

# 日本消化器癌発生学会 理事長直轄プロジェクト

## 特別推進研究「癌のゲノム解析と臨床応用の新展開」

### 研究発表会抄録

日時： 平成 28 年 2 月 13 日 (土) 10:00~12:00

場所： 九州大学 コラボステーション II セミナー室 (2 階)

(九州大学医系キャンパス内:福岡市東区馬出 3-1-1)

- |   |  |       |                            |       |
|---|--|-------|----------------------------|-------|
| 1 | B 型慢性肝炎 (CHB) の発癌リスクに関与する microRNA の探索                   | 高橋 秀明 | 札幌医科大学<br>分子生物学講座          | 2 ページ |
| 2 | DNA 脱メチル化異常をバイオマーカーとする癌易罹患性の評価                           | 齋藤 正昭 | 自治医科大学埼玉医療センター<br>一般・消化器外科 | 3 ページ |
| 3 | 活性化胃がん関連線維芽細胞には多くのエピジェネティック異常が存在する                       | 前田 将宏 | 国立がん研究センター研究所<br>エピゲノム解析分野 | 4 ページ |
| 4 | Droplet digital PCR を用いた胃癌患者血漿遊離 DNA における HER2 増幅モニタリング  | 庄田 勝俊 | 京都府立医大<br>消化器外科            | 5 ページ |
| 5 | 胃癌における trastuzumab 二次耐性に関する遺伝子の同定                        | 岩槻 政晃 | 熊本大学<br>消化器外科              | 6 ページ |
| 6 | 大腸癌のゲノム・エピゲノム解析より明らかとなった腫瘍内多様性とクローン進化                    | 内 龍太郎 | 九州大学病院 別府病院<br>外科          | 7 ページ |
| 7 | ゲノムワイド shRNA スクリーニング法による新たな膀胱癌肝転移抑制因子候補 ITIH5 の同定とその機能解析 | 佐々木 健 | 鹿児島大学<br>消化器・乳腺甲状腺外科学      | 8 ページ |

## B 型慢性肝炎(CHB)の発癌リスクに關与する

### microRNA の探索

高橋秀明<sup>1,2)</sup>、奥瀬千晃<sup>2)</sup>、山田典栄<sup>3)</sup>、新沼猛<sup>1)</sup>、山本英一郎<sup>1)</sup>、  
丸山玲緒<sup>1)</sup>、四柳宏<sup>4)</sup>、鈴木通博<sup>2)</sup>、伊東文生<sup>2)</sup>、鈴木拓<sup>1)</sup>

1)札幌医科大学分子生物学講座、2)聖マリアンナ医科大学消化器・肝臓内科、  
3)清川病院肝臓病センター、4)東京大学医学部感染症内科

【背景】 核酸アナログ(NA)製剤の登場によりCHBの制御が可能となりつつあるが、発癌の完全な抑制には至っていない。

【目的】 NA治療後に発癌例と非発癌症例を比較することで、発癌に關与するmicroRNA(以下miRNA)の同定を目指す。

【患者および方法】 CHB患者でNA治療開始後2年以上経過している症例を対象とした。1) 非発癌群:① n=14; NA治療前、② n=13; NA治療後。2) 発癌群:③発癌前: n=8、生検後NA治療5名、未治療3名)。④癌部: n=10。⑤非癌部: n=10。⑥正常肝: n=5。正常肝を除き全例、男性で肝硬変例は除外した。miRNAマイクロアレイ解析を行い、発現プロファイルを解析、発癌リスク因子候補を同定した後、定量RT-PCRで候補miRNAが発癌予測に有効かの検討を行った。

#### 【結果】

- (1) 発癌群は非発癌群に比べてNA導入年齢が有意に高かった。
- (2) 発現プロファイルでは正常肝⑥に最も発現パターンが類似していたのは非発癌群治療後②であり、もっとも異なるのは発癌群治療前③であった。
- (3) 発現プロファイル解析と定量RT-PCRの結果、13 miRNAがマイクロアレイと同様の発現パターンであり、3 miRNAが非発癌群CHB①や②と発癌群発癌前CHB③の間で有意差が認められた。

