

平成 31 年 2 月 25 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08658

研究課題名(和文)日本人悪性中皮腫におけるゲノム不安定性に基づく治療戦略の基礎的検討

研究課題名(英文) Analysis on genomic instability in malignant mesotheliomas of Japanese patients as therapeutic targets

研究代表者

玉置 知子(橋本知子)(Tamaoki(Hashimoto), Tomoko)

兵庫医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：10172868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫(MM)ゲノムでは染色体3p21にあるBAP1遺伝子の機能欠失が共通するが、この部位に微細欠損等のゲノム不安定性を見出した。マイクロサテライト不安定性(MSI)は免疫チェックポイント阻害剤の有効性と関わるため、MMでのMSIを調べたが、高MSIは見られなかった。他の複数の染色体領域にもゲノム不安定性が見出された。当該部位にある遺伝子に部分欠失があるMMもあり、タンパク補充療法の有効性が示唆された。MM発症にはBAP1に生殖細胞系列変異を持つBAP1症候群も関わる。この症候群のMMは予後が良い傾向があるため、この症候群の検討は、新たな治療方策につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Somatic deletions and mutations in the BAP1 gene, located in 3p21, is one of the common characteristics of malignant mesotheliomas (MMs). Genomic analysis of the 3p21 region showed genomic instability with many microdeletions. Then, microsatellite instability (MSI) was tested, since MSI-high condition is a good marker of immune checkpoint inhibitors. But none of MM genomes showed MSI-high, suggesting that these inhibitors may not be effective. Genomic instability was also detected in other chromosome regions. In several MMs, partial deletions of a gene were detected. Hence, replacement therapy of this gene may be effective for these MMs. Recently, a few cases with BAP1 germline mutations (BAP1 syndrome) have been reported. These cases developed MMs with better prognosis than sporadic non-hereditary cases, suggesting that germline BAP1 mutations and BAP1-related genes may be new therapeutic targets.

研究分野：がんゲノム

キーワード：悪性中皮腫 ゲノム不安定性 マイクロサテライト不安定性(MSI) BAP1遺伝子 BAP1症候群

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで日本人悪性中皮腫

(Malignant mesothelioma, MM) 細胞を培養樹立してゲノム解析を行い (1)、9p 領域の *CDKN2A*, *2B* 遺伝子欠損がほぼ全例に認められるほか、3p21 領域のゲノム不安定性 (2)、続いてこの領域にある *BAP1* 遺伝子が両アレルで変異し、不活性となっていることを報告してきた (3)。これらの変異は、生殖細胞系列には見られず、体細胞変異であった。MM は、アスベストという環境要因によることはよく知られているが、我々の MM 患者の生殖細胞系列ゲノム解析より、ゲノム不安定性、ゲノムリモデリング、ゲノム修復にかかわる遺伝子群に、稀なバリエーションが複数あるという特徴も判明した (2)。すなわち、このような多因子の遺伝的要因がある場合に、アスベストの影響で腫瘍化が起こりやすい可能性が示唆された。しかし、具体的な発症機構までは解明できず、治療方策を提案するに至らなかった。

MM の臨床的な大きな課題は、有効な治療法が未だ確立していないことである。本研究開始当時、ミスマッチ修復 (MMR) 遺伝子変異のためにゲノムの不安定性が特徴である Lynch 症候群で、免疫チェックポイント阻害剤の効果があることが示唆された。MMR 異常については、ゲノム上の繰り返し配列である、マイクロサテライトリピートの不安定性 (MSI) が指標となっている。

3p21 領域については、我々が 3p 領域に注目し発表 (2) するよりも 6 か月早く、また我々が *BAP1* 遺伝子の微細欠失 (3) を発表するよりも 10 か月早く、2011 年に米国スローンケタリングがんセンター症例が報告された (Nat Genet. 2011 Jun 5;43(7):668-72.)。これには体細胞変異をもつ 24 例が挙げられ、8 例を除き 16 例に 3p21 領域の欠損もしくは変異が少なくとも 1 アレルにあることが報告され、*BAP1* 遺伝子変異も注目されていたが、彼らの解析手法ではエクソンレベルの欠損が検出されておらず、変異頻度が低かった。

