

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08720

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる乳がん及び前立腺がん特異的がん関連遺伝子の多型解析

研究課題名(英文) Analysis of polymorphisms of breast cancer and prostate cancer risk-associated genetic variations by using semiconductor-based next-gen sequencings

研究代表者

中村 洋子 (Nakamura, Yohko)

千葉県がんセンター(研究所)・がん予防センター・主席研究員

研究者番号：60260254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：健常者約8,100人対象のコホート研究で、乳がん発症40例、前立腺がん発症28例、70歳までがんの発症がなく家族歴無しの33例の血液を用いがん関連遺伝子の多型解析を行った。その結果、遺伝子多型に伴いアミノ酸変化が認められ、タンパク構造に影響を与えタンパク質の機能を変えることが予測される2遺伝子に着目した。また、乳がん発症40症について乳がん関連遺伝子の多型解析を行ったところ、アミノ酸置換を伴う変異は6症例で5種類のアミノ酸置換が認められた。このうち既知ではあるが、がん発症との関連が不明なSNPは4つ、未知のSNPは1つ同定された。がん予防、治療、予後予測へ結びつく分子診断技術開発が期待された。

研究成果の概要(英文)：We conducted next-generation sequencing to identify potential genetic variants associated with the incidence of cancer in a cohort study containing 8,100 healthy individuals. We sequenced the genome of a cohort of individuals, including 40 breast cancer cases and 28 prostate cancer cases, and observed the recurrence of several functional non-synonymous SNVs with significant associations to the risk of cancer in 2 genes. Sanger sequencing also confirmed the recurrence of these mutations. We also analyzed polymorphisms of breast cancer related genes in the 40 breast cancer and found five amino acid substitutions in six of those 40 cases. Those substitutions were results of the presence of four known and one unknown SNPs. The risk variants characterized in this study can be a useful predictive tool for the early detection, diagnosis and monitoring of cancer. Analysis of those functional risk alleles may highlight the underlying mechanisms leading to oncogenesis in these risk populations.

研究分野：分子生物学

キーワード：乳がん 前立腺がん エクソーム解析 がん関連遺伝子 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

J-MICC STUDY（日本多施設共同コホート研究）は、10万人以上の人々の健康状況を20年にわたって追跡し、どのような人がどのような環境の下でどのような病気になりやすいかを調べている。そして、体質を考慮したがんを含む生活習慣病の予防対策に必要な基礎資料を提供することを目的としている。千葉県がんセンター研究所がん予防センターでは、2006年からJ-MICC STUDYに参加し、千葉県印西市、我孫子市、柏市において、個人の体質とがんに罹患した県民との関係を調査している。この追跡調査は、遺伝子の解析を含めた分子疫学コホートと健康増進および健康診断の受診率を向上させ、がんを予防する啓発運動として進めているものである。これまでに約8,100人の血液が集まっている。

また、千葉県における乳がん及び前立腺がんの罹患率は地域性がある。乳がんは、腫瘍マーカーにCA15-3、CA125、CEA、p53抗体、NCC-ST-439などがあり、早期に発見し適切な治療を受ければ治る可能性の高いがんである。前立腺がんの腫瘍マーカーはPSAなどがあり、早期発見、早期治療により高い確率で根治が可能である。

これまでに、がんとの関連が文献報告され、がん変異のデータベースCOSMICで体細胞変異の頻度が高いがん関連遺伝子409種類を選択（Life Technologies Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel Target Gene List）し、全エクソン解析を行う系を確立した。がんリスクと関わる多型とがん体細胞変異の両方を解析できれば、がんリスク多型と体細胞でのがんドライバー変異、さらに遺伝子変異のパターンから変異Signature及びコピーナンバーの変異(CNV)を一度に統合して解析することが可能である。

