

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07212

研究課題名(和文)悪性中皮腫のゲノム統合解析と合成致死性を利用した分子標的探索の基礎的検討

研究課題名(英文) Integrative genomic analysis of malignant mesothelioma to find therapeutic molecular targets

研究代表者

吉川 良恵 (Yoshikawa, Yoshie)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10566673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫(MM)のゲノム解析法として、エクソン/遺伝子単位のコピー数変化(CNA)を捉えられるdigitalMLPA法を開発した。本法により、MMはchromothripsis-like pattern CNAが特徴であることが示された。上皮型MMでは検体間CNA頻度差が大きく、わずかな領域に1アレル欠損が見られるのみの患者は予後良好であった。他方CDKN2A/2Bに加え、3p21, TP53, NF2にも2アレル欠損が生じている患者は予後不良であった。二相型、肉腫型はCNAした染色体数が多く、染色体内でも増幅・欠損の変化が見られた。CNA解析によりMM予後予測の可能性が示せた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性中皮腫は、化学療法抵抗性の極めて予後不良の腫瘍である。本学は本邦で最もMM患者数が多く、早期診断・治療に取り組んできたが、今なお診断後2年内に死亡する患者の方が多い。遺伝子解析によりchromothripsis-like patternが検出されず、CNA変化が少なければ予後は良好と予測される。当該患者の治療を軽減できる可能性が示され、QOL改善につながる。また予後不良患者腫瘍で共通してコピー数変化が生じる領域から、悪性化に寄与する遺伝子を見出し、本分子に対する分子標的薬の探索に研究を進展させることは治療法の開発につながり、基礎研究として意義深い。

研究成果の概要(英文)：In order to detect exon/gene level copy number alterations (CNAs) in malignant mesothelioma (MM), we developed the digitalMLPA that is a novel technique for CN detection which combines MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) and NGS. digitalMLPA analysis of MMs found the characteristic chromothripsis-like pattern CNAs in MMs. Some patients with the epithelioid type MMs having a few one-allele deletion showed good prognosis, but others with the epithelioid type MMs having biallelic deletion of CDKN2A in the combined loss of BAP1, SETD2, TP53, and NF2 showed poor prognosis. In bi-phasic and sarcomatoid types MMs, the number of chromosomes with CNAs was large and CNAs of segmental gain and loss inner chromosome were detected. Copy number analysis using digitalMLPA would be useful to estimate patient's prognosis.

研究分野：遺伝子解析

キーワード：悪性中皮腫 ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫(Malignant Mesothelioma: MM)はアスベスト曝露が主要因で、曝露から 30-40 年の経過を経て発症する。早期は無症状の場合が多く、多くは進行した状態での診断となり、抗がん剤や放射線治療に抵抗性で、極めて予後不良である。発症までに長期間の経過を経るにもかかわらず、塩基置換や数塩基の欠失・挿入等シーケンスレベル変異は小児がんレベルと少なく、主として *BAP1*, *NF2*, *TP53*, 等が知られる^(1, 2)。一方高解像度 CGH アレイ (平均プローブ間距離 254bp) を用いた解析により *BAP1* 搭載領域 3p21 に 2 アレル欠損を含む exon/gene 単位の激しいゲノムコピー数変化 (Copy number alterations: CNAs) が生じていることを代表者らは見出した⁽³⁾。しかし、CGH アレイを用いて全ゲノム exon 単位の CNAs を解析することはコスト面や多量の DNA が必要な点から現実的ではない。捉えきれしていない腫瘍の発生・進展過程で生じる変異を統合的に解析する必要がある。

また、*BAP1* は BAP1-Tumor Predisposition Syndrome (*BAP1*-TPDS)の原因遺伝子であり、本遺伝子の生殖細胞系列変異を有する家系は MM, ブドウ膜黒色腫、腎細胞がんなどの腫瘍を高頻度で発症することが知られている⁽⁴⁾。MM はその発症に gene-environment interaction (GxE)が具体的に検証された代表例と言える。アスベスト曝露歴があっても発症しないケースが圧倒的多数であるため、その発生に遺伝的バックグラウンドの寄与を考慮する必要がある。代表者らは MM 研究で著名なハワイ大学がんセンター Dr Carbone と国際共同研究を実施し成果を上げており、本邦ではほとんど報告の無い家族性 MM 患者検体が入手可能である。

