

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07269

研究課題名(和文) 家族性肺腺癌発病機序の分子細胞学的解析に関する研究

研究課題名(英文) Study on molecular cytological analysis of the pathogenic mechanism of familial lung adenocarcinoma

研究代表者

福島 喜代康 (Fukushima, Kiyoyasu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：00746620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、3世代に渡って24名に肺癌の発生を認めるといふ、肺癌の常染色体優性遺伝形式が強く疑われる大家系を本邦で初めて見いだした。

家族性肺癌の病原遺伝子変異を同定するため、次世代シーケンサーを用いて同家系内の肺癌患者3名と健常者6名のゲノムを解析した。その結果、19番染色体上の遺伝子の変異と、17番染色体上のある遺伝子に見つかった変異がこの家系の肺癌の発生に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において検討される肺腺癌関連遺伝子は、その強い遺伝性と高い発がん性、そして肺腺癌特異性から考えて、弧発性肺腺癌においても肺腺癌発症の key molecule である可能性が高く、肺癌のみならず他の癌においても発症の本質的なメカニズムに関与している可能性がある。この遺伝子の変異を明らかにできれば、肺腺癌発症のメカニズム解明と新たな診断法や治療薬の開発にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：For the first time in Japan, we have found a large family with strongly suspected autosomal dominant inheritance of lung cancer, in which 24 people develop lung cancer over three generations.

To identify pathogenic gene mutations in familial lung cancer, we analyzed the genomes of 3 lung cancer patients and 6 healthy individuals in the same family using a next-generation sequencer. The results suggest that mutations in the gene on chromosome 19 and mutations found in a gene on chromosome 17 may be involved in the development of lung cancer in this family.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺腺癌 がん遺伝子 家族性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在までのところ、家族性肺がんの原因遺伝子変異として確定しているものはない。研究協力機関の日本赤十字社長崎原爆諫早病院(諫早日赤病院)では3世代に渡って24名に肺がんの発生を認めるといふ、肺がんの常染色体優性遺伝形式が強く疑われる大家系を本邦で初めて見いだした(図1)。

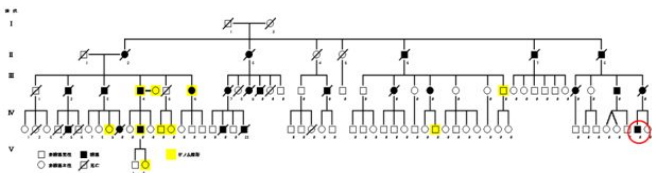


図1. 家族性肺腺癌家系の家系図

黒塗りされているのが家系内の肺がん患者。赤枠で示されているのが平成29年に新たに肺がん発症が判明した患者。

本研究開始までに、家族性肺がん家系の病原遺伝子変異を同定するため、図1に示した家系内の肺がん患者3名(第2世代の4、6及び第3世代の12)及び同一家系内の健常被験者6名(第2世代の4W、22及び第3世代の13、15、16、18)の計9名よりインフォームドコンセントのもとゲノムDNAを抽出し、エクソーム変異解析と連鎖不平衡解析を組み合わせること(連鎖・エクソームアプローチ)で、当該家系における家族性肺がん関連遺伝子変異を解析した。

まず、2014年にエクソームリシーケンシングデータを参照配列hg19にマッピングし、得られた約8万種の遺伝子変異から癌患者3名が共通に有し、かつ健常被験者が有さない遺伝子変異を抽出した。それら遺伝子変異から、synonymous変異、homozygote変異及びsegmental duplicationsを排除した結果、最終的に25種類の遺伝子変異を特定した。

一方、同じエクソームリシーケンシングデータを用いて、rsIDが付与されている約2万個のSNPsを選択し、家系情報を利用して連鎖不平衡解析を行い、当該家系における肺がん関連染色体領域を抽出した。その結果、2.49~2.69の高いLODスコアを示す2つの染色体領域(chr3、13)を得ることができた。

以上の2つの解析結果を重ね合わせたところ、遺伝子ADCY5の遺伝子変異が当該家系の家族性肺がん関連遺伝子変異であることが予想された。文献検索を行ったところ、ADCY5は弧発性肺がんでメチル化されていることが報告されており、肺がん発症に強く関連していた。

