

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08665

研究課題名（和文）消化器がんリスク関連機能SNPの解析及びその臨床応用

研究課題名（英文）Analysis of gastrointestinal cancer risk-related function SNP and its clinical application

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・主任上席研究員

研究者番号：60260254

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：がんリスクを予測する新規バイオマーカー開発を目的とし、がん関連遺伝子の次世代シーケンス解析を行い、がん関連非同義生殖細胞系列一塩基多型（SNP）を同定した。その結果、前向きコホート研究の参加者のうち、大腸がんを発症したグループは2個のSNPを18.6%と16.3%の頻度で保有し、胃がんを発症したグループは1個のSNPを12.5%の頻度で保有すること、これらSNPは非リスクグループの参加者と比較して、リスクグループで有意に濃縮されることを見出した。そのうち2個のSNPは機能ドメイン内に存在することから、これらのSNPが遺伝子の機能を変化させ、特定の悪性腫瘍の発生に関連していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体細胞変異の頻度が高いと評価されたがん関連遺伝子409種類の全エクソン解析をすることで、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を一度に統合して解析することは、がんの遺伝子異常を推測することが可能になると考えられる。我々は、個々の患者の包括的な理解が多数のゲノム情報の組み合わせでがん予防のバイオマーカーとして確立でき、がん臨床バイオマーカー、発がん機構の解析と結びつくことで特色のある独創的なものとなると考える。この成果は、Clinical Genomicsの概念を実際のがん臨床に反映されていくものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Development of the novel biomarkers to predict cancer risk is considered to be important for cancer prevention. We therefore attempted to identify non-synonymous germline single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with carcinogenesis by using next generation sequencing (NGS) of the cancer-related gene panel. Of 116 participants enrolled in a Japanese prospective cohort study, our NGS analysis revealed that two SNPs were recurrently observed in the participants diagnosed with colon cancer with 18.6% and 16.3% of frequencies. On the other hand, one SNP was recurrently observed in gastric cancer group with 12.5% of frequency. All of them were significantly enriched in each cancer group, when compared with cancer-free participants. Intriguingly, two of three SNPs were located in certain functional domains. Our present study strongly suggests that these SNPs are associated with carcinogenesis of certain malignancies resulting from the alteration of the function of these genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん 遺伝子 ゲノム SNP がん予防

1. 研究開始当初の背景

近年の遺伝子解析技術の革新的な進歩によって、大量の遺伝子情報を短時間でかつ低価格で解析することが可能になった。この技術を利用した全ゲノム解析によって「がん」に特徴的な遺伝子異常の全体像として、細胞のがん化には少数のがん遺伝子で生じた変異(ドライバー変異)の影響が極めて大きいことが示されている。これを受けて、これまでにがんとの関連が文献報告され、がんにおける遺伝子変異のデータベース(COSMIC など)で体細胞変異の頻度が高いと評価されたがん関連遺伝子 409 種類(Life Technologies Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel Target Gene List)の全エクソン解析をすることで、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 およ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は、がんの遺伝子異常を推測することが可能になると考えられる。遺伝子情報に基づいてがん患者ごとにその治療を最適化する「がんゲノム医療」の推進が進む中で、遺伝子情報において個々の患者を包括的に理解する「ゲノム Signature」という包括的分子診断の考え方が生まれている。我々は、Germline がんリスク因子が体細胞変異に直接影響もしくは相関可能か否かを解析、検討し、個々の患者の包括的な理解が多数のゲノム情報の組み合わせでがん予防のバイオマーカーとして確立することを目指す研究を行う。

2. 研究の目的

我々は、8000 名以上の健常者に対して前向きコホート調査を約 10 年間継続し、比較的若年で消化器がんを発症したリスク群、70 歳までがんを発症せず、かつ家族歴もない非リスク群に対し 409 がん関連遺伝子のエクソーム解析を行い、リスク候補の 3 遺伝子に機能性 SNP を同定した。本研究では、全国 10 万人 J-MICC コホートと連携した検討及び過去の当施設での消化器がん症例 400 例を replication cohort として、さらにシーケンズ公開情報(東北メガバンクプロジェクト日本人 1000 人の情報等)を利用して遺伝統計学的解析を追加する。腫瘍体細胞変異に関しても全エクソームを解析し、臨床所見などについても多変量解析を加え、上記 3 遺伝子機能性リスク SNP と体細胞変異 Signature や臨床所見との関連、サロゲートマーカーとしての可能性、がん予防、診断、予後予測、治療法等への利用可能性を追求するとともに、分子生物学的機能解析を試み、発がん感受性への関与の解明を計る。