2. 研究の目的

最終目標は悪性中皮腫を早期発見し、有効な分子標的薬を開発し患者予後を改善することである。そのため MM 易罹患性遺伝子の生殖細胞系列変異、および発生・進展過程で生じる体細胞変異を digitalMLPA, next generation sequencing, RNA-seq 等統合的なゲノム解析により検出し、早期発見・分子標的薬の開発につながる標的分子を見出すことが目的である。

3. 研究の方法

I. 家族性 MM 患者の良好な予後と生殖細胞系列変異

2018 年時点で MM 患者の診断後余命中央値は約 1 年であったが、一部 5 年以上生存する患者が存在した。ハワイ大学との共同研究で、1, 2 親等の親族内に複数人発症 MM 同親族内に *BAP1*-TPDS 頻発腫瘍を発症 MM、多腫瘍併発 MM、若年 (50 歳未満) 発症 MM をまとめて Familial MM と定義した。Familial MM *BAP1* 生殖細胞系列変異有 (43 例)では余命中央値 5 年、Familial MM *BAP1* 生殖細胞系列変異無 (34 例)では余命中央値 10 年であった。Familial MM *BAP1* 生殖細胞系列変異無患者には、MLH1, SMARCA2, SMARCA4, TP53 などががん抑制遺伝子に機能喪失型と推定される生殖細胞系列変異が検出された⁽⁵⁾。本研究は、生殖細胞系列変異解析が、アスベスト曝露歴が明らかでないケースの MM の早期発見・予後予測につながる可能性を示した。そこで解析対象とする遺伝子を増し、*BAP1* 以外の MM 易罹患性遺伝子を探索する目的で、トルコ家族性 MM 22 家系の whole genome sequencing を行った。しかし、複数家系に共通する遺伝子変異は見つかっておらず、別々のがん抑制遺伝子に in silico 機能喪失型と推定された変異が検出されるのみであった。その一つとして *BLM* の frameshift 変異があげられ、*BLM* の機能喪失が MM 易罹患性に寄与することを Blm (+/-)マウスを用いて検証した。すなわち、Blm (+/-)マウスにアスベスト投与により MM が野生型より高頻度発生し、生存日数も短かった⁽⁶⁾。これ以外にも、DNA 修復遺伝子 X の生殖細胞系列ゲノムでの欠損も見つけ、現在検証実験を実施中である。しかし、共通性の高い MM 易罹患性遺伝子の探索は予想外に難航している。

II. Whole genome sequencing により検出された腫瘍体細胞ゲノム再構成

Chromothripsis-like pattern と呼ばれる segmental CNAs が、*BAP1*, *SETD2*, *CDKN2A*, *NF2*, *TP53* 遺伝子に高頻度で生じることが報告された^(1, 7)。それ以外に、機能破壊されやすい遺伝子を探るために、MM 患者腫瘍の whole genome sequencing を少数例試みた。一例を図 1 に示すが、segmental CNAs を示し、RNA-seq により融合遺伝子が確認された。このようなゲノム再構成は種々検出されるものの、切断点は検体毎に異なる状況であるとの情報が共同研究者から得られた。費用対効果や解析労力を考えると whole genome sequencing は効率的とは言えず、我々のオリジナル手法である digitalMLPA 解析を中心に据えることとした。

III. digitalMLPA によるゲノムコピー数解析による予後予測

MM 用の網羅的ゲノムコピー数解析手法 digitalMLPA をオランダ企業 MRC-Holland と共同開発した。本法では、NGS 用シーケンス配列を末端に付加した 384 種類のプローブ領域を MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)法で増幅し、NGS で増幅産物をシーケンスし、リード数を比較することによりゲノムコピー数を解析する。3p 搭載の *VHL*, *SETD2*, *SMARCC1*, *BAP1*, *PBRM1*, 9p21 搭載 *CDKN2A/2B*, 17p13 搭載 *TP53* 遺伝子は全エクソン、22q12.2 搭載 *NF2* の

