

がん種横断的ゲノム解析による発がん機構の解明に関する研究

森山光彦¹⁾, 黒田和道²⁾, 杉谷雅彦³⁾, 増田しのぶ⁴⁾, 江角真理子³⁾,
八田善弘⁵⁾, 橋本 修⁶⁾, 高橋昌里⁷⁾

Cross-sectional genomic analysis study of human carcinogenesis

Mitsuhiko MORIYAMA¹⁾, Kazumichi KURODA²⁾, Masahiko SUGITANI³⁾, Shinobu MASUDA⁴⁾,
Mariko ESUMI³⁾, Yoshihiro HATTA⁵⁾, Shu HASHIMOTO⁶⁾, Shori TAKAHASHI⁷⁾

要旨

がんは、ゲノム・エピゲノムの変化が蓄積することにより発生するが、これらの変化は各がん種のみみにみられる特殊なものではなく、すべての臓器由来のがんについて頻回に認められるがん遺伝子、抑制遺伝子の変化であると考えられている。がん組織の次世代シーケンサーの解析により、各がん種に共通した抑制遺伝子が確認されてきている。本研究は、がん種横断的に遺伝子異常を解析することにより、これまで認識されなかった発がんメカニズムの解析を行い、バイオマーカー及び創薬に繋げることにある。各がん種に共通した発がん候補遺伝子の同定には至らなかったが、各がん種において腫瘍発生と進展に関わる遺伝子の異常を検出し得た。今後は、本研究により構築し得たシステムを通して研究者間において連携を取り合い、さらなる発がん・進展遺伝子の確定を行いたい。

1. はじめに

がんは、ゲノム・エピゲノム異常が蓄積することによって多段階に発生・進行する遺伝子の疾患である。2000年にヒトゲノム解析が終了し、その後登場した次世代シーケンサーによる急激なコストダウンとバイオインフォマティクスの発達により、ゲノム解析技術が飛躍的に向上し、大規模で体系的ながん遺伝子の探索が可能となっている。このように、がんはゲノム・エピゲノムの変化が蓄積することにより生じるが、これらの変化は各がん種のみみにみられる特殊なものではなく、すべての臓器由来のがんについて頻回に認められるがん遺伝子、抑制遺伝子の変化であると考えられる。がんの次世代シーケンサー (NGS) の解析により、例えば、*ARID1A* や *ARID2*¹⁾ などが各がん種に共通した抑制遺伝子であると認識されるようになった。このように、がん種

横断的に遺伝子異常を解析することにより、これまで認識されなかった発がんメカニズムの側面が見えてくる可能性がある。また、発がんやがん進展の liquid biopsy によるバイオマーカーの開発や創薬に繋がるのが推測される。

現在まで、各臓器についてのゲノム解析は米国人ゲノムアトラス (TCGA) および国際がんゲノムコンソーシアム (ICGC) により多数検体による報告がなされている。さらに、各がん種のシーケンサーデータを集積して横断的な解析を行うことにより得られる統計パワーを利用して高感度なゲノム解析を行い、それらを比較解析することによりがん種を超えたがんサブタイプ分類についての知見を得ることが可能となっている。その一方で、これらのビッグデータについては多数の施設より検体を収集するため連結不可能な匿名化がなされており、詳細な臨床

1) 日本大学医学部内科学系消化器肝臓内科学分野

2) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

3) 日本大学医学部病態病理学系形態機能病理学分野

4) 日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野

5) 日本大学医学部内科学系血液膠原病内科学分野

6) 日本大学医学部内科学系呼吸器内科学分野

7) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野

森山光彦: moriyama.mitsuhiko@nihon-u.ac.jp

情報と連結して変異シグネチャーなどのゲノム変化とがんの原因を検索することが困難であることも少なくない。さらに、一方NGSによる解析では、施設により使うプローブや解析プラットフォームが異なるため、施設により解析結果が異なる。すなわち、それぞれのデータを統合するのが極めて困難であることが、TCGAおよびICGCが現在直面している障壁であり、Pan Cancer Projectの進捗を阻んでいる。

本研究は、単独施設でがん治療に携わる診療科の枠を越えて検体を収集し解析することにより、得られたdataと詳細な臨床情報をリンクさせて、がん種横断的に発がんのメカニズムを明らかにすることを目的とするものである。本研究にて使用される本学で得られる検体は、基本的な情報はもちろん薬剤の投与状況・年数まで把握しているため、薬剤感受性や発がんの影響までも詳細に検討することが可能である。さらに詳細な臨床情報とがん種横断的研究を組み合わせることにより、あるがん種で報告されている薬剤や併存疾患の影響を、他がん種において容易に観察することができる。

