

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22134003

研究課題名（和文）治療によって修飾されるがんのゲノミクス解析とバイオマーカー探索

研究課題名（英文）Cancer genomics analysis and biomarker discovery under therapeutic modification

研究代表者

石川 俊平（Ishikawa, Shumpei）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50418638

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 79,800,000 円

研究成果の概要（和文）：治療標的・バイオマーカーが明らかになっていない低分子化合物に関して耐性株のゲノミクス解析や機能ゲノムスクリーニングによって同定を試みた。免疫治療のバイオマーカー探索のために腫瘍浸潤リンパ球の抗原受容体レパートリー解析技術を確立した。有効な分子標的が存在しないびまん性胃癌については、全エクソームシーケンスにより治療標的候補となるRHOAのドライバー遺伝子変異を同定した。

研究成果の概要（英文）：We tried to identify the therapeutic targets and biomarkers of uncharacterized chemical compound by genomics analysis of the resistant sub-clone cells and functional genomics screening. We also established the antigen receptor repertoire analysis technology of tumor infiltrating lymphocytes for biomarker discovery of the cancer immunotherapy. For diffuse-type gastric cancer, where the valid molecular target is absent, we performed the whole exome sequencing and have identified RHOA driver gene mutations as potential therapeutic targets.

研究分野：ゲノム病理学

キーワード：ゲノム がん 治療標的

1. 研究開始当初の背景

がん治療の効果、副作用に関わるバイオマーカーは、市販後しばらくして多くの臨床サンプルを収集することによって為され臨床開発早期における効果的な対応には必ずしも直結しないことが多い。さらに抗腫瘍性効果の重要標的が必ずしも明確でない新世代の抗腫瘍薬、免疫療法等ではターゲットアプローチによるバイオマーカーの探索を困難にしている。一方で近年の並列型シーケンシングの技術によりがんにおける塩基レベルでの変異が全ゲノムスケールで同定可能となっている。本提案では培養細胞株、臨床検体を用いて比較的世代の新しい抗腫瘍薬、臨床開発中の新薬、免疫療法を対象に系統的にダイナミックなゲノム解析を行うことにより治療のゲノムバイオマーカー候補を同定しその検証をも行う。最終的には臨床開発早期におけるバイオマーカーの同定を可能とし開発側のバイオマーカーを用いた積極的な臨床開発への先鞭をつけることを目的とする。

2. 研究の目的

バイオマーカー探索の対象となる化合物については化合物耐性株の樹立及び shRNA ライブラリーによる標的タンパク複合体や synthetic lethal 遺伝子の同定を進める予定である。周辺解析技術の開発については全トランスクリプトレベルの配列解読技術を構築し、またより高速、安価に解読するために半導体シーケンサーを用いたデータ取得、アルゴリズムの構築も行っている。免疫ゲノムレパートリーについては腫瘍に浸潤するがん組織に浸潤する T リンパ球の抗原受容体の再構成レパートリーの網羅的探索を実施し未知の部分が多い腫瘍浸潤リンパ球の獲得免疫の特徴を捉えると共に、がん免疫治療（細胞療法・ワクチン）のバイオマーカーの特定を試みる。また既存の薬剤に抵抗性の難治性がんの新たな治療標的を同定するべく臨床検体の包括的ゲノム解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 薬剤バイオマーカーの探索

化合物耐性株の樹立

バイオマーカー探索の対象となる化合物については長期の sub-lethal 濃度の培養により耐性株の樹立を行った。耐性株についてはゲノム解析を行った。

機能ゲノムスクリーニング

shRNA ライブラリーによる標的タンパク複合体や synthetic lethal 遺伝子の同定を試みた。

(2) ゲノム解析評価のための解析パイプラインの確立

全トランスクリプトレベルの配列解読技術の構築

薬剤耐性の評価にかかわる周辺技術の開発については配列異常解析、発現異常解析、

異常バリエーション解析を全トランスクリプトレベルで行うためのパイプライン構築・解析技術の構築を行った。

メタトランスクリプトーム解析の技術開発

腫瘍の進展・薬剤耐性に関わる可能性のある微生物の解析のため多様な生物種にわたるメタトランスクリプトーム解析のパイプライン構築を行った。

(3) 免疫ゲノミクスのレパートリー解析

免疫療法のバイオマーカーの同定を試みて腫瘍に浸潤するがん組織に浸潤する T リンパ球の抗原受容体の再構成レパートリーの網羅的解析技術の開発を行った。

(4) 治療抵抗性難治性がんの新規治療標的・バイオマーカーの探索

既存の薬剤に抵抗性の難治性がんの新たな治療標的を同定するべくびまん性胃癌の組織のエクソーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 薬剤バイオマーカーの探索