【結論】 治療・発癌の有無や経時的要素を考慮に入れたグループ分けは、臨床病態を反映しており、これらを用いた発癌予測が可能であることが示唆された。

# DNA 脱メチル化異常をバイオマーカーとする

## 癌易罹患性の評価

齊藤正昭、鈴木浩一、染谷崇徳、石岡大輔、市田晃佑、武藤雄太、  
加藤高晴、渡部文昭、兼田裕司、辻仲真康、菊川利奈、宮倉安幸、  
清崎浩一、野田弘志、力山敏樹

自治医科大学附属さいたま医療センター一般・消化器外科

【背景】今回我々は反復配列における脱メチル化異常に着目し、癌易罹患性、field defect 同定への応用が可能かを検討した。

### 【対象と方法】

#### 1 胃癌における検討

当施設で施行した胃癌切除症例 103 例を対象とした。単発胃癌症例 83 例(GS 群)と同時性多発胃癌症例 20 例(GM 群)の 2 群に分類し検討を行った。

#### 2 大腸癌における検討

当施設で施行した右側大腸癌症例 99 例を対象とした。単発大腸癌症例 75 例(CS 群)と同時性多発大腸癌症例 14 例(CM 群)の 2 群に分類し検討を行った。

胃癌、大腸癌切除例ともに切除検体の腫瘍近傍の非癌部粘膜を採取し DNA を抽出し、反復配列(LINE-1、Sata $\alpha$ )の相対的脱メチル化レベル(RDL)を算出した。

### 【結果】

#### 1 胃癌における検討

Sata $\alpha$  配列において GM 群の方が、有意に RDL が高かった(P<0.001)。ROC 曲線では RDL カットオフ値を 0.55 とした場合、多発胃癌予測能の感度 86%、特異度 61%、AUC 0.757 であった。

#### 2 大腸癌における検討

LINE-1 配列において CM 群の方が、有意に RDL が高かった(P<0.001)。また LINE-1RDL と年齢とに正相関が認められた(P=0.043)。RDL カットオフ値を 5 とした場合、高 RDL 群で有意に術後異時性大腸腫瘍発生率が高かった(P=0.003)。

【まとめ】反復配列の脱メチル化異常は、適切な術式選択や、リスクに応じた適切な術後フォローアップの間隔設定などに臨床応用できると考えられた。

# 活性化胃がん関連線維芽細胞には 多くのエピジェネティック異常が存在する

前田将宏<sup>1)</sup>、竹島秀幸<sup>1)</sup>、石井源一郎<sup>2)</sup>、服部奈緒子<sup>1)</sup>、落合淳志<sup>3)</sup>、  
坂井義治<sup>4)</sup>、岡部寛<sup>5)</sup>、牛島俊和<sup>1)</sup>

- 1)国立がん研究センター研究所エピゲノム、  
2)国立がん研究センター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理分野、  
3)国立がん研究センター中央病院病理、4)京都大学消化管外科、5)大津市民病院外科

## **Epigenetic Alterations Are Frequently Present in Activated Gastric Cancer-Associated Fibroblasts**

【背景と目的】 がん関連線維芽細胞(CAF)はがん進展に重要な役割を果たしており、そのがん細胞との相互作用に介在する分泌因子は治療標的となり得る。一方でCAFの特性を規定するエピジェネティック変化は未だに不明な点が多い。そこでCAFのエピジェネティック異常を解明しCAFの治療標的を探索することを目的とした。

【方法】 胃癌切除検体より樹立したCAFと非がん関連線維芽細胞(NCAF)14組について、ゲノム網羅的なDNAメチル化解析および抑制型ヒストン修飾であるH3K27me3解析を行った。また遺伝子発現解析と組み合わせてエピジェネティックに制御される治療標的の探索を行った。

