

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290074

研究課題名(和文) 難治胃癌のトランスクリプトーム解析による治療標的分子の探索研究

研究課題名(英文) Identification of novel fusion genes in gastric cancer by whole transcriptome sequencing: Discovery of potential therapeutic targets for gastric cancer

研究代表者

細田 文恵 (Hosoda, Fumie)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：30219191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌の治療標的分子探索を目的とし、難治進行胃癌218症例の全トランスクリプトーム解析を行なった。腫瘍含量の低い胃癌手術検体に考慮した融合遺伝子予測条件を設定し、214症例において1つ以上の融合遺伝子候補を予測した。約400種類の融合遺伝子候補を選出してRT-PCR/直接シーケンス法による検証実験を行ない、230種類の融合遺伝子の発現を確認した。RETキナーゼ融合遺伝子など治療標的分子候補として有望な4つの新規融合遺伝子を見出した。未分化難治胃癌で見つかったRETキナーゼ融合遺伝子がNIH3T3形質転換能とヌードマウス腫瘍形成能を示し、RETキナーゼ阻害剤により増殖阻害を受けることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Genomic rearrangements are frequently associated with cancer and can generate gene fusions with oncogenic property. Such somatic fusion genes are good targets for cancer therapy, but remain poorly characterized in gastric cancer. To discover new therapeutic targets, we applied a whole transcriptome sequencing approach to 218 gastric tumor specimens. We have predicted 1107 chimeric transcripts by read-pair mapping analysis, including 164 recurrent in-frame fusion genes and 160 singleton with more than ten mapped sequence reads. RT-PCR analysis of the 400 candidate transcripts revealed that 230 fusion genes are expressed in a tumor-specific manner. We found four important kinase fusion genes including a RET fusion as a promising therapeutic target. The novel RET fusion gene has been shown to transform NIH3T3 cell and to form tumor in nude mice. The RET kinase inhibitor such as vandetanib and XL184, effectively inhibited transformed NIH3T3 cell proliferation.

研究分野：ゲノム医科学 分子腫瘍学

キーワード：胃癌 トランスクリプトーム 融合遺伝子 治療標的分子

1. 研究開始当初の背景

近年日本人の食生活の変化や癌の早期発見・治療の進歩により、胃癌の死亡率は年々減少してきたものの依然男女ともに肺癌に次いで2位である。胃癌発見時において外科切除により根治する早期癌が約半分、残りは進行癌であり、抗癌剤治療という選択が欠かせない。しかしながら、手術前後の補助化学療法として TS-1 やシスプラチン等の投与が行われる以外、他の癌に比べて胃癌の抗癌剤の種類は少なく、分子標的治療薬の開発も遅れている。その一因は胃癌の組織学的、分子生物学的多様性にあると言われている。若年層の女性に多いとされるスキルス胃癌など特に予後不良であり、効果的な抗癌剤の出現が強く望まれている。2012年研究課題申請時点において、HER2/ERBB2 陽性抗体、抗 EGFR 抗体が臨床試験中であり、VEGF を標的とする製剤が計画検討中である。また、スキルス胃癌には抗 FGFR2 抗体や TGFBR を阻害する低分子化合物が有望視されている。胃癌の性質の多様性を考えれば、基礎研究分野からのさらなる標的分子候補の提案と、胃癌の個性に応じた標的分子の絞り込みと創薬ターゲットを同定する開発研究が必要である。

研究代表者らはそれまでに、分化型胃癌 113 症例の網羅的なゲノムコピー数解析から EGFR, HER2/ERBB2, FGFR2 遺伝子のコピー数増多をそれぞれ 20%, 40%, 10%の頻度で検出し、コピー数増多に応じてそれら遺伝子が発現亢進していることを確認してきた(1)。癌の増殖、分化に関わるキナーゼレセプター分子を標的にした上記のような製剤が一定の割合で胃癌に奏功する可能性は十分期待できると思われた。一方、未分化型胃癌 50 症例のゲノム解析においては、分化型胃癌に比べてコピー数異常を示す領域が数少なく、検出方法の限界が懸念された(1)。また、未分化型胃癌におけるチミジンキナーゼ遺伝子のリシークエンス解析から、NTRK3, LTK, CSK, ROR2 遺伝子のキナーゼドメインに再発変異と、HER2/ERBB2 と HCK 遺伝子のコピー数増多を見出し、未分化型胃癌の治療標的分子の可能性を提案したが、出現頻度の高い共通異常は見出せなかった(2)。このような過去の研究実績に基づき、胃癌においては個性に応じた分子標的治療薬の開発が必須であると考え、進行胃癌や悪性度の高い未分化型胃癌の多数検体を対象として、大規模 RNA シークエンス解析を行い、癌特異的に異常発現を示す RNA 分子を網羅的に探索すべく本研究計画を立てた。

