

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月6日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590590

研究課題名（和文）悪性中皮腫発生抑制にかかわる遺伝子多型の検索

研究課題名（英文）Detection of frequent genomic deletions in malignant mesothelioma cells

研究代表者

玉置 知子(橋本 知子) (TAMAOKI TOMOKO (HASHIMOTO TOMOKO) )

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10172868

研究成果の概要(和文):兵庫医科大学で採取した悪性中皮腫(以下中皮腫)細胞・組織のゲノムを解析し、1p、3p21、4q、9p21、16p13、22q の欠損を見いだした。9p21 では *CDKN2A・2B (p15-16)* が全ての中皮腫細胞で両アレル欠損、22q では *NF2* 遺伝子が 80%の中皮腫細胞で欠損していた。新規のヘテロ欠損領域として 3p21.1-21.31 を見出し、上皮型に特異的であった。この領域にあるセマフォリン遺伝子群は発現低下し、アンタゴニストの *VEGFA* 発現は増加し、*VEGF* 優位の状況であることが示された。さらに上皮型中皮腫のほぼ全例(15/16)に、この領域の *BAP1* 遺伝子の両アレル欠損もしくは1アレル欠損+/-他アレルの変異を見出し、免疫染色にても *BAP1(-)*を確認した。また患者さんの正常ゲノム検索の結果、*BAP1* 変異は体細胞レベルの変異であった。以上より、*CDKN2A・2B* 欠損は全ての中皮腫の、*BAP1* 欠損・変異は上皮型中皮腫の分子マーカーとなること、特に *BAP1* シグナル系の再活性化が上皮型中皮腫の治療の分子標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文):Malignant mesothelioma (MM) is an asbestos-related tumor. Array-based CGH was performed using MM primary-cultured cells established in Hyogo College of Medicine (HCM). In HCM-MM cell samples, frequent deletions were detected in 1p, 3p21, 4q, 9p21, 16p13 and 22q. We also used ATCC and Riken MM cells. All 21 MM cells showed homozygous deletions in the 9p21 region carrying the *CDKN2A/p16* and *CDKN2B/p15* genes. Homozygous or heterozygous deletions in the 22q region carrying the *NF2* gene were detected in 80% of HCC-MM cells, and deletions in 3p21.1-21.31 in 50%. We focused on the 3p21 region because it was specific to the epithelioid type. Since 3p21.1 and 3p21.31 regions contain Semaphorin family genes that inhibit VEGF activity, we analyzed gene expression profiles and found that lower expression of several *SEMA* genes and higher expression of *VEGFA* in epithelioid MMs than in Met5a, a normal mesothelial cell line, suggesting that *VEGFA* biological activity may be higher in epithelioid MMs. Genome alterations of *BAP1*, located in 3p21.1, was detected in 15 of 16 epithelioid MMs; biallelic deletions or monoallelic deletions with or without mutations. Immunostaining with anti-BAP1 antibody showed negative nuclear staining in most of epithelioid MMs. These *BAP1* mutations and deletions were somatic, since no germinal mutations were detected. These results showed that *BAP1* mutation plays a significant role in the pathogenesis of epithelioid MMs.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:境界医学・病態検査学

キーワード:悪性中皮腫、上皮型中皮腫、ゲノム解析、*CDKN2A・2B*、セマフォリン、*VEGF*、*BAP1*

## 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫(以下 中皮腫)発生の重要な環境要因はアスベスト(石綿)曝露であることは自明である。中皮腫のもう一つの大きな問題は、一旦発症すると2007年~2008年当時では治療として有効なものが無いことであった。手術、化学療法の組み合わせが試みられてきたが、少なくとも予後を著明に改善した、という状況にはなかった。また現在においても依然として中皮腫は完治が見込めない悪性腫瘍であることには変わりがない。