我々の報告 (3) では、*BAP1* 遺伝子変異が見いだされる割合が 60% 程度と高かったが、当時の他の海外の報告では 20% 程度であり、

我々の解析結果は「変異頻度が高すぎる」ことが問題とされ、検出技術の差か、人種差かの問題も提起されている状況であった。よって本研究では、本邦の MM 症例の検討を中心としたが、米国ハワイ大がんセンターとの共同研究で米国症例との比較も行った。

また同じく 2011 年に *BAP1* 遺伝子に生殖細胞系列変異をもつ家族発症例が欧米で報告された (Nat Genet. 2011 Aug 28;43(10):1022-5.)。このような家系では MM のみならず、ぶどう膜黒色腫、腎がん、その他の腫瘍の発生が注目されていた。現在ではこのような生殖細胞系列の *BAP1* 遺伝子変異をもつ症例に対して、*BAP1* 症候群 (*BAP1* syndrome) という名称が提唱されている。*BAP1* 症候群では、MM の発症は若年性で、比較的予後がよいことも知られていた。本邦には、*BAP1* 症候群の家系の報告もなかったため、本研究ではこの生殖細胞系列遺伝子変異論文の責任著者を米国の共同研究者として解析を進めた。

また *BAP1* 周辺には腎がんにもかかわる *PBRM1* 遺伝子があることから腎がんゲノムと MM ゲノムを比較して、MM ゲノムの特徴を考察した。

(本研究は、兵庫医科大学倫理審査委員会承認を受けている)

2. 研究の目的

ゲノムワイドに不安定性がある部分を検出し、その部分の遺伝子が治療ターゲットの可能性があるかを検討する。

MM で MSI が認められるかどうかを検出し、免疫チェックポイント阻害剤が効果を示すかどうかを検討する。

臨床経過が異なる症例を検討し、進展が緩徐である場合にはその要因を解析し、治療との関係を考察する。

3. 研究の方法

手術切除 MM 組織から得られたゲノム、MM 組織から直接得られたゲノム、同じ患者の末梢血 (正常ゲノム)。日本以外の検体としては、米国の 24 検体も解析し、比較した。

解析方法としては、次世代シーケンサー (NGS) 解析、アレイ CGH、サンガー法、MLPA

法(4)、それ改変したDigital MLPA法を用いた。

4. 研究成果

(1) ゲノム解析による遺伝子変異の状況

9p領域の*CDKN2A*遺伝子欠損の周囲に、*MTAP*遺伝子欠損も見いだされた。この遺伝子欠損は核酸代謝阻害剤による治療が有効であるという可能性が報告されていたが、臨床的にこの薬剤に対する効果は限定的であることが知られていたため、新たなターゲットをNGS解析で探索した。

NGS解析では、塩基置換は見つけることができるが、100bpから数kbのアレル欠損を見つけることが難しいため、我々は日米症例を併せた33例について、高解像度カスタムアレイCGHとターゲットNGSを併用し、ゲノム不安定性が判明している3p21にマッピングされる251遺伝子を詳細解析した。変異頻度が高かった遺伝子は、*BAP1* (16/33, 48%)、*SETD2* (9/33, 27%)、*PBRM1* (5/33, 15%)、*SMARCC1* (2/33, 6%)で、両アレル変異が認められ、米国患者でもこれまでの報告よりも変異の頻度が高いことを明らかにした(5)。

本邦のMMでの解析で認められた変異は、米国症例でも共通しており(5)、治療を考える際には日米で共通した方針で臨むことができると考えられた。

(2) ゲノム解析によるゲノム不安定性状況

3p21領域を詳細に見ると、一括して連続的に欠損しているのではなく、微細欠損が多発しており、この領域のゲノム不安定性が解明された。3p21.3にはMMR遺伝子の一つ、*MLH1*遺伝子がマッピングされるが、両アレル欠失は検出されなかった。MMゲノムの不安定性をマイクロサテライトリピートの不安定性(MSI)の点から調べたが、MHI-highは認められなかった。よってMMではゲノムの微小欠失が多発してゲノム不安定性があるにも関わらず、免疫チェックポイント阻害剤の効果は期待できないことが判明した。