2. 研究の目的

胃切除術が標準治療である胃癌においても、切除不能進行癌や悪性度の高い未分化型癌に対する有効な分子標的治療薬の開発が強く望まれている。本研究は難治胃癌の治療標的分子同定を主目的とし、大規模 RNA シーク

エンス解析によって、癌特異的な発現を示す構造異常 RNA 分子(融合遺伝子やスプライシングアイソフォームなど)を網羅的に探索する。特に治療薬の開発に直結しやすい融合遺伝子の同定を初期の解析目標とする。必要に応じて RNA シークエンスデータに基づく発現解析や機能解析を行い、治療標的分子としての可能性を検討する。また、胃癌の臨床病理像と相関する癌の個性診断に役立つような構造異常・発現異常 RNA 分子を同定し、胃癌の基礎的理解や診断医薬の開発に資することを目的とする。

3. 研究の方法

次世代シークエンサーを活用して胃癌の大規模 RNA シークエンス解析を実施した。直接配列解析法は、1)リファレンス配列にマッピングすることにより既知 mRNA あるいは長鎖 non-coding RNA (ncRNA)の構造異常(融合遺伝子やスプライシングバリエーション等)を容易に検出できる、2)シークエンスリード数のカウントから遺伝子発現量を推定できる、3)遺伝子変異やアレル特異的な発現を明らかにする cSNP を解析できる、4)リファレンス配列にマッピングされない新規遺伝子の構造予測が可能である、など、一次配列データに基づく情報解析の運用次第で多くの情報を一度に取得できる特長がある。

国立がん研究センターバイオバンクに凍結保存されている胃癌手術検体 230 症例(2014年度までの実績、当初目標は200症例)からトータル RNA を抽出し、RIN>4 の RNA 品質を有する 218 症例について、イルミナ社 TruSeq RNA Sample Prep Kit またはアジレント社 SureSelect Strand Specific RNA-Seq Library Preparation Kit を用いてインサートサイズ 250-300 bp の RNA シークエンスライブラリを調製した。イルミナ社シークエンサー HiSeq2000 を用いて、100 bp のペアエンドシークエンスを行なった。Bowtie, Tophat プログラムを用いて、得られた塩基配列をヒトゲノムリファレンス配列(hg19)および既知のヒト RNA リファレンス配列(RefSeq, Ensembl 等)にマッピングした。ペアエンドの両端配列の位置情報に基づき、融合遺伝子候補を予測しリストアップした。RT-PCR 法による融合遺伝子候補の確認と、胃癌多数検体を用いた異常出現頻度の算出を行い、必要に応じてキナーゼ融合遺伝子の機能解析を行なった。また、シークエンスリード数に基づく遺伝子発現量推定を行ない、構造異常の機能的意義を推測した。

4. 研究成果

本研究は難治進行胃癌の大規模トランスクリプトーム解析から、胃癌の治療標的分子を探索することを主たる目的とし、2014年度までに 218 症例の RNA シークエンスを実施し

た。融合遺伝子候補の予測条件は、1) マップされたシークエンスリード数が、in-frame 融合遺伝子の場合は2以上、「in-frame 以外」の融合遺伝子の場合は3以上あること、2) 両端のマップされたシークエンスリード長が、in-frame 融合遺伝子の場合は60塩基以上、「in-frame 以外」の融合遺伝子の場合は100塩基以上あること、3) リボソームタンパク質や核内低分子リボ核タンパク質など細胞内に大量に存在する転写物、また胃癌組織に大量に発現している転写物(リゾチーム、ペプシノーゲンCなど)の配列を含まないこと、とした。予測条件の設定は、別途関連研究で実施中の胃癌の全エクソンシークエンス解析によって癌検体における腫瘍細胞含量を算出した結果、胃癌では腫瘍細胞含量が比較的低い検体が多いことから、緩い条件を採用した。その結果、218症例中214症例において1つ以上の融合遺伝子候補が予測され、最多は173個の融合遺伝子候補を持つ症例があった。組織型別の融合遺伝子候補の出現頻度は、乳頭状腺癌(pap)と高分化管状腺癌(tub1)で高く、粘液癌(muc)で低かった。中分化管状腺癌(tub2)、充実型低分化腺癌(por1)、非充実型低分化腺癌(por2)、印環細胞癌(sig)は同等であった。