アスベスト曝露より中皮腫発生までに30年ないし40年を要することから、職業による高曝露歴を有する方々はすでに高齢化しつつある。このような集団での中皮腫死亡例が日に日に増加している現状から、現時点を失すると、曝露歴を正確に把握できる患者さんおよび非発症者の協力を得ることは困難になると考えられる。アスベストの我が国への輸入のピークが1970年から1990年であった事実より、今後数十年にわたる中皮腫の発生増加が予測されている。従って、現時点をはずさず、発症抑制を目指した研究を行うことが必要と考えた。

兵庫医科大学は、企業によるアスベスト汚染による中皮腫が多発することが知られる、兵庫県尼崎市に隣接して立地するため、中皮腫患者さんの診療実績も多い。実際、兵庫医科大学には本邦の中皮腫年間発生数の約7%が受診し、検診のニーズも高い。また中皮腫患者さんや曝露非発症者から中皮腫治療や発症予防についての期待が寄せられ、研究協力の意思も伝えられている。本研究グループには兵庫医科大学の中皮腫診療の責任者である中野孝司が研究分担者として参加しており、本研究は、このような地域の特殊性に基づいて計画された。

昨近、癌の集学的治療としてさまざまな試みが行われ、早期の外科的治療や分子標的薬治療の結果、予後が改善してきた。分子標的治療や治療薬剤の選定には、がん組織特異的な遺伝子の変異や、本人の生殖細胞系列の遺伝子多型の解明が有益である例が挙げられていた。しかしその中で中皮腫の予後は特段に厳しく、新規治療プロトコルであっても満足な効果がない状況が続いていた。

研究代表者は *RB* 遺伝子のクローニングと機能解析(Proc Natl Acad Sci U SA.88:5257-61, 1991. Oncogene.6:463-9, 1991)、がん細胞周期や化学療法の検討(Int J Cancer.76:897-902, 1998. Cancer Res.61:1029- 37, 2001. J Clin Oncol.24:102-5. 2006. Int J Oncol. 28:815-21.2006.)、がんマーカーである  $\alpha$ -fetoprotein 遺伝子発現制御(Mol Cell Biol. 11:5885-93, 同 6041-9, 1991. J Biol Chem. 267:14580-5, 1992. Hepatology. 35:82-7, 2002. Life Sci. 79:1988-94. 2006.)に関わる基礎研究を行ってきた。また遺伝子多型研究によりアルコール感受性等を検索し(Lancet

341(8859):1544,1993. Lancet. 348(9027):581-3, 1996)、ゲノム解析にともなう倫理面の対応への経験もあった。

本研究分担者・中野は早くより、中皮腫組織ではグリコサミノグリカンの増加とその分画が早期臨床診断に有用であること(Cancer, 57:106-110, 1986)、腫瘍由来の IL-6 が予後不良因子となること(Cancer, 58:1699-1701, 1986, Br J Cancer, 77:907-912, 1998)を示し、中皮腫の診断精度を飛躍的に向上させてきた。研究分担者・辻村は中皮腫の病理診断を担当しているとともに、肝幹細胞の特性や感染・炎症の制御機構の分子機構の解析に携わり、腫瘍と生体環境を包括して研究してきた。以上より、臨床から基礎、基礎から臨床へという双方向性の研究を行う条件が整っていた。

一方、中皮腫の遺伝子異常についても研究が蓄積され、がん抑制遺伝子 *CDKN2A/p16*・*NF2* 欠損等の関与が報告されていた。我々は、ウイルスという「環境」によって発症する成人T細胞白血病では急性転化後の細胞では *CDKN2A* のゲノム欠損が有意に高く、急性転化直前に欠損が起こる例を見出していた(Exp Hematol. 27:1004-9. 1999)。 *CDKN2A* 欠損発見の経緯は悪性黒色腫である。これは紫外線によって誘発される腫瘍であることを考え合わせると、腫瘍細胞の lineage が全く異なるが、長期間の環境ストレスで発症する中皮腫での *CDKN2A* 欠損との共通点が見える。従ってゲノムには環境ストレスに脆弱な部分があり、そこに rearrangement が起こることが少なくとも腫瘍の悪性化につながるという仮説に立って、中皮腫細胞とその患者さんの正常細胞のゲノムをアレイCGHで解析すること、遺伝子発現解析で confirm することを計画した。しかも、研究分担者の辻村らのグループが、尼崎地区を中心とした患者さんの協力によって得られた中皮腫より細胞株を樹立しつつあり、正常細胞のコンタミがない状態で中皮腫細胞を解析できる条件に恵まれた(その後、Cancer Sci. 102:648-55.2011.に発表)。中皮腫細胞、および中皮腫患者さんの正常細胞をゲノムレベルで比較解析することにより、中皮腫発症につながる分子が見つかるものと期待した。