3. 研究の方法

コホート研究試料を用いたゲノム解析による変異遺伝子群の抽出とその機能解析

これまでの解析で得られた 3 つの遺伝子は、クロマチンリモデリング、DNA 修復、微小管形成に関与するタンパク質をコードする遺伝子である。そこで、当該遺伝子を単離し人工的に変異を導入して胃がんおよび大腸がん細胞株に発現させ、当該細胞の細胞増殖率や腫瘍形成率あるいは薬剤に対する感受性などの形質変化および関連遺伝子の発現パターン変化を調べ、がんに対してこれらの遺伝子群がどのような機能を持っているかを検討する。さらに、下記の研究項目を実施することで新たに見つかった胃がんおよび大腸がんに関連する体細胞変異の中でミスセンス変異やナンセンス変異、あるいは Non-synonymous 変異が同定された場合、リスク多型との関連性について上述と同様の手法で検討を行う。

がん関連遺伝子パネルによる消化器がんの機能的多型およびコピーナンバー変異(CNV)解析

千葉県内のコホート研究での集団解析から得られる胃がんおよび大腸がんのリスク群と非リスク群で 400 種類以上のがん関連遺伝子の全エクソンを解読し、がんのリスクに関与する可能性がありアミノ酸変化やストップコドンを示すことで機能的な影響が生じる可能性の高い多型を PGM で検出した。そこで、当センターでの胃がん、大腸がん症例 400 例においてもリスクファクター候補の多型(SNP)を同様に同定し比較検討する。

さらに次世代シーケンサーによる解読回数が多い(平均 Coverage 200 リード以上)エクソーム解析では、その解読の回数の大小でゲノムコピー数の変化(Copy Number Variant: CNV)を解析できる。遺伝子ごとの解読回数をゲノムの物理地図上にプロットした一例を図上に示す。体細胞変異に加え、ゲノムコピー数の変化を類推することができ、遺伝子増幅や欠失がどの遺伝子で起っているかを検討し、多型、変異、変異パターンとの関連を検討する。

胃がんおよび大腸がんにおける新たなゲノム Signature の提唱

機能的な遺伝子変異に留まらず、エクソーム解析では、アミノ酸変異を伴わない多数の遺伝子変異についても解析が可能となる。また、体細胞での遺伝子変異、核酸変化のパターンによる Mutation Signature 解析を行い、リスク多型と Mutation Signature の関連を検討する。

本研究で、次世代シーケンサーによる包括的な解析結果に基づき、新たな正常組織およびがんゲノム Signature からの包括的な解析を提唱し、その Signature そのものが最終的に新たなバイオマーカーとしてがん予防、様々な臨床診断に活用できるかを検討する。さらに既存の臨床症状や生化学検査、病理検査等を検討に加えることで包括的ながん予防、診断、予後予測法の確立を試みる。

