化研究事業)

委託業務成果報告(業務報告)

肝臓がん・胆道がんがんゲノム・トランスクリプトーム解読

担当責任者 柴田 龍弘 国立がん研究センター がんゲノミクス研究分野 分野長

研究要旨

本研究事業は日本を含めたアジアで罹患率が高い難治がんに焦点を絞り、有効な治療標的の同定と共に戦略的にがんゲノム解読を進め、国際貢献と同時に革新的な治療・予防法の開発と臨床導出を目指すものである。今年度の主な研究成果としては、1. 世界最大規模の肝臓がんゲノム解読研究を行い、高頻度なTERT遺伝子の活性化異常、PI3K/mTOR経路の異常など有望な治療標的を含めた、全体像を描出することができた。2. 胆道がんでは新たにFGFR2融合遺伝子を同定した。FGFR2融合遺伝子についてはin vitro モデルにおいて複数のFGFR阻害剤が有効性を示したことから、胆道癌における最初の有効な分子標的薬となる可能性が期待される、が挙げられ、順調に研究が進んでいる。来年度は更に胆道がんの包括的な解析、並びに、ゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノムデータの統合解析についても研究を進める。

A. 研究目的

がんは我が国の死因の1位であり、保健医療上その治療や予防の重要性は極めて高い。がんはゲノムの病気であり、がんゲノムの包括的解明は診断・治療・予防法の開発にとって必須である。申請者グループはすでに国際がんゲノムコンソーシアム (ICGC)において日本の代表研究機関として参加し、国際貢献を果たしている。本研究事業はその規模を拡大し、日本を含めたアジアで罹患率が高い難治がんに焦点を絞り、有効な治療標的の同定と共に戦略的にがんゲノム解読を進め、以下の目的達成を目指す。

1. 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、低分化胃がん)におけるがんゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノム異常を包括的・統合的に解析し、個別化医療に繋がる新規

診断・治療標的の同定を進める。

2. 欧米並びにアジアの研究機関との連携によって大規模な変異データと臨床情報を収集し、疫学背景・人種間における発がんの差異の解明に繋がる基礎データ集積と新たな予防介入に資する発がん要因の推定研究を進める。

B. 研究方法

1. がんゲノム・トランスクリプトーム・メチローム解読

ICGC では各がん種について 200(希少がん)-500(高頻度がん)症例の解析が必要とされている。本研究では、各所属機関並びに協力機関において集積された凍結検体を中心としてゲノム解析を進める。

胆道がん 200 症例について、正常部並びにがん組織から DNA を抽出し、エクソン領域並びに非コード RNA 領域を濃縮し、高速シーケンサーにて解読し、正常とがん部の結果を比較する

ことで、がん細胞特異的な体細胞変異を同定する。その際独自に構築したアルゴリズムを用いて、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ることで、正常細胞の混入が多い検体でも高精度にゲノム異常を検出する。一部の症例では全ゲノム解読も施行し、染色体構造異常の同定や非コード領域の変異についても検討を行う。

肝臓がん 200 例、胆道がん 100 症例について、正常部並びにがん組織から RNA を抽出し、同様に高速シーケンサーにて解読を行う。センス・アンチセンスを区別する鎖特異的シーケンス解析を行い、両鎖の発現比についても解析する。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、融合遺伝子並びに体細胞変異の検出、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する。

2. 統合データ解析

先行して解析が進んでいる肝がんのデータセットを用いて、分子経路解析等も加えながら、新たな分子分類の検討など統合データ解析手法について開発を進める。更にデータが揃い次第開発した解析手法を適用し、胆道がん・低分化胃がんの発生・進展において重要な分子経路の同定・臨床病理像との関連等について検討を進める。

3. がんゲノムビッグデータ疫学解析

欧米並びにアジアの研究機関と連携し、大規模な変異データと臨床情報を集積し、変異パターン・染色体構造異常・ドライバー変異・分子経路等について比較解析を行い、人種や疫学的背景による相違点や特徴の抽出を行なう。すでに肝がんについては先行研究を進めており、同様に胆道がん、胃がんについてもデータ集積後に解析を開始する。

3. 倫理的遵守事項

本研究は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、個別に同意を取得し、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. がんゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノム包括的・統合的解析と個別化医療に繋がる新規診断・治療標的の同定(計画進達度 100%)