本研究計画時点では、中皮腫の個人差による易罹患性や、ゲノム多型解析に基づいた易罹患性のデータも無かった。例えば HIV に感染した場合、その受容体の遺伝子多型のタイプによって AIDS 発症が遅くなる(Nat. Med. 3:1160-2, 1997)が、これは環境要因に加えて遺伝要因(遺伝子多型)が発症や疾患の重症度を定めることを明確に示している。環境要因が発症に関わる生活習慣病についても、同様に遺伝要因の解析がなされ、関連遺伝子が多数明らかにされてきた。このような遺伝要因を解析するためには、中皮腫患者さんとその同胞対のゲノム解析ができることが望ましい。この手法は、これまでも多く

の遺伝性疾患の責任遺伝子のクローニングに使われた方法でもある。遺伝子多型より高リスクグループが判別できれば、効率的な医療介入を目指すことも視野に入る可能性があると考えた。なお、本研究の開始前に、兵庫医科大学倫理委員会の承認を得た。

## 2. 研究の目的

兵庫医科大学に受診されている中皮腫患者さんより腫瘍組織と末梢血の提供を受けて、以下の2点を明らかにする。比較のために、日本の理研株、米国 ATCC 株、また正常中皮由来細胞を利用する。

### (1) 兵庫医大の悪性中皮腫のゲノム解析

中皮腫の腫瘍組織より樹立した兵庫医科大学 (Hyogo College of Medicine, HMC) 独自の中皮腫 (malignant mesothelioma, MM) 細胞株や中皮腫由来培養細胞を中心に網羅的なゲノム解析により欠損、増幅がないかを検索する。変異の集積する部位を見つけ、どのような遺伝子が関与するかを知る。その結果をもとに遺伝子発現解析を行い、変異との関係を明らかにする。

以上より、本邦の中皮腫に特異的なゲノム変異を見つけて、診断のマーカーとして利用できるかを検討する。遺伝子発現解析を通じて中皮腫発症抑制の分子基盤を解明する。

### (2) 患者さんの末梢血正常ゲノム解析

中皮腫で見出された中皮腫特異的な変異部位について、正常細胞で生殖細胞系列変異を検索する。正常細胞で、特異的な何らかの変化がないかを網羅的にゲノム解析でしらべる。患者さんの同胞で中皮腫発症のない方に協力をお願いし末梢血のゲノム解析をおこない、患者さんのゲノムと比較する。

以上より、本邦の中皮腫に特異的な生殖細胞系列の特徴やゲノム多型で易罹患性を示すマーカーがあるかどうかを検索する。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料:

- ① 兵庫医大に受診された患者さん由来の中皮腫組織
- ② ①より短期間培養された細胞、樹立細胞株
- ③ ATCC、理研で保有する細胞株 (陽性コントロール。ATCC に登録されている中皮腫細胞株は非日本人由来)。正常中皮由来 SV40 トランスフォーム株 Met5a(ATCC)
- ④ 反応性中皮 (RM) 細胞の短期間培養細胞
- ⑤ 患者さんおよび同胞の協力者の末梢血。状況が許すかぎり、患者さんからは腫瘍組織と末梢血の提供を受けた。