4. 研究成果

消化器がん発症リスク関連 germline 遺伝子多型の同定とその機能解析

我々のグループは、2006 年より健常人を対象とした前向きコホート研究を北総地域（印西市、我孫子市、柏市）で推進中であるが、ここで収集した血液試料と情報を活用して、本研究課題を実施した。約 8000 人のコホート研究参加者から、消化器がんを発症したリスク群（胃がん 40 人および大腸がん 43 人）と、70 歳までがんを発症せず、かつ、がんの家族歴もない非リスク群（33 人）を抽出した。合計 116 人の血液試料から抽出したゲノム DNA について、次世代シーケンサー（Ion PGM, Thermo Fisher Scientific 社）を用いてがん関連 409 遺伝子のターゲットエクソーム解析（Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel, Thermo Fisher Scientific 社）を行い、アミノ酸変化を伴う germline 遺伝子多型を検索した。得られたデータを、hg19（基準ゲノム）と比較することにより、アノテーションが付与されたアミノ酸変化を伴う germline 遺伝子多型を、胃がんリスク群 40 名から 626 個（一人当たり 15.7 個）、大腸がんリスク群 43 名から 648 個（一人当たり 15.1 個）同定した。このうちの大部分はミスセンス変異であり、一部ナンセンス変異およびスプライシングサイトの変異も含まれていた。次に、それら遺伝子多型のうち非リスク群には存在せず、かつ、非リスク群と比較して胃がんまたは大腸がんリスク群において有意差を持って高頻度で存在する遺伝子多型を絞り込み、胃がんまたは大腸がんの発症リスクと関連する遺伝子多型とした。その結果、胃がん発症リスクと関連する germline 遺伝子多型候補として遺伝子 A のミスセンス変異 ($p=0.04$) を、大腸がん発症リスクと関連する germline 遺伝子多型候補として遺伝子 B ミスセンス変異 ($p=0.02$) と遺伝子 C のミスセンス変異 ($p=0.01$) を同定した。実際に、遺伝子 A の当該多型は胃がんリスク群の 40 人中 5 人 (12.5%) で認められ、5 人全てが多型をヘテロで保持していた。一方、遺伝子 B の当該多型は大腸がんリスク群の 43 人中 7 人 (16.3%) で認められ、そのうち 1 人は多型をホモで保有していた。また、遺伝子 C の当該多型は大腸がんリスク群の 43 人中 8 人 (18.6%) で認められ、8 人全てが多型をヘテロで保有しており、その内の 2 人は同時に遺伝子 B の当該多型もヘテロで保有していた。これまでのところ、COSMIC データベースを含む複数のデータベースおよび論文等において、遺伝子 A の当該多型が胃がんの発症および進展に寄与するとの報告、および、遺伝子 B と遺伝子 C の当該多型が大腸がんの発症および進展に寄与するとの報告は共になく、これら germline 遺伝子多型が新規のがん発症リスク因子となり得ると考えられる。

次に、がん発症リスク因子の候補として同定したアミノ酸変化を伴う 3 個の germline 遺伝子多型が、実際に胃がんおよび大腸がんを予測するマーカーとなり得るかについて検証を行った。そこで、当院バイオバンクに保管された症例を用いて、これら germline 遺伝子多型の有無についてサンガーシーケンス法によって調べた。まず、胃がん 105 症例から抽出したゲノム DNA を用いて遺伝子 A の当該多型を検索したところ、当該多型は胃がん患者 105 人中 9 人 (8.6%) で認められ、これら 9 人は全て多型をヘテロで保有することを見出した。コホート研究試料の非リスク群をさらに 80 人分追加して合計 113 人とし、非リスク群中の当該多型の出現頻度を基準とし、胃がん患者で有意に当該多型が濃縮されているかについて比較検討を行った。その結果、非リスク群のシーケンス解析より、113 人中 2 人がヘテロで当該多型を保有していることが判明し、非リスク群の多型アレルの出現頻度は 0.009 となった。これに対して、胃がん患者における多型アレルの出現頻度は 0.043 となり、Fisher's Exact Test の結果、遺伝子 A の当該多型が胃がん患者で有意に ($p=0.02$) 濃縮されていることを明らかにした。以上、遺伝子 A の当該多型を調べることにより胃がんの発症リスクを予測するための新規マーカー候補としての可能性を提唱した。一方で、大腸がん 70 症例から抽出したゲノム DNA を用いて遺伝子 B と遺伝子 C の当該多型の頻度についても同様に検索した。これまでのところ、遺伝子 B と遺伝子 C の当該多型は、大腸がん患者において濃縮される傾向にあることを見出している。

先行研究において、がん発症リスク因子の候補として、3 個の遺伝子に生じたアミノ酸変化を伴う germline 遺伝子多型を、予備的に見出していた。本研究では、解析に用いるサンプルセットの追加変更を受けて上記追加解析を行い、結果的に遺伝子 A、遺伝子 B および遺伝子 C を新規に同定した。遺伝子 A は、胃がんに関連した既知の遺伝子でありその機能ドメイン中にある当該多型は pathogenic であると予想される (FATHMM prediction)。遺伝子 B は、発がん関連シグナルを促進する転写調節因子で、当該多型は pathogenic であると予想される。遺伝子 C は、細胞の生存および血管新生に関わる転写因子で、その機能ドメイン中にある当該多型は pathogenic であると予想される。現在、これらの germline 遺伝子多型が、胃がんあるいは大腸がんの発症および進展に寄与する可能性とその分子メカニズムについて、培養細胞株を用いた解析、臨床検体を用いた解析、遺伝子改変マウスを用いた解析などを組み合わせて多面的に推進中であり、後続研究にて解明していく。

