

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461040

研究課題名(和文)胆道がんのトランスクリプトーム解析による新規治療標的遺伝子の同定と診断

研究課題名(英文) Whole transcriptome analysis and novel therapeutic targets in biliary tract cancer

研究代表者

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・主任研究員

研究者番号：80222727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胆道がんについて、新しい分子診断と分子標的治療の基盤を確立するために、トランスクリプトーム解析を行なった。160症例の胆道がん凍結検体(肝内胆管がん109症例、肝外胆管がん40症例、胆嚢がん11症例)の全RNAシーケンス解析の結果、FGFR2が融合遺伝子を形成して活性化していることを発見した。FGFR2融合遺伝子を導入した細胞株に対して低分子FGFR阻害剤がコロニー形成を抑制することを示した。更に、cAMPプロテインキナーゼ(PKA)の触媒サブユニットが融合遺伝子形成によって腫瘍で強発現しており、PKA分子経路の活性化が胆道がんの重要なドライバー分子経路の一つであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Biliary tract cancer (BTC) is an intractable cancer, with limited therapeutic options. To find out cancer driver alterations and biomarkers for personalized therapy, we performed whole transcriptome sequencing analyses of 160 BTC cases. FGFR2 fusion kinase genes we identified are one of the high-potential therapeutic targets of BTC. Novel fusion genes, ATP1B-PRKACA/PRKACB involving cAMP-dependent protein kinase (PKA) signal components (PRKACA and PRKACB) were identified in extrahepatic cholangiocarcinoma. The fusions robustly induced expression of the PRKACA and PRKACB, and demonstrated increased or comparative PKA activity compared to wild-type PKA activating downstream MAPK. These analyses pave the way to genotype-based actionable target therapy.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：胆道がん トランスクリプトーム 融合遺伝子 分子診断 治療標的遺伝子

1. 研究開始当初の背景

胆道がんは、胆管がん(肝内胆管がん、肝外胆管がん)・胆のうがん・乳頭部がんの3種類に大別される。特に胆管がん・胆のうがんは、発症早期の臨床症状に乏しくかつ浸潤性が高いことから、多くの症例では進行期で発見されることになり、その予後は不良な難治がんである。胆管がんは東アジアを中心に発生頻度が高いが、近年欧米を含めて全世界的に発生頻度が増加している。手術切除が唯一の根治治療であるが、再発率が高く、5年生存率は手術可能症例の15~25%である。最近、手術不能例あるいは再発症例に対して、塩酸ゲムシタピン単独あるいは塩酸ゲムシタピンとプラチナ製剤との併用(GC療法)が他の化学療法と比較して全生存期間への改善効果が認められている。また、これまでに分子標的候補としてEGFR、VEGFR、c-METといったものが取り上げられている。しかしながら、既存の化学療法で明らかな著効を示すものはこれまで知られていない。従って、胆道がんに対し、分子標的治療を含む新たな有効な治療法が強く求められている。

がんは、遺伝子に生じた変異がその発生や進展に大きな役割を果たしている。がん細胞に生じた多くの変異の中で、その分子の特徴の解析によってアキレス腱となるドライバー変異を同定することが、分子標的治療の糸口になる。胆道がんにおけるドライバー変異としては、KRAS及びBRAF遺伝子変異が報告されている。また近年には、チロシンキナーゼの融合遺伝子として脳腫瘍で同定されたFIG-ROS1が胆管がんでも少数例(2症例)報告された(Gu et al. PLoS One 2011)。極最近には、各種の腫瘍のトランスクリプトーム解析によって、胆管がん2症例、乳がん4症例、膀胱がん2症例、肺扁平上皮がん6症例などでFGFR1,2,3チロシンキナーゼと他の遺伝子との融合遺伝子の同定が報告されている(Wu et al. Cancer Discovery 2013)。

本研究では、高速シーケンサーを用いて胆道がん100症例のトランスクリプトーム解析を行い、検出した遺伝子変異の分子生物学的特徴による選別を行うことによって、難治性の胆道がんの新しいドライバー変異を同定し、革新的な診断と分子標的治療の基盤が確立できると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、進行期で発見されることが多く、これまでの化学療法での治癒は極めて困難である胆道がんについて、がんのドライバーとなっている新しい治療標的分子を同定し、革新的な診断と分子標的治療の基盤を確立することを目的にしている。計画している研究項目は、(1)胆道がん100症例の腫瘍RNAのトランスクリプトーム解析、(2)遺伝子発現、遺伝子構造情報からの胆道がん遺伝子変異の同定、(3)分子標的治療候補となる胆道がんドライバー変異の同定、(4)選出し

