

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

平成 2 5 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河野 隆志

平成 2 6 ( 2 0 1 4 ) 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

# 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

### 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、TP53 遺伝子の変異頻度が低く、ARID1A, SMARCA4/BRG1, PBRM1, BPTF 等の SWI/SNF クロマチン制御遺伝子群の失活変異の頻度が高い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。低分化胃癌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 GLI1 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 譲治 | 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な治療法を提供する個別医療・予知医療の実現へ向けて、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、ゲノム網羅的な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、全ゲノムに亘って網羅的に

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、低分化胃癌、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公の体制を整える。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・進展に關与する遺伝子、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

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。

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) により全エクソン領域を濃縮し大量並列シーケンシング HiSeq2000 (Illumina) にて全エクソン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。すでにホモ欠失領域を同定し、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關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關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、さらにはがん特異的 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)。一方、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、ARID1A, SMARCA4/BRG1, PBRM1, BPTF 等の SWI/SNF クロマチン制御遺伝子群の失活変異の頻度が高いことを明らかにした ( $P < 0.001$  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 遺伝子の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 RB1 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

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 (CN>3) 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。

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 例を超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* の変異と対側アリルの欠失により 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 遺伝子を特定した。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 GL01 を新たながん遺伝子として同定した。低分子 GL01 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 がん化パスウェイを制御することで 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。一方、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ろう。

##### 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。従来報告通り、TP53 と RB1 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、転移能の獲得に参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

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。

「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. 肺がんの分子病理学的分類法に関する研究

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。

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, in press.
- 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-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.
- 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, Hiramatsu 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, Koeffler 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, Fukushima 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- $\kappa$ 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) Gailhouse 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- $\kappa$ B Inducing Kinase, a Central Signaling Component of the Non-Canonical Pathway of NF- $\kappa$ 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. -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) Yamamoto Y, Konishi H, Ichikawa D, Arita T, Shoda K, Komatsu S, Shiozaki A, Ikoma H, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Inoue J, Inazawa J, Otsuji E. Significance of GSTP1 for predicting the prognosis and chemotherapeutic efficacy in esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Rep 2013;30:1687-94.
- 57) 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.
- 58) 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. 15<sup>th</sup> 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. 15<sup>th</sup> 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 104<sup>nd</sup> 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, 28<sup>th</sup> Annual EAU Congress, 2013.
- 7) Nakahata S, Morishita K. 16<sup>th</sup> 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、富士フイルム株式会社；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る。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られる。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。

## 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 Third 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

「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：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



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

3q26 領域における遺伝子増幅に関する研究

ヒト組織研究における試料提供体制の確立

研究分担者 野口雅之

研究要旨：

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常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。

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

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。

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、について分けて報告する。

3q26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譲治博士が開発した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相関するECT2 についてさらに検討した。ECT2 (epithelial cell transforming sequence 2) は細胞分裂をに關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-Meier 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 遺伝子で 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、肺腺癌においても 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、PKCi-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。

#### 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, Ish

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/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med*, 2013, 137(5):685-705.

2. 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(5):668-84.

3. 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 Oncol*, 2013, 8(6):736-743

4. 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 : 248-254.

5. Usui S, Minami Y, Shiosawa T, Iyama S, Sato Y, and Noguchi M. Differences in the prognostic implications of vascular invasion between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Lung Cancer*, 2013, 82(3):407-12.

6. 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 ade-

nocarcinoma in situ may mimic papillary adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 2013, 137(12):1792-7.

7. Iwakawa R, Takenaka M, Kohno T, Shimada Y, Totoki Y, Shibata T, Tsuka 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.