このように、現在世界的規模で行われているコンソーシアムの研究と比較して、絶対数では劣るものの詳細な臨床情報を利用することで、大規模組織では見落とされやすい、あるいは観察することのできない現象を見つげられる可能性が十分にあり、その点にも本プロジェクトの意義がある。

以上本研究は、病理科・消化器科・婦人科・呼吸器科・小児科・血液内科を含めて幅広く横断的に各がん種を解析するものである。これら多岐にわたる異なる診療科が協力して一つの研究に向かうことは、多施設共同研究では不可能なことである。国内でも有数の研究施設が併設されている日本大学医学部が、各診療分野の垣根を越えて、その特徴を最大限に生かしてPan Cancer Projectを遂行すれば、他のプロジェクトでは得られない知見が得られる。尚、各研究毎に当院倫理委員会の臨床研究の承認を得て実施する。

1. 肝がん (I)

—マイクロゲノミクスからがんの発生進展と腫瘍抗原を探る—

がんゲノム変異解析から、がん heterogeneity が予想以上に示唆されてきているものの、何ががん発

生の driver mutation で、何ががん進展の driver mutation か、まだわかっていない。本研究では、これらがんゲノム進化を明らかにする目的で、症例毎に詳細なゲノム解析を実施した。具体的にはホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) を対象とし、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) により、多彩ながん組織像や前がん病変を個別に採取し、ゲノム解析を実施した。ここでは、これを「マイクロゲノミクス」と呼ぶ。さらに、明らかとなった変異を対象に腫瘍抗原 (neoantigen) 候補を推測し、腫瘍免疫の可能性を探った。

本研究では、以下の5つの独立したテーマについて研究を遂行した。以下のごとく結果を得た。

1) ヒト早期肝細胞がんと前がん病変の全エクソーム解析 (WES)

12mmの早期肝細胞がん症例では、2箇所各々100を超えるアミノ酸置換変異が観察され、その6割は共通変異であった。隣接する dysplasia でもがん部と同じ変異が観察された。17mmの境界不明瞭な異型結節を伴う早期がん症例では、2箇所の dysplasia に各々100近いアミノ酸置換変異が観察され、その5-6割は両者に共通変異であった。以上より、腫瘍径2cm以下の早期肝細胞がんでも腫瘍結節内部でがん細胞クローンの進化が見られた。また、dysplasia においてもがん部同様の遺伝子変異が明らかとなり、前がん病変であることが遺伝子レベルで示された。

2) ヒト肝細胞がん腫瘍抗原候補の推定

上記の早期肝細胞がんについて腫瘍抗原候補を検討した。WESの結果からHLAを決定し、アミノ酸変異を伴う63個の遺伝子変異を対象に、HLAタイプと9アミノ酸ペプチドとの結合親和性を検討した。変異に伴い親和性亢進が予測され、肝臓に発現が予想されるものが8個見つかった。これらの提示にはHLA-Cの関与が多く占めると予想された。今後、複合体形成の親和性亢進を生化学的に証明し、これら複合体と反応するT細胞の関与についても、T細胞受容体のレパトア解析からアプローチし、腫瘍免疫の成立の可能性と、治療への応用につなげていきたい。

3) ラット肝細胞がんの原発腫瘍と肺転移腫瘍の腫瘍結節クローン解析

Long Evans Cinnamon (LEC) ラット (銅輸送ポンプ *Atp7b* 遺伝子欠損による銅異常蓄積から発がんへ至る肝がんモデルラット) の肝細胞がんを全ゲノム解析した結果、6アミノ酸置換変異を見つけた。2変異は、複数の肝臓内腫瘍結節と複数の肺転移巣全てに共通であった。残りの4変異は肝臓内腫瘍のみ見られたが、肝臓内腫瘍結節ごとに、+1, +2, +4変異と変異の連続的蓄積、すなわちがんクローンの直線的進化が観察された。以上より、2変異がこの腫瘍の driver 変異であり、次々に新たな変異を獲得、heterogeneousな進化を起こしていると思われた。転移巣では同一の細胞集団を起源に複数の結節が形成されたと考えられた。

