

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24221011

研究課題名(和文)統合的ゲノム解析によるがん細胞集団進化の解明

研究課題名(英文)An integrated genomic analysis on evolution of cancer cell population

研究代表者

油谷 浩幸 (Aburatani, Hiroyuki)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：10202657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,500,000円

研究成果の概要(和文)：治療抵抗性腫瘍細胞のサバイバルおよびクローン進化、さらに腫瘍微小環境に対する適応について解明すべく、腫瘍細胞集団内のゲノム不均一性とエピゲノムの可塑性についてヒト腫瘍検体および腫瘍細胞の解析を行った。

グリオーマ再発に際してアルキル化剤治療によりミスマッチ修復異常を来したクローンは高頻度にC>T変異を生じ、悪性転化を引き起こす。また、腫瘍内微小環境において形成される低pH状態下では転写因子SREBP2が活性化され、酢酸代謝に関わるACSS2などの遺伝子発現誘導、腫瘍細胞増殖をもたらした。

エピゲノム変異は腫瘍の発生・進展の過程でクロマチンドメイン、遺伝子、制御領域など様々なレベルで生じる。

研究成果の概要(英文)： We studied genetic heterogeneity and epigenetic plasticity among the tumor cell population which promote survival and clonal evolution of resistant cell clones and adaptation to the tumor microenvironment.

We demonstrated evolution of DNA repair defects during malignant progression of low-grade gliomas after temozolomide treatment, which suggest that tumor cells may undergo positive selection during TMZ treatment in the context of mismatch repair deficiency. Adaptation to the intratumoral microenvironment is crucial for tumor cell survival. Under the low pH condition, the transcription factor SREBP2 is activated, leading to tumor cell proliferation by altering acetic acid metabolism with ACSS2 induction.

In summary, epigenomic alteration occurs in various levels, such as chromatin domains, genes, and regulatory regions during tumor development and progression.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：ゲノム エピゲノム クロマチン クローン進化 微小環境 不均一性 可塑性

### 1. 研究開始当初の背景

がんゲノム解析により、癌発生および進展の“ドライバー”となる種々のがんの体細胞変異プロファイルが同定されつつあり、とりわけクロマチンリモデリングやDNAメチル化などエピジェネティクス制御に関わる遺伝子の変異が新たに報告されるなど、上皮間葉移行や癌幹細胞に関わるクロマチン動態制御の変異が細胞悪性化に関与することがいよいよ明白となった。腫瘍細胞集団の進化においてゲノムおよびエピゲノムの異質性を解明することにより、再発転移の阻害、薬剤耐性の克服につながる事が期待される。

### 2. 研究の目的

がん細胞集団に蓄積した変異の時系列観察によって「癌細胞集団の進化」にかかわるゲノム変異を同定し、従来単クローナルと考えられていた癌細胞集団のゲノム・エピゲノムの不均一性 (heterogeneity) を解明することにより、癌細胞の制御を目指す。

- (1) 癌細胞集団のゲノム不均一性の解析
- (2) がん細胞におけるクロマチン動態異常の解析
- (3) ゲノム変異、クロマチン情報の統合によるがん細胞集団進化の解明

### 3. 研究の方法

がん細胞集団内のゲノム不均一性とエピゲノムの可塑性は、治療抵抗性細胞クローンのサバイバル、さらにはクローン進化をもたらすと考えられる。経時的に収集した腫瘍検体のゲノム・エピゲノム解析に加えて、腫瘍内微小環境を模した条件に対する腫瘍細胞の応答について検討した。

#### (1) 癌細胞集団のゲノム不均一性の解析

グリオーマ (神経膠腫)、卵巣がん、肝細胞がん、大腸がんの腫瘍内不均一性と悪性転化に際してのクローン進化を明らかにするため、同一症例の腫瘍内のマルチプルサンプリングおよび経時的ゲノム (エクソーム) 解析、トランスクリプトーム、DNAメチローム解析を行った。

#### (2) がん細胞におけるクロマチン動態異常の解析

肝細胞がんの進展とクロマチンリモデリング複合体変異、DNA脱メチル化との関連に着目した。早期肝がんおよび進行がんにおける遺伝子変異の違い、FAIRE解析による転写制御領域の変動、TET1高発現症例におけるDNAメチル化異常を検討した。