8. Yoshihiko Murata, Yuko Minami, Reika Iwakawa, Jun Yokota, Shingo Usui, Koji Tsubota, Kouya Shiraishi, Shingo Sakashita, Kaishi Satomi, Tatsuo Iijima, and Noguchi M. ECT2 amplification and overexpression as a new prognostic biomarker for early-stage lung adenocarcinoma. *Cancer Science* [in press]

## 2. 学会発表

1. 糸口直江、中川智貴、佐藤泰樹、中村優子、薄井真悟、南優子、野口雅之．気管支洗浄液の液状化検体細胞診を用いた免疫染色による肺癌診断の試み．第54回日本臨床細胞学会総会（春期大会）、2013年6月2日、グランドプリンス新高輪

2. 村田佳彦、南優子、野口雅之．肺癌における3q26領域の遺伝子増幅の意義、第102回日本病理学会総会、2013年、6月8日、ロイトン札幌

3. 糸口直江、佐藤泰樹、永田千草、南優子、野口雅之．肺腺癌の悪性度因子としてのOCIAD2の臨床病理学的意義、第102回日本病理学会総会、2013年、6月8日、ロイトン札幌

4. 佐藤泰樹、坂下信悟、南優子、野口雅之．進行肺腺癌におけるIGBP1の異常発現の解析、第102回日本病理学会総会、2013年、6月7日、ロイトン札幌

5. 村田佳彦、南優子、岩川麗香、横田淳、野口雅之．ECT2の遺伝子異常は早期肺腺癌における新規予後マーカーである、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日、パシフィコ横浜

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：特になし

## 腎細胞がんの網羅的なゲノム異常解析

分担研究者 小川 誠司 京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座 教授

### 研究要旨

腎細胞癌における分子病態の詳細を明らかにするために、全エクソンシーケンスによる網羅的な遺伝子変異の検出を行った。その結果、新規の遺伝子変異である *TCEB1* 変異を同定した。*TCEB1* 変異は VHL の不活化と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 複合体の異常を認めた。*TCEB1* 変異により、VHL 複合体の機能が喪失し、低酸素誘導因子が蓄積することが明らかとなった。

### A. 研究目的

腎細胞癌では、VHL 遺伝子の不活化が高頻度に生じることが知られている。VHL は低酸素誘導因子 (HIF) をユビキチン化することによりその分解を促しており、VHL の不活化により HIF が蓄積することが腎細胞癌の発生の主要な要因であると考えられている。一方、低頻度ながら VHL に異常の見られない腎細胞癌が存在することも知られているが、このような症例における分子病態については、これまで明らかとされていない。このように腎細胞癌の分子病態には未だ不明な点もあり、充分には解明されていない。本研究では、全エクソンシーケエンシングにより、腎細胞癌における新規遺伝子変異を同定し、その機能的な意義を明らかにすること試みた。

### B. 研究方法

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)により全エクソン領域を濃縮し大量並列シーケエンサ HiSeq2000 (Illumina)にて全エクソンシーケエンシングを行った。また、メチル化アレイ (Infinium HumanMethylation450) 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。

(倫理面への配慮)

本研究は東京大学倫理委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

全エクソンシーケエンシングを行った106例の腎細胞癌のうち、70例がVHLの変異を有していた。また、メチル化アレイの結果、22例にVHLのプロモーター領域のメチル化を認めた。合計92例にVHLの不活化を認め、残りの14例にはVHLの異常が検出されなかった。これら14例のうち、5例に*TCEB1*の変

異を認めた。正確な変異頻度を測定するために全240症例について*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8qに存在し、Elongin Cタンパクをコードしている。Elongin Cは、VHLおよびElongin BとともにVHL complexを形成し、HIFのユビキチン化を促している。*TCEB1*変異例は常に8q LOH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。両者を合わせると、240例中229例(95%)にVHL complexの異常を認めた。*TCEB1*の変異はTyr79(7例)およびAla100(1例)の2か所のアミノ酸に対応する塩基の一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、変異によってVHLとの相互作用が失われるためにVHL complex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の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との複合体形成が確認されたものの、変異型Elongin CはVHLとの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をノックダウンしたうえで、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*の変異と対側アリルの欠失により、VHL complex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。

### D. 考察

本研究により、VHL complex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り、腎細胞癌の分子病態におけるVHL complexの重要性が一層強調される結果となった。VHL complex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。一方、VHLとは異なり*TCEB1*