【結果】 遺伝子発現に関与する転写開始点近傍のメチル化レベルを対象としたメチル化解析では、CAF特異的なメチル化異常は高、低メチル化共に認められたが、変化領域は多くはなかった。一方でH3K27me3はCAFで広範な変化を示し増加・減少共に認められた。またH3K27me3の低下により発現が上昇した分泌因子として、CAFで共通して高発現しているWNTファミリー蛋白や、また従来の遺伝子発現解析では同定困難であった血管新生因子蛋白などを同定した。

【結論】 CAFでは多くのエピジェネティック異常が存在し、エピジェネティックなアプローチによりCAFの治療標的を同定できた。

# Droplet digital PCR を用いた胃癌患者血漿遊離 DNA における

## HER2 増幅モニタリング

庄田勝俊<sup>1,2)</sup>、市川大輔<sup>1)</sup>、荻野真平<sup>1)</sup>、藤田悠司<sup>1,2)</sup>、濱田隼一<sup>1,2)</sup>、  
小西博貴<sup>1)</sup>、有田智洋<sup>1)</sup>、小菅敏幸<sup>1)</sup>、小松周平<sup>1)</sup>、塩崎敦<sup>1)</sup>、  
岡本和真<sup>1)</sup>、増田清士<sup>2)</sup>、井本逸勢<sup>2)</sup>、大辻英吾<sup>1)</sup>

1) 京都府立医科大学消化器外科、2) 徳島大学大学院人類遺伝学分野

**【背景】** 近年 Liquid biopsy の有用性が次々と報告されている。今回、絶対定量が可能な Droplet digital PCR (ddPCR) を用いて胃癌再発患者を中心に治療マーカーとしての臨床的有用性を検討した。

**【方法】** サンプルは 30 例の健常者血漿遊離 DNA、60 例の胃癌術前血漿遊離 DNA を用いた。参照遺伝子は RPPH1 を用いて、血漿 HER2 増幅は ddPCR を用いた HER2:RPPH1 ratio (HER2 ratio) で算出した。再発を来した 17 症例においては治療経過中の血漿 HER2 ratio の dynamics を検討した。

**【結果】** 血漿 HER2 増幅の cut-off 値は健常者 HER2 ratio の mean+2SD を用いた。血漿 HER2 ratio は組織 HER2 ステータスとの有意な相関を認め ( $p < 0.001$ )、感度・特異度はそれぞれ 0.733、0.933 であった。術後モニタリングにおいては、組織 HER2 陽性例において血漿 HER2 ratio は治療効果と相関して推移する傾向を示した。HER2 陰性例においては 13 例中 7 例において再発時の HER2 ratio が陽転化し、その後も継続的な上昇を示す傾向を認めた。

**【結語】** ddPCR を用いた血漿 HER2 増幅モニタリングはリアルタイムな患者病態の把握を可能にし、治療中に新たな治療選択を提示出来る可能性がある。今後臨床応用に向けて更なる検討が必要である。

# 胃癌における trastuzumab 二次耐性に関与する遺伝子の同定

岩槻政晃、馬場秀夫

熊本大学大学院消化器外科学

【背景】トラスツズマブの HER2 陽性進行胃癌に対する化学療法への上乗せ効果が示された。しかし、実臨床ではその耐性化が問題となっており、トラスツズマブ耐性のメカニズムの解明は急務である。本研究ではトラスツズマブ耐性胃癌細胞株を作成し、トラスツズマブ二次耐性に関与する遺伝子群の同定を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

## 【方法】

- (1) 耐性株の作成: HER2 陽性胃癌細胞株に、トラスツズマブを持続曝露させ、耐性株(R 株)を作成した。
- (2) microarray: R 株と親株(P 株)を cDNA/CGH array で遺伝子発現とゲノムコピー数を比較し、二次耐性に関与する遺伝子群を同定した。
- (3) gene ontology 解析を行い、二次耐性に関わる遺伝子群を解析した。