#### (3) ゲノム変異、クロマチン情報の統合によるがん細胞集団進化の解明

エピゲノム可塑性を解明するために、がん組織微小環境 (低酸素、低栄養、低 pH) に対するクロマチン動態、および過剰 Wnt シグナルの制御に関わる長鎖非コード RNA の同定および機能解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 癌細胞集団のゲノム不均一性の解析

肝細胞がん、グリオーマ、卵巣がん、大腸がん (PLoS Genet 2016) の原発腫瘍および再発腫瘍組織からのマルチプルサンプリング検体のゲノム解析により、同一腫瘍内不均一性が示された。再発グリオーマは新たに多くの変異を獲得しており、なかでもアルキル化剤を投与された症例の多くで C>T 変異が大半を占めることが特徴的であった。経過中にグアニンメチル化に伴うミスマッチ修復異常を来したクローンが hypermutator となり、悪性転化を引き起こしたと推定された (図 1) (Science 2014, Acta Neuropathol 2015)。

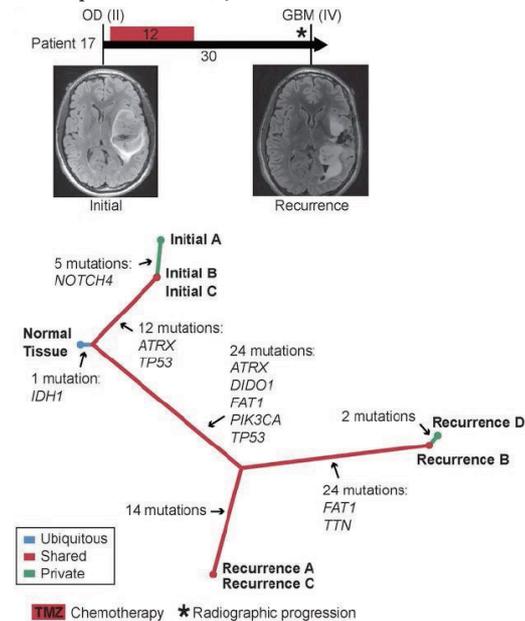


図 1 神経膠腫クローン進化の系統樹

一方、オリゴデンドログリオーマの複数部位および再発腫瘍の解析では、神経膠腫のゲノム多様性を示すものの悪性化を強力に促すドライバー変異の獲得は稀であり、DNAメチル化プロファイルも安定していた (Acta Neuropathol Commun 2017)。

なお、当初予定した腫瘍ゼノグラフトの解析は免疫不全マウス体内では遺伝子変異が急速に蓄積する例が多いことが明らかになったため、同一症例のマルチプルサンプリングや原発及び再発腫瘍との比較に注力した。

#### (2) がん細胞におけるクロマチン動態異常の解析

肝細胞がんについて早期肝がんと進行がんの統合ゲノム解析を行い、早期肝がん段階で生じる変異として TERT および専ら進行期に生じる変異遺伝子として ARID1A および ARID2 が同定された。発がんドライバーとなる転写因子の活性化変異が生じて、その標的遺伝子の活性化には当該遺伝子の DNA 脱メチル化が相関することが見出された (投稿中)。

一方、DNAメチル化プロファイルに基づく症例層別化を試みたところ、特定のサブ集団 G2 では早期肝がんの段階において、クロマチンドメインとして知られる topologically associated domain 単位で異常な DNAメチル化ドメインが形成されていた。また DNA脱メチル化にかかわる TET1 遺伝子が特定のメチル化クラスター G3 で高発現し

ており(図 2)、特定のエンハンサー領域でのヒドロキシメチルシトシン(hmC)の上昇・メチルシトシン(mC)の低下が観察された(図3)。*TET1* が高発現する肝がん細胞株の増殖は *TET1* 依存的であり、脱メチル化によるスーパーエンハンサーの活性維持が想定された(投稿中)。