にはナンセンス変異やフレームシフト変異は1例も見られなかった。このことから、Elongin Cの機能が完全に喪失してしまうことは、何らかの理由により腫瘍細胞にとって不利となることが推測された。変異型のElongin Cには、腫瘍細胞の生存に必須となる機能（例えば、まだ知られていない分子との相互作用）が残存しているのかどうか、さらなる検討が必要である。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. 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
2. Yoshida K, Sanada M, Ogawa S. Deep sequencing in cancer research. *Jpn J Clin Oncol* 43(2):110-115. 2013
3. 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* 41(4):e89. 2013
4. 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

5. 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

6. 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, Hiramatsu 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

7. 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 science.* 2013

8. 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, Saunthararajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet.* 2013

9. 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* 92(3):431-438. 2013

10. 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, Koeffler 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

#### **学会発表**

1. Yusuke Sato, Shigekatsu Maekawa, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Aiko Sato, Genta Nagae, Teppei Shimamura, Yasunobu Nagata, Kenichi Yosida, Masashi Sanada, Haruki Kume, Hiroyuki Aburatani, Satoru Miyano, Yukio Homma, Seishi Ogawa. Integrative analysis of clear cell renal cell carcinoma, AACR 104nd Annual Meeting, 2013
2. Yusuke Sato, Shigekatsu Maekawa, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Aiko Sato, Genta Nagae, Teppei Shimamura, Yasunobu Nagata, Kenichi Yosida, Masashi Sanada, Haruki Kume, Hiroyuki Aburatani, Satoru Miyano, Seishi Ogawa, Yukio Homma. Integrative analysis of clear cell renal cell carcinoma, 28th Annual EAU Congress, 2013
3. 佐藤悠佑、前川滋克、奥野友介、白石友一、佐藤亜以子、永江玄太、島村徹平、眞田昌、久米春喜、油谷浩幸、宮野悟、小川誠司、本間之夫．淡明細胞型腎細胞癌における統合的ゲノム解析 第101回日本泌尿器科学会総会、2013
4. 佐藤悠佑、吉里哲一、白石友一、前川滋克、奥野友介、嘉村巧、永江玄太、菅野純夫、油谷浩幸、眞田昌、宮野悟、本間之夫、小川誠司．Integrated molecular analysis of clear cell renal cell carcinoma 第72回日本癌学会学術総会、2013

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。



難治性白血病を基礎とした多段階発癌機構の解明  
分担研究者 森下 和広 宮崎大学・医学部・教授

研究要旨

難治性急性骨髄性白血病(AML)の新規治療法の開発のため、網羅的遺伝子発現解析並びに統合的ゲノム解析を行い、白血病原因遺伝子の単離と分子標的遺伝子群の単離を行っている。とくに EVI1 高発現白血病は AML の10%を占め、かつ付随する monosomy 7 も原因不明な重要な難治性白血病である。今回この monosomy 7 の原因遺伝子をゲノム解析により単離し機能解析を行った。その結果 mono7 遺伝子産物は、CGRP 並びに、GM-CSFR 情報伝達系を負に制御する細胞内タンパク質である事が分かった。さらに EVI1 TG マウス由来幹細胞分画(HSC)に mono7 遺伝子 Knockdown(KD)させ、NOG マウス移植させると、それぞれの HSC を移植したマウスよりも寿命が遙かに短く白血病化した。このことから、EVI1 高発現と mono7 遺伝子 KD の組み合わせは難治性白血病の重要なステップである事がわかった。

A. 研究目的

難治性白血病はゲノム異常の蓄積が著しく、固形癌に近い複雑核型を示す。この難治性を凌駕する新規治療法の開発のためには、その原因となる遺伝子群を複数個同定する必要がある。我々は難治性急性骨髄性白血病に対する統合的ゲノム解析を行い、EVI1 高発現白血病に伴う 7 番染色体欠失に対して候補遺伝子群の単離を行なう。さらに、in vitro 並びに in vivo 実験により機能を解析し、白血病発症に及ぼす影響を明らかにし、その結果に基づいた疾患特異的診断治療法の開発につなげる。