### (2) 方法

#### ① 中皮腫細胞の解析

- ・中皮腫細胞・組織より、ゲノム DNA を抽出。
- ・アレイ CGH により解析。遺伝子欠損、増

幅の共通部位を見つける。

- ・共通部位があれば、さらに詳細な検討を行う。Real-time PCR で欠損状況を確認する。当該領域の Sequencing を行う。
  - ・遺伝子発現の状況を確認するため、total RNA を抽出し、mRNA を分離。
  - ・cDNA アレイをおこなう。
  - ・遺伝子発現パスウェイ解析: パスウェイデータベースから推測、上流・下流の遺伝子群を明らかにする。
  - ・遺伝子発現を個別に検討するため、RT-PCR、Western プロット、免疫染色を行う。
- #### ② 正常末梢血ゲノムの解析
- ・患者さんの末梢血正常ゲノムを抽出する
  - ・アレイ CGH により、解析。欠損、増幅、SNP の状況を解析する
  - ・同胞対がある場合には、比較する
- #### ③ 変異が見出された遺伝子の機能解析
- ・siRNA の正常中皮由来株に導入。遺伝子発現阻害の影響を見る。
  - ・遺伝子発現ベクターの構築と正常中皮由来細胞株、中皮腫細胞への導入。遺伝子強制発現の影響を見る。

## 4. 研究成果

### (1) 中皮腫細胞株における 1p, 3p21, 4q, 9p21, 16p13, 22q のゲノム欠損

兵庫医科大学に受診された悪性中皮腫の患者さんの切除腫瘍もしくは胸水から得られた培養悪性中皮腫細胞と本学で樹立された中皮腫培養細胞・細胞株 (HMC-MM 細胞)、細胞バンクから得られた悪性中皮腫細胞株を用いて、アレイ CGH を行い、欠損・増幅領域を見出した (図 1)。この中でも高頻度に見られる欠損領域は、1p, 3p21, 4q, 9p21, 16p13, 22q であった (図 1)。そのうち、特に高頻度に欠損が見られる3か所を検討した。正常中皮細胞株である Met5a、反応性中皮細胞ではこのような欠損、増幅は認めなかった。

### ① 9p21 領域欠損は悪性中皮腫の全例に認め、CDKN2A/p16・CDKN2B/p15 を含む

この領域の欠損はすでに報告があったが、最小の共通欠損領域や中皮腫の何パーセントでこの欠損がみられるかの報告はなかった。我々のアレイ CGH の解析では、HCM-MM 細胞、その他バンク株の全てで、両アレルの欠損 (ホモ欠損) が認められた。中皮腫の 100% にみられるとの報告は、我々が最初である。最長の欠損は両アレルの 300kb であったが、欠損の範囲は細胞毎に異なっていた。共通欠損領域は 36.6kb で、遺伝子はこれまで中皮腫で注目されていた CDKN2A/p16・CDKN2B/p15 遺伝子を含んでいた (図 2)。よって、この 36.6kb の欠損は、中皮腫の全てに共通する有効な分子マーカーと判明した。

以上より CDKN2A・2B 欠損を中皮腫診断マ

カーとして利用すべく、Western ブロットや免疫染色に使える抗 CDKN2A・2B 抗体を探したが、適切なものが入手できなかった。続いて、FISH（蛍光 in situ hybridization）での欠損の検出を試みた。市販の FISH プロブは約 300kb であるため、欠損領域がこれ以上に大きい場合は静止核 FISH で欠損が検出された。しかし欠損がこれよりも小さい場合には、FISH シグナルが検出されたりされなかったりして不安定であった。安定して FISH を行うには 200kb 程度のプロブが望ましいとされており、全中皮腫の CDKN2A・2B 欠損領域に相当する 30kb 程度のプロブは入手できなかった。

以上より、CDKN2A・2B 欠損診断にはゲノム DNA を使用する以外に有効な方法がないことが判明した。よって CDKN2A・2B の 2 領域に分けて real-time PCR による定量を行い、欠損検出に成功した（表 1）。