さらにクロマチンリモデリング因子 ARID1/2 変異と相関するオープンクロマチン領域を抽出し、クロマチン活性化に関わる転写因子候補を同定した。

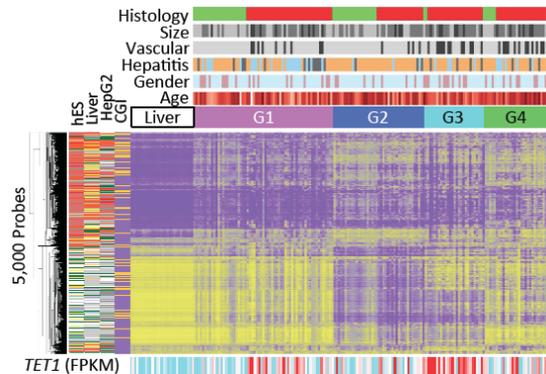


図 2 DNA メチル化による層別化

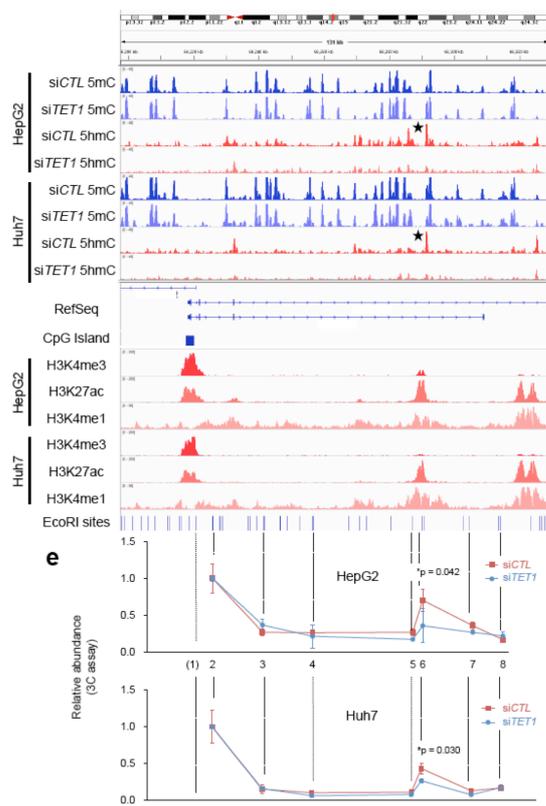


図3 mC/hmC の変動およびクロマチン相互作用

以上、エピゲノム変異は腫瘍の発生・進展の過程でクロマチンドメイン、遺伝子、制御領域など様々なレベルで生じていることが明らかとなった。

(3)ゲノム変異、クロマチン情報の統合によるがん細胞集団進化の解明

活性型ヒストン修飾に加えて  $\beta$ -catenin の ChIP-seq および RNA-seq 解析により腫瘍増殖

に関わる長鎖ノンコーディング RNA(lncRNA)の同定を進めた。Polycomb 抑制複合体 PRC2 と相互作用し、クロマチン状態の制御を介して  $\beta$ -カテニン標的遺伝子群の転写を正に制御する lncRNA が同定された(特許出願済)。shRNA あるいは CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックアウトにより *in vitro* での細胞増殖抑制も観察されるが、ゼノグラフトの増殖は劇的に抑制された。ノックアウト株では LGR5 の発現が低下することから、 $\beta$ -カテニンシグナルを制御することによってがん幹細胞の維持に重要な役割を果たすと考えられた(投稿準備中)。

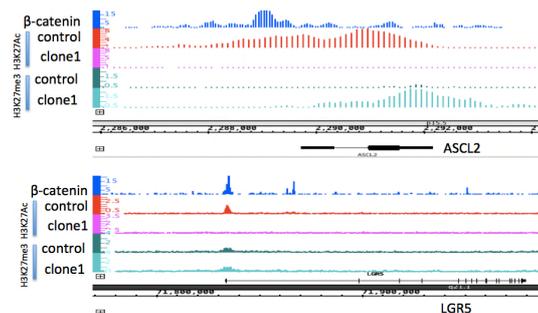


図4 lncRNA ノックアウトによるクロマチン変化

腫瘍内微小環境においては低 pH 状態が形成されるが、酸性環境下(pH6.8)において転写因子 SREBP2 が活性化され、酢酸代謝に関わる ACSS2 などの遺伝子群を誘導し、腫瘍細胞増殖をもたらすことを明らかにした(図5)(Cell Report 2017)。