B. 研究方法

染色体 3q26 並びに 7 番染色体異常を有する AML 患者検体 24 例、AML 細胞株 18 株を用いて SNP アレイ解析、網羅的遺伝子発現解析を行い、7 番染色体を中心としたゲノム解析、並びに遺伝子発現解析を行う。7 番染色体においてゲノム欠失領域から候補遺伝子として mono7 遺伝子を単離しており、その構造と情報伝達解析から GPCR 情報伝達系への関与を検討する。さらには、GM-CSF 情報伝達系への関与と細胞増殖能、造血幹細胞 (HSC) を用いて knockdown(KD)並びに過剰発現による replating assay、遺伝子発現解析、ならびに機能解析を行う。さらに EVI1 TG マウスの作製、mono7 遺伝子欠損マウスを作製し、その掛け合わせによる白血病発症機構の解明を行う。EVI1TG マウスの HSC に mono7 遺伝子 KD を導入し、NOG 免疫不全マウスへの移植実験により白血病化の検討を進める。

(倫理面への配慮)

患者検体の使用に関しては、宮崎大学医学部医の倫理審査会の承認(承認番号 606、540)をうけ、同意(インフォームドコンセント)の上で使用を行っている。実験動物に関しては宮崎大学動物実験委員会の承認(2009-520、2009-515-2)を受け使用を行っている。利益相反に関しては、宮崎大学利益相反委員会適切に処理されている。

C. 研究結果

3q26 染色体異常に伴う EVI1 転写因子の発現亢進に加えて、mosomy7 の合併率が高く、どちらの異常があっても 5 年生存率が 10%を下回る難治性白血病である。Mono7 遺伝子発現は、7 番染色体異常を有する白血病細胞株、ならびに患者検体において発現低下が見られ、さらにこの発現低下には haploinsufficiency と共に、プロモーターメチル化等のエピゲノム異常が伴うことが分かった。さらにこの mono7 遺伝子は GPCR 情報伝達系を負に制御することが構造上で考えられるため、EVI1 高発現白血病においてその候補レセプターを網羅的遺伝子発現解析により探索し、Calcitonin receptor like receptor (CRLR)を同定した。さらに、このリガンドが CGRP であることも判り、mono7 遺伝子 KD により、CGRP 刺激による cAMP の上昇、下流の CREB リン酸化亢進が細胞増殖能の活性化に繋がることが示唆された。さらに mono7 KD 実験により、GM-CSFR の細胞内タンパク質半減期が有意に延長し、GM-CSF 非依存的細胞増殖能を獲得した。In vivo 実験において EVI1 TG マウスを作製、同時に conditional mono7 遺伝子欠損マウスを作製した。EVI1TG マウス HSC に対して mono7 KD レンチウイルスを感染させ、NOG 免疫不全マウスに移植したところ、それぞれ別に移植したマウスよりも生存期間が有意に短縮し、白血病化したことから、EVI1 高発現と mono7 遺伝子発現低下の二つの組み合わせは相乗的に白血病発症に関わると考えられる。

D. 考察

EVI1 高発現に伴う monosomy7 のゲノム解析から候補がん抑制遺伝子候補として mono7 を同定した。これまでの結果から、EVI1 高発現により幹細胞維持、分化阻害などに影響するが、mono7 遺伝子異常は明らかに細胞増殖能の亢進が見られる。志賀立ってこの両者の異常の組み合わせは、所謂白血病発症の二段階説にマッチしており、確証を得るためにはさらなる検討が必要と考えられる。

## E. 結論

EVII 難治性白血病に加わる monosomy7 の原因遺伝子探索とその機能解析を行った。EVII そのものの異常は白血病幹細胞維持に重要な役割を有し、細胞増殖には余り影響がないが、monosomy 7 が加わることで、細胞増殖に大きな役割を有することが判り、それが難治性を示す大きな原因となることが示唆された。今後この機構をさらに検討し、治療対策へと繋げる必要がある。