RT-PCR法による融合遺伝子の発現と遺伝子構造の検証実験の対象として、recurrentに出現するin-frame融合遺伝子候補164種類、単独だがマップされたシークエンスリード数10以上で発現量が多いと考えられるin-frame融合遺伝子候補160種類、「in-frame 以外」の融合遺伝子候補でrecurrentに出現する334種類を選択した。2015年度内に高頻度に出現する候補から順に約400種類のRT-PCRを実行し、230種類の融合遺伝子の存在を確認した。本研究で採用した情報解析手法は、非充実性の胃癌組織のように腫瘍細胞含量が低い癌に対する方策としてfalse-negativeを減らすために少ないリード数の候補も拾い上げる条件に設定したため、融合遺伝子検出の正答率が57%であった。

本研究において確認された高頻度in-frame融合遺伝子として、既報のCLDN18-ARHGAP26(7症例、3.2%)(3)、DUS4L-BCAP29(7症例、3.2%)(4)の他、同等程度の頻度で出現する新規融合遺伝子を12個見出した。これらはリード数2の中から数多く見つかり、情報解析手法の工夫が効を奏したものと考えている。注目すべきin-frame融合遺伝子を検出した症例については、既知癌遺伝子のゲノムコピー数異常とKRAS, BRAF等胃の発癌に重要な遺伝子の変異解析を行い、ドライバー変異を持たない症例においてはこれらの新規融合遺伝子が機能的に重要である可能性があると考え、さらに解析を進めることにした。単独出現であったが、治療標的分子候補として有望な3つのin-frameキナーゼ融合遺伝子(RETキナーゼ融合遺伝子、EPHB1キナーゼ融合遺伝子、TNIK

キナーゼ融合遺伝子)およびNRG2融合遺伝子(NRG2はHER2/ERBB2レセプターの活性化に機能する)を見出した。非充実型低分化腺癌(por2)において検出された新規のRETキナーゼ融合遺伝子については、NIH3T3導入細胞における足場非依存性増殖能および、ヌードマウス(BALB/c-nu/nu)への皮下移植による腫瘍形成能を確認した。さらにRETキナーゼ阻害剤(Vandetanib, XL184)処理により融合遺伝子のRETキナーゼドメインのチロシンリン酸化(Y1062)が顕著に抑制され、NIH3T3形質転換細胞の増殖抑制がかかることを確認した。「in-frame 以外」の融合遺伝子では、フレームシフトによる遺伝子破壊の他、相当数の5'-非翻訳領域遺伝子との融合遺伝子形成が見つかり、プロモーター交換の可能性が推測される。プロモーター交換による遺伝子活性化/不活性化は発癌の機序の一つであり、腫瘍における下流遺伝子の発現量を比較することによりその意義を検討中である。

RT-PCR法による検証実験の結果は、少ないサポートリード数ではあるが、正しい配列を持つ候補を拾い上げるために、今後の情報解析手法の改良に向けて重要な基盤的情報を提供できるものと期待している。高頻度に出現された機能未知の新規融合遺伝子や発現量の変化を来すプロモーター交換などの構造異常について今後詳しい解析を行い、胃癌の治療標的分子として有望な融合遺伝子や胃癌の個性診断に役立つような腫瘍特異的RNA分子探索を進めていきたい。

引用文献

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*. 2015, 34, 1196-1206. doi: 10.1038/onc.2014.57.

Kubo T, Kuroda Y, Shimizu H, Kokubu A, Okada N, Hosoda F, Arai Y, Nakamura Y, Taniguchi H, Yanagihara K, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Shibata T. Resequencing and Copy Number Analysis of the Human Tyrosine Kinase Gene Family in Poorly Differentiated Gastric Cancer. *Carcinogenesis*. 2009, 30, 1857-1864. doi: 10.1093/carcin/bgp206.