た標的分子に対する診断法の開発、である。

3. 研究の方法

胆道がんのドライバーとなっている新規治療標的分子を同定し、新しい診断と分子標的治療の基盤とするため、胆道がんの大規模トランスクリプトーム解析を行なった。

(1)-183症例の胆道がん腫瘍部凍結組織よりtotal RNAを単離し、Bioanalyzerで純度評価を行い、RIN>5.5の品質を有する160検体のRNAを得た。Agilent社のストランド特異的RNAシーケン斯拉イブラリキットを用いて、300bp程度に断片化したペアエンドcDNAライブラリを作製した。Illumina社HiSeq2500高速DNAシーケンサーを用いて、片側101baseのペアエンドシーケンスを行い、各検体RNAについて少なくとも5000万リードのシーケンスを得た。

(2)-得られたシーケンスデータは、BWA-MEMプログラムを用いてRefSeq, Ensemble, LincRNAのRNAリファレンスデータベースとhg19ヒトゲノムリファレンス配列にマッピングした。Totokiらが開発したin houseアルゴリズムを用いることによって融合遺伝子候補を得た。得られた融合遺伝子候補については、がん部と非がん部におけるRT-PCRとサンガー法によるシーケンスの確認によってがん特異的な融合遺伝子の検証を行った。更に、同定した融合遺伝子の内から、キナーゼタンパク質が関係するものを選び出した。トランスクリプトームデータを用いてキナーゼ遺伝子内の各エクソンの発現量を調べ、キナーゼドメイン部分の発現が亢進しているものを同定し、分子標的候補とした。

(3)-同定した融合遺伝子は、NIH3T3マウス線維芽細胞株等に強発現させ、形質転換能を確認した。遺伝子導入細胞より総タンパク質を抽出し、導入遺伝子の発現やシグナルタンパクやリン酸化の発現量変化をWestern法で調べた。特異的低分子阻害剤が入手出来る物については、WST法とSoft agar assay法によって、細胞増殖とコロニー形成への阻害効果を調べた。シグナルタンパクの発現やリン酸化への影響を調べた。

(4)-融合遺伝子を強発現させた細胞株をヌードマウスに皮下移植して造腫瘍性を検討した。

(5)-融合遺伝子を形成する遺伝子に対応するBAC(細菌人工染色体)プローブを入手し、融合遺伝子陽性と陰性の腫瘍のホルマリンパラフィン切片を用いてFISH(fluorescent in situ hybridization)法による診断を検討した。

4. 研究成果

これまでの化学療法では治癒が困難である難治性の胆道がんについて、がんのドライバーとなっている新しい治療標的分子を同定し、革新的な診断と分子標的治療の基盤を確立するために、胆道がんの大規模トランスクリ

リプトーム解析を行なった。

これまでに 160 症例の胆道がん凍結検体 (肝内胆管がん 109 症例、肝外胆管がん 40 症例、胆嚢がん 11 症例)の全 RNA シークエンスデータを得ることが出来た。この結果、一部の胆道がんにおいては FGFR2 受容体キナーゼ遺伝子が他の遺伝子と融合遺伝子を形成していることを発見した。現在までに、FGFR2-AHCYL1, FGFR2-BICC1 type1, FGFR2-BICC1 type2, FGFR2-KCTD1, FGFR2-TXLNA の 4 パートナー遺伝子、5 種類の融合型を同定している。これらはいずれも FGFR2 のチロシンキナーゼドメインを有した融合タンパクをコードしていた。各融合遺伝子の野生型及び FGFR2 チロシンキナーゼ活性喪失変異型を NIH3T3 細胞に安定発現させ、細胞の足場非依存性コロニー形成及び免疫不全マウスへの移植での腫瘍形成を調べたところ、いずれの融合遺伝子においても野生型を導入した細胞ではコロニーあるいは皮下腫瘍を形成したが、キナーゼ活性喪失変異体ではコロニー形成は著しく減弱して皮下腫瘍は形成されなかった。いずれの野生型融合遺伝子の発現細胞でも FGFR キナーゼドメインの強いリン酸化が認められ、下流シグナルである MAPK のリン酸化が亢進した。このリン酸化は FGFR キナーゼ阻害剤 (BGJ398 及び PD173074)処理によって顕著に抑制された。これらのことにより、FGFR2 融合遺伝子は一部の胆道がんにおける重要なドライバー遺伝子であり、治療標的分子であることが明らかとなった。更に、cAMP プロテインキナーゼ(PKA)の触媒サブユニットが ATP1B1-PRKACA, ATP1B1-PRKACB という融合遺伝子を形成して腫瘍で強発現しており、PKA 分子経路の活性化が胆道がんにおける重要な分子経路であることを明らかにした。