4) 肝細胞腺腫と関連肝細胞がんの遺伝子変異解析

HCAは肝臓の良性腫瘍で、WHO分類の3型には分類されない unclassified HCA (UHCA) がある。変異解析から、3型のいずれかに再分類される可能性を検討した。症例1では、inflammatory HCA (IHCA) に特徴的な変異遺伝子 *JAK1* と同様 *JAK/STAT* シグナリングに参与する *JAK3* の変異が見つかった。症例2では、*CTNNB1* 変異が30年後のHCCに見つかり、初発のUHCAにも見つければ、 β -catenin activated type (bHCA) の可能性が出てきた。

5) 初発肝細胞がんと再発混合型肝がんの遺伝子変異解析

肝細胞がんと混合型肝がんを異時発生した再発肝がん症例について、遺伝子変異解析からがん発生の起源を検討した。3回目の混合型肝がんに見つかった変異は、2回目の肝細胞がんにはあったが初回の肝細胞がんにはなかった。従って、3回目の混合型肝がんは2回目の肝細胞がん起源と同じ可能性がある。

以上のように、良性腫瘍である肝細胞腺腫から、前がん病変を含めた早期肝細胞がん、そして肝細胞がんの再発を繰り返した混合型肝がんまで、マイクロゲノミクスを実施した。組織型の違いはもとより、同一患者の異時発生腫瘍や、同一腫瘍内の異なる腫瘍部位でも遺伝子変異の違いは観察された。腫瘍の進展にはhetero-cloneを生み出すことは間違いなく、そのheterogeneityが腫瘍生物学的にいかなる意味

があるかは、未知である。一方、一部には同一変異が保存される場合もみられ、異時発生でも起源は同じと考えられる。まさに driver mutation といえる。まだ解析半ばの状況であり、さらに解析が進めばクローン進化の様相とその意義は明らかになると思われる。特に、LCMを駆使したゲノム変異解析は、形態学的診断では境界領域であった異型病変について、遺伝子レベルで腫瘍といえる変異があることをはじめて示した。遺伝子変異の蓄積は、形態学的な異変を伴わなくとも既におこっているといえる。LCMでの正確な組織採取とその後の解析は、腫瘍生物学、腫瘍診断学に新たな道を切り開くと考える。

2. 乳がんについての検討

1) 細胞接着蛋白 *E-Cadherin* の異常は、乳腺小葉がんの特徴のひとつであり、*E-Cadherin* 免疫組織化学法 (IHC) は、乳腺小葉がん乳管がんの鑑別診断に有用な手法である。*E-Cadherin* 蛋白の異常を引き起こす原因として、*E-Cadherin* の遺伝子 *CDH-1* (16q22.1) の変異、欠失、gene methylation, LOH, 或いは16番染色体長腕の欠失 (16q loss) などが上げられる。今回、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) された病理組織を用いて、Dual-FISH法、定量PCR法 (DNA)、定量RT-PCR法 (mRNA) により *CDH-1* 遺伝子を解析して比較を行った。その結果、固定条件の安定した新しい検体では各種解析結果も安定する傾向が示され、症例BおよびCでは、DNAレベルでの *CDH-1* 遺伝子の欠失による *E-Cadherin* 発現の消失があり、AではDNAレベルでの *CDH-1* 遺伝子の欠失等は認められないがmRNA発現は検出されない例も認められた。また、*CDH-1* 遺伝子変異の点突然変異は、浸潤性小葉がん (ILC) だけではなく、非浸潤性の小葉がん (LCIS) でも検出された。

2) 浸潤性乳管がん (IDC) における Ras homolog A (*RhoA*) 発現の意義をIHCと定量RT-PCR法で検討した結果では、腫瘍包巣内の部位による *RhoA* mRNA発現量の差は認められなかったが、IHCによる *RhoA* 蛋白発現は腫瘍包巣の中心部よりも進展部で高い傾向が示された。また、*RhoA* を介したF-actinの高発現による腫瘍の進展は、*HER2* mRNA発現量と高い相関を示したことから、特に *HER2* を高発現しているタイプの IDCにおける *RhoA* 発現の意義

が示唆された。

3. 大腸がんの検討

治療標的分子としての遺伝子変異について大腸がんの手術、生検検体からの *KRAS*, *NRAS* 変異解析法を検討した。現在、唯一の体外診断薬であり受託検査で行っている PCR+rSSO 法 (MBL) を A 法、研究用試薬としての Q probe 法 (ARKRAY) を B 法、BNA Extended RAS (RIKEN GENESIS) を C 法として比較した。

