

## 大腸がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析

### [1] 組織

代表者：油谷 浩幸

(東京大学先端科学技術研究センター)

対応者：石岡 千加史

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

大内 康太

(東京大学先端科学技術研究センター)

高橋 信 (東北大学加齢医学研究所)

小峰 啓吾 (東北大学病院・腫瘍内科)

研究費：物件費 181,510 円，旅費 218,490 円

### [2] 研究経過

世界一の長寿国となっている日本において、がんは国民病であり、2人に1人はがんを発症し、3人に1人はがんで亡くなる時代となっている。大腸がんは罹患患者数で男性で第2位、女性で1位を占める疾患である。また死亡者数では第3位(2004年約40,000人)を占め、2015年にはさらに増加(約66,000人)すると予測される。大腸がんの治療成績を改善させることは、総死亡の30%を占めるがん死亡数を低下させることに大きく寄与するものと考えられる。

分子標的治療薬、とくに抗EGFR抗体薬(セツキシマブ、パニツムマブ)と抗VEGF抗体薬(ベバシズマブ)の導入により、進行・再発大腸がんの治療成績(無増悪生存期間と全生存期間)が着実に向上していることは1990年代以降の大規模臨床第Ⅲ相試験の結果から明らかである。その一方で、分子標的治療薬は高額であり、従来の化学療法薬やその他のがんに用いられる分子標的薬と比べて費用対効果が劣る。また、無駄な医療費となる無効患者の副作用回避の観点から、より有効な対象に選択的に治療を適応する必要がある。

本研究計画は、進行・再発結腸直腸がん(以下大腸がん)の治療感受性を予測するバイオマーカーを探索し、臨床応用のためのバイオマーカーの開発を行うことである。

これまでの貴施設・臨床腫瘍学分野の研究において、大腸がんの網羅的発現解析を行い、遺伝子発現プロファイルによって大腸がんが大きく4つのサブタイプに分類されることが示された。また、サブタイプ間で、抗EGFR抗体薬の治療効果が異なる可能性があることが示された。抗EGFR抗体薬については既にKRAS遺伝子変異が治療効果を予測するバイオマ

ーカーであることが知られているが、このサブタイプ分類はKRAS遺伝子変異よりも治療効果の予測性が高いこと可能性が示唆されている。以上の成果を臨床上有用なバイオマーカーにするためのtranslational researchとして以下の共同研究を行う。

大腸がんのホルマリン固定パラフィン包埋

(Formalin Fixed Paraffin embedded: FFPE) 組織の新規コホートを使用し、

① 網羅的遺伝子発現解析によるサブタイプ分類を行い、抗EGFR抗体薬の治療効果が予測可能か検証を行う。

(加齢医学研究所にて実施)

② サブタイプ分類を規定するgeneticな変化について探索するため、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行う。

(東京大学・先端科学技術研究センターにて実施)

③ サブタイプ分類を規定するepigeneticな変化を探索するため、miRNAアレイ、メチル化アレイによる網羅的解析を行う。

(加齢医学研究所および東京大学・先端科学技術研究センターにて実施)

これらの結果を統合的に解析することにより、サブタイプ分類を規定する分子生物学的背景を明らかにする。

以下、研究活動状況の概要を記す。

① 網羅的遺伝子発現解析

新規大腸がんコホート(93例)について、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。

② 次世代シーケンサーによる全エクソン解析

FFPE サンプルから抽出したDNAを用いてWESを行う際の問題点として、ホルマリン固定や長期に渡る保存により生じるDNAの断片化やクロスリンク等の化学修飾が挙げられ、質の高いデータを得ることが困難とされている。本研究の中で、全エクソン解析のプロトコルの最適化とデータ精度の検証を行った。

③ メチル化解析

Illumina社のInfinium HumanMethylation 450 Bead Chipを用いて腫瘍組織49例、正常大腸粘膜10例計59例分の網羅的メチル化データを取得した。

④ 統合解析

今後、各解析症例数を増やしつつ、バイオマーカー探索、サブタイプを規定する生物学的背景の検討を行っていく予定である。

なお、東京大学科学技術研究センターにおける研究活動は、代表者（油谷浩幸）と分担者（大内康太）による原則週に1度のミーティングに基づき行っている。分担者（大内康太）は、月に一度程度東北大学加齢医学研究所の対応者（石岡千加史）と分担者（高橋信、小峰啓吾）を訪問し、進捗状況の報告と研究方針に関する打ち合わせを行っている。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、93例の新規大腸がんコホートをを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、事前に規定した遺伝子セットにより、大腸がんを4つのサブタイプに分類可能であることを確認した。現在、その分子生物学的背景および抗 EGFR 抗体薬の治療効果等の臨床データとの関連性について検討を進めている。

第2に、次世代シーケンサーによる全エクソン解析のプロトコルの最適化を行い、FFPE 組織由来の DNA でも良好な塩基配列データが得られることを確認した。具体的には、同一検体で凍結組織と FFPE 組織からそれぞれ DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、データの比較を行った結果、一塩基多型の検出感度は 70-90%であった。また、大腸がんを高頻度に変異を認める KRAS、TP53 遺伝子について、サンガー法により検出された変異を正確に検出可能であった。また、TCGA の大腸がんにおける変異に関するデータベースとの比較で、検出された変異のプロファイルがほぼ一致していることを確認した。現在までに 34 症例分の全エクソン解析のデータを得た。今後、遺伝子発現プロファイルによるサブタイプおよび抗 EGFR 抗体等の治療効果と関連する遺伝子変異を探索していく予定である。

第3に、網羅的メチル化解析の結果、メチル化の程度による階層的クラスタリングを行い、正常大腸粘膜と低メチル化および高メチル化大腸がんを分類することが可能であることが明らかとなった。今後、網羅的遺伝子発現解析および全エクソン解析との統合解析を進めていく予定である。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、東京大学先端科学技術研究センターと加齢医学研究所それぞれの研究の長所を活かした研究であり、大腸がん検体を利用して、ゲノム、エピゲノムの網羅的かつ包括的な解析が可能となった。膨大なデータのため、解析には時間を要するが、

治療効果を予測するバイオマーカーとして期待できる結果が得られつつある。検証データを追加した上で、特許申請を目指し研究を進めていく予定である。臨床的に有用なバイオマーカー開発に向け、より大きなプロジェクトに発展していくことが期待される。

### 4] 成果資料

論文未発表