## F. 健康危険情報 特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Kai H, Akamatsu E, Torii E, Ko-dama H, Yukizaki C, Akagi I, Ino H, Sakakibara Y, Suiko M, Yamamoto I, Okayama A, Mor-ishita K, Kataoka H, Matsuno K.: Identification of a bioactive compound against adult T-cell leukemia from bitter melon seeds. *Plants* 2014 3:18-26.
- 3) 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.
- 4) 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 ATLL model mice. *Blood Cancer J.* 2013 3:e132.
- 5) 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.
- 6) 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- $\kappa$ B pathway in adult T-cell leukemia cells. *Cell Biol Int.* 2013 37:742-7.

- 7) 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 EVII-regulated GPR56. *Leukemia.* 2013 27:1637-49.
2. 学会発表
  - 1) Kaneda K, Morishita K.: Integrin A6 as a special marker of refractory leukemia is important for maintaining of leukemia stem cells. The 11<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium. (第 11 回幹細胞シンポジウム) 文京区. 2013.5.17
  - 2) Nakahata S, Morishita K.: 16<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. CANADA (Montreal). 2013.6.26-30
  - 3) 市川朝永、中畑新吾、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 による HTLV-1/Tax 誘導性 NF $\kappa$ B 活性抑制機構の解析. 第 34 回日本炎症・再生医学会. 京都. 2013.7.2
  - 4) 市川朝永、中畑新吾、藤井雅寛、伊波英克、森下和広：NDRG2 は PP2A リクルーターとして PTEN 及び NIK 活性調節に関わる. 第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム. 港区. 2013.8.25
  - 5) 中武彩子、小林行治、西片一朗、中畑新吾、岩永正子、相良康子、北中明、天野正宏、前田宏一、末岡榮三朗、瀬戸口充、岡山昭彦、宇都宮與、下田和哉、渡邊俊樹、森下和広：血中可溶性 CADM1/TSLC1 測定による ATL 診断法の開発. 第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム. 港区. 2013.8.25
  - 6) 西片一朗、市川朝永、中畑新吾、藤井雅寛、伊波英克、白神俊幸、田中勇悦、森下和広：ATL 細胞における CADM1 高発現は HTLV-1 Tax を含む NF- $\kappa$ B 活性化に依存する. 第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム. 港区. 2013.8.24-25 (ポスター)
  - 7) 市川朝永、田村知丈、中畑新吾、迫田隅男、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスによる 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜. 2013.9.11
  - 8) 市川朝永、田村知丈、中畑新吾、迫田隅男、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスによる 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜. 2013.9.11 (ポスター)
  - 9) 兼田(中島)加珠子、井川香織、太田智美、岡本朝久、帖佐悦男、迫田隅男、森下和広：MEL/1PR DM16 による骨分化制御機構の解明. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜. 2013.9.12 (ポスター)
  - 10) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K : NDRG2 inactivation in cancer cells leads to activation of the P13 K/AKT pathway via sustained phosphorylation of PTEN. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜. 2013.10.3 (ポスター)

