

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16942

研究課題名（和文）エクソームシーケンスによる脂腺癌の発癌メカニズム解明

研究課題名（英文）Exome sequencing of sebaceous carcinoma of the eyelid

研究代表者

秋山 雅人（Masato, Akiyama）

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：10757686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：合計49例の日本人眼瞼脂腺癌の研究参加同意を取得し、38人に由来する腫瘍と血液からDNAを抽出し、エクソームシーケンスを行った。さらに、既知の3遺伝子に加えて、約2割の患者の腫瘍細胞に変異が同定される遺伝子を同定した。これらの結果より、本邦における眼瞼脂腺癌はこれまでに日本人以外を対象とした研究で報告されていた遺伝子異常を有していることが確認され、主要ながん関連遺伝子は人種を超えて共通していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眼科領域の悪性腫瘍は非常に稀少であり、がんゲノム解析はほとんどの悪性腫瘍で進んでいないのが現状である。本研究は、眼科領域で比較的頻度が高く致死性の悪性腫瘍である眼瞼脂腺癌患者38例を対象に網羅的ながんゲノム解析を行ったものであり、今後の眼瞼悪性腫瘍におけるがんゲノム診療の推進に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：A total of 49 Japanese patients with sebaceous carcinomas of the eyelid participated in the study. DNA was extracted for exome sequencing from both tumor tissues and blood samples obtained from 38 patients. As a result of the exome sequence analysis, we found that three previously reported genes were frequently mutated in our Japanese samples. We identified a novel gene that was mutated in approximately 20% of tumors. These results confirm that sebaceous carcinomas of the eyelid in the Japanese population have somatic mutations which have been previously reported in the studies of non-Japanese patients, and that major sebaceous carcinoma-related genes are shared across populations.

研究分野：眼科学

キーワード：眼瞼脂腺癌 がんゲノム エクソームシーケンス

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノムシーケンス技術の著しい進歩と低価格化により、悪性腫瘍の遺伝的原因の解明が進んでおり、様々な腫瘍の分子生物学的背景の解明が進み、得られた知見はがん診療にも役立てられるようになった。一方、十分に研究が行われていない腫瘍も存在し、その大部分は罹患者が少ないものである。眼周囲や眼内に発生する眼科領域の悪性腫瘍は、非常に稀であり、一部の腫瘍を除きほとんどは遺伝学的検索がなされていなかった。

脂腺癌は、本邦では眼瞼腫瘍の中で頻度の高い腫瘍であり、他の眼瞼腫瘍と比較して、局所再発や、リンパ節転移、遠隔転移も比較的多くみられ、10年生存率は80%未満と考えられている(引用1)。治療は、腫瘍切除を基本とするが、現時点で有効な治療薬剤はなく、全身転移を生じるとエビデンスに基づいた治療ができない。また、腫瘍切除は有効であると考えられているが、眼瞼部の切除と再建の結果、閉瞼が困難となる兔眼などの合併症が存在する。本疾患の治療として、13-23%で眼窩内容組織の全除去(眼窩内容除去術)が行われたとの報告(引用2,3)もあり、視機能の損失と整容的欠失により、一部の患者では生活の質が著しく低下する。

眼瞼腫瘍の割合は、人種により異なることが知られている。過去の臨床研究では、欧米人の眼瞼腫瘍では脂腺癌の頻度は5%未満であり、8割が基底細胞癌である。欧米と比較すると、本邦を含むアジアでは脂腺癌の頻度が高いことが知られており、アジアで多い疾患であることが示唆されている(引用4)。肺がんでは、同じ悪性腫瘍でも、人種によって原因となる体細胞変異の影響が異なる可能性が示されており(引用5)、本疾患のように臨床的な人種差がある疾患を対象にゲノム研究を行うことで、分子生物学的な観点で人種間の違いについての検証を可能とし、病因論に新たな知見をもたらす可能性があると考えられた。

## 2. 研究の目的

眼科領域の悪性腫瘍の一つである眼瞼脂腺癌(sebaceous carcinoma of the eyelid)を対象に、遺伝子の全翻訳領域を対象としたエクソームシーケンスによる体細胞変異の網羅的変異解析を行い、発癌の分子機構を明らかにすること。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究参加同意の取得

当初の計画では、九州大学単施設で研究参加者を集う予定であったが、予定よりも収集数が多くはなかったことから、多施設で検体収集を行うこととして、九州大学を含む5つの大学病院で検体の収集を行った。

### (2) 採血と手術による検体の収集

採血により取得した血液と手術により切除された腫瘍検体それぞれから、DNAを抽出した。また、既に手術が完了していた患者からは、FFPE検体からDNA抽出を行うこととし標本を取得した。