すでに、J-MICC STUDYで収集した血液サンプル中、後にがんに罹患した人の血液DNAを用いて、409種類のがん関連遺伝子の全エクソン配列解析を行っている。がん種としては乳がん、20検体、前立腺がん、20検体について解析を行った。対照群として、8年間の経過の中で、75歳以上となり、がんの罹患及び家族歴がない人のがんの3種類のマーカー（PSA、CEA、CA19-9またはCA125、CEA、CA19-9）が陰性であった28人の健常者の血液DNAを解析した。その結果、非癌健常者では2例以下にしか認められなかったが、がんリスク群では全例に認められたアミノ酸変化を伴う遺伝子変化（多型）は、乳がんでは13箇所、前立腺がんでは2箇所に認められた。さらに、乳がん、前立腺がんを含む他のがん種の解析結果から、リスク群に共通して集積した遺伝子多型は50箇所であった。これら多型のうち、34症例で検出された遺伝子多型は、がんに関連することが既に発表されているがん関連遺伝子の多型であり（Hum.Mol.Genet.23:6096-6111,2014、

J.Natl.Cancer Inst. 100:437-442,2008）、非癌健常者では稀な多型であり、ある一定の低い頻度で拡散していると考えられる。また、アミノ酸の変化により遺伝子のタンパク構造に影響を与え、タンパク質の機能を変えることも予想される。

我々は、すでに乳がん及び前立腺がんではアミノ酸変化を伴う遺伝子変化（多型）を認めており、本研究課題では、乳がん、前立腺がんにおける、がん予防、診断、治療、予後予測に結びつく技術開発を目的として解析を行う。

2. 研究の目的

400種類以上の主ながん関連遺伝子の全エクソン配列情報を検討できるゲノムシーケンシングプラットフォームを確立し、県内の乳がん及び前立腺がん患者での体細胞変異を確認している。本研究では、乳がん、前立腺がんを発症したリスクグループ及び70歳までがんの発症を認めていない非リスクグループのがん関連遺伝子の多型解析を行い、県内のがん高発症地区の原因究明と体細胞変異との関連について検討し、さらに院内患者集団と比較し、リスクマーカー、体細胞変異Signatureを同定し、がん予防、治療、予後予測へ結びつく分子診断技術を将来的に開発することを目的とする。

3. 研究の方法

Ion Torrent PGM および Proton シーケンサーによる400種類以上のがん関連遺伝子のExome解析を、前向きコホート研究の集団から得られる乳がん、前立腺がん発症リスク群と非リスク群で検討し、さらにがん患者症例40例をトレーニングセットとして、今後乳がん、前立腺がんを診断される症例20例を予測セットとし、リスク多型と体細胞変異の相関を検討する。遺伝子解読は、当施設で確立したゲノム領域あたり平均1000回の解読を安価に解析できる系を使用し、遺伝子変異・多型・コピー数解析を一度に進める。また、院内症例においてリスク多型の解析も加え、得られた解析結果と臨床症状や既存の臨床所見などとの相関について多変量解析等を用いて検討する。これらの結果から包括的な乳がん及び前立腺がん予防・診断法等の確立を検討する。

4. 研究成果

千葉県東北部には、がんの集積性が見られ、その地域を含む健常者約8,100人を対象に最長12年間追跡しているコホート研究が進行中である。その中で県内のがん高発症地区の原因究明と体細胞変異との関連について検討し、さらに院内患者集団と比較し、リスクマーカー、体細胞変異Signatureを同定し、がん予防、治療、予後予測へ結びつく分子診断技術を将来的に開発することを目的としている。

このコホート研究で収集した血液検体を用い、乳がん発症 40 例、前立腺がん発症 28 例をリスク群、さらに 70 歳までがんの発症がなく、がんマーカー (CEA, CA19-9) 陰性、家族歴無し の 33 例を非リスク群として、400 種類以上のがん関連遺伝子について、リスク群特異的かつ機能的な多型同定のため、Ion Ampli Seq と Comprehensive Cancer Panel (CCP) を使用し、Ion Torrent PGM 半導体シーケンサー解析を行った。さらに、キャピラリーシーケンサーによる遺伝子の多型解析等を行った。その結果、リスク群は非リスク群に比べ、より多くの報告されていない遺伝子多型が検出され、ナンセンスやミッセンス変異を示す多型も多く検出された。その中で遺伝子多型に伴いアミノ酸変化が認められ、タンパク構造に影響を与え、タンパク質の機能を変えることが予測される 2 遺伝子に着目した。また、乳がん発症症例 40 症例について、乳がんに関連した遺伝子の多型解析を行ったところ、がんの家族歴有と無の症例に共通に検出されたアミノ酸置換を伴う変異は 6 症例で 5 種類のアミノ酸置換が認められた。このうち既知ではあるが、がん発症との関連が未だ不明な SNP は 4 つ、未知の SNP は 1 つ同定された。今後、がん予防、治療、予後予測へ結びつく分子診断技術開発が期待される。また、がんの予防、特定検診への受診勧誘、早期がん発見率の向上、並びに国内へのがん感受性集団の拡散状況を将来的に把握でき、広くがん対策に利用できるものと確信する。