続いて生検組織でこの方法を検討した。病理医によって中皮腫と判断された部分をレーザーにて切り取り細胞を集め（50 個程度）、上記と同様に real-time PCR を施行したところ、CDKN2A・2B 欠損が確認された。よってこの方法は、組織での中皮腫早期診断に有効であることが判明した。しかし熟練した病理医が組織の切り取りを行う必要があること、さらに PCR にも熟練を要するなど技術的な制約が大きい。よってどの施設でも誰にでも簡便にできる方法とは言えない。従って「中皮腫の 100%に CDKN2A・2B 欠損がある」という今回の成果を簡便に中皮腫診断に利用するには、免疫染色に適した抗 CDKN2A・2B 抗体や FISH プロブの開発が必要と考えられた。

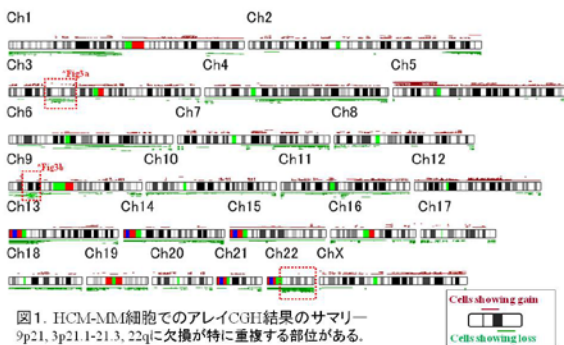


図1. HCM-MM細胞でのアレイCGH結果のサマリー  
9p21, 3p21.1-21.3, 22qに欠損が特に重複する部位がある。

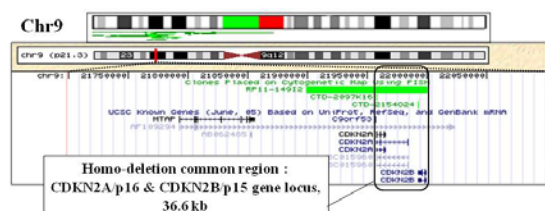


図2. 9p21の共通欠損領域と遺伝子マッピング

表1. Real-time PCRによるCopy number analysis

	Cell	Relative ratio to copy level	
		CDKN2A	CDKN2B
ATCC or Riken BRC cell lines	Met5a(control)*	1.00	1.00
	H28	0	0
	H2052	0	0
	H2452	0	0
	MSTO-211H	0	0
	HMMME	0	0
HCM cell lines	MM16	0.01	0
	MM19	0.02	0
	MM21	0.02	0
	MM26	0.01	0
	MM30	0.01	0
	MM34	0.01	0
	MM35	0.01	0
	MM39	0	0
	MM45	0	0
	MM46	0	0
	MM48	0	0.02
	MM56	0	0
	MM62	0	0
	MM67	0	0
MM80	0	0	

\*Met5a: 正常中皮由来細胞株。ゲノム量はMet5aと比較した。

②22q欠損・変異は80%にありNF2が関与  
HMC-MM 細胞の80%に両アレル・片アレル欠損（ホモ・ヘテロ欠損）をみとめた（図1）。これまでの欧米や日本の他の地区の中皮腫でもこの部位の欠損が報告されていたが、欠損の頻度についての報告は無かった。

### ③3p欠損は上皮型で検出される特徴的な分子マーカーである

ホモもしくはヘテロの 3p21.1-3p21.3 欠損が50%の HMC-MM 細胞に見出された。共通欠損領域は200kb以下であり、複数の遺伝子が含まれていた（図3）。この領域の欠損の大きさについては、CDKN2A・2BやNF2遺伝子の欠損領域の大きさとは関連がなく、ゲノム全体の微細な欠損・過剰部分が多くみられるかどうか、すなわちゲノムの不安定性とも関連がなかった。この領域には、肺がんでも欠損等が見いだされており、癌抑制遺伝子があることが推測されたため、解析をこの領域に絞ることとした。また、この領域の欠損は、biphasic type や sarcomatous type には見られず、epithelioid type（上皮型）に限られていた。3p21.1のホモ・ヘテロ欠損は、上皮型 HCM-MM 細胞(7/11)、および上皮型 MM 組織(2/2)で認められた。この領域には、数個の遺伝子があり、その一つが semaphorin 遺伝子ファミリーの SEMA3G である。