しかし本家系における遺伝性肺がんの原因遺伝子がADCY5のみと結論付けられる結果が得られず、そのため2016年には、更なる候補遺伝子特定のため、上記エクソームリシーケンシングデータについてSingle Nucleotide Variant(SNV)およびShort Insertion/Deletion(InDel)を網羅的にスクリーニングした。その後、がんの原因となる遺伝性因子を同定するため、各検体において検出された変異を以下の4条件で絞り込みを行い、その結果17変異を選抜した;(1)クオリティが低い変異を除外、(2)Non-Synonymous変異(Missense、Nonsense、Readthrough、Insertion、Deletion、Insertion-Deletion、Frameshift)を選抜、(3)癌患者3名でヘテロ、健常者6名でリファレンス・ホモを示す変異を選抜、(4)ゲノムビューワー上での目視による確認で、明らかな偽陽性変異を除外。

さらに、選抜された17変異のうち、1000 Genome日本人データで頻度が1%以上のものを除外した後、各変異に関して変異のタンパク質機能への影響を予測した。この予測結果から、19番染色体上の5つの遺伝子(特許出願前のため遺伝子名は伏せる)の5変異を最終候補とした。

### 2. 研究の目的

本研究前半では、非小細胞肺がん検体について、次世代シーケンサーを用いて前述の5遺伝子のターゲットリシーケンス解析を実施し、体細胞変異の浸透率を検索することで、これら5遺伝子が癌原因遺伝子であることを実証することを目指した。

また、本研究後半では、本家系の癌患者の体細胞と腫瘍細胞の全ゲノムシーケンシング解析による構造変異(SV)の検索を行った。

本研究から得られる結果は肺腺癌発症のメカニズム解明につながり、新たな分子診断法の開発や新たな肺腺癌の治療薬の創薬が可能になると期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 候補5遺伝子の、肺がんの腫瘍検体における変異の有無の解析

非小細胞肺がんにおいて、この5遺伝子の体細胞変異(表1)の浸透率を検索するために、諫早日赤病院に凍結保存されていた切除腫瘍組織8検体と非癌組織2検体(表2)から抽出されたDNAについて上記の5遺伝子領域の配列解析を行った。

	Chrom	Position REF	ALT	AA Change
1	19p13.2	129xxxxx G	T	p.R L
2	19p13.2	132xxxxx G	A	p.R C
3	19p13	145xxxxx C	G	p.S C
4	19p13.1	160xxxxx C	T	p.G R
5	19p12	207xxxxx C	A	p.G V

表 1. 解析を行った 5 遺伝子とその変異。遺伝子名と 19 番染色体上の変異部位の下 5 桁は非表示となっている。

ID	Dx	Stage	備考
GIC01	LK (腺癌)・DM	T1bN1M0	同一患者由来
GIC02	正常肺		
GIC03	正常肺		同一患者由来
GIC04	LK (高分化腺癌)	pT2bN0M0 stage II A	
GIC05	LK (腺癌)・BA・HT		
GIC06	LK (腺癌, BAC)		
GIC07	LK (乳頭腺癌)・COPD		
GIC08	LK (腺癌) 右S9		
GIC09	LK (腺癌), DM	pT2N0M0 stage I B	
GIC10	LK (腺癌), DM		

表 2. 変異解析に用いた検体

カスタムパネルを 5 遺伝子について設計し (アンプリコン長 125-275bp) 次世代シーケンサー (Ion S5) を用いて配列解析を行った。得られたリード配列を TMAP (torrent mapping alignment program) を用いてリファレンス配列にマッピングし、Torrent Variant Caller を用いて変異の検出およびアレルカウントの算出を行って、検出した変異にアノテーションを付与した。エクソーム解析で絞り込まれていた変異 (表 1) について本解析における検出有無の確認を行った。対象のサンプルとして、家系内の同一の肺腺癌患者の正常組織と腫瘍組織から抽出された DNA を用いた (表 2 の GIC01 と GIC02)。

## (2) 腫瘍及び非腫瘍検体を用いた全ゲノムシーケンシング解析による検索

2020 年にがん種横断的全ゲノム解析 (PCAWG) コンソーシアムが 38 種類のがんについて 2800 例以上の全ゲノム解析を行った結果が発表され、非コード領域にも多数のがん責任遺伝子変異の存在が示唆された (RheInbay et al. 020. Nature. 578: 102-111)。我々が標的遺伝子変異の特定に至らない原因のひとつに、当時我々がエクソーム解析のみに頼ってきたことがあるのではないかと考えられたため、本家系内がん患者の正常組織及び腫瘍組織より抽出した核酸 (表 2 の GIC01 と GIC02) の whole genome sequencing を行った。