- 中畑新吾、市川朝永、齋藤祐介、新井康仁、滝智彦、谷脇雅史、森下和広：癌細胞におけるDNRG2の不活性化はPTENの恒常的なリン酸化を促し、P13/AKT経路の活性化を引き起こす。第72回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.3 (ポスター)
- 11) Ichikawa T, Nakahata S, Tamura T, Sakoda S, Morishita K : Molecular mechanisms of 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO)-induced oral carcinogenesis in NDRG2-deficient mice. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜 2013.10.5  
市川朝永、中畑新吾、田村知丈、迫田隅男、森下和広：がん抑制遺伝子 NDRG2 欠損マウスにおける 4-NQO 誘導性口腔がん発症機構の解析。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.5
- 12) Nagai K, Nakahata S, Ichikawa T, Meda K, Utsunomiya A, Kanai Y, Sueoka E, Morishita K : DNA methylation profiles of various types of ATLL associated with development of ATLL. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜。2013.10.5 (ポスター)  
長井健太郎、中畑新吾、市川朝永、前田宏一、宇都宮與、金井弥栄、末岡榮三朗、森下和広：ATLL の DNA メチル化は ATLL の発症に関連する。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.5 (ポスター)
- 13) Kaneda K, Suekane A, Saito Y, Yamakawa N, Kurosawa J, Morishita K : Investigation of therapeutic efficacy of neutralizing antibody of integrin for AML. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜。2013.10.5 (ポスター)  
兼田(中島)加珠子、末金彰、齋藤祐介、山川哲生、黒澤仁、森下和広：AML に対するインテグリン中和抗体の治療効果に関する検討。第 72 回日本癌学会学術総会。横浜。2013.10.5 (ポスター)
- 14) Yamamoto H, Yokoyama K, Lu J, Oba S, Kawamura T, Yoshimi A, Morishita K, Kurokawa M, Koutani A : Identification of miRNA targeting Evi 1. 第 75 回日本血液学会学術集会。札幌。2013.10. (ポスター)
- 15) Kaneda K, Suekane A, Yamakawa N, Saito Y, Morishita K : Survival and drug resistance of LSCs Cell by integrin alpha 6 in EVI1<sup>high</sup> AML. 第 75 回日本血液学会学術集会。札幌。2013.10. (ポスター)
- 16) Nakahata S, Ichikawa T, Saito Y, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K. : Down-regulation of NDRG2 induces activation of the P13K pathway through PTEN inactivation in ATL. 第 75 回日本血液学会学術集会。札幌。2013.10. (ポスター)
- 17) 兼田(中島)加珠子、末金彰、齋藤祐介、森下和広：GPR56 は白血病幹細胞の新規治療標的である。第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.3 (ポスター)
- 18) 兼田(中島)加珠子、井川加織、太田智美、黒木修司、関本朝久、帖佐悦男、迫田隅男、森下和広：骨軟骨分化制御における MEL1/PRDM16 の機能解析。第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.3 (ポスター)
- 19) 伊波英克、池辺詠美、川口晶、手塚健太、田口慎也、廣瀬仁志、西園晃、堀光雄、長谷川寛雄、山田恭暉、上野孝治、田中勇悦、澤洋文、Hall William W、南康文、Jeang Kuan-Teh、緒方正雄、森下和広、長谷川秀樹、藤澤順一：Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice. 第 36 回日本分子生物学会年会。神戸。2013.12.5 (ポスター)

#### H. 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

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

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

研究分担者 稲澤譲治（東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授）

研究要旨

各種がんにおける微細ゲノム構造異常やエピゲノム変化をゲノムワイドに検出し、これを網羅的発現解析データや特定の表現型と比較することで、新規のがん関連遺伝子を同定するとともに病態形成機構を解明し、個別化がん医療に資する診断、治療、予防の開発に資する成果を上げる。

A．研究目的

各種がんにおける微細ゲノム構造異常やエピゲノム変化をゲノムワイドに検出し、これを網羅的発現解析や特定の表現型（臨床情報、病理組織、各種がん細胞の特性など）と比較することで新規のがん関連遺伝子を同定し、さらに病態形成機構を明らかにすることにより、がんの診断、治療、予防の個別化に資する成果を上げることを目的とする。

B．研究方法

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、がん肝細胞性、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する。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する。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する。同定

したがん関連遺伝子の機能を解析し、その破綻によって起きるがん病態を解明し、がん個性化医療の実現に資するものとする。

（倫理面への配慮）研究は、「ヒトゲノム研究に関する基本原則」（科学技術会議生命倫理委員会）ならびに「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」（厚生科学審議会先端医療技術評価部会）を遵守して遂行すると共に、東京医科歯科大学をはじめ共同研究施設の各機関に設置された倫理委員会の承認を得て実施されている。

