

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390090

研究課題名(和文) 家族性膵臓がんの原因遺伝子の解明

研究課題名(英文) Identification of susceptible genes in familial pancreatic cancer in Japan

研究代表者

古川 徹 (Furukawa, Toru)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：30282122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：本邦における家族性膵臓がんの原因遺伝子探索のため22家系47名を集積し全エクソン配列解析を行った。非同義性一塩基多様性、スプライス部多様性、翻訳領域内挿入欠失を選択し、1000 Genome、Human Genetic Variation Databaseで頻度1%未満の稀な多様性を抽出した。既知及びマウス遺伝子改変実験による膵臓がん関連遺伝子に着目して候補遺伝子を絞り込んだ。結果、BRCA2、PALB2、PUM1、FARP1、FAM193A、CTNNA1、MLL5に原因となる可能性のある一塩基多様性、挿入欠失を見出した。また、家族性膵臓がん及び関連腫瘍の臨床・分子病理学的特徴を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We examined 47 individuals in 22 families of Japanese familial pancreatic cancer kindred to identify susceptible germline variants by whole exome sequencing. Nonsynonymous single nucleotide variants, splice-site variants, insertions, and deletions that were rarely found or not found in the 1000 Genome or the Human Genetic Variation databases were collected. Known susceptible genes and genes identified as candidate pancreatic cancer genes in the mouse sleeping beauty experiment were selected. We found potentially susceptible germline variants in BRCA2, PALB2, PUM1, FARP1, FAM193A, CTNNA1, and MLL5. These germline variants may contribute to susceptibility to familial pancreatic cancer in Japan. We also examined acinar cell carcinoma cases by whole exome and found germline variants in BRCA2 and FAT genes with loss of the wild type allele in cancer tissues. Moreover, we determined clinicopathological and molecular characteristics of familial pancreatic cancer and its associated lesions.

研究分野：人体病理学

キーワード：膵臓がん 家族性腫瘍 全エクソン解析 次世代シーケンサー 遺伝子 DNA解析 SNP 人類遺伝

1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは我が国では臓器別がん死亡数で全臓器中第5位であり、年間2万4千人あまりが罹患し2万2千人程が死亡している。罹患数と死亡数の対比で明らかのようにその予後は極めて悪く、5年生存率は僅かに5%程度である。膵臓がんは家系内発症が認められることが知られており、特に、第1度近親者内に2人以上の膵臓がん患者がいる場合は家族性膵臓がんとして定義されている。米国での研究では膵臓がん患者全体の10-20%程度において家系内近親者に膵臓がん患者が存在し、家系を集積した追跡調査において、第1度近親者内に膵臓がん罹患者が2人以上いる場合の膵臓がん発症リスクは9倍となり、3人以上いる場合は32倍となると報告されている(Klein AP et al. Cancer Res 64:2634-8, 2004)。家族性膵臓がん家系においては通常型の膵臓がんである浸潤性膵管がんの前駆病態である膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)が多く見つかることも報告されている(Bruno K et al. Am J Surg Pathol 30:1067-76, 2006)。家系内発症のリスクが高まることは家族性膵臓がんの発症に遺伝的要因が強く関与していることを示唆し、原因遺伝子の解明が望まれている。これまでに原因遺伝子の探索が欧米において行われ、原因遺伝子として *BRCA1*、*BRCA2*、*CDKN2A*、*LKB1/STK11*、*PALLD*、*PALB2* が挙げられている。本邦においては家族性膵臓がんの体系的な研究はこれまでされておらず、その発症リスクは不明であり、原因遺伝子についても未知である。

2. 研究の目的

本研究は、全ゲノムエクソンシーケンス法を用い、家族性膵臓がん家系内の罹患者、非罹患者における全遺伝子の遺伝子変異を完全解明して比較することにより家族性膵臓がんの原因遺伝子を明らかにする事、また、本邦における家族性膵臓がんおよび関連腫瘍の臨床・分子病理学的特徴を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1)対象

第1度近親者内に2人以上の膵臓がん患者が認められる家系を家族性膵臓がん家系とし、第2度近親者内に2人以上の膵臓がん患者が認められる家系を第2度近親者内膵臓がん家系とした。本研究グループ診療施設及び関連施設において膵臓がん(IPMNを含む)の診断にて診療した患者及び家族に研究内容の説明をし、自由意志のもとに研究参加への同意を得た患者及び家族を研究対象とする。1家系から同胞間あるいは親子間の罹患者、非罹患者を比較対照とする。同意が得られた患者及び家族から血液15mlを採血し、連結可能匿名化の上保存する。腫瘍が切除された例では腫瘍部を凍結組織として採取、保存す

る。本研究は研究代表者及び研究協力者施設における倫理審査委員会にて承認された(東京女子医科大学遺伝子解析研究倫理委員会承認番号213、杏林大学医学部倫理委員会承認番号663)。

(2)全ゲノムエクソン配列解析

家族性膵臓がん患者家系内の罹患者、非罹患者DNA検体について全ゲノムエクソン配列解析を行った。全ゲノム解析には大規模並列型シーケンサー SOLiD system (Life Technologies)を使用した。ゲノム中のエクソン領域の抽出には Sureselect system (Agilent) あるいは TargetSeq (Life Technologies)を用いた。Life Scope でマッピングし、施設内にて構築した解析パイプラインを用いて塩基置換、欠失・挿入同定及びアノテーション付与を行った。一塩基多様性(SNV)データベースである dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)、1000 Genome (<http://www.1000genomes.org/>)、The Human Genetic Variation Database (HGVD) (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB>)との比較、機能予測プログラムである Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、SIFT (<http://sift.jcvi.org/>)によるタンパク機能予測を用いて疾患原因となりうる稀なSNVを有する遺伝子候補を得た