当初の研究計画通り、胆道がん 200 症例のゲノム解読、肝臓がん 200 例のトランスクリプトーム解読を終了予定である。日米共同研究による世界最大規模の肝細胞がんゲノム解読から高頻度な TERT 遺伝子の活性化異常、PI3K/mTOR 経路の異常など有望な治療標的を含めた、全体像を描出することができた(Nature Genetics 誌に報告)。胆道がんのゲノム解析から、ドライバー変異の全体像を描出し、約 50% の症例で治療標的の可能性となりうる何らかのゲノム異常が存在することを突き止めた (manuscript under review)。肝臓がんについては、米国 TCGA 肝臓グループとも連携しながらゲノムデータに発現・メチル化データを統合した解析を進めている。

2. 疫学背景・人種間における発がんの差異の解明に繋がる基礎データ集積と新たな予

防介入に資する発がん要因の推定研究(計画進捗度 100%)

肝臓がん 600 例の解読データを用いて、疫学背景・人種間の異なる症例の変異シグネチャー解析を行い、肝炎ウイルスとは異なり日本人に特徴的な発がん要因の存在を推定し、その成果を Nature Genetics 誌に報告した(日経新聞・毎日新聞等でも報道)。胆道がんのゲノム解読データについても同様に変異刻印解析を行い、肝臓がんとは異なった特徴的なシグネチャーの同定と発生部位との関連を発見した (manuscript under review)。

3. 早期臨床探索拠点との協調等による日本発創薬開発の加速

胆道がんにおける FGFR2 融合遺伝子のパートナーを更に同定し(Hepatology, 2014, 特許取得・各国移行準備中、論文準備中)、本邦製薬会社との共同研究を通して臨床試験の推進並びに早期臨床探索拠点による全国規模スクリーニング体制(BT-SCRUM)の推進にも貢献した。

D. 考察

本研究事業は日本を含めたアジアで罹患率が高い難治がんに焦点を絞り、有効な治療標的の同定と共に戦略的にがんゲノム解読を進め、国際貢献と同時に革新的な治療・予防法の開発と臨床導出を目指すものである。今年度の成果として、1. 世界最大規模の肝臓がんゲノム解読研究を行い、高頻度なTERT遺伝子の活性化異常、PI3K/mTOR経路の異常など有望な治療標的を含めた、全体像を描出することができた。TERT遺伝子は、プロモーター変異、遺伝子増幅、HBVゲノム挿入による活性化といった複数の活性化異常を起こす分子機構が寄与し、全体の70%の症例で何らかの異常を認め、肝臓がんにおける最も高頻度な癌遺伝子として今後の臨床開発が大いに期待される。

胆道がんと同定したFGFR2融合遺伝子については、肝内胆管がんの10%以上の症例で陽性であり、かつin vitro モデルにおいて複数のFGFR阻害剤が有効性を示したことから、胆道癌における最初の有効な分子標的薬となる可能性が期待

される。本研究成果は迅速に臨床開発へ導出され、前臨床研究やフェーズ1臨床試験のための分子診断などのTR研究へと進んでいる。

E. 結論

今年度の成果として、1. 肝臓がんの大規模ゲノム解析による新たな治療標的の同定と変異シグネチャー解析による新たな日本人発がん要因の推定、2. 胆道がんにおける FGFR2 融合遺伝子の発見と診断・治療へ向けた臨床開発、が挙げられる。来年度は更に胆道がんの包括的な解析、並びに、ゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノムデータの統合解析についても研究を進める。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文原著)

- 1) Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guitteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet.* 2014 46(12):1267-73.

- 2) Fujimoto A, Furuta M, Shiraishi Y, Gotoh K, Kawakami Y, Arihiro K, Nakamura T, Ueno M, Ariizumi S, Nguyen HH, Shigemizu D, Abe T, Boroevich KA, Nakano K, Sasaki A, Kitada R, Maejima K, Yamamoto Y, Tanaka H, Shibuya T, Shibata T, Ojima H, Shimada K, Hayami S, Shigekawa Y, Aikata H, Ohdan H, Marubashi S, Yamada T, Kubo M, Hirano S, Ishikawa O, Yamamoto M, Yamaue H, Chayama K, Miyano S, Tsunoda T, Nakagawa H. *Nat Commun.* 2015 Jan 30;6:6120.
- 3) Arai Y, Tototki 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*, 2014 59:1427-1434.
- 4) Shibata T, Aburatani H. Exploration of liver cancer genomes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 2014, 11:340-9.
- 5) 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*, 2014, Mar 24. doi: 10.1038/onc.2014.57.