The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014, 513, 202-209. doi: 10.1038/nature13480.

Kim H-P, Cho G-A, Han S-W, Shin J-Y, Jeong E-G, Song S-H, Lee W-C, Lee K-H, Bang

D, Seo J-S, Kim J-II, Kim T-Y. Novel fusion transcripts in human gastric cancer revealed by transcriptome analysis. *Oncogene*. 2014, 33, 5434-5441. doi: 10.1038/onc.2013.490.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計8件)

Rokutan H, Hosoda F, Hama N, Nakamura H, Totoki Y, Furukawa E, Arakawa E, Urushidate T, Ohashi S, Sato H, Shimizu H, Igarashi K, Yachida S, Katai H, Taniguchi H, Fukayama M, Shibata T. Comprehensive mutation profiling of mucinous gastric carcinoma. *J Pathol*. 査読有、2016, in press.

Yachida S, Wood LD, Suzuki M, Takai E, Totoki Y, Kato M, Luchini C, Arai Y, Nakamura H, Hama N, Elzawahry A, Hosoda F, Shiota T, Morimoto N, Hori K, Funazaki J, Tanaka H, Morizane C, Okusaka T, Nara S, Shimada K, Hiraoka N, Taniguchi H, Higuchi R, Oshima M, Okano K, Hirono S, Mizuma M, Arihiro K, Yamamoto M, Unno M, Yamaue H, Weiss MJ, Wolfgang CL, Furukawa T, Nakagama H, Vogelstein B, Kiyono T, Hruban RH, Shibata T. Genomic Sequencing Identifies ELF3 as a Driver of Ampullary Carcinoma. *Cancer Cell*. 査読有、2016, 29, 229-240. doi: 10.1016/j.ccell.2015.12.012.

Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shiota T, Elzawahry A, Kato M, Hama N, Hosoda F, Urushidate T, Ohashi S, Hiraoka N, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, Miyagawa S, Shibata T. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet*. 査読有、2015, 47, 1003-1010. doi: 10.1038/ng.3375.

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*. 査読有、2015, 34, 1196-1206. doi: 10.1038/onc.2014.57.

Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton

R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet*. 査読有、2014, 46, 1267-1273. doi: 10.1038/ng.3126.

Totoki Y, Yoshida A, Hosoda F, Nakamura H, Hama N, Ogura K, Yoshida A, Fujiwara T, Arai Y, Toguchida J, Tsuda H, Miyano S, Kawai A, Shibata T. Unique mutation portraits and frequent COL2A1 gene alteration in chondrosarcoma. *Genome Res*. 査読有、2014, 24, 1411-1420. doi: 10.1101/gr.160598.113.

Arai Y, Totoki Y, Hosoda F, Shiota T, Hama N, Nakamura H, Ojima H, Furuta K, Shimada K, Okusaka T, Kosuge A, Shibata T. Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 査読有、2014, 59, 1427-1434. doi: 10.1002/hep.26890.

Alexandrov LB, ---, Hosoda F, ---, Nakamura H, ---, Totoki Y, ---, Shibata T, ---, Stratton MR. (全著者70名、4解析団体) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 査読有、2013, 500, 415-421. doi:10.1038/nature12477.

〔学会発表〕(計8件)

細田文恵、土時泰、六反啓文、濱奈津子、新井康仁、谷口浩和、柴田龍弘、胃がん218症例のRNAシーケンス解析による新規融合遺伝子の同定、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日、名古屋国際会議場(名古屋市)

土時泰、吉田朗彦、細田文恵、中村浩実、濱奈津子、小倉浩一、新井康仁、戸口田淳也、川井章、柴田龍弘、軟骨肉腫の全ゲノム解析、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日、名古屋国際会議場(名古屋市)

新井康仁、中村浩実、土時泰、代田智樹、濱奈津子、尾島英知、細田文恵、島田和明、森実千種、奥坂拓志、柴田龍弘、網羅的シーケンス解析による胆道がん分子標的の同定、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月9日、名古屋国際会議場(名古屋市)