消化器がん発症リスク関連 germline 遺伝子多型と相関する遺伝子異常

当院バイオバンクが保有する胃がん試料のうち、遺伝子 A の当該多型を保有する 9 症例について全エクソーム解析を進め、当該遺伝子多型を持つ胃がんの特徴的なゲノム異常の検索を行った。腫瘍および正常組織から抽出したゲノム DNA について Ion AmpliSeq™ Exome RDY Kit (Thermo Fisher Scientific 社)を用いてライブラリーを作成し、次世代シーケンサー(Ion Proton、Thermo Fisher Scientific 社)にて塩基配列の解読を行った。これまでのところ、遺伝子 A の当該多型を保有する症例に特徴的な、体細胞遺伝子変異および遺伝子の増幅や欠失等は同定されていない。この点については、今後、全エクソーム解析を行う症例数をさらに増やすと共に、並行して解析を進めている胃がん症例の GWAS データを含めた統合的な解析が必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mikami H, Kimura O, Yamamoto H, Kikuchi S, Nakamura Y, Ando T, Yamakado M.	4. 巻 9
2. 論文標題 A multicentre clinical validation of AminoIndex Cancer Screening (AICS).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13831
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-50304-y.	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 -
1. 著者名 Naoyuki Okamoto ¹ , Haruo Mikami ² , Yohko Nakamura ² , Miho Kusakabe ² , Naohito Yamamoto ³ , Nobuhiro Takiguchi ⁴ , Yoshihiro Nabeya ⁵ , Hiroaki Soda ⁶ , Satoshi Fukasawa ⁷ , Takeshi Kishida ⁸ , Manabu Shiozawa ⁹ , Akira Yoshida ¹⁰ , Takuya Shimizu ¹ , Shunsuke Fujimoto ¹ , Mitsuhiro Ueda ¹ , Seiichi Inagaki ¹ , Yohei Miyagi ¹¹ , Hiroki Nagase ²	4. 巻 5
2. 論文標題 A Nobel Multivariate Index for Cancer Risk Detection Based On the Serum Trace Elements: Metallo-Balance Method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Epidemiology and Prevention	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.36648/cancer.5.1.4	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 Ando K, Nakamura Y, Nagase H, Nakagawara A, Koshinaga T, Wada S, Makishima M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Co-Inhibition of the DNA Damage Response and CHK1 Enhances Apoptosis of Neuroblastoma Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E3700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20153700.	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 -
1. 著者名 Islam MS, Takano R, Yokochi T, Akter J, Nakamura Y, Nakagawara A, Tatsumi Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 Programmed expression of pro-apoptotic BMCC1 during apoptosis, triggered by DNA damage in neuroblastoma cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer.	6. 最初と最後の頁 542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-019-5772-4.	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 -

〔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 Haruo Mikami, Yohko Nakamura, Miho Kusakabe, Hiroki Nagase
2. 発表標題 A large cohort study to evaluate the cancer screening test measuring serum trace and major element: Metallo-balance
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 三上春夫、岡本直幸、宮城洋平、中村洋子、永瀬浩喜
2. 発表標題 血清中の元素含有量を用いた新たながんスクリーニング法開発に関する研究 ~メタロバランス~
3. 学会等名 第27回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村洋子、三上春夫、宮城洋平、永瀬浩喜
2. 発表標題 血清中の元素含有量を用いた新たながんスクリーニング法開発に関する研究
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 三上春夫、宮城洋平、中村洋子、永瀬浩喜
2. 発表標題 血清中の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
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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://www.facebook.com/CCCR1.chiba.gan.kenkyujo

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	下里 修 (Shimozato Osamu) (30344063)	千葉県がんセンター(研究所)・がん予防センター 腫瘍ゲノム研究室・室長 (82504)	
研究分担者	巽 康年 (Tatsumi Yasutoshi) (00450578)	千葉県がんセンター(研究所)・がん予防センター 腫瘍ゲノム研究室・研究員 (82504)	

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
---------	---------