(和文業績)

なし

2、学会発表

- 1) 日本癌学会総会(横浜 9/25/2014)

Understanding cancer heterogeneity: from its molecular mechanisms to future therapeutic strategies

- 2) The 98th annual meeting of the German Society of Pathology (Berlin 6/13/2014)

Genome sequencing analysis of hepatitis-associated HCC

- 3) 第 87 回日本生化学会(京都 10/17/2014)
がんゲノム生成の多様性の解明

- 4) 日本癌学会総会(横浜 9/25/2014)

Ethnic-specific mutational signature of liver cancer

- 5) 日本癌学会総会(横浜 9/25/2014)

胆管がんにおける分子標的としての FGFR2 融合遺伝子の同定

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1、特許取得

- a. FGFR2 融合遺伝子

(PCT/JP2013/068505(2012-09WO;LP0068;F A4009-14176)(各国移行準備中)

- b. 胆道がんにおける新規治療標的融合遺伝子(明細書作成中 LP0065)

- c. 胃がんの責任因子としての新規融合遺伝子 (LP0051PCT)

2、実用新案登録

なし

3、その他

なし

厚生労働科学研究委託費(革新的がん医療実用化研究事業)

委託業務成果報告(業務報告)

エピゲノム解析・情報解析技術開発・データ統合解析に関する研究

担当責任者 油谷 浩幸 東京大学 先端科学技術研究センター 教授

研究要旨

がんゲノムの包括的解明は診断・治療・予防法の開発にとって必須であり、申請者グループはすでに国際がんゲノムコンソーシアム (ICGC)において日本を代表する研究機関として参加し、国際貢献を果たしてきた。日本人に特徴的かつ健康対策上重要な固形がん(肝がん、低分化胃がん)におけるがんゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノム異常を包括的・統合的に解析し、個別化医療に繋がる新規診断・治療標的の同定を進める。

肝細胞がんについては、日本人413例並びに米国人90例(合計503例)のがん組織・正常組織について、エクソーム解析を行い、肝細胞がんの発生に重要なドライバー遺伝子を30個同定した。TERT遺伝子の活性化は肝炎ウイルス型にかかわらず、肝細胞がんにおいて最も高頻度に生じるドライバー遺伝子変異であることを確認した。

胃がんについては30例のびまん型胃がん組織およびペアとなる正常組織の全エクソン解析を含む87症例のゲノム変異解析を実施した。RHOA遺伝子変異は25% (87症例中22症例)に観察され、R5Q、G17E、Y42C/Sに集中していた。変異体を有する細胞株ではノックダウンにより細胞増殖能の低下が認められ、びまん型胃がんのドライバー変異と考えられた。

A. 研究目的

がんは我が国の死因の1位であり、保健医療上その治療や予防の重要性は極めて高い。がんはゲノムの病気であり、がんゲノムの包括的解明は診断・治療・予防法の開発にとって必須である。申請者グループはすでに国際がんゲノムコンソーシアム (ICGC)において日本の代表研究機関として参加し、国際貢献を果たしている。本研究事業はその規模を拡大し、日本を含めたアジアで罹患率が高い難治がんに焦点を絞り、有効な治療標的の同定と共に戦略的にがんゲノム解読を進め、以下の目的達成を目指す。

1. 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、低分化胃がん)におけるがんゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノム異常を包括的・統合的に解析し、個別化医療に繋がる新規診断・治療標的の同定を進める。

2. 欧米並びにアジアの研究機関との連携によって大規模な変異データと臨床情報を収集し、疫学背景・人種間における発がんの差異の解明に繋がる基礎データ集積と新たな予防介入に資する発がん要因の推定研究を進める。

B. 研究方法

1. 日本人に特徴的かつ健康対策上重

要な固形がんのゲノム解析

1) 肝細胞がんの統合解析・国際連携による比較解析

肝細胞がんに生じるゲノム変異を明らかにするために、代表研究者の柴田らと協力して日本人 413 例並びに米国人 90 例(合計 503 例)のがん組織・正常組織について、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解読を行った。

さらに、肝細胞がんの進展機序を明らかにするために、早期肝がん検体 50 症例のエクソーム解析を実施し、進行がん病変における変異遺伝子と比較した。

2) 胃がんにおけるゲノム解析

びまん型胃がんの成因を明らかにするために、discovery setとして30例のびまん型胃がん組織およびペアとなる正常組織の全エクソン解析を実施した。複数症例において変異が認められた遺伝子および特定のシグナル経路に存在する遺伝子を加えた46遺伝子パネルを用いて合計 87 症例のスクリーニングを実施した。