一方で腎がん(透明細胞癌が大多数)ゲノムでは、3p領域全体の欠失が透明細胞がんのほぼ全例に見いだされ(6)、MMの欠失状況とは異なり、MMゲノムの特徴が微細欠失・増幅が多発することにあることが示された。

(3) Digital MLPAの解析

Digital MLPA解析では複数の染色体領域に不安定性(微細欠失、微細増幅)が見いだされ、詳細に見るとA遺伝子にエクソン単位の欠損が見いだされた。この遺伝子の変異についての大多数の報告では変異タンパクが産生され、それが正常タンパクに対してdominant negativeに働いて、正常タンパク機能を抑制するとしている。今回見いだされたMMでの遺伝子変異は、エクソン単位の欠失によって変異アレルから安定したタンパクが産生されないことから、dominant negativeに働く可能性はないと推測される。よって正常タンパクの補充効果が見込めることになり、ベクターによる正常遺伝子補充が有効である可能性が考えられた。

その他、増幅する遺伝子も見いだされた。タンパク発現が増加していることが判明すれば、こちらも治療標的になる可能性がある。

(4) 生殖細胞系列のゲノム変異

MM発症には、少数ながら生殖細胞系列に*BAP1*遺伝子変異を有するBAP1症候群が関わる。本邦では症例報告がほとんどないため、米国症例を中心に臨床像を確認した。

Lynch症候群はMMRに関与する遺伝子のいずれかの生殖細胞系列変異が原因である。家族性大腸ポリポーシス(FAP)は*APC*遺伝子の生殖細胞系列変異が原因である。この両疾患の初発の腫瘍は大腸癌であることが多く、若年発症である。しかし早期治療により腫瘍自体の予後が比較的良好なことが経験的に知られている。

BAP1症候群では、MMもぶどう膜黒色腫も若年発症で比較的良好な予後があると報告されている。散発性、非遺伝性のMMおよび悪性黒色腫は、予後不良の腫瘍であるにも関わらず、BAP1症候群に発生するこれらの腫瘍が比較的良好であることは、Lynch症候群やFAPの腫瘍の状況と類似する。なぜBAP1症候群でのMMの悪性度が低いかどうかは現時点では明らかではないが、BAP1症候群の臨床経験が新たな治療ターゲットを見出す契機となる可能性がある。

本邦ではまだBAP1症候群が確認されていない。しかし今後、BAP1症候群が判明した場

合には、患者本人にどのような情報を提供し、どのようなフォローアップ計画を立てるのかについては現時点ではまだ確定的ではない。よって現行の治療法を組み合わせるの対応となると思われるが、一方では遺伝カウンセリングの機会を十分に設定し、医療者から up-to-date な情報提供を十分に行うことに留意しつつ、患者家族の理解を確認し考えを傾聴しつつ慎重に対応することが必須となる。

引用文献

1) Establishment of a cell line from a Japanese patient useful for generating an in vivo model of malignant pleural mesothelioma. Sato A, Torii I, Tao LH, Song M, Kondo N, Yoshikawa Y, Hashimoto-Tamaoki T, Hasegawa S, Nakano T, Tsujimura T. *Cancer Sci.* 2011 Mar;102(3):648-55. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01827.x.

2) Frequent deletion of 3p21.1 region carrying semaphorin 3G and aberrant expression of the genes participating in semaphorin signaling in the epithelioid type of malignant mesothelioma cells. Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, Morinaga T, Fukuoka K, Yamada S, Murakami A, Kondo N, Matsumoto S, Okumura Y, Tanaka F, Hasegawa S, Hashimoto-Tamaoki T, Nakano T. *Int J Oncol.* 2011 Dec;39(6):1365-74. doi: 10.3892/ijo.2011.1158.

3) Frequent inactivation of the BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma. Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, Emi M, Morinaga T, Fukuoka K, Yamada S, Murakami A, Kondo N, Matsumoto S, Okumura Y, Tanaka F, Hasegawa S, Nakano T, Hashimoto-Tamaoki T. *Cancer Sci.* 2012 May;103(5):868-74. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02223.x.