次に、FGFR2 融合遺伝子に対する分子診断系の開発を行なった。まず、FGFR2 領域の BAC プローブを用いた break-apart FISH 法によって、ホルマリン固定標本 (FFPE)での FGFR2 遺伝子構造異常の検出と判別の条件を検討した。これに加えて、FFPE サンプルから断片化した total RNA を抽出し、AMP 法 (Anchored multiplex PCR)と次世代シークエンスによる FGFR2 融合遺伝子の検出に成功した。

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 7 件)

1. Yoshida A, Arai Y, Kobayashi E, Yonemori K, Ogura K, Hama N, Mukai W, Motoi T, Kawai A, Shibata T, Hiraoka N. CIC Break-Apart Fluorescence In Situ Hybridization Misses a Subset of CIC-DUX4 Sarcomas: A Clinicopathological and Molecular Study.

Histopathology. 査読有, 2017, in press.

2. Sugita S, Arai Y, Aoyama T, Asanuma H, Mukai W, Hama N, Emori M, Shibata T, Hasegawa T. NUTM2A-CIC fusion small round cell sarcoma: A genetically distinct variant of CIC-rearranged sarcoma. Hum Pathol. 査読有, 2017, in press.

3. Yachida S, Wood LD, Suzuki M, Takai E, Totoki Y, Kato M, Luchini C, Arai Y, Nakamura H, Hama N, Elzawahry A, Hosoda F, Shirota 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, 29:229-40. doi: 10.1016/j.ccell.2015.12.012.

4. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shirota 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.

5. Hosoda F, Arai Y, Okada N, Shimizu H, Miyamoto M, Kitagawa N, Katai H, Taniguchi H, Yanagihara K, Imoto I, Inazawa J, Ohki M, Shibata T. Integrated genomic and functional analyses reveal glyoxalase I as a novel metabolic oncogene in human gastric cancer. Oncogene. 査読有, 2015, 34:1196-206. doi: 10.1038/onc.2014.57.

6. Arai Y, Totoki Y, Hosoda F, Shirota T, Hama N, Nakamura H, Ojima H, Furuta K, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, 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.

7. Sugita S, Arai Y, Tonooka A, Hama N, Totoki Y, Fujii T, Aoyama T, Asanuma H, Tsukahara T, Kaya M, Shibata T, Hasegawa T. A novel CIC-FOXO4 gene fusion in undifferentiated small round cell sarcoma: A genetically distinct variant of Ewing-like sarcoma. Am J Surg Pathol. 査読有, 2014, 38:1571-1576. doi: 10.1097/PAS.0000000000000286.

[学会発表](計 4 件)

研究者番号：10373333

1. 新井康仁、中村浩実、十時 泰、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、Oncogenic driver fusion genes in biliary tract cancer、第 75 回日本がん学会学術総会、2016 年 10 月 06 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(4)研究協力者
なし

2. 新井康仁、中村浩実、十時 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管がん分子標的の同定、第 74 回日本がん学会学術総会、2015 年 10 月 08 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

3. 十時 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 回日本がん学会学術総会、2015 年 10 月 08 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

4. 新井康仁、十時 泰、細田文恵、代田智樹、濱 奈津子、中村浩実、尾島英知、古田 耕、島田和明、小菅智男、森実千種、奥坂拓志、柴田龍弘、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 回日本がん学会学術総会、2014 年 09 月 25 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

新井康仁、医歯薬出版、医学の歩み-特集がんゲノム研究の進歩-固形がんにおける融合遺伝子の解析と治療への展開、2014、134 ページ

〔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

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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

柴田 龍弘 (SHIBATA, Tatsuhito)

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