化合物耐性株の樹立

バイオマーカー探索の対象となる化合物については長期の sub-lethal 濃度の培養により耐性株の樹立を行った。耐性株についてはゲノム解析を行い、化合物の標的タンパクと相互作用するタンパクをコードする遺伝子の発現異常を認めた。

機能ゲノムスクリーニング

15000 遺伝子をターゲットとする pooled shRNA ライブラリーを系を立ち上げ、抗腫瘍薬であるヒストン修飾酵素阻害剤を用いてその添加の有無によって細胞増殖活性の著しく変わる遺伝子の選抜を行った。既知の転写因子を含め、ヒストン修飾酵素と複合体を形成する遺伝子が含まれ、単純な synthetic lethal 遺伝子に加えて複合体情報が得られることが示唆された。

(2) ゲノム解析評価のための解析パイプラインの確立

全トランスクリプトレベルの配列解読技術の構築

Reference となるトランスクリプト配列、SNP 情報、CNV 情報との比較を含め、配列異常解析、発現異常解析、異常バリエーション解析を精度よく行うアッセイ手法、アルゴリズムを構築することが出来た。また半導体シーケンサーの出力から得られる長さの異なる配列の集団に対しても解析可能なパイプラインを構築した。

メタトランスクリプトーム解析の技術開発

腫瘍の進展・薬剤耐性に関わる可能性のある微生物の解析のため多様な生物種にわたるメタトランスクリプトーム解析のパイプライン構築を行った。パイロット研究として胃のメタトランスクリプトーム解析を行い腫瘍に存在するいくつかのウイルスを特定した。

(3) 免疫ゲノミクスのレパートリー解析
リンパ節などのリンパ組織、非腫瘍部組織に比較して腫瘍部は浸潤リンパ球のクローナルな増殖を認め、腫瘍特異的な TCR の配列を特定することが出来た。

(4) 治療抵抗性難治癌の新規治療標的・バイオマーカーの探索

既存の薬剤に抵抗性の難治性がんの新たな治療標的を同定するべくびまん性胃癌の組織のエクソーム解析を行った。Small GTPase のひとつである RHOA の変異を約 1/4 の症例に認め、腫瘍のドライバー遺伝子であることを実験的に確認できた。

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 25 件)すべて査読あり

1. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T.
Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. **Nat Genet.** 2014 Nov 2. doi: 10.1038/ng.3126. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25362482.
2. Ibrahim R, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Goto A, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Takai D, Nakajima J, Fukayama M, Niki T, Murakami Y.
Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition. **Hum Pathol.** 2014 Jul;45(7):1397-405. doi:10.1016/j.humpath.2014.02.013. Epub 2014 Feb 28. PubMed PMID: 24775604.
3. Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S*

Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma.

Nat Genet. 2014 Jun;46(6):583-7. doi: 10.1038/ng.2984. Epub 2014 May 11. PubMed PMID: 24816255. (* Corresponding)

4. Hamanaka W, Motoi N, Ishikawa S, Ushijima M, Inamura K, Hatano S, Uehara H, Okumura S, Nakagawa K, Nishio M, Horai T, Aburatani H, Matsuura M, Iwasaki A, Ishikawa Y.
A subset of small cell lung cancer with low neuroendocrine expression and good prognosis: a comparison study of surgical and inoperable cases with biopsy. **Hum Pathol.** 2014 May;45(5):1045-56. doi: 10.1016/j.humpath.2014.01.001. Epub 2014 Jan 23. PubMed PMID: 24746210.
5. Tanaka M, Suzuki HI, Shibahara J, Kunita A, Isagawa T, Yoshimi A, Kurokawa M, Miyazono K, Aburatani H, Ishikawa S, Fukayama M.
EVI1 oncogene promotes KRAS pathway through suppression of microRNA-96 in pancreatic carcinogenesis. **Oncogene.** 2014 May 8;33(19):2454-63. doi: 10.1038/onc.2013.204. Epub 2013 Jun 10. PubMed PMID: 23752186.
6. Hayashi A, Morikawa T, Kawai T, Kume H, Ishikawa S, Homma Y, Fukayama M.
Clinicopathological and prognostic significance of EZH2 expression in upper urinary tract carcinoma. **Virchows Arch.** 2014 Apr;464(4):463-71. doi: 10.1007/s00428-014-1541-6. Epub 2014 Jan 21. PubMed PMID: 24446035
7. Hayashi A, Yamauchi N, Shibahara J, Kimura H, Morikawa T, Ishikawa S, Nagae G, Nishi A, Sakamoto Y, Kokudo N, Aburatani H, Fukayama M.
Concurrent activation of acetylation and tri-methylation of H3K27 in a subset of hepatocellular carcinoma with aggressive behavior. **PLoS One.** 2014 Mar 10;9(3):e91330. doi:10.1371/journal.pone.0091330. eCollection 2014. PubMed PMID: 24614346; PubMed Central PMCID: PMC3948868.
8. Ui T, Morishima K, Saito S, Sakuma Y, Fujii H, Hosoya Y, Ishikawa S, Aburatani H, Fukayama M, Niki T,