2. 欧米並びにアジアの研究機関との連携によるメタ解析

塩基変異の特徴的パターンを抽出することにより、それぞれの症例に生じた変異プロセスを推定することが可能である。胃がん症例において変異パターンの比較を行った。

3. 倫理的遵守事項

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し実施した。

C. 研究結果

1. 日本人に特徴的かつ健康対策上重要な固形がんのゲノム解析

1) 肝細胞がんの統合解析・国際連携による比較解析

肝細胞がんの発生に重要なドライバー遺伝子を30個同定し(今回新たに同定した13個を含む)、中でも、*TERT* 遺伝子が肝細胞がんにおいて最も高頻度に生じるドライバー遺伝子変異であることを確認した。テロメラーゼ遺伝子の活性化は細胞のがん化において重要な役割を担うと考えられ、*TERT* 遺伝子プロモーターの活性型突然変異に加えて、*TERT* 遺伝子のコピー数増加、*TERT* 遺伝子座へのB型肝炎ウイルス挿入が相互排他的に起こり、かつ肝細胞がん全体のおよそ70%でこれらの異常のいずれかが起こっていることが認められた。*TERT* 遺伝子異常の頻度は肝炎ウイルスの種類(B型肝炎、C型肝炎、非ウイルス性)とは無関係であり、日本人、米国人いずれのグループでも同様な頻度で異常を認めた(Totoki, Tatsuno, Covington, et al. Nature genetics 2014)。

TERT 遺伝子プロモーター変異は早期病変においても高頻度に観察され、*TP53*、*β-catenin* の変異も既に存在することが観察された。

2) 胃がんにおけるゲノム解析

RHOA 遺伝子変異は87症例中22症例(25%)に観察され、R5Q、G17E、Y42C/Sに集中していた。変異体を有する細胞株ではノックダウンにより細胞増殖能の低下が認められ、びまん型胃がんのドライバー変異と考えられた(Kakiuchi, et al. Nature genetics 2014)。がんゲノムアトラスプロジェクトにおいても同様の変異が認められた。

現在、症例数を増やして胃がんのサブタイプのゲノム解析を進める一方、*RHOA* および *ARHGAP* タンパクの免疫染色による評価、融合遺伝子の検出を進めている。

2. 欧米並びにアジアの研究機関との連携によるメタ解析

腸型胃がんとびまん型胃がんでは塩基置換のパターンに異なる傾向が認められたため、さらに症例数を増やして検討する。

D. 考察

異なる地域の症例を比較することによって、同一癌腫の中でも発がんプロセスの違いを抽出することができた。

びまん性胃癌のように腫瘍細胞成分が低い腫瘍ではゲノム解析の前処理を丁寧に行うことによって検出感度を向上出来たものと考えられる。

E. 結論

我々は本事業を通して、肝細胞がんにおけるドライバー変異として *TERT* 遺伝子を含む 30 遺伝子を同定し、びまん型胃がんでは 25% の症例に存在する変異として *RHOA* 遺伝子を同定した。肝細胞がんでは地域によって特徴的な発がんプロセスが示唆され、胃がんでは組織型によって異なるプロセスの関与が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文原著)

- 1) van Thuijl HF, Mazor T, Johnson BE, Fouse SD, Aihara K, Hong C, Malmström A, Hallbeck M, Heimans JJ, Kloezeman JJ, Stenmark-Askmal M, Lamfers ML, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Söderkvist P, Taylor BS, Molinaro AM, Wesseling P, Reijneveld JC, Chang SM, Ylstra B, Costello JF. Evolution of DNA repair defects during malignant progression of low-grade gliomas after temozolomide

treatment. *Acta Neuropathol.* 2015 Feb 28. [Epub ahead of print]

- 2) Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet.* 2014 46(12):1267-73.
- 3) Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S. Recurrent gain-of-function mutations of *RHOA* in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet.* 2014 46(6):583-7.