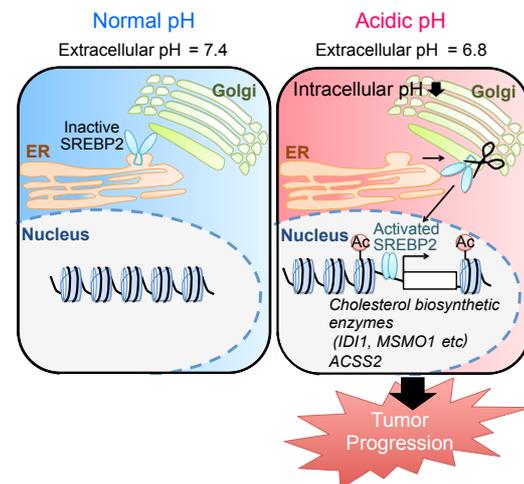


図5 低 pH 環境下でのがん代謝応答

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 81 件)

- ① Aihara K, Mukasa A, Nagae G, Nomura M, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Shibahara J, Takahashi M, Momose T, Tanaka S, Takayanagi S, Yanagisawa S, Nejo T, Takahashi S, Omata M, Otani R, Saito K, Narita Y, Nagane M, Nishikawa R, Ueki K, Aburatani H, Saito N. Genetic and epigenetic stability of oligodendrogliomas

- at recurrence. **Acta Neuropathol Commun.** 5(1):18. 2017  
DOI 10.1007/s10120-015-0493-0
- ② Kondo A, Yamamoto S, Nakaki R, Shimamura T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Yoshida T, Aburatani H, Osawa T. Extracellular Acidic pH Activates the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 to Promote Tumor Progression. **Cell Rep.** 18(9):2228-2242. 2017  
DOI 10.1007/s10120-015-0493-0
- ③ Tsuji S, Midorikawa Y, Seki M, Takayama T, Sugiyama Y, Aburatani H. Network-based analysis for identification of candidate genes for colorectal cancer progression. **Biochem Biophys Res Commun.** 476(4):534-40. 2016  
DOI 10.1007/s10120-015-0493-0
- ④ Fujimoto A, Furuta M, Totoki Y, Tsunoda T, Kato M, Shiraishi Y, Tanaka H, Taniguchi H, Kawakami Y, Ueno M, Gotoh K, Ariizumi SI, Wardell CP, Hayami S, Nakamura T, Aikata H, Arihiro K, Boroevich KA, Abe T, Nakano K, Maejima K, Sasaki-Oku A, Ohsawa A, Shibuya T, Nakamura H, Hama N, Hosoda F, Arai Y, Ohashi S, Urushidate T, Nagae G, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Ojima H, Hiraoka N, Okusaka T, Kubo M, Marubashi S, Yamada T, Hirano S, Yamamoto M, Ohdan H, Shimada K, Ishikawa O, Yamaue H, Chayama K, Miyano S, Aburatani H, Shibata T, Nakagawa H. Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer. **Nat Genet.** 48(5):500-9. 2016  
DOI 10.1007/s10120-015-0493-0
- ⑤ Uchi R, Takahashi Y, Niida A, Shimamura T, Hirata H, Sugimachi K, Sawada G, Iwaya T, Kurashige J, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Chiba K, Shiraishi Y, Nagae G, Yoshida K, Nagata Y, Haeno H, Yamamoto H, Ishii H, Doki Y, Iinuma H, Sasaki S, Nagayama S, Yamada K, Yachida S, Kato M, Shibata T, Oki E, Saeki H, Shirabe K, Oda Y, Maehara Y, Komune S, Mori M, Suzuki Y, Yamamoto K, Aburatani H, Ogawa S, Miyano S, Mimori K. Integrated Multiregional Analysis Proposing a New Model of Colorectal Cancer Evolution. **PLoS Genet.** 2016 Feb 18;12(2):e1005778. DOI 10.1371/journal.pgen.1005778
- ⑥ Saito Y, Nagae G, Motoi N, Miyauchi E, Ninomiya H, Uehara H, Mun M, Okumura S, Ohyanagi F, Nishio M, Satoh Y, Aburatani H, Ishikawa Y. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype in surgically resected small cell lung carcinoma. **Cancer Sci.** 107(3):320-5. 2016  
DOI 10.1111/cas.12876
- ⑦ Ikemura M, Shibahara J, Mukasa A, Takayanagi S, Aihara K, Saito N, Aburatani H, Fukayama M. Utility of ATRX immunohistochemistry in diagnosis of adult diffuse gliomas. **Histopathology.** 69(2):260-7. 2016  
DOI 10.1111/his.12927
- ⑧ Kaneda A, Nonaka A, Fujita T, Yamanaka R, Fujimoto M, Miyazono K, Aburatani H. Epigenomic Regulation of Smad1 Signaling During Cellular Senescence Induced by Ras Activation. **Methods Mol Biol.** 1344:341-53. 2016  
DOI 10.1007/978-1-4939-2966-5\_22
- ⑨ Ouchi K, Takahashi S, Yamada Y, Tsuji S, Tatsuno K, Takahashi H, Takahashi N, Takahashi M, Shimodaira H, Aburatani H, Ishioka C. DNA methylation status as a biomarker of anti-EGFR treatment for metastatic colorectal cancer. **Cancer Sci.** 106(12):1722-9. 2015  
DOI 10.1111/cas.12827
- ⑩ Uehara Y, Oda K, Ikeda Y, Koso T, Tsuji S, Yamamoto S, Asada K, Sone K, Kurikawa R, Makii C, Hagiwara O, Tanikawa M, Maeda D, Hasegawa K, Nakagawa S, Wada-Hiraike O, Kawana K, Fukayama M, Fujiwara K, Yano T, Osuga Y, Fujii T, Aburatani H. Integrated copy number and expression analysis identifies profiles of whole-arm chromosomal alterations and subgroups with favorable outcome in ovarian clear cell carcinomas. **PLoS One.** 10(6):e0128066. 2015  
DOI 10.1371/journal.pone.0128066
- ⑪ Ushiku T, Ishikawa S, Kakiuchi M, Tanaka A, Katoh H, Aburatani H, Lauwers GY, Fukayama M. RHOA mutation in diffuse-type gastric cancer: a comparative clinicopathology analysis of 87 cases. **Gastric Cancer.** 19(2):403-11. 2016.  
DOI 10.1007/s10120-015-0493-0
- ⑫ van Thuijl HF, Mazor T, Johnson BE, Fouse SD, Aihara K, Hong C, Malmström A, Hallbeck M, Heimans JJ, Kloezeman JJ, Stenmark-Askmal M, Lamfers ML, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Söderkvist P, Taylor BS, Molinaro AM, Wesseling P, Reijneveld JC, Chang SM, Ylstra B, Costello JF. Evolution of DNA repair defects during malignant progression of low-grade gliomas after temozolomide treatment. **Acta Neuropathol.** 2015 Feb 28. DOI 10.1007/s00401-015-1403-6
- ⑬ Johnson BE, Mazor T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, Fouse SD, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Asthana S, Jalbert LE, Nelson SJ, Bollen AW,