また3p21.31領域のホモ欠損、ヘテロ欠損は、やはり上皮型 HCM-MM 細胞(7/11)、および上皮型 MM 組織(2/2)で認められた。この領域には、semaphorin 遺伝子ファミリーの、SEMA3F、SEMA3B、および RASSF1A がある。これらの semaphorin 遺伝子群は、VEGF と拮抗して、neuropilin に結合することにより、VEGF の細胞増殖機能を阻害するとされている。そこで、cDNA アレイを用いて、遺伝子発現を検討したところ、組織型に関わらず

SAMA3B、SEMA3F、SEMA6B の発現低下がみられた。また SEMA3A は上皮型で特異的に発現低下がみられた（反応性中皮細胞に比較して、 $p < 0.05$ ）。

一方、VEGFA は全ての中皮腫で発現亢進がみられたが、上皮型で特に顕著であった。VEGFA の相対的な生物学的活性を推定する目的で、VEGFA 発現量/SEMA3A 発現量比を求めたところ、反応性中皮細胞に対しても、非上皮型中皮腫細胞に対しても、上皮型では有意に高値を示した ( $p < 0.01$ )。

以上より、3p 欠損は上皮型のマーカーとなること、およびセマフォリンシグナル系の抑制と VEGFA の発現上昇が悪性化の一因である可能性が示された。この結果より、セマフォリンシグナル系の再活性化が上皮型の治療戦略の標的になる可能性が示された。

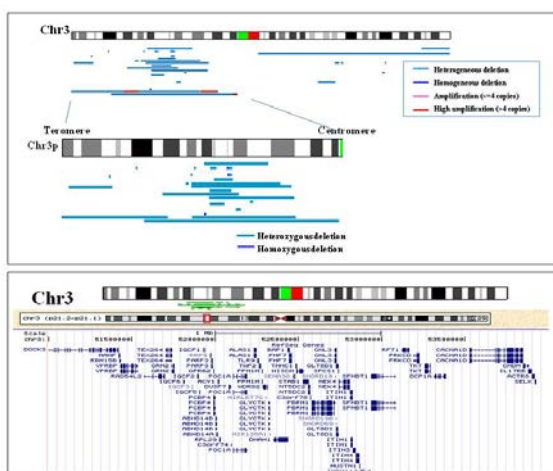


図3. 3p21.1-21.3の共通欠損領域と遺伝子マッピング

#### ④3p21.1にあるBAP1は、上皮型のほぼ全例で、欠損・変異を両アレルに持つ

3p21.1のBAP1 (BRCA1-associated protein 1) 近辺に限定した欠損が認められたため(図3)、HMC-MM18細胞とATCC5株、計23細胞においてBAP1遺伝子のsequencingをexonごとに行った。以上の23細胞のうち16細胞が上皮型である。その結果、上皮型の15細胞で、変異が見出された。その内容としては、ホモ欠損10細胞、1アレルの欠損+対側アレルの点変異による premature termination 1細胞、1アレルの欠損+対側アレルの挿入・欠損変異による premature termination 1細胞、1アレルの欠損+対側アレルの missense mutation 1細胞、両アレルの欠損をヘテロで持つもの2細胞であった。上皮型以外ではbiphasic typeの1例に両アレルの missense mutationが見出されたのみであった(表2)。

さらに16例のHMC-MM細胞で、BAP1タンパク発現をWesternブロットで解析した。上皮型11例のうち6例ではBAP1バンドは検出されず、2例では発現量がMet5aの10%未満、2例では30%未満であり、BAP1欠損・変異