この結果、主要な変異である *KRAS* codon12/13 の変異は方法の違いに関わらず高感度に検出できることが示されたが、マイナー変異とされる変異は検出感度の低下が見られた。従って、セツキシマブに対するコンパニオン診断として大腸がん検体から RAS 変異解析を行う際は、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を良く鏡検して腫瘍細胞の含有量を高める注意が必要と考えられた。

4. 肺がん (I)

肺がんの *EGFR* 遺伝子検査も分子標的治療のコンパニオン診断として必須となっているが、進行期の肺がん患者では微小な生検検体または気管支洗浄液などの細胞診検体に限られる場合も多い。しかし現在では、肺がん診療ガイドライン上で検索しなければならぬ項目も増加しているため、検体量不足が懸念されている。そこで、診断のために各種染色を行った細胞診標本からの *EGFR* 遺伝子変異解析の可能性について検討した。

この結果、日常的に使用される染色法であるパパニコロウ染色、ギムザ染色、PAS 染色を行った標本のいずれにおいても *EGFR* 遺伝子変異は十分に検出可能であることが示された。

以上の検討により、今回検討を行ったがん種では、FFPE 検体からの分子病理学的解析によってがんの発生と進展に関与し、診断マーカーや治療マーカーとなる分子の検出が可能であった。生体内におけるがんの発生や進展様式を解明するために、個々の患者の病態を把握できる病理組織検体は、解析技術の発展に伴って、さらに高精度に解析が進むことが期待される。

5. 肺がん (II)

がん細胞は多様な遺伝子変異が生じることが知られているが、なかでも細胞内でエネルギー生産を担うミトコンドリアの機能低下を招く遺伝子変異は、多くのがん細胞に共通して生じていることが知られている。しかしながら、ミトコンドリアの機能低下とがんの発生、進行との関係は、今日、ほとんど分かっていない。近年、がん細胞は細胞外小胞であるエクソソームを細胞外に多量に排出し、がん細胞同士あるいは、がん細胞と宿主細胞間でエクソソームを分泌し交換することで情報伝達を行っていることが知られている。がん患者では、ミトコンドリアの遺伝子異常を有するがん細胞からエクソソームが多量に分泌され、血中に流出し循環していると考えられる。このようなエクソソーム内にみられるミトコンドリア遺伝子の変異を調べることで、血液を介してがん細胞の存在や病態を解析できないかどうかを検討した。

1) エクソソーム内 RNA 発現解析

研究計画に関しては、日本大学医学部附属板橋病院から承認を得た。書面による同意を得て採取した小細胞がん患者の血清から Total exosome isolation kit (from serum) (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてエクソソームを単離した後、単離したエクソソームから RNA 抽出した。RNA 量およびサイズは Agilent RNA 6000 Pico Kit (agilent 社) を用いてバイオアナライザーで解析を行った。得られたエクソソーム RNA を Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてライブラリ調製した後、次世代シーケンサー (Ion PGM; Thermo Fisher Scientific 社) 用いて RNA 発現を行った。

2) ミトコンドリア DNA 解析

小細胞がん患者の血餅から Puregene blood Core Kit B (Qiagen 社) を用いて DNA 抽出を行った。得られた DNA 量は Nanodrop (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて解析した。ミトコンドリア DNA の増幅は REPLI-g Mitochondrial DNA Kit (Qiagen 社) を用いて行った。得られたミトコンドリア DNA 量は Qubit® dsDNA HS assay kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて Qubit (Thermo Fisher Scientific 社) で解析を行った。ミトコンドリア DNA を Nex-