C．研究結果

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ノム・エピゲノム解析を実施することで、がん抑制性マイクロRNA（TS-miRNA）の複数を同定した。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を同定した。さらに、がん関連のスト

レス応答性転写因子NRF2を標的とする4種の miRNA (miR-507, -634, -450a, -129-5p) を同定した。それらの中で、miR-507 はNRF2関連がん化パスウェイを制御し、がん抑制に関わることを明らかにした。これらマイクロRNA は予後予測バイオマーカーやがん治療核酸薬としての応用が期待される。また、がん抑制遺伝子候補としてオートファジー関連分子 LC3Av1を明らかにした。

#### D . 考察

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

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. Uno M, Saitoh Y, Mochida K, Tsuruyama E, Kiyono T, Imoto I, Inazawa J, Yuasa Y, Kubota T, Yamaoka S: NF- $\kappa$ B Inducing Kinase, a Central Signaling Component of the Non-Canonical Pathway of NF- $\kappa$ B,

Contributes to Ovarian Cancer Progression. PLoS One. 9:e88347. 2014

2. Takemura K, Kawachi H, Eishi Y, Kitagaki K, Negi M, Kobayashi M, Uchida K, Inoue J, Inazawa J, Kawano T, Board PG:  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase as a novel immunohistochemical biomarker for the malignancy of esophageal squamous tumors. Hum Pathol. 45:331-41. 2014
3. Dobashi Y, Sato E, Oda Y, Inazawa J, Ooi A: Significance of Akt activation and AKT gene increases in soft tissue tumors. Hum Pathol. 45:127-36. 2014
4. 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. 12:58-68. 2014
5. 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. 8:e76463. 2013
6. Yamamoto Y, Konishi H, Ichikawa D, Arita T, Shoda K, Komatsu S, Shiozaki A, Ikoma H, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Inoue J, Inazawa J, Otsuji E: Significance of GSTP1 for predicting the prognosis and chemotherapeutic efficacy in esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 30:1687-94. 2013
7. 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. 8:e62757. 2013



8. Furuta M, Kozaki K, Tanimoto K, Tanaka S, Arii 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. 8:e60155. 2013
2. 学会発表
1. 永田啓明、小崎健一、谷本幸介、藤原直人、井元清哉、市川大輔、宮野悟、河野辰幸、大辻英吾、稲澤譲治：食道扁平上皮癌におけるリンパ節転移予測マーカー同定を目指した網羅的 DNA メチル化探索 .第 72 回日本癌学会学術総会 .パシフィコ横浜 . 神奈川 . 2013 年 10 月 3 日
  2. 岩館怜子、井上純、青木大輔、稲澤譲治：オートファジー障害を持つ癌細胞における化合物スクリーニング .第 72 回日本癌学会学術総会 .パシフィコ横浜 .神奈川 . 2013 年 10 月 3 日
  3. 山本信祐、井上純、河野辰幸、小崎健一、小村健、稲澤譲治：NRF2 活性化癌に対する MicroRNA を基盤とした診断・治療 .第 72 回日本癌学会学術総会 .パシフィコ横浜 . 神奈川 . 2013 年 10 月 4 日
  4. Michelle Nuylan、井上純、河野辰幸、稲澤譲治：食道癌における LAPTM5 遺伝子の発現低下 .第 72 回日本癌学会学術総会 .パシフィコ横浜 . 神奈川 . 2013 年 10 月 4 日
  5. 山本正樹、西村純一、林深、大屋敷一馬、安藤潔、野地秀義、北村邦朗、衛藤徹也、安藤寿彦、増子正義、七島勉、柴山浩彦、長谷昌知、稲澤譲治、木下タロウ、金倉讓：Inherent resistance to eculizumab in PNH. 第 75 回日本血液学会学術総会 .さっぽろ芸文館北海道 2013 年 10 月 13 日
  6. 森田圭一、松川祥、原田浩之、島本裕彰、富岡寛文、田中香衣、林深、小崎健一、稲澤譲治、小村健：口腔扁平上皮癌患者のゲノム構造異常解析による治療抵抗性予測 . 第 51 回日本癌治療学会学術集会 . 国立京都国際会館 . 京都 . 2013 年 10 月 24 日
  7. Daniela Tiaki Uehara、林深、井本逸勢、蒔田芳男、羽田明、稲澤譲治：SNP arrays analysis of 432 patients with intellectual disability and multiple congenital anomalies of unknown etiology. 日本人類遺伝学会第 58 回大会 .江陽グランドホテル . 宮城 . 2013 年 11 月 22 日
  8. 林深、岡本伸彦、高梨潤一、稲澤譲治：小脳脳幹部低形成(MICPCH)の原因となる多彩な病態の探索 . 日本人類遺伝学会第 58 回大会 .江陽グランドホテル .宮城 . 2013 年 11 月 23 日
- (国内：ポスター)
1. 森田圭一、松川祥、原田浩之、中島雄介、島本裕彰、富岡寛文、田中香衣、林深、小崎健一、稲澤譲治、小村 健：口腔扁平上皮癌患者のゲノム構造異常解析による治療抵抗性予測 .第 37 回日本頭頸部癌学会 . 京王プラザホテル . 東京 . 2013 年 6 月 14 日
  2. 土橋洋、小田義直、稲澤譲治、大井章史：骨軟部腫瘍における Akt の活性化と遺伝子増加の意義 .第 72 回日本癌学会学術総会 .パシフィコ横浜 . 神奈川 . 2013 年 10 月 3 日
  3. 村松智輝、小崎健一、井元清哉、山口類、宮野悟、稲澤譲治：口腔がん細胞株に認められた 19 番染色体の増幅領域に座位する遺伝子は、Rho シグナル経路を介して転移に寄与している可能性がある . 第