- Yasuda Y.
The HSP90 inhibitor 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) synergizes with cisplatin and induces apoptosis in cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell lines via the Akt/XIAP pathway.
Oncol Rep. 2014 Feb;31(2):619-24. doi: 10.3892/or.2013.2899. PubMed PMID: 24317439
9. Ichimura T, Morikawa T, Kawai T, Nakagawa T, Matsushita H, Kakimi K, Kume H, **Ishikawa S**, Homma Y, Fukayama M.
Prognostic Significance of CD204-Positive Macrophages in Upper Urinary Tract Cancer.
Ann Surg Oncol. 2014 Jun;21(6):2105-12. doi: 10.1245/s10434-014-3503-2. Epub 2014 Feb 4. PubMed PMID: 24492923
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. 2014 Jun;46(6):583-7. doi: 10.1038/ng.2984. Epub 2014 May 11. PubMed PMID: 24816255.
11. Nakaya T, Kikuchi Y, Kunita A, **Ishikawa S**, Matsusaka K, Hino R, Aburatani H, Fukayama M.
Enrichment of stem-like cell population comprises transformation ability of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A for non-transformed cells.
Virus Res. 2013 Mar 22. 108–115. doi: 10.1016/j.virusres.2013.03.009. Epub 2013 Mar 22. PMID: 23524324
12. Matsubara D, Kanai Y, **Ishikawa S**, Ohara S, Yoshimoto T, Sakatani T, Oguni S, Tamura T, Kataoka H, Endo S, Murakami Y, Aburatani H, Fukayama M, Niki T. Identification of CCDC6-RET fusion in the human lung adenocarcinoma cell line, LC-2/ad.
J Thorac Oncol. 2012 Dec;7(12):1872-6
13. Matsubara D, Kishaba Y, **Ishikawa S**, Sakatani T, Oguni S, Tamura T, Hoshino H, Sugiyama Y, Endo S, Murakami Y, Aburatani H, Fukayama M, Niki T.
Lung cancer with loss of BRG1/BRM, shows epithelial mesenchymal transition phenotype and distinct histologic and genetic features.
Cancer Sci. 2012 Nov 19. doi: 10.1111/cas.12065. [Epub ahead of print]
14. Abe H, **Maeda D**, Hino R, Otake Y, Isogai M, Ushiku AS, Matsusaka K, Kunita A, Ushiku T, Uozaki H, Tateishi Y, Hishima T, Iwasaki Y, **Ishikawa S**, Fukayama M. ARID1A expression loss in gastric cancer: pathway-dependent roles with and without Epstein-Barr virus infection and microsatellite instability.
Virchows Arch. 2012 Oct;461(4):367-77.
15. Ota S, **Ishikawa S***, Takazawa Y, Goto A, Fujii T, Ohashi K, Fukayama M. Quantitative analysis of viral load per haploid genome revealed the different biological features of Merkel cell polyomavirus infection in skin tumor.
PLoS One 2012; 7(6): e39954. (* Corresponding).
16. Ikeda Y, Oda K, Nakagawa S, Murayama-Hosokawa S, Yamamoto S, **Ishikawa S**, Wang L, Takazawa Y, **Maeda D**, Wada-Hiraike O, Kawana K, Fukayama M, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y.
Genome-wide single nucleotide polymorphism arrays as a diagnostic tool in patients with synchronous endometrial and ovarian cancer.
Int J Gynecol Cancer. 2012 Jun;22(5):725-31.
17. Fujiwara T, Hiramatsu M, Isagawa T, Ninomiya H, Inamura K, **Ishikawa S**, Ushijima M, Matsuura M, Jones MH, Shimane M, Nomura H, Ishikawa Y, Aburatani H.
ASCL1-coexpression profiling but not single gene expression profiling defines lung adenocarcinomas of neuroendocrine nature with poor prognosis.
Lung Cancer. 2011 Jul 5. [Epub ahead of print]
18. Watanabe A, Ogiwara H, Ehata S, Mukasa A, **Ishikawa S**, **Maeda D**, Ueki K, Ino Y, Todo T, Yamada Y, Fukayama M, Saito N, Miyazono K, Aburatani H.

- Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 26;108(30):12384-9.
19. Isagawa T, Nagae G, Shiraki N, Fujita T, Sato N, **Ishikawa S**, Kume S, Aburatani H.
DNA methylation profiling of embryonic stem cell differentiation into the three germ layers.
PLoS One. 2011;6(10):e26052.
20. Maeda D, Shibahara J, Sakuma T, Isobe M, Teshima S, Mori M, Oda K, Nakagawa S, Taketani Y, **Ishikawa S**, Fukayama M.
β-catenin (CTNNB1) S33C mutation in ovarian microcystic stromal tumors.
Am J Surg Pathol. 2011 Oct;35(10):1429-40.
21. Tanaka M, Shibahara J, Fukushima N, Shinozaki A, Umeda M, **Ishikawa S**, Kokudo N, Fukayama M.
Claudin-18 is an early-stage marker of pancreatic carcinogenesis.
J Histochem Cytochem. 2011 Oct;59(10):942-52.
22. Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Fujita T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Nonaka A, Yoshida S, Matsusaka K, Midorikawa Y, **Ishikawa S**, Soejima H, Fukayama M, Suemori H, Nakatsuji N, Kume S, Aburatani H.
Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation.
Hum Mol Genet. 2011 Jul 15;20(14):2710-21
23. Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, Arai Y, Hosoda F, **Ishikawa S**, Tsutsumi S, Sonoda K, Totsuka H, Shirakihara T, Sakamoto H, Wang L, Ojima H, Shimada K, Kosuge T, Okusaka T, Kato K, Kusuda J, Yoshida T, Aburatani H, Shibata T.
High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome.
Nat Genet. 2011 May;43(5):464-9.
24. Matsubara D, **Ishikawa S**, Sachiko O, Aburatani H, Fukayama M, Niki T.
Co-activation of epidermal growth factor receptor and c-MET defines a distinct subset of lung adenocarcinomas.
Am J Pathol. 2010 Nov;177(5):2191-204.
25. Matsubara D, **Ishikawa S**, Oguni S, Aburatani H, Fukayama M, Niki T.
Molecular predictors of sensitivity to the MET inhibitor PHA665752 in lung carcinoma cells.

J Thorac Oncol. 2010 Sep;5(9):1317-24.

〔学会発表〕(計3件)

1. **Shumpei Ishikawa**, Discovery of Frequent Gain-of function Mutation in Diffuse-type Gastric Carcinoma. 2014 SNUCRI Cancer Symposium April 16th-19th, 2014 Hotel Hyundai in Mokpo, Korea
2. **Shumpei Ishikawa**, Discovery of recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric cancer. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日(木)~27日(土) パシフィコ横浜、横浜
3. **Shumpei Ishikawa**, Discovery of frequent driver mutations in diffuse-type gastric carcinoma, COLD SPRING HARBOR CONFERENCES THE BIOLOGY OF GENOMES May 6–May 10, 2014, N.Y., U.S.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: Use of rhoa in cancer diagnosis and inhibitor screening
発明者: 油谷浩幸、石川俊平他5名
権利者: 国立大学東京大学他
種類: 出願
番号: PCT/JP2014/004539
出願年月日: 2013年9月6日(優先日)
国内外の別: PCT/JP

取得状況(計0件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
石川 俊平 (Ishikawa Shumpei)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
(H25.1-H27.3)
研究者番号: 50418638

(2)研究分担者
前田 大地 (Maeda Daichi)
秋田大学・大学院医学系研究科・准教授
(H26.4-H27.3)
研究者番号: 30585500

(3)連携研究者
該当なし