- Gustafson WC, Charron E, Weiss WA, Smirnov IV, Song JS, Olshen AB, Cha S, Zhao Y, Moore RA, Mungall AJ, Jones SJ, Hirst M, Marra MA, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Chang SM, Taylor BS, Costello JF. Mutational Analysis Reveals the Origin and Therapy-Driven Evolution of Recurrent Glioma. **Science**. 343(6167):189-93. 2014  
DOI 10.1126/science.1239947
- ⑭ Shibata T, Aburatani H. Exploration of liver cancer genomes. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 11(6):340-9. 2014  
DOI 10.1038/nrgastro.2014.6
- ⑮ Aihara K, Mukasa A, Gotoh K, Saito K, Nagae G, Tsuji S, Tatuno K, Yamamoto S, Takayanagi S, Narita Y, Shibui S, Aburatani H, Saito N. H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients. **Neuro Oncol**. 16(1):140-6. 2014  
DOI 10.1093/neuonc/not144
- ⑯ Sato T, Kaneda A, Tsuji S, Isagawa T, Yamamoto S, Fujita T, Yamanaka R, Tanaka Y, Nukiwa T, Marquez VE, Ishikawa Y, Ichinose M, Aburatani H. PRC2 overexpression and PRC2-target gene repression relating to poorer prognosis in small cell lung cancer. **Sci Rep**. 3:1911. 2014  
DOI 10.1038/srep01911