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 8 件)

- 1) Tatsumi Y, Takano R, Islam MS, Yokochi T, Itami M, Nakamura Y, Nakagawara A. BMCC1, which is an interacting partner of BCL2, attenuates AKT activity, accompanied by apoptosis. *Cell Death Dis.* 6:e1607. doi: 10.1038/cddis.2014.568. 2015 査読有
- 2) Kaneko Y, Suenaga Y, Islam SM, Matsumoto D, Nakamura Y, Ohira M, Yokoi S, Nakagawara A. Functional interplay between MYCN, NCYM and OCT4 promotes aggressiveness of human neuroblastomas. *Cancer Sci.* 106, 840-847, doi: 10.1111/cas.12677. 2015 査読有
- 3) Fukuda M, Takatori A, Nakamura Y, Suganami A, Hoshino T, Tamura Y, Nakagawara A. Effects of novel small compounds targeting TrkB on neuronal cell survival and depression-like behavior. *Neurochem. Int.* 97:42-8 pii: S0197-0186(16)30086-9. doi: 10.1016/j.neuint.2016.04.017. 2016. 査

読有

- 4) Islam MS, Tatsumi Y, Takano R, Yokochi T, Akter J, Ozaki T, Nakamura Y, Ohira M, Nakagawara A. Transcriptional regulation of BMCC1 mediated by E2F1 in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 478(1):81-86. pii: S0006-291X(16)31210-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.089. 2016. 査読有
- 5) Satoh S, Takatori A, Ogura A, Kohashi K, Souzaki R, Kinoshita Y, Taguchi T, Hossain MS, Ohira M, Nakamura Y, Nakagawara A. Neuronal leucine-rich repeat 1 negatively regulates anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Sci Rep.* 2016;6:32682. doi:10.1038/srep32682. 査読有
- 6) Li Y, Ohira M, Zhou Y, Xiong T, Luo W, Yang C, Li X, Gao Z, Zhou R, Nakamura Y, Kamijo T, Kaneko Y, Taketani T, Ueyama J, Tajiri T, Zhang H, Wang J, Yang H, Yin Y, Nakagawara A. Genomic analysis-integrated whole-exome sequencing of neuroblastomas identifies genetic mutations in axon guidance pathway. *Oncotarget.* 2017 doi: 10.18632/oncotarget.18079. 査読有
- 7) Koyama T, Kuriyama N, Ozaki E, Matsui D, Watanabe I, Takeshita W, Iwai K, Watanabe Y, Nakatochi M, Shimanoe C, Tanaka K, Oze I, Ito H, Uemura H, Katsuura-Kamano S, Ibusuki R, Shimoshikiryo I, Takashima N, Kadota A, Kawai S, Sasakabe T, Okada R, Hishida A, Naito M, Kuriki K, Endoh K, Furusyo N, Ikezaki H, Suzuki S, Hosono A, Mikami H, Nakamura Y, Kubo M, Wakai K. Genetic Variants of RAMP2 and CLR are Associated with Stroke. *J Atheroscler Thromb.* 24(12):1267-1281. 2017. doi: 10.5551/jat.41517. 査読有