4) Frequent genomic rearrangements of BRCA1 associated protein-1 (BAP1) gene in Japanese malignant mesothelioma-characterization of deletions at exon level. Emi M, Yoshikawa

Y, Sato C, Sato A, Sato H, Kato T, Tsujimura T, Hasegawa S, Nakano T, Hashimoto-Tamaoki T. *J Hum Genet.* 2015 Oct;60(10):647-9. doi: 10.1038/jhg.2015.91.

5) High-density array-CGH with targeted NGS unmask multiple noncontiguous minute deletions on chromosome 3p21 in mesothelioma. Yoshikawa Y, Emi M, Hashimoto-Tamaoki T, Ohmuraya M, Sato A, Tsujimura T, Hasegawa S, Nakano T, Nasu M, Pastorino S, Szymiczek A, Bononi A, Tanji M, Pagano I, Gaudino G, Napolitano A, Goparaju C, Pass HI, Yang H, Carbone M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Nov 22;113(47):13432-13437.

6) Genomic profiling of the genes on chromosome 3p in sporadic clear cell renal cell carcinoma. Togo Y, Yoshikawa Y, Suzuki T, Nakano Y, Kanematsu A, Zozumi M, Nojima M, Hirota S, Yamamoto S, Hashimoto-Tamaoki T. *Int J Oncol.* 2016 Apr;48(4):1571-80. doi: 10.3892/ijo.2016.3395.

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2件)

- ① Pastorino S, Yoshikawa Y, Pass HI, Emi M, Nasu M, Pagano I, Takinishi Y, Yamamoto R, Minaai M, Hashimoto-Tamaoki T, Ohmuraya M, Goto K, Goparaju C, Sarin KY, Tanji M, Bononi A, Napolitano A, Gaudino G, Hesdorffer M, Yang H, Carbone M. Subset of Mesotheliomas With Improved Survival Occurring in Carriers of BAP1 and Other Germline Mutations. *J Clin Oncol.* 2018 Oct 30;JCO2018790352. doi: 10.1200/JCO.2018.79.0352. 査読有
- ② Yoshikawa Y, Emi M, Hashimoto-Tamaoki T, Ohmuraya M, Sato A, Tsujimura T, Hasegawa S, Nakano T, Nasu M, Pastorino

S, Szymiczek A, Bononi A, Tanji M, Pagano I, Gaudino G, Napolitano A, Goparaju C, Pass HI, Yang H, Carbone M. High-density array-CGH with targeted NGS unmask multiple noncontiguous minute deletions on chromosome 3p21 in mesothelioma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016, 113:13432- 13437. DOI:10.1073/pnas.1612074113 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 吉川 良恵、大村谷 昌樹、玉置 (橋本) 知子、江見 充、デジタルMLPAとターゲットシーケンスによる癌の微小ゲノム欠損の検出、第76回日本癌学会学術総会、2017年
- ② Yoshikawa Y, Emi M, Hashimoto-Tamaoki T. BAP1 mutations in malignant mesotheliomas: a comparison between Japanese and Caucasian patients. 第75回日本癌学会学術総会、2016年
- ③ Hashimoto-Tamaoki T, Yoshikawa Y, Togo Y, Hirota S, Sato C, Yamamoto S. Chromosome 3p rearrangement and BAP1 mutations in renal cell carcinomas and malignant mesotheliomas. The 13th International Congress of Human Genetics. 2016年
- ④ 吉川 良恵、江見 充、佐藤 鮎子、大搦 泰一郎、辻村 亨、中野 孝司、玉置 (橋本) 知子、悪性中皮腫と腎細胞がんで高頻度に検出されるBAP1及びPBRM1の変異比較、第74回日本癌学会学術総会、2015年
- ⑤ 玉置 (橋本) 知子、吉川 良恵、佐藤 智佳、福岡 和也、辻村 亨、中野 孝司。日本人悪性中皮腫のゲノム解析。日本人類遺伝学会第60回大会、2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉置 知子 (橋本知子) (TAMAOKI, Tomoko) (HASHIMOTO, Tomoko)
兵庫医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号：10172868

(2) 研究分担者

吉川 良恵 (YOSHIKAWA, Yoshie)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：10566673

中野 芳朗 (NAKANO, Yoshiro)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：30360267

小山 英則 (KOYAMA, Hidenori)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：80301852

大村谷 昌樹 (OHMURAYA, Masaki)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：60398229