を持つ例では全てでBAP1タンパク発現が著明に低下していた。欠損・変異が無い上皮型の1例および非上皮型5例では、Met5aの50%から120%であった。

さらにBAP1免疫染色を行った。正常肺細胞では核に局在した発現がみられた。免疫染色に用いることができたHMC-MM細胞17例のうち、上皮型の12例中10例で核染色はnegativeであった。しかし非上皮型5例のうちBAP1変異が見出された1例以外の4例で、染色はpositiveであった。

上皮型に比して非上皮型の症例数が少ないため、さらに症例の蓄積が必要ではあるが、以上の結果は3p21欠損、その中でもBAP1欠損・変異は上皮型の特徴であることを強く示唆している。これまで中皮腫には、組織型特異的な遺伝子マーカーの報告はみられず、我々の今回の報告が初めてである。上皮型は、中皮腫の中でも比較的治療効果が期待されることから、BAP1欠損・変異の検出は臨床診断・治療方針の決定に有効であると考えられる。

表2. BAP1領域の変異

組織型	細胞株	樹立	Exon 13欠損	MM細胞でのゲノム変異	生殖細胞系列の変異
Epithelial	MM19-P	HCM	-/-	全エクソンのホモ欠損	なし
	MM21-P	HCM	-/-	全エクソンのホモ欠損	なし
	MM26-P	HCM	+/+		なし
	MM34-P	HCM	-/-	全エクソンのホモ欠損	なし
	MM35-P	HCM	+/-	ヘテロ欠損+Exon 13D置換 (g.52437922>D)	なし
	MM39-P	HCM	+/-	ヘテロ欠損+Exon 1-5Dの欠損	*
	MM45-P	HCM	+/-	ヘテロ欠損	なし
	MM48-P	HCM	+/-	ヘテロ欠損+Exon 1-5Dの欠損	なし
	MM56-P	HCM	+/-	Exon 6Dの挿入・置換 (g.52441419delAinsCO)	*
	MM57-P	HCM	-/-	Exon 10-17Dのホモ欠損	なし
	MM67-P	HCM	+/-	ヘテロ欠損	*
	MM14-T	HCM	-/-	全エクソンのホモ欠損	なし
	MM29-T	HCM	+/-	ヘテロ欠損+Exon 9Dの欠損 (g.52440352_52440350del)	なし
	H28	ATCC	+/+	Exon 7Dの欠損 (g.52441351_52441329del)	*
H2452	ATCC	+/-	ヘテロ欠損+Exon 5Dの置換 (g.52442065C>A)	*	
HMMME	日本人・発症	+/-	ヘテロ欠損+Exon 7Dの欠損 (g.52441321_52441303del)	*	
Non-epithelial (Biphasic)	MM16-P	HCM	+/+		*
	MM30-P	HCM	+/+		*
	MM62-P	HCM	+/+	Exon 7D置換 (g.52441252A>C)	*
Non-epithelial (Sarcomatoid)	MM80-P	HCM	+/+		*
	MSTO-211H	ATCC	+/+		*
	MM46-P	HCM	+/+		なし
H2052	ATCC	+/+		*	

\*: サンプルングができないため、確定できず。HMC:兵庫医大株 ATCC:米国ATCC株

#### ⑤BAP1変異は生殖細胞系列では見られないため、体細胞変異である

BAP1変異は同じ患者さんの正常DNAでは検出されなかった。このことは、BAP1変異は生殖細胞レベルの遺伝子変異ではなく、体細胞レベルの変異であることを示している。

我々がこの結果のまとめをしていた2011年、米国とヨーロッパから、BAP1欠損が中皮腫に関わると発表された。これらの発表は中皮腫の約20%にBAP1変異が認められる点が共通しており、また数家系ではBAP1の変異が生殖細胞系列でも見られたとして、家族性の発症が発表された。この家族例の特徴は、Spitz melanomaという特異なmelanomaが発症し、中皮腫も引続いて発症することである。しかし我々の症例では生殖細胞系列の変異がみられず、調べた限りでは、melanoma合併例はなかった。