[学会発表] (計 48 件)

発表者はいずれも油谷浩幸

- ① Progression of hepatocellular carcinoma: Interplay of genome and epigenome. 第75回日本癌学会総会 10/08/2016 横浜
- ② Interplay of genome and epigenome in progression of hepatocellular carcinoma 12th Scientific Workshop, International Cancer Genome Consortium 9/21/2016 Boston (USA)
- ③ Progression of hepatocellular carcinoma: interplay of genome and epigenome. The 41st Naito Conference on Tumor Heterogeneity and Plasticity 7/6/2016 札幌
- ④ Methylation profiling of hepatocellular carcinoma. 第35回札幌国際がんシンポジウム 6/24/2016 札幌
- ⑤ Early hepatocellular carcinoma. 第102回日本消化器病学会総会 The 5th International Forum 4/22/2016 東京
- ⑥ Integrated genomic analysis of liver cancer progression. 第13回国際人類遺伝学会 4/4/2016 京都
- ⑦ Molecular spectra of hepatocellular carcinoma 第25回アジア太平洋肝臓病学会議年次総会 2/20/2016 東京
- ⑧ Genomic dissection of high grade serous

- ovarian cancer. Advances in Genome Biology and Technology 2/12/2016 Orlando (USA)
- ⑨ Genomic dissection of high grade serous ovarian cancer. 22<sup>nd</sup> International Symposium at Yonsei Song-Dang Institute for Cancer Research 10/16/2015 Seoul (Korea)
- ⑩ Comprehensive genomic characterization of gastric cancer. 第74回日本癌学会総会 10/8/2015, 名古屋
- ⑪ Genomic dissection of high grade serous ovarian carcinoma 第13回日本臨床腫瘍学会学術集会 7/16/2015 札幌
- ⑫ Progression of Hepatocellular Carcinoma. 第34回札幌国際がんシンポジウム 6/25/2015 札幌
- ⑬ Chromatin remodeling complex gene mutations in cancer. 第37回日本分子生物学会年会 11/27/2014 横浜
- ⑭ 大規模がんゲノム解析 第59回人類遺伝学会 11/22/2014 東京
- ⑮ Chromatin remodeling complex gene mutations in cancer. The 4th Japan-France Cancer Workshop 11/19/2014 京都
- ⑯ Mutation in chromatin remodeling complex genes and cancer. 第73回日本癌学会総会 9/25/2014 横浜
- ⑰ Integrated genomic analysis of hepatocellular carcinoma. International Scientific Coordination Network (ISCN) 11/20-23, 2013, Toulouse (France)
- ⑱ DNA demethylation and Cancer. 第72回日本癌学会総会 10/5/2013 横浜
- ⑲ Integrated genomics of hepatocellular carcinoma genome. Advances in Genome Biology and Technology 2013 2/22/2013 Marco Island (USA)
- ⑳ Genomics of cancer progression. NSFC-JST Workshop on Genomics for Clinical Studies 2/5/2013 Shanghai (China)
- 21 ゲノム医療: パーソナルオンコロジーの実現へ向けて 第54回日本消化器病学会大会 10/11/2012 神戸
- 22 Genomics of Cancer Progression 第71回日本癌学会総会 9/20/2012 札幌

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 抗癌治療に用いられる長鎖非コード RNA  
発明者: 油谷 浩幸, 野中 綾, 宮澤 達也  
権利者: 東京大学, ほか  
種類: 特許権  
番号: **PCT/JP2013/080878**  
出願年月日: 2013/11/15  
国内外の別: 国外

○取得状況(計1件)

名称:肝細胞癌由来の癌細胞の存否の判定方法、判定用マーカーおよびキット  
発明者:酒井綾子、永江玄太、梶田昌裕、油谷浩幸、緑川泰  
権利者:東京大学、ほか  
種類:特許権  
番号:特許第 6056092 号  
取得年月日:2016/12/16  
国内外の別:国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

油谷 浩幸 (ABURATANI, Hiroyuki)  
東京大学・先端科学技術研究センター・教授  
研究者番号:10202657

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者

堤 修一 (TSUTSUMI, Shuichi)  
東京大学・先端科学技術研究センター・特任  
准教授  
研究者番号: 30345152

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