4 エクソン、他 HIF1A (14q), NCOR1 (17p), UBE2O (17q), HCFC1 (Xq)の数エクソンをコピー数解析、また全染色体のカリオタイプングが可能である。本法は、NGS を使用するが、ライブラリー調製時の精製操作がなく簡便であり、またデータ容量が小さく特別なバイオインフォマティクスの技術も要しない。したがって、臨床応用しやすい点がまず利点として挙げられる。本法にて MM 細胞株 16 種、本学悪性胸膜中皮腫患者 50 検体 (内 12 検体は腫瘍割合を増加させるため primary culture 後解析) をコピー数解析し、まず MM の特性をとらえた。

細胞培養することで *CDKN2A* 遺伝子の欠損が促進されることは報告されており、解析した 16 MM 細胞株では 11 細胞で全遺伝子領域 2 アレル欠損、4 細胞で一部エクソンの 2 アレル欠損、1 細胞で 1 アレル増幅が確認された。患者検体中、primary culture した 12 検体は全例、腫瘍組織解析分 38 検体中 26 検体 (68.4%) で欠損していた。*CDKN2A* 遺伝子の欠損は MM の診断に有用であるが、FISH による日常診断が難しい多くの機関で、隣接遺伝子 *MTAP* の共欠損を免疫染色陰性で判定している。*MTAP* 共欠損は 2 アレル欠損が *CDKN2A/2B* から隣接遺伝子まで広がった場合を検出しており、*CDKN2A* の一部エクソンのみの欠損の場合見落とされる可能性が高い。熟練した技術と判定の習熟が必要な FISH に比べて、digitalMLPA 法は簡便である。

高頻度で CN 変化が生じる 3p 領域については、複雑なコピー数変動パターンを示した。*SETD2*, *SMARCC1*, *BAP1*, *PBRM1* の 4 遺伝子全て欠損 (もしくはトリソミーで 2 アレル欠損) が最も多く患者検体 50 例の内 22 例 (44%)、内 6 例は一部遺伝子に 2 アレル欠損を認めた。一部遺伝子の欠損は 10 例 (20%) で、他 3 遺伝子は欠損しているにもかかわらず *BAP1* で欠損が見られない検体が 3 例あったのは興味深い。欠損後重複し uniparental disomy ではないかと推測された。4 遺伝子共欠損無しは 17 検体 (34%) で、内 1 例には増幅が検出された。

TP53 遺伝子は MM では変異が少ないといわれていたが、細胞株では 5/16 (31.2%) の頻度で 2 アレル欠損が検出された。組織検体は腫瘍含量が低いいため 1 アレル変化か 2 アレル変化の判別が難しいが、欠損は 50 検体中 20 検体 (40%) で生じており、明らかな 2 アレル欠損が 2 検体で見られた。

NF2 遺伝子の isoform 1 は 16 エクソンからなるが、現 version では 4 エクソンしかカバーできていない。細胞株 16 中 10 検体 (62.5%) で *NF2* 欠損が検出され、内 3 検体で 2 アレル欠損、一方患者検体 50 中 32 検体 (64%) が欠損、内 8 検体では 2 アレル欠損が検出された。

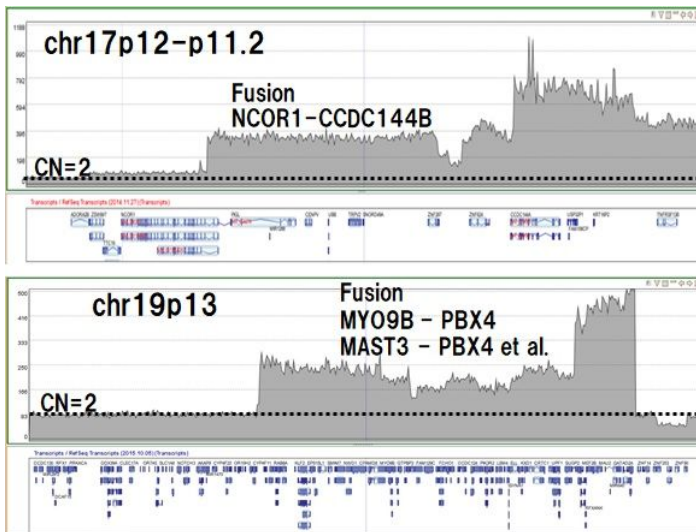
染色体 1q (5/16), 3q (5/16), 5p (9/16), 7p (10/16), 12q (4/16), 16q (7/16), 17q (5/16), 19 (8/16), 20q (9/16)等に増幅が検出された。組織検体では増幅は検出されるがコピー数変化が小さく、probe が sparse である上記領域は閾値設定がし難かったため、細胞株での増幅検出頻度をカッコ内に示した。