- 72 回日本癌学会学術総会 . パシフィコ横浜 . 神奈川 . 2013 年 10 月 3 日
- 2010-035447  
(海外)
4. 藤原直人、井上純、河野辰幸、小崎健一、稲澤譲治：複数癌腫における、MicroRNA-634 による細胞死誘導機構 . 第 72 回日本癌学会学術総会 . パシフィコ横浜 . 神奈川 . 2013 年 10 月 5 日
  5. 森田圭一、谷本幸介、林深、小崎健一、稲澤譲治、小村健：次世代シーケンサーを用いた Gorlin 症候群患者における hedgehog pathway のゲノム解析 . 第 58 回日本口腔外科学会学術総会 . 福岡国際会議場・マリノメッセ福岡 . 福岡 . 2013 年 10 月 12 日
  6. 森田圭一、谷本幸介、林深、小崎健一、稲澤譲治、小村健：次世代シーケンサーを用いた Gorlin 症候群患者における hedgehog pathway のゲノム解析 . 日本人類遺伝学会第 58 回大会 . 江陽グランドホテル . 宮城 . 2013 年 11 月 22 日
1. 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
  2. 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 WO2010/013842
- 2 . 実用新案登録
  - 3 . その他

#### G . 知的財産権の出願・登録状況

##### 1 . 特許取得

(国内)

1. 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、富士フイルム株式会社 ; 特許公開 2010-035525
2. 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

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

- 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, in press.
- 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-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.
- 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/American Thoracic 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, Hiramatsu 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, Koeffler 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- $\kappa$ 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 PPF1B1-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- $\kappa$ B Inducing Kinase, a Central Signaling Component of the Non-Canonical Pathway of NF- $\kappa$ 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.  $\alpha$ -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) Yamamoto Y, Konishi H, Ichikawa D, Arita T, Shoda K, Komatsu S, Shiozaki A, Ikoma H, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Inoue J, Inazawa J, Otsuji E. Significance of GSTP1 for predicting the prognosis and chemotherapeutic efficacy in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2013;30:1687-94.
- 57) 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.
- 58) Furuta M, Kozaki K, Tanimoto K, Tanaka S, Arii 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.