中皮腫の組織型とBAP1変異の関連に注目したのは我々が最初であり、また変異検出率も我々

のほうが圧倒的に高い。人種的バックグラウンドの違いもあるが、我々が丁寧にゲノム解析を行った結果を反映しているのかもしれない。我々の結果は、BAP1 シグナル系の再活性化は本邦の上皮型中皮腫の治療の分子標的として重要であることを示唆している。

### (2)中皮腫患者さんの正常ゲノムDNA解析

血液の提供を頂いた患者さんの正常ゲノムを検索した。

#### ①特異的な欠損、重複、変異は認められない

中皮腫患者においては、中皮腫で頻度が高く見られた欠損部位の正常ゲノム変異は見られなかった。特に欧米の家系例のような BAP1 変異については、塩基配列レベルでチェックをしたが、変異は認められなかった。よって、中皮腫での欠損・変異は、腫瘍化の過程で生じる体細胞変異であることが明らかになった。

#### ②SNP解析と同胞対の解析では特異性が確定できない

中皮腫患者の正常ゲノムでは、SNP がホモ接合として並ぶ部分が多少とも延長する傾向が見られたが有意とは結論できなかった。また同胞対で、1人が発症、1人が発症していない場合のSNP解析は最も informative であるが、我々は3組しかアクセスできなかったため、有意な結果は見られなかった。今後、患者さんを全国的に登録して検索する必要がある。

### (3)BAP1 欠損の機能解析

#### 正常中皮由来細胞におけるBAP1 遺伝子発現抑制の効果は不明である

Met5a に siRNA にて BAP1 遺伝子発現をノックダウンした。細胞増殖が促進されることが期待されたが、結果はそれに矛盾した。1細胞のみの結果であり、さらに実験が必要である。また、発現ベクターを構築したが、ベクターの収量が極めて少なく、その原因を検討中である。

### 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 2 件)

- ① Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, Emi M, Morinaga T, Fukuoka K, Yamada S, Murakami A, Kondo N, Matsumoto S, Okumura Y, Tanaka F, Hasegawa S, Nakano T, Hashimoto-Tamaoki T. Frequent inactivation of BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma. *Cancer Sci*. 2012 [Epub ahead of print]
- ② Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, Morinaga T, Fukuoka K, Yamada S, Murakami A, Kondo N, Matsumoto S, Okumura Y, Tanaka F, Hasegawa S, Hashimoto-Tamaoki T, Nakano

T. Frequent deltion 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(6):1365-74.

[学会発表] (計4件)

- ① Yoshikawa Y, Nakano Y, Sato A, Fukuoka K, Murakami A, Yamada S, Morinaga T, Tsujimura T, Hashimoto-Tamaoki T. Frequent deletions in 3p21.1 region in malignant mesothelioma cell lines established from Japanese patients. (IMIG2010) 2010.8.31-9.3 Kyoto
- ② 吉川良恵, 森永伴法, 佐藤鮎子, 福岡和也, 辻村亨, 玉置(橋本)知子, 中野孝司. 悪性中皮腫におけるBAP1(BRCA1 associated protein 1) 遺伝子の高頻度欠失. 第 69 回日本癌学会学術総会 (JCA2010) 2010.9.24 大阪

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

玉置 知子(橋本 知子)  
(TAMAOKI TOMOKO (HASHIMOTO TOMOKO))  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号:10172868

#### (2)研究分担者

辻村 亨(TSUJIMURA TORU)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号:20227408  
中野 孝司(NAKANO TAKASHI)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号:10155781  
福岡 和也(FUKUOKA KAZUYA)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号:80305721  
森永 伴法(MORINAGA TOMONORI)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号:10351818  
吉川 麗月(YOSHIKAWA REIGETSU)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号:90319864  
2008 年  
齊藤 優子(SAITO YUKO)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号:00254350  
2008 年  
吉川 良恵(YOSHIKAWA YOSHIE)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号:10566673  
2010 年