別プロジェクトで腎細胞がん (ccRCC) のコピー数変化を同じ probe を用いて digitalMLPA 解析している。MM と ccRCC はいずれも塩基置換等シーケンスレベル変異は少なく、コピー数変化が生じやすい。コピー数変化が生じやすい染色体はよく似ており、3p 欠損が多い。両者とも *BAP1* 生殖細胞系列変異で罹患しやすい腫瘍であり、体細胞変異も生じやすい。しかし、両者の診断後余命は大きく異なり ccRCC では 10 年 (中央値) であるが、MM では 1 年 (中央値) である。本学 ccRCC 患者 60 検体と MM 解析のコピー数解析結果を表 1 に比較した。ccRCC はゲノム解析と予後の関連解析が良く研究されており、腫瘍発生に寄与するといわれる 3p loss, 5q gain 頻度については MM の方が低い、悪性化に寄与すると報告される 1p, 4q, 9p, 14q, 17p13 (*TP53*), 22q12.2 (*NF2*)欠損は MM が圧倒的に頻度が高い。またその欠損パターンに大きな差があり、ccRCC では、染色体の広い範囲の 1 アレル欠損がほとんどで、診断時転移有であった患者 3 名 (5%) にのみ *CDKN2A/2B* の 2 アレル欠損が検出された。一方 MM では上述のように高頻度で 2 アレル欠損が検出され、エクソン単位でコピー数解析した 7 遺伝子の内いずれかの遺伝子に 2 アレル欠損が検出された割合は 74% で、さらに複数遺伝子に 2 アレル欠損が検出された検体は 15 例 (30%) あった (図 2)。2 アレル欠損に代表される segmental コピー数変化が、MM の悪性化に寄与していると推測された。実際、図 2 の全遺伝子に 2 アレル欠損が検出された検体は P05, P06, T02, T06, T18 であり、すべて上皮型 (3p21 欠損は主に上皮型で生じる⁽⁸⁾) で、T18 (診断後 2 年経過していない) を除き他は 2 年以内に亡くなっていた。なお、本学では 5 年以上生存患者が約 3 割おり、診断後 2 年内の死亡を予後不良群と考えている。一方、図 2 のいずれの遺伝子にもコピー数変化がない T16 は、著しいリンパ管侵襲を認め、肺胞内に腫瘍が蓄積し予後不良と思われたが、標準治療が有効で 2 年経過現在 disease free である。*BAP1*, *PBRM1* の 1 アレル欠損のみ検出された T07 も、disease free で 5 年生存している。

Sparse ではあるが全染色体のカリオタイプング結果から、二相型か肉腫型の患者腫瘍は染色体内で増幅と欠損が生じ segmental にコピー数変動し (chromothripsis-like pattern CNA とと思われる) CNA 示す染色体数が多い傾向が認められた。

表 1 : 本学腎細胞がんと悪性中皮腫患者腫瘍に検出されたコピー数変化の頻度

	Copy number alteration rate (%)	
	ccRCC n = 60	MM n = 50
3p loss	93.3	44.0*
5q gain	51.7	34.0
1p loss	10.0	70.0
4q loss	15.0	64.0
9p loss	18.3	86.0
14q loss	55.0	62.0
17p13 loss	5.0	40.8
22q12.2 loss	6.7	61.2
		*loss of all 4 gene