## 【結果】

- (1) トラスツズマブの持続曝露により、耐性の獲得を確認した(IC50: P 株; 0.17 $\mu$ g/ml, R 株; 988.8 $\mu$ g/ml)。
- (2) R 株で発現が上昇した 1117 遺伝子とゲノムコピー数と相関関係がある 18 遺伝子を同定した。
- (3) 細胞分化に関わる遺伝子群や細胞外マトリックスに関わる遺伝子群に変化が見られた。

【結論】トラスツズマブ耐性株を作成し、二次耐性に関与する遺伝子群を同定した。二次耐性にはゲノムレベルでのダイナミックな変化が生じている。HER2 陽性にもかかわらずトラスツズマブ耐性を獲得するメカニズムの解明は、更なる個別化治療の発展に寄与する。

# 大腸がんのゲノム・エピゲノム解析により明らかとなった

## 腫瘍内多様性とクローン進化

内龍太郎

九州大学病院別府病院外科

背景:大腸癌の進化は様々な研究報告があるが、実際に一人の患者の進化について詳細に解析した研究は少ない。一つの癌の詳細な進化を理解する方法として、腫瘍内多様性の解析が報告されている。一腫瘍内の場所の異なる部位間で共通する異常と、不均一な異常を区別し、進化を類推することが可能である。

目的:大腸癌の腫瘍内多様性を理解し、その進化の詳細について明らかにする。

方法:9症例の大腸癌よりそれぞれ5-21か所、合計75か所の検体を採取した。各部位に対して、全エクソンシーケンス、SNPアレイ、メチル化アレイを行い、腫瘍内多様性を評価した。

結果:9症例、全ての大腸癌で広範なゲノム・エピゲノムの多様性が明らかとなった。各腫瘍において、全ての部位に共通するFounder異常としてAPC、KRASなどの変異を認める一方、PIK3CAなどの変異は不均一なProgressor異常として多く観察された。変異シグネチャー解析では、年齢との関連が報告されている、CpG siteのC>T変異がFounder変異でProgressor変異より有意に多かった。DNAメチル化の解析では、CpG Islandの高メチル化がFounder異常でProgressor異常より高頻度に認めた。

結論:大腸癌は一腫瘍内でも不均一な異常を呈しており、その詳細な解析により一腫瘍内の進化を類推することが可能であった。

## ゲノムワイド shRNA スクリーニング法による

### 新たな膵癌肝転移抑制因子候補 ITIH5 の同定とその機能解析

佐々木健、藏原弘、前村公成、又木雄弘、夏越祥次

鹿児島大学大学院消化器・乳腺甲状腺外科学

浸潤性膵管癌は、早期から血行性およびリンパ行性転移を引き起こす予後不良な消化器癌の一つであり、転移の分子メカニズムの解明とその制御は治療成績向上のための重要課題である。本研究は、マウスの経門脈的血行性肝転移モデルと21,416種類の疾患関連遺伝子に対する74,468種類のshRNAをコードしたレンチウイルスライブラリーを用いて、生体内で、機能に基づいて、網羅的に膵癌の肝転移抑制に関わる新規の遺伝子を検索・同定し、血行性転移の分子メカニズムを解明すること、さらには、臨床検体を用いてこれらの遺伝子と予後を含めた臨床病理学的因子との関連性を調べ、最終的にはこれらの基礎研究の成果を臨床に還元することを目的とする。ゲノムワイドshRNAスクリーニング法により同定された新規の肝転移抑制因子の候補であるInter- $\alpha$ -trypsin inhibitor heavy chain 5(ITIH5)は、正常膵管上皮、非転移性あるいは低転移性膵癌細胞株で高発現し、逆に転移性膵癌細胞株では発現しないこと、浸潤能・遊走能を制御することにより肝転移を抑制すること、膵癌根治切除標本におけるITIH5の発現を免疫組織染色で評価することにより、肝転移再発や予後予測に有用であることなどをこれまでに明らかにした。今後は、ITIH5が膵癌細胞の浸潤能・遊走能を制御する詳細なメカニズムを明らかにしていく。