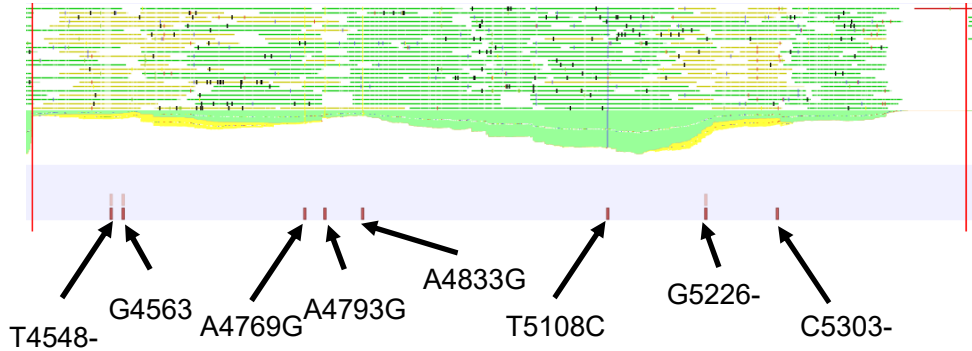


図1 MT-ND2の変異箇所の一例

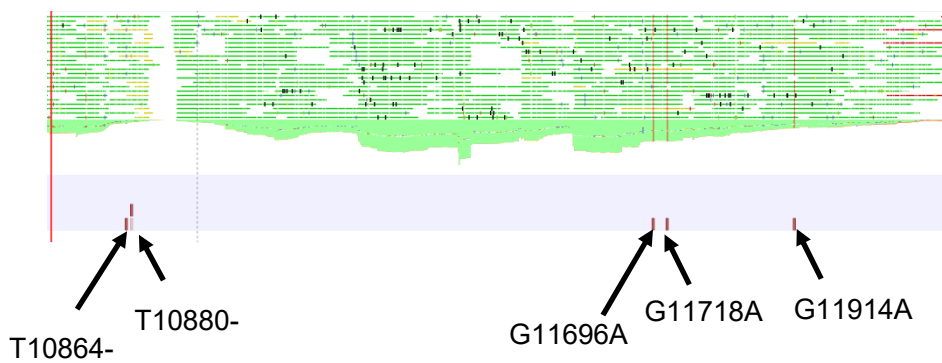


図2 MT-ND4の変異箇所の一例

tera DNA Sample Preparation Kit (illumina社) を用いてライブラリ調製した後、次世代シーケンス (Miseq; illumina社) 用いてDNA発現を行った。

3) シークエンスおよび変異解析

得られたシーケンスデータはCLC Genomics Workbench (Qiagen社) を用いて解析した。変異解析はIngenuity® Variant Analysis (トミーデジタルバイオロジー社) を用いて解析した。

この結果、小細胞がん患者の血清中エクソソーム内RNAのシーケンスデータのバリエーション解析した結果、ミトコンドリアに多数の変異が認められ、なかでもMT-ND2 (図1) およびMT-ND4 (図2) に多くみられた。健常者でもミトコンドリアDNAの変異がみられたが、健常者に比べて小細胞がん患者で変異箇所の増加する傾向がみられた。さらに、血餅から得られた増幅ミトコンドリアDNAでも同様の結果が得られた。血餅中ミトコンドリアDNA変異と比較して、エクソソーム内のミトコンドリアRNA変異は塩基の欠損によるものが多い傾向がみ

られた。

6. 肝がん (II)

肝がんにおける発がん原因の一つとして、ウイルス感染が推定されており、現在まで多数のGenomic, Epigenomic, Somaticな検討がなされている。今回我々は、HBV感染が引き起こすヒト染色体へのHBVゲノムの組み込み様式の検出と発がんとの関連について検討した。

1) 肝がん組織切片を用いて Fluorescence in situ hybridization (FISH) を行い、ヒト染色体に組み込まれたHepatitis B Virus (HBV) の検出を行った。FISHプローブはpBRHBadr72 (Fujiyama, A. et al., Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. Nucleic Acids Research. 1983. 11 (13) 4601-4610) を用いた。FISHプローブシグナルの検出およびデータの解析はLeica CW-4000サイトジェネティックワークステーションを用いた。