グレーで示す山は NGS のリード数を示す。2 コピーを示す CN = 2 から上は増幅しており、かつ segmental CNA を示した。

図 1: Whole genome sequencing、RNA-seq により確認されたゲノム再構成と融合遺伝子

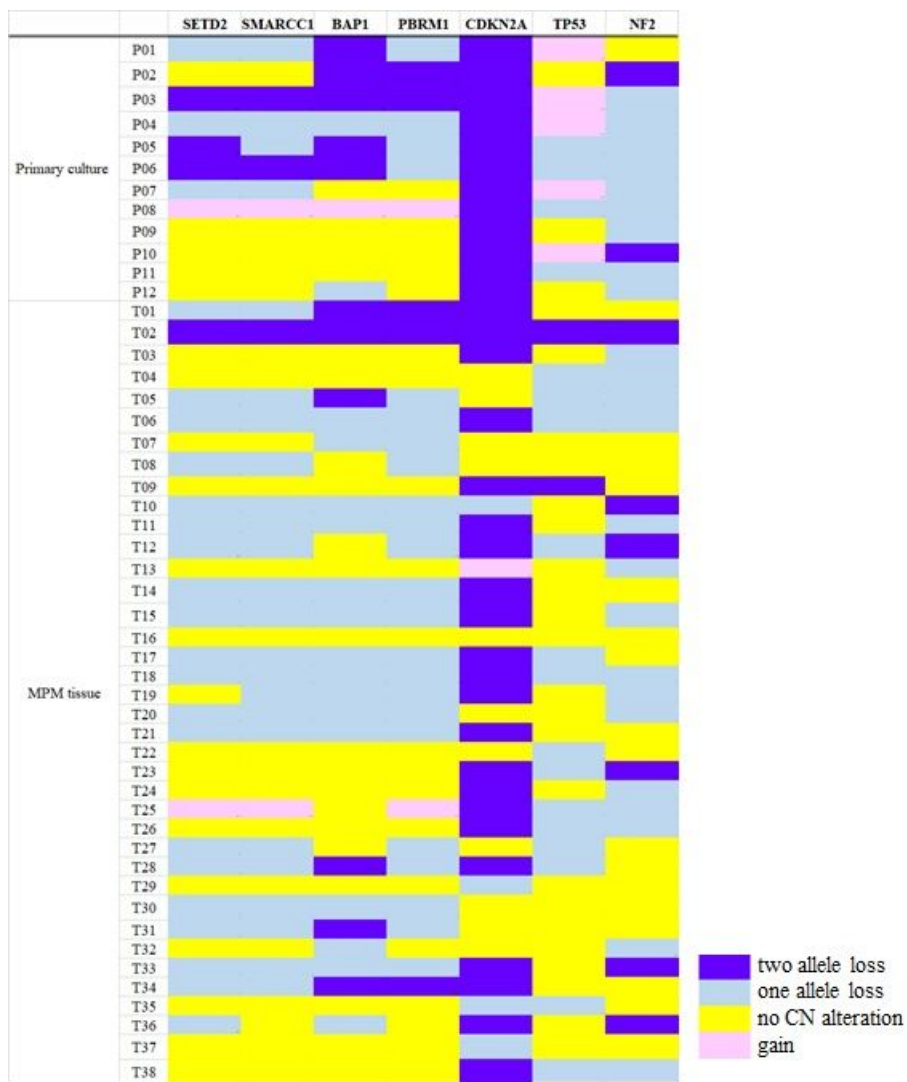


図 2 : 本学悪性中皮腫 50 検体の digital MLPA 解析 : SETD2, SMARCC1, BAP1, PBRM1, CDKN2A/2B, TP53, NF2 に検出されたコピー数変化

4 . 研究成果

現在悪性中皮腫の遺伝子異常に関する病理診断では、*CDKN2A (p16)*の2 アレル欠損と *BAP1* の核染色陰性が主な指標とされている。FISH 法は煩雑な技術を要し判定も熟練を要するので、日常診断業務として採用できる機関は限られる。NGS を使用するが digitalMLPA は簡便で、MM で高頻度コピー数変化する 12 遺伝子と全染色体のカリオタイピングを一度に実施することができ汎用性に優れる。本法を用い、悪性中皮腫はコピー数変化が chromothripsis-like pattern を示すことが特徴であることを明らかとした。特に二相型、肉腫型は激しいコピー数変化を示す傾向が見られた。上皮型では、コピー数変化の頻度差が大きく、一部検体は 1 アレル欠損が見られるのみで、これ等患者は予後良好であった。他方 *CDKN2A/2B* に加え、*3p21*, *TP53*, *NF2* にも 2 アレル欠損が生じている患者は予後不良であった。今後腫瘍の進展過程でコピー数変化が生じやすい領域から悪性化に寄与する遺伝子を見出し、本分子に対する分子標的薬の探索に研究を進展させる予定である。