### (3) DNAの抽出と保管

DNAの抽出は、九州大学と東京大学で同一のプロトコルに従い行われた。DNAの保管は、九州大学で行った。

### (4) ライブラリ作成とシーケンス

ライブラリ作成とシーケンスは、全て外部委託で行った。SureSelect Human All Exon V6を用いてライブラリ作成を行い、NovaSeq6000でシーケンスを行った。データ量は、腫瘍検体で36Gb/sample、血液検体で10Gb/sampleとなるように設定した。シーケンスデータは、FASTQ形式で受領した。

### (5) シーケンスデータ解析

FastQCで品質の評価を行った後、Burrows-Wheeler Alignerを用いて参照配列にマッピングし、Mutect2のbest practiceに準じて変異コールを行った。また、コール後の品質管理として、シーケンス深度やアレル頻度の条件検討を行った。

## 4. 研究成果

- (1) 検体の収集  
九州大学を含む本邦の5施設で検体収集を行い、合計49例の眼瞼脂腺癌患者から研究の参加同意を取得した。
- (2) エクソームシーケンス  
(1)で研究同意を取得したもので、凍結検体が取得できた38例について血液検体と腫瘍検体それぞれについて、エクソームシーケンスを行った。血液検体については、7-12Gb/sample、腫瘍検体については28-42Gb/sample程度のシーケンスデータを取得した。品質を評価したところ、個体レベルで問題は生じていないと判断し全ての検体をさらなる解析に進めることとした。
- (3) 解析結果  
海外の研究で報告されていた、既知の3つの脂腺癌関連遺伝子(文献6,7)の変異は、本邦における眼瞼脂腺癌でも多く観察され統計学的にも有意であることを確認した。また、これらの3遺伝子に加え、過去に眼瞼脂腺癌で有意な関連が知られていない遺伝子に、8例(21%)で体細胞変異が認められる新規遺伝子が特定された。変異数について検討を行ったところ、38例中36例では既報と同様に体細胞変異数は他の悪性腫瘍と比較して少なかったが、比較的多く変異が認められた症例が2例存在した。また、変異的特徴(シグネチャー)の解析を試みたところ、前述の通り変異数が少ないため推定が困難であったが、変異数が少ない2例では、それぞれ異なるシグネチャーが抽出された。これらの結果から、本邦における眼瞼脂腺癌の体細胞変異は過去の報告と類似した体細胞異常によるものであることが確認され、新規眼瞼脂腺癌候補遺伝子が一つ特定された。

### <引用文献>

1. Dasgupta T, Wilson LD, Yu JB. A retrospective review of 1349 cases of sebaceous carcinoma. *Cancer*. 2009;115(1):158-165. doi:10.1002/cncr.23952
2. Zürcher M, Hintschich CR, Garner a, Bunce C, Collin JR. Sebaceous carcinoma of the eyelid: a clinicopathological study. *Br J Ophthalmol*. 1998;82(9):1049-1055. doi:10.1136/bjo.82.9.1049
3. Shields JA, Demirci H, Marr BP, Eagle RC, Shields CL. Sebaceous carcinoma of the ocular region: A review. *Surv Ophthalmol*. 2005;50(2):103-122. doi:10.1016/j.survophthal.2004.12.008
4. Watanabe A, Sun MT, Pirbhai A, Ueda K, Katori N, Selva D. Sebaceous carcinoma in Japanese patients: clinical presentation, staging and outcomes. *Br J Ophthalmol*. 2013;97(11):1459-1463. doi:10.1136/bjophthalmol-2013-303758
5. Kohno T, Nakaoku T, Tsuta K, et al. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(2):156-164. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2014.11.11
6. North JP, Golovato J, Vaske CJ, et al. Cell of origin and mutation pattern define three clinically distinct classes of sebaceous carcinoma. *Nat Commun*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-04008-y
7. Bao Y, Selfridge JE, Wang J, et al. Mutations in TP53, ZNF750, and RB1 typify ocular sebaceous carcinoma. *J Genet Genomics*. 2019;46(6):315-318. doi:10.1016/j.jgg.2019.06.001

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 左野裕介, 秋山雅人, 藤井裕也, 関瑛子, 山名佳奈子, 吉川洋, 田邊美香, 園田康平
2. 発表標題 眼瞼脂腺癌8例のエクソーム解析
3. 学会等名 第37回 日本眼腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 左野裕介, 秋山雅人, 藤井裕也, 関瑛子, 高木健一, 山名佳奈子, 塩瀬聡美, 吉川洋, 田邊美香, 園田康平
2. 発表標題 眼瞼脂腺癌3例のエクソーム解析
3. 学会等名 九州大学眼科研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山 雅人
2. 発表標題 脂腺癌のビッグデータ解析
3. 学会等名 第32回日本眼瞼義眼床手術学会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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