この結果では、HBVゲノムは肝細胞核内および細胞質内に検出された。HCV抗体陽性の肝がん例にお

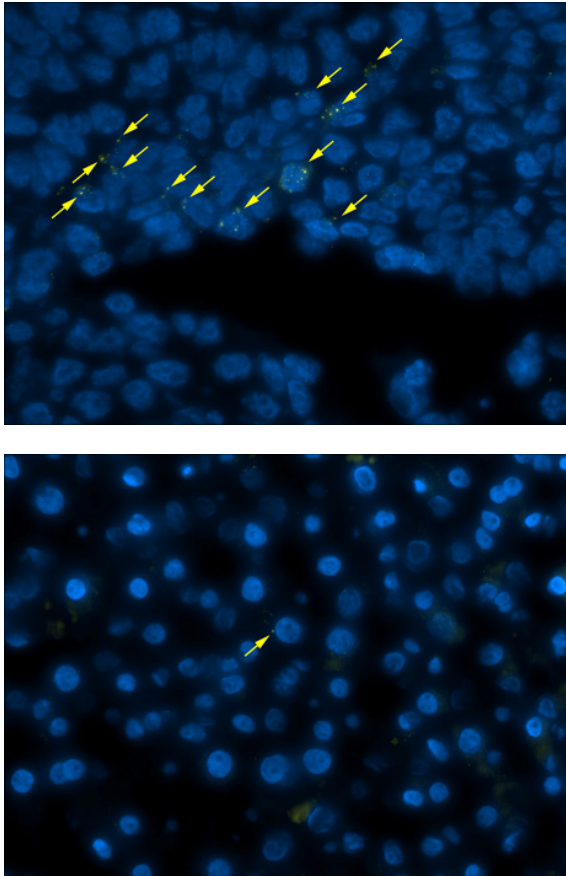


Fig.1

いても、肝細胞核内および細胞質内に検出された (Fig.1 矢印はHBVゲノムの蛍光を示す)。

Fig.1 上段は、HBV感染肝がんのがん部肝組織を用いたFISH法による、HBVゲノムの検出像を提示する。主にがん細胞核内および細胞質にHBVゲノムが認められる。

Fig.1 下段は、同一症例の非がん部肝組織を用いたFISH法による、HBVゲノムの検出像を提示する。肝細胞核内と細胞質内にHBVゲノムが認められた。

2) HBV感染肝がん症例の末梢血リンパ球より、次世代シーケンサーによるHBVゲノムの組み込みの有無を検出した。

本邦で発生数の多い乳がん・肺がん・胃がん・肝がん・大腸がん・子宮頸がんのうち、細菌およびウイルスの感染が発がんの原因の一つと考えられているがんは、肝がん・胃がん・大腸がん・子宮頸がんが挙げられる。感染症により発がんが励起される場合、その要因として感染微生物由来ゲノム断片のヒトゲノムへの組み込みによる種々の遺伝子の異常の寄与が推測されている。この挿入様式の解析には、

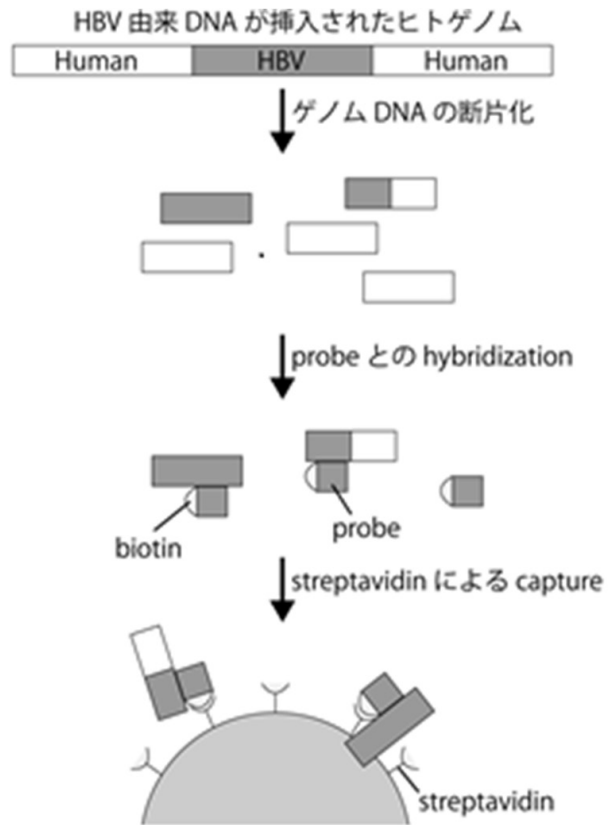


図3 シークエンスクャプチャー法の概要

次世代シーケンサーを用いた、がん組織由来ゲノムDNAの解析が有効である。

次に、肝がん・胃がん・大腸がん・膵がんおよび子宮頸がん発生に関与しているとの報告がなされている微生物には、*Helicobacter pylori* (HP), Hepatitis B virus (HBV), Hepatitis C virus (HCV), Human papilloma virus (HPV), Cytomegaro virus (CMV)などが知られている。そこで、肝がん例でのHBVゲノムのヒトゲノムへの組み込み様式を、手術切除組織(がん部と非がん部)と末梢血白血球において検出した。これらの微生物由来ゲノムの組み込み検出法として我々は、シーケンスクャプチャー法(図3)を利用して、ハイブリダイゼーションにて得られた産物を、次世代シーケンサーを用いて組み込みの解析・検出を行う。微生物ゲノムをprobeとしたキャプチャー法を行うことで、100検体以上の臨床試料を1ランで問題なく解析できることを示す結果を得ており、次世代シーケンサーを用いた目的ゲノムの組み込み解析の劇的な低コスト化ができる。