[引用文献]

- [1] Bueno R, Stawiski EW, Goldstein LD, et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet.* 2016; 48: 407-16.
- [2] Hmeljak J, Sanchez-Vega F, Hoadley KA, et al. Integrative Molecular Characterization of Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer discovery.* 2018.
- [3] Yoshikawa Y, Emi M, Hashimoto-Tamaoki T, et al. 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: 13432-7.
- [4] Carbone M, Harbour JW, Brugarolas J, et al. Biological Mechanisms and Clinical Significance of BAP1 Mutations in Human Cancer. *Cancer discovery.* 2020; 10: 1103-20.
- [5] Pastorino S, Yoshikawa Y, Pass HI, et al. A Subset of Mesotheliomas With Improved Survival Occurring in Carriers of BAP1 and Other Germline Mutations. *J Clin Oncol.* 2018: JCO2018790352.
- [6] Bononi A, Goto K, Ak G, et al. Heterozygous germline BLM mutations increase susceptibility to asbestos and mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020; 117: 33466-73.
- [7] Mansfield AS, Peikert T, Smadbeck JB, et al. Neoantigenic Potential of Complex Chromosomal Rearrangements in Mesothelioma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer.* 2019; 14: 276-87.
- [8] Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, et al. 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. *Int J Oncol.* 2011; 39: 1365-74.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshikawa Y, Emi M, Nakano T, Gaudino G	4. 巻 Feb. 9
2. 論文標題 Mesothelioma developing in carriers of inherited genetic mutations.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transl Lung Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 67-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/tlcr.2019.11.15.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Pastorino, S., Yoshikawa, Y., Pass, H. I., Emi, M., Nasu, M., Pagano, I., Takinishi, Y., Yamamoto, R., Minaai, M., Hashimoto, T., Tamaoki, T., Ohmuraya, M., Goto, K., Goparaju, C., Sarin, K. Y., Tanji, M., Bononi, A., Napolitano, A., Gaudino, G., Hesdorffer, M., Yang, H., Carbone, M.	4. 巻 36
2. 論文標題 A Subset of Mesotheliomas With Improved Survival Occurring in Carriers of BAP1 and Other Germline Mutations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 3485-3494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1200/JCO.2018.79.0352	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Bononi Angela, Goto Keisuke, Ak Guntulu, Yoshikawa Yoshie, Emi Mitsuru, Yang Haining, Carbone Michele et al.	4. 巻 117
2. 論文標題 Heterozygous germline BLM mutations increase susceptibility to asbestos and mesothelioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 33466 ~ 33473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2019652117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshikawa Yoshie, Kuribayashi Kozo, Minami Toshiyuki, Ohmuraya Masaki, Kijima Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Epigenetic Alterations and Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitors? Current Standards and Future Perspectives in Malignant Pleural Mesothelioma Treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2020.554570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hidaka Kouko, Takeda Tetsushi, Kinoshita Yoshiaki, Nabeshima Kazuki, Tamiya Sadafumi, Yoshikawa Yoshie, Tsujimura Tohru	4. 巻 70
2. 論文標題 Development of mesothelioma in situ and its progression to invasive disease observed in a patient with uncontrolled pleural effusions for 15 years	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 1009 ~ 1014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉川良恵、江見充、大村谷昌樹、玉置(橋本)知子
2. 発表標題 Malignant mesothelioma patients with BAP1 and other germline mutations in relation to survival prognosis
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川良恵、大村谷昌樹、玉置(橋本)知子、江見充
2. 発表標題 Frequent detection of structural variations in TP53 gene of malignant mesothelioma by digital MLPA
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江見充、吉川良恵、玉置(橋本)知子、大村谷昌樹
2. 発表標題 Digital MLPA identifies large difference of frequency with homozygous deletion at CDK2A (p16) gene between in cultured cells and malignant mesothelioma tissues
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川良恵、大村谷昌樹、玉置（橋本）知子、江見充
2. 発表標題 The landscape of copy number alteration detected by digital MLPA in malignant mesothelioma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大村谷 昌樹 (Ohmuraya Masaki) (60398229)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	江見 充 (Emi Mitsuru) (90221118)	兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	ハワイ大学がんセンター	ニューヨーク大学ランゴン医療センター	