### 全ゲノムシーケンシング解析による SNV/InDel の検索

表 2 の GIC01 と GIC02 検体から抽出した DNA に対し、TruSeq Nano DNA Library Prep Kit (イルミナ社) を用いてライブラリを作成し、NovaSeq 6000 (イルミナ社) で、Paired-end、Multiplex 法でシーケンシングを行った。得られたデータのバイオフィンフォマティクス解析を行った。

### 全ゲノムシーケンシング解析による家族性肺がんに関与する構造変異 (SV) の探索

構造変異探索のために使用した 3 つのソフトウェアと、対象となる変異の種類は以下のものである。

- (a) BreakDancer: Insertion, Deletion, Inversion, Translocation
- (b) Pindel: Insertion, Deletion, Replace, Inversion, Tandem duplication
- (c) Control-FREEC: CNV

また、構造変異探索のための絞り込み条件 (一次、二次、三次) は以下のもので行った。

< 一次絞り込み >

- (a) BreakDancer
  - ・ SV を支持しているリードを 8 本以上持つものが 1 サンプル以上あるもの。
  - ・ 一方の BreakPoint 周辺領域が、もう一方の BreakPoint 周辺領域の Segmental Duplication 領域ではないもの。
- (b) Pindel
  - ・ SV を持つとコールされたものが 1 サンプル以上あるもの。
  - ・ 一方の BreakPoint 周辺領域が、もう一方の BreakPoint 周辺領域の Segmental Duplication 領域ではないもの。

< 二次絞り込み >

(a) - (c) 共通

chr19: 11850000-2385000 (エクソーム解析の結果、候補変異が集中していた領域) に含まれるもの。

< 三次絞り込み >

(a) BreakDancer

- ・SV の開始および終了位置周辺の領域が、繰り返し配列の領域でないもの。
- ・検出した SV を支持しているリードが両方のサンプルで 8 以上あるもの。

(b) Pindel

- ・SV の開始および終了位置周辺の領域が、繰り返し配列の領域でないもの。
- ・両方のサンプルで検出された変異。

最終的に IGV 上で、該当サンプルと解析サンプル以外のリードの状況の目視での確認を行った。

全ゲノムシーケンシング解析による家族性肺がんの網羅的体細胞変異解析

現在癌のパネル検査に用いられている遺伝子上の変異が認められるかを網羅的に検索した。体細胞変異解析のために使用したソフトウェアと対象となる変異の種類は以下のものである。

DRAGEN Bio-IT Platform Somatic Pipeline (Tumor/Normal mode) : SNV, Short InDel

また、体細胞変異探索のための絞り込み条件 (一次から三次) は、以下のとおりである。

< 一次絞り込み >

Non-Synonymous 変異 (Missense, Nonsense, Readthrough, Insertion, Deletion, Insertion-Deletion, Frameshift) もしくは Splice site 上の変異 (Splice donor site, Splice acceptor site) で であると予測されたもの。

< 二次絞り込み >

変異検出の精度評価の Filter (BA 列) を Pass したもの。

< 三次絞り込み >

(a) 癌パネル (QIASeq Lung Cancer Panel) 搭載遺伝子 (72 遺伝子) 上の変異。

(b) FMI CDx パネル搭載遺伝子 (309 遺伝子) 上の変異。

4. 研究成果

(1) 候補 5 遺伝子の、肺癌の腫瘍検体における変異の有無の解析

エクソーム解析で絞り込まれた 4 変異 (表 1 の 2-5。表 1 の 1 は該当箇所がデザインに含まれていないため除外) は対象の 2 サンプルのいずれでも検出されたが、対象サンプル以外の 8 サンプルではすべてにおいて検出されなかった (表 3)。

	Chrom	GIC01	GIC02	GIC03	GIC04	GIC05	GIC06	GIC07	GIC08	GIC09	GIC10
2	19p13.2	0 1	0 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
		0.5108	0.5073	0	0	0	0	0	0	0	0
3	19p13.2	0 1	0 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
		0.48	0.484	0	0	0	0	0	0	0	0
4	19p13	0 1	0 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
		0.4967	0.509	0	0	0	0	0	0	0	0
5	19p13.1	0 1	0 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
		0.4642	0.4985	0	0	0	0	0	0	0	0

表 3. エクソーム解析で得られた変異の肺癌検体における検出確認

このように最初のエクソーム解析で得られていた変異は肺癌の責任遺伝子変異ではない可能性が高くなったため、得られていた配列情報から、以下の異なる方法での原因遺伝子の絞り込みを試みた。