(和文業績)

なし

2. 学会発表

- 1) 日本癌学会総会(横浜 9/25/2014)
Mutation in chromatin remodeling complex genes and cancer.
- 2) The 4th Japan-France Cancer Workshop (Kyoto 11/19/2014) Chromatin remodeling complex gene mutations in cancer
- 3) 第 59 回人類遺伝学会(東京 11/22/2014)

大規模がんゲノム解析

4) 第 37 回日本分子生物学会 (横浜
11/27/2014) Chromatin remodeling complex
gene mutations in cancer

5) Systems Biology of Liver Cancer (RIKEN
Yokohama 1/21/2015) Integrative genomic
analysis of human hepatocellular carcinoma.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)

1、特許取得
なし

2、実用新案登録
なし

3、その他
以上、特筆すべき事項なし

厚生労働科学研究委託費(革新的がん医療実用化研究事業)
委託業務成果報告(業務報告)

胃がんゲノム・トランスクリプトーム解読に関する研究
谷内田 真一 国立がん研究センター がんゲノミクス研究分野 ユニット長

研究要旨

本研究事業は日本を含めたアジアで罹患率が高い難治がんに焦点を絞り、有効な治療標的の同定と共に戦略的にがんゲノム解読を進め、国際貢献と同時に革新的な治療・予防法の開発と臨床導出を目指すものである。当初の予定通り、低分化胃がんを含めた胃がん症例について全エクソン解読並びにトランスクリプトーム解読を順調に進め、キナーゼを含め新規融合遺伝子を複数同定できた。来年度は更に胃がん・胆道がんの包括的な解析、並びに、ゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノムデータの統合解析についても研究を進める。

A. 研究目的

がんは我が国の死因の1位であり、保健医療上その治療や予防の重要性は極めて高い。がんはゲノムの病気であり、がんゲノムの包括的解明は診断・治療・予防法の開発にとって必須である。申請者グループはすでに国際がんゲノムコンソーシアム (ICGC)において日本の代表研究機関として参加し、肝がん全ゲノム解読・国際連携によるがん変異パターン同定等で国際貢献を果たしている。本研究事業はその規模を拡大し、日本を含めたアジアで罹患率が高い難治がんに焦点を絞り、有効な治療標的の同定と共に戦略的にがんゲノム解読を進め、以下の目的達成を目指す。

1. 最新のゲノムシーケンス解析技術を駆使し、低分化胃がんにおけるがんゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノム異常を包括的・統合的に解析し、個別化医療に繋がる新規診断・治療標的の同定を進める。

B. 研究方法

1. がんゲノム・トランスクリプトーム・メチローム解読

低分化胃がんを含めた胃がん 500 症例について、正常部並びにがん組織から DNA を抽出し、エクソン領域並びに非コード RNA 領域を濃縮し、高速シーケンサーにて解読し、正常とがん部の結果を比較することで、がん細胞特異的な体細胞変異を同定する。その際独自に構築したアルゴリズムを用いて、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ることで、正常細胞の混入が多い検体でも高精度にゲノム異常を検出する。一部の症例では全ゲノム解読も施行し、染色体構造異常の同定や非コード領域の変異についても検討を行う。

胃がん 200 症例について、正常部並びにがん組織から RNA を抽出し、同様に高速シーケンサーにて解読を行う。センス・アンチセンスを区別する鎖特異的シーケンス解析を行い、両鎖の発現比についても解析する。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、融合遺伝子並びに体細胞変異の検出、mRNA 並びに非コード RNA の発現変化、異常プライミングなどを網羅的に検出する。

3. 倫理的遵守事項

本研究は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、個別に同意を取得し、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. 胃がんゲノム・トランスクリプトーム包括的解析

当初の研究計画通り、低分化胃がんを含めた胃がん 500 症例について全エクソン解読に着手し、順調にシーケンス解読を進めた。胃がん 200 症例について、正常部並びにがん組織から RNA を抽出し、高速シーケンサーにて解読を行った。キナーゼを含め新規融合遺伝子を複数同定できた。

D. 考察

胃がんにおける分子治療標的はHER2遺伝子増幅以外に現時点で有望なものは報告されていない。またRHOA遺伝子の活性化型変異は低分化胃がんの一部の症例に見られるだけなので、特に難治癌として知られるスキラス胃がんに代表されるような低分化胃がんにおけるゲノム異常全体像と治療標的の同定は未だ十分に進んでいるとは言えない。本研究においては、低

分化胃がんを中心もより包括的な分子解析を進めることでその全体像の解明を目指す。

E. 結論

当初の予定通り、低分化胃がんを含めた胃がん症例について全エクソン解読並びにトランスクリプトーム解読を順調に進め、キナーゼを含め新規融合遺伝子を複数同定できた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文原著)