Totsuka Y, Lin Y, Kato M, Hosoda F, Shibata T, Kurosaka I, Matsushima Y. A multidisciplinary approach to explore the

etiology of esophageal cancer in China.
第73回日本癌学会学術総会、2014年9月26日、パシフィコ横浜（横浜市）

十時泰、辰野健二、Kyle Convington、上田宏生、加藤護、中村浩実、山本尚吾、濱奈津子、細田文恵、新井康仁、David A Wheeler、油谷浩幸、柴田龍弘、肝がんの民族特異的な体細胞塩基置換シグネチャー、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月26日、パシフィコ横浜（横浜市）

新井康仁、十時泰、細田文恵、代田智樹、濱奈津子、尾島英知、古田耕、小菅智男、島田和明、森実千種、奥坂拓志、柴田龍弘、胆管がんにおける分子標的としてのFGFR2融合遺伝子の同定、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月26日、パシフィコ横浜（横浜市）

新井康仁、十時泰、吉田朗彦、濱奈津子、中村浩実、河野隆志、蔦幸治、細田文恵、津田均、柴田龍弘、肺癌における新規の治療標的融合遺伝子、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（横浜市）

細田文恵、十時泰、新井康仁、濱奈津子、谷口浩和、柴田龍弘、胃がんにおける長鎖非コードRNA転写物の構造異常の解析、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月4日、パシフィコ横浜（横浜市）

〔産業財産権〕

出願状況（計7件）

名称：CEP55 遺伝子と RET 遺伝子との融合遺伝子
発明者：柴田龍弘、細田文恵
権利者：国立研究開発法人国立がん研究センター、LSIP ファンド運営合同会社
種類：特許（発明）
番号：PCT/JP2013/069929
出願年月日：2013年7月23日
国内外の別：PCT

名称：CEP55 遺伝子と RET 遺伝子との融合遺伝子
発明者：柴田龍弘、細田文恵
権利者：国立研究開発法人国立がん研究センター、LSIP ファンド運営合同会社
種類：特許（発明）
番号：特願 2014-526941
出願年月日：2013年7月23日
国内外の別：日本

名称：CEP55 遺伝子と RET 遺伝子との融合遺伝子
発明者：柴田龍弘、細田文恵
権利者：国立研究開発法人国立がん研究センター、LSIP ファンド運営合同会社
種類：特許（発明）
番号：14/417052

出願年月日：2013年7月23日
国内外の別：アメリカ

名称：CEP55 遺伝子と RET 遺伝子との融合遺伝子
発明者：柴田龍弘、細田文恵
権利者：国立研究開発法人国立がん研究センター、LSIP ファンド運営合同会社
種類：特許（発明）
番号：13822713.7
出願年月日：2013年7月23日
国内外の別：欧州

名称：CEP55 遺伝子と RET 遺伝子との融合遺伝子
発明者：柴田龍弘、細田文恵
権利者：国立研究開発法人国立がん研究センター、LSIP ファンド運営合同会社
種類：特許（発明）
番号：201380039589.X
出願年月日：2013年7月23日
国内外の別：中国

名称：胃がんの責任因子としての新規融合遺伝子
発明者：柴田龍弘、細田文恵
権利者：国立研究開発法人国立がん研究センター、LSIP ファンド運営合同会社
種類：特許（発明）
番号：PCT/JP2014/83526
出願年月日：2014年12月18日
国内外の別：PCT

名称：胃がんの責任因子としての新規融合遺伝子
発明者：柴田龍弘、細田文恵
権利者：国立研究開発法人国立がん研究センター、LSIP ファンド運営合同会社
種類：特許（発明）
番号：特願 2015-553596
出願年月日：2014年12月18日
国内外の別：日本

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.nccri.ncc.go.jp/s009/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
細田 文恵 (HOSODA, Fumie)
国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所がんゲノミクス研究分野・ユニット長
研究者番号：30219191
(3) 連携研究者
柴田 龍弘 (SHIBATA, Tatsuhiro)
国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所がんゲノミクス研究分野・分野

長

研究者番号：90311414

十時 泰 (TOTOKI, Yasushi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所がんゲノミクス研究分野・ユニット長

研究者番号：10373333

新井 康仁 (ARAI, Yasuhito)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所がんゲノミクス研究分野・主任研究員

研究者番号：80222727

谷口 浩和 (TANIGUCHI, Hirokazu)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院病理科・医員

研究者番号：30415525

(3)研究協力者

六反 啓文 (ROKUTAN, Hirofumi)