これにより、統計的有意性を議論できるレベルの

多数検体の解析が可能となる。これまでも多数の微生物DNA挿入部位の解析が行われてきたが、がん細胞での挿入にのみ焦点が当てられて来た。本研究においても同様な情報を得ることが目的の一つであるが、そこに留まらず、非がん部組織並びに白血球での微生物ゲノムの挿入について特に注目した。

実際に次世代シーケンサーを用いた先行研究では、非がん部組織でのHBVやHPVゲノムの挿入が確認されている²⁾。非がん部組織および白血球への挿入は特異性が低く、多数検体の解析により統計的に意味を持つ発がんに関連する挿入が見出せると考えられる。

HBs抗原陽性肝がんおよびHCV抗体陽性肝がんのがん部肝組織より、HBVゲノムの組み込みの有無について、同様にマッピング解析を施行して検索した。現在までの結果を以下に提示する。

1. がん部においては、Chr.1; *RCC2*, *SYT14*, Chr.2; *CPS1*, Chr.15; *FAH*, *CERS3* 部位に、いずれもHBVゲノムの挿入が認められた。
2. 非がん部においては、Chr.2; *FN1*, Chr.5; *PIK3R1*, Chr.18; *RP11-146N18.1*の部位にHBVゲノムの挿入が認められている。
3. これらに関しては症例によって、HBVゲノムの挿入部位は異なっており、解析を継続している。

以上今回の研究より、末梢血よりHBVゲノムのヒト染色体上への組み込みを確認した。

7. 小児がん

成人がんと比較し、小児がんは以下のごとくいくつかの際立った特徴を有している。

1. 発症数が成人と比べて少数（年間発症数 2000）である。
2. ほとんどが上皮性ではなく肉腫で、組織型も多種にわたる。
3. 好発年齢があり、治療反応性や予後と関連している。
4. 後天的な遺伝子異常だけでなく、遺伝的な素因ががんの発症に関連している可能性が高い。
5. 多くが従来型の化学療法剤で治癒が期待できる。
6. 稀だが自然寛解する例がある。
7. 分化誘導療法や抗体療法、ワクチン療法が試みられ、一定の効果が報告されている。

小児がんの希少性からわが国では、中央診断が以前から実施され、診断とリスク因子の同定を目的とした遺伝子変異やゲノム異常についての研究が行われてきた。これとは別に当科では上記の4, 7に着目し、独自の研究を実施している。

1) 遺伝子解析

これまでに血小板減少を主たる症状とし、後に急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群に移行した姉弟例から*RUNX1*の胚細胞性変異を同定した（2011年の第16回ヨーロッパ血液学会、2011年の第114回日本小児科学会で発表）。同様の事例で*CEBPA*の点変異を同定しているが、現在、この変異について機能解析を実施中である（未発表）。また、全消化管に多発するリンパ腫と診断された女兒について、リステリア髄膜炎の既往歴から免疫不全症を疑い、*PI3Kδ*遺伝子の胚細胞性変異を東京医科歯科大学と共同して同定した（2014年の第56回日本小児血液・がん学会にて発表済み）。さらに、好酸球の異常増多（200000/uL）を示した症例では、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析により特発性好酸球増多症の原責任遺伝子の同定を試みている（未発表）。

稀な染色体転座を有する急性リンパ性白血病の症例では、RNAシーケンサーの手法を用いて、白血病関連新規融合遺伝子の同定を現在試みている（未発表）。

2) 抗体療法とエピゲノム異常

近年、チェックポイント阻害薬や抗体療法を含む分子標的治療が注目されているが、小児がんにおいてもその効果は検証されるべきである。このため、当科では病理学分野と共同し、いくつかの分子について、epigeneticな変化に着目した。ワクチン治療が開発されている*WT1*、チェックポイント阻害薬として様々ながん種に有効性が期待される*PDL1*とそのリガンド*PDL1*, *PDL2*、神経芽腫の抗体治療薬として開発された*GD2*である。*GD2*は神経芽腫だけでなく、多くの小児がんにも発現していることが報告されていることから、有望な治療標的と考えられる。

当院の臨床研究審査委員会の承認を得て開始された共同研究では、*GD2*に関して新たな知見が得られ

た（2017年の日本病理学会総会にて発表予定）。他の分子の発現と治療反応性、予後との関連を今後、明らかにしていく予定である。

8. 血液がん

8.1 未知のがん関連遺伝子の同定

われわれは特異な染色体転座を持つ複数の白血病、リンパ腫症例を経験し、これらはいずれも未知の融合遺伝子を持つと推測された。本研究でこれらの症例を対象に新たな融合遺伝子、または白血病やリンパ腫に関連する遺伝子の同定、病因の解明、新規治療の開発を目指した。いずれも凍結保存検体を用い次世代シーケンスで解析した。