- 8) Nakagawa-Senda H, Hachiya T, Shimizu A, Hosono S, Oze I, Watanabe M, Matsuo K, Ito H, Hara M, Nishida Y, Endoh K, Kuriki K, Katsuura-Kamano S, Arisawa K, Nindita Y, Ibusuki R, Suzuki S, Hosono A, Mikami H, Nakamura Y, Takashima N, Nakamura Y, Kuriyama N, Ozaki E, Furusyo N, Ikezaki H, Nakatochi M, Sasakabe T, Kawai S, Okada R, Hishida A, Naito M, Wakai K, Momozawa Y, Kubo M, Tanaka H. A genome-wide association study in the Japanese population identifies the 12q24 locus for habitual coffee consumption: The J-MICC Study. *Sci Rep.* 8(1):1493. 2018. doi: 10.1038/s41598-018-19914-w. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 中村洋子、高山喜美子、稲田順子、高橋志保子、永瀬浩喜、西本 寛、若尾文彦、猿木信裕、三上春夫 がん登録を応用した生存率公開の試み-KapWeb-地域がん登録全国協議会第 24 回学術集会、2015 年 6 月 前橋
- 2) Yohko Nakamura, Yoshiaki Maru, Yasutoshi Tatsumi, Sana Yokoi, Miki Ohira, Yuki Nakamura, Kimiko Takayama, Junko Inada, Jin Katayama, Hiroki Nagase, Haruo Mikami Analysis of cancer risk-associated genetic variations by using semiconductor-based next-gen sequencings in J-MICC study 第 74 回日本癌学会学術集会、2015 年 10 月、名古屋
- 3) 中村洋子、丸喜明、巽康年、横井左奈、大平美紀、中村友紀、高山喜美子、稲田潤子、田中尚武、山本尚人、鍋谷圭宏、滝口伸浩、植田健、片山稔、永瀬浩喜、三上春夫 半導体次世代シーケンサーによるリスク集団特異的がん関連遺伝子多型解析 日本人類遺伝学会第 60 回大会、2015 年 10 月、新宿
- 4) 中村洋子、丸喜明、巽康年、横井左奈、大平美紀、中村友紀、高山喜美子、稲田潤子、片山稔、永瀬浩喜、三上春夫 半導体次世代シーケンサーによるリスク集団特異的がん関連遺伝子多型解析 第 53 回癌治療学会学術集会、2015 年 10 月、京都
- 5) 高山喜美子、中村洋子、三上春夫、永瀬浩喜 千葉県がん登録から全国がん登録へ 平成 27 年度(第 54 回)千葉県公衆衛生学会、2016 年 2 月、千葉
- 6) 中村洋子、高山喜美子、稲田潤子、横畑由紀子、横山よし子、高峰友紀子、江口高子、船戸静子、高橋志保子、三上春夫、永瀬浩喜 千葉県がん登録から全国がん登録へ 地域がん登録全国協議会第 25 回学術集会、2016 年 6 月、金沢
- 7) Yohko Nakamura, Yoshiaki Maru, Yasutoshi Tatsumi, Kazuhiro Okumura, Sana Yokoi, Miki Ohira, Yoshihiro Nabeya, Satoshi Fukasawa, Jin Katayama, Hiroki Nagase, Haruo Mikami Analysis of non-synonymous genetic variations associated with cancer risk by a prospective cohort study 前向きコホート研究によるがんの高リスク群でのアミノ酸変化を伴う多型の解析 第 75 回日本癌学会学術総、2016 年 10 月、横浜
- 8) 中村洋子、滝口伸浩、三上春夫、永瀬浩喜 前向きコホート研究による胃がん高リスク群でのアミノ酸変化を伴う多型の解析 第 26 回日本癌病態治療研究会、2017 年 6 月、横浜
- 9) 中村洋子、高山喜美子、三上春夫、永

瀬浩喜 千葉利根川水系におけるがんの高罹患率の原因究明 第 26 回日本がん登録協議会学術集会、2017 年 6 月、松山

- 10) 三上春夫、宮城洋平、中村洋子、永瀬浩喜 血清中の微量元素含有量を用いた新たながんスクリーニング法の開発に関する研究 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月、横浜

- 11) 中村洋子、巽康年、奥村和弘、高取敦志、丸喜明、横井左奈、大平美紀、鍋谷圭宏、深沢賢、片山稔、三上春夫、永瀬浩喜 前向きコホート研究によるがんの高リスク群でのアミノ酸変化を伴う多型の解析 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月、横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等
 千葉県がんセンター研究所
<https://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/index.html>
 千葉県がんセンター研究所 Facebook
<https://m.facebook.com/CCCRI.chiba.gan.kenkyujo>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 洋子 (Yohko Nakamura)
 千葉県がんセンター研究所・がん予防センター・主席研究員
 研究者番号：60260254

(2)研究分担者

三上春夫 (Haruo Mikami)
 千葉県がんセンター研究所・がん予防セン

ター・部長
研究者番号：10332355

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()