なし

(和文業績)

なし

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得

胃がんの責任因子としての新規融合遺伝子 (LP0051PCT)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「国際連携を基盤とした日本人難治固形がんゲノム統合解析による新たな治療標的の同定と予防戦略への展開研究」

機関名 独立行政法人 国立がん研究センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Understanding cancer heterogeneity: from its molecular mechanisms to future therapeutic strategies	柴田 龍弘	日本癌学会総会（横浜）	9/25/2014	国内
Genome sequencing analysis of hepatitis-associated HCC	柴田 龍弘	The 98th annual meeting of the German Society of Pathology（ベルリン）	6/13/2014	国外
がんゲノム生成の多様性の解明	柴田 龍弘	第87回日本生化学会（京都）	10/17/2014	国内
Ethnic-specific mutational signature of liver cancer	Yasushi Totoki, Kenji Tatsuno, Kyle Covington, Hiroki Ueda, Mamoru Kato, Hiromi Nakamura, Shogo Yamamoto, Natsuko Hama, Fumie Hosoda, Yasuhito Arai, David A. Wheeler, Hiroyuki Aburatani, Tatsuhiko Shibata	日本癌学会総会（横浜）	9/25/2014	国内
胆管がんにおける分子標的としてのFGFR2融合遺伝子の同定	新井康仁、十時 泰、細田文恵、代田智樹、濱 奈津子、中村浩実、尾島英知、古田 耕、島田和明、小菅智男、森実千種、奥坂拓志、柴田龍弘	日本癌学会総会（横浜）	9/25/2014	国内
Mutation in chromatin remodeling complex genes and cancer.	油谷浩幸	日本癌学会総会（横浜）	9/25/2014	国内
Chromatin remodeling complex gene mutations in cancer	油谷浩幸	The 4th Japan-France Cancer Workshop（Kyoto）	11/19/2014	国内
大規模がんゲノム解析	油谷浩幸	第59回人類遺伝学会（東京）	11/22/2014	国内
Chromatin remodeling complex gene mutations in cancer	油谷浩幸	第37回日本分子生物学会（横浜）	11/27/2014	国内
Integrative genomic analysis of human hepatocellular carcinoma.	油谷浩幸	Systems Biology of Liver Cancer (RIKEN Yokohama)	1/21/2015)	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes.	Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T.	Nature Genet	2014, 46:1267-73	国外
Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma.	Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S.	Nature Genet	2014 46(6):583	国外
Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity	Fujimoto A, Furuta M, Shiraishi Y, Gotoh K, Kawakami Y, Arihiro K, Nakamura T, Ueno M, Ariizumi S, Hai Nguyen H, Shigemizu D, Abe T, Boroevich KA, Nakaño K, Sasaki A, Kitada R, Maejima K, Yamamoto Y, Tanaka H, Shibuya T, Shibata T, Ojima H, Shimada K, Hayami S, Shigekawa Y, Aikata H, Ohdan H, Marubashi S, Yamada T, Kubo M, Hirano S, Ishikawa O, Yamamoto M, Yamaue H, Chayama K, Miyano S, Tsunoda T, Nakagawa H.	Nature Commun	2015 Jan 30;6:6120. doi: 10.1038/ncomms7120	国外
Exploration of liver cancer genomes.	Shibata T, Aburatani H.	Nat Rev Gastroenterol Hepatol.	2014, 11:340-9.	国外
FGFR2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma.	Arai Y, Totoki Y, Hosoda F, Shirota T, Hama N, Nakamura H, Ojima H, Furuta K, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, Shibata T.	Hepatology	2014 59:1427-1434	国外
Evolution of DNA repair defects during malignant progression of low-grade gliomas after temozolomide treatment.	van Thuijl HF, Mazor T, Johnson BE, Fouse SD, Aihara K, Hong C, Malmström A, Hallbeck M, Heimans JJ, Kloezeman JJ, Stenmark-Askmal M, Lamfers ML, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Söderkvist P, Taylor BS, Molinaro AM, Wesseling P, Reijneveld JC, Chang SM, Ylstra B, Costello JF.	Acta Neuropathol.	2015 Feb 28. [Epub ahead of print]	国外
Integrated genomic and functional analyses reveal Glyoxalase I as a novel metabolic oncogene in human gastric cancer.	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.	Oncogene	2014, Mar 24. doi: 10.1038/onc.2014.57	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。