1) 芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍 (blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm *BPDCN*)

*BPDCN*は極めて予後不良であるが症例が少ないため、長らくその起源や発症に関与する遺伝子異常は不明であった。われわれは、特異な染色体転座を有する*BPDCN*を経験した。この転座は過去にも*BPDCN*で複数の報告があり*BPDCN*の発症または進展などに関与している可能性が高い。次世代シーケンスおよびサンガー法を用いて*myc*遺伝子と他の遺伝子との融合を確認した。今後*myc*の発現を類似症例を含めて検討予定である。

2) バーキットリンパ腫

最近われわれは診断時に限局期であり、しかも高齢であるにもかかわらず化学療法で寛解を維持しているバーキットリンパ腫を経験した。この症例では体細胞に染色体転座が認められ、末梢血検体で転座の塩基配列を決定した。この転座に*myc*遺伝子の発現を抑制している遺伝子が含まれている可能性を見出した。

3) 骨髄増殖性腫瘍

未知の染色体転座を伴う骨髄増殖性腫瘍を経験した。シーケンスで*PDGFb*の関連する融合遺伝子であることを確認した。今後、*PDGFb*の発現や*in vitro*でチロシンキナーゼ阻害薬による反応性を検討する予定である。(発表準備中)

8.2 骨髄腫細胞の細胞周期とオートファジーの研究

cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6の阻害薬 abemaciclibの骨髄腫細胞への影響を検討した。Abemaciclibの濃度依存的に骨髄腫細胞の細胞周期G0/G1の増加、S-G2/Mの減少、アポトーシス、オートファジーが認められた。Abemaciclibとclarithromycinを併用すると骨髄腫細胞のアポトーシスが抑制されたことから、このアポトーシスはオートファジーによる細胞死と考えられた。本研究は骨髄腫に対する新たな治療戦略に結びつけられると考えている。

まとめ

わが国におけるがん死亡は年間30万人を超え、高齢化社会を背景として高齢者の発がん例の増加と共に疾患死亡率は増加傾向にある。本邦では、現状では2人に1人ががんを発症して、3人に1人ががんにて死亡する。現在までに多数の発がんに関連する遺伝子異常は報告されているが、依然として発がん候補遺伝子 (driver gene) は確定されていない。一方で発がん研究は個々のグループでの研究が大部分であり、大規模研究は数少ない。今回我々は、大学内での研究機構を通して、がん種横断的に候補遺伝子の検索を行い、発がんバイオマーカーの開発と創薬を最終的な目的として研究体制を構築した。

研究開始より1年間の短期間の検索では、未だにdriver geneは確立されていないが、検索方法もLMC, FISH, NGS, capture methodsなどの最新の手法と機器を使用して施行し得た。今後これらの得られたdataを解析して、がん種横断的なバイオマーカーの開発と、それを利用した創薬へと繋げていくことが期待される。

また、今回使用したこれら方法論の公開においても、学内には大きな成果が得られたと思う。この紀要を見た医学部内の研究者が、相談の上利用することも可能であろう。

本プロジェクトは平成28年度の1年に亘って日本大学医学部総合医学研究所において実施されたものである。その成果の一端を上記したが、多数の発がん候補遺伝子を検出して、発がんについて多くの新しい知見が得られたと自負している。これらの成果は、実際にプロジェクトに参加した研究者だけでなく、文部科学省および本学並びに医学部、さらに

関係共同機関の方々の長期に亘るプロジェクトに対する支援の賜物であります。支援いただいた皆様に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Kelso TWR, Porter DK, Amaral ML, Shokhirev MN, Benner C, Hargreaves DC. Chromatin accessibility underlies synthetic lethality of SWI/SNF subunits in ARID1A-mutant cancers. *Elife*. 2017 Oct 2;6. pii: e30506. doi: 10.7554/eLife.30506.
- 2) Ferber MJ, Montoya DP, Yu C, Aderca I, McGee A, Thorland EC, Nagorney DM, Gostout BS, Burgart LJ, Boix L, Bruix J, McMahon BJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI, Roberts LR. Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers. *Oncogene*. 2003 Jun 12;22(24):3813-20.