いずれか 1 検体以上において変異を検出している 45 変異検出

Non-Synonymous 変異 5 変異に絞られる

1000 Genomes プロジェクトの日本人サンプルで頻度が 1%未満か 情報が無い変異 1 変異

IGV による目視確認 0 変異

このようにエクソーム解析で絞り込まれていた生殖細胞変異は検出されたが、体細胞変異は肺癌組織において検出を確認することはできなかった。ただ、19 番染色体の 11850000-2385000 の領域に候補変異が集中していることが認められた。

(2) 腫瘍及び非腫瘍検体を用いた全ゲノムシーケンシング解析による検索

全ゲノムシーケンシング解析による SNV/InDel の検索

正常組織検体と腫瘍組織検体の Read データを入力として、Illumina DRAGEN Bio-IT Platform による体細胞変異解析を実施した。検出した SNV/InDel に対してアノテーション情

報を付与した後、一定の基準を満たす SNV/InDel の絞込みを行った。

全ゲノムシーケンシング解析による家族性肺がんに寄与する構造変異 (SV) の探索

SV の BreakDancer および Pindel による検出結果を示す (表 4 および 5)。

	GIC01	GIC02
Insertion	2	4
Deletion	2,446	2,386
Inversion	852	469
Intra-chromosomal translocation	1,347	1,221
Inter-chromosomal translocation	104	103

表 4. BreakDancer による SV の検出

	GIC01	GIC02
Insertion	470,984	461,166
Deletion	516,884	504,797
Replace	38,089	36,388
Inversion	1,984	1,970
Tandem duplication	2,320	2,217

表 5. Pindel による SV の検出

BreakDancer を用いた translocation 以外の SV 解析では、三次絞り込み後に 8 変異 (6 領域) が検出され、IGV 上で、該当サンプルと今回の解析サンプル以外のリードの状況を目視確認したところ、ともに 19 番染色体の intron 上の deletion である 2 変異 (1847bp および 548bp) が検出された。

BreakDancer を用いた translocation の SV 解析では、三次絞り込み後に 2 変異が検出され、IGV 上での目視確認後、intra-chromosome translocation である 1 変異が検出された。

Pindel を用いた SV 解析では、三次絞り込み後に 2 変異が検出され、IGV 上での目視確認後、Break Dancer でも検出された Intron 上の Deletion (548bp) 1 変異が検出された。

全ゲノムシーケンシング解析による家族性肺がんの網羅的体細胞変異解析

体細胞変異探索のための一次絞り込み後に 146 変異が検出され、二次絞り込み後に 88 変異となった。

三次絞り込みとして肺癌パネル (QIASeq Lung Cancer Panel) 搭載遺伝子 (72 遺伝子) 上の変異を検索したところ、2 か所 (2 番染色体と 17 番染色体) の 4 変異が検出された。

また、三次絞り込みとして肺癌パネル FMI CDx パネル搭載遺伝子 (309 遺伝子) 上の変異を用いたところ、3 か所 (14 番染色体と 17 番染色体) の 4 変異が検出された。17 番染色体上の遺伝子 X (特許出願前のため遺伝子名は伏せる) の 2 変異は、どちらのパネルを用いても検出された。

現在までのところ本家系における肺腺癌発生の原因遺伝子変異の特定にまでは至っていない。

前述の、全ゲノムシーケンシングの SV 解析で検出された 19 番染色体の intron 上の 548bp の deletion と 19 番染色体上の intra-chromosome translocation、それと網羅的体細胞変異解析で検出された 17 番染色体上の遺伝子 X の 2 つの変異は発がんの過程に寄与している可能性が高く、今後さらに解析を進めていきたいと考えている。

近年がんのゲノム情報は急速に蓄積しつつあり、解析に活用できる遺伝子情報も、エピジェネティック制御因子やスプライシング因子などに関するものも含めて増加し続けている。本研究を進める上で、既に本家系内の 9 名のゲノムデータと、1 名の正常組織及び腫瘍組織の全ゲノムシーケンシングデータは得られている。2022 年には本家系から新たに 1 名が肺癌疑いで検査中であり、肺癌診断が確定した場合には、新たにエクソーム解析を行い、検出 SNV の絞り込みを再度行って変異の網羅的な解析を行いたいと考えている。また全ゲノムシーケンシングを可能な限り多くの検体で行いたい。さらに可能であればメチル化の解析や、ゲノム編集技術を用いた発がん実験なども行いたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	久保 亨 (Kubo Toru)  (50444873)	長崎大学・熱帯医学研究所・客員研究員  (17301)	
研究分担者	永安 武 (Nagayasu Takeshi)  (80284686)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授  (17301)	
研究分担者	松本 桂太郎 (Matsumoto Keitaro)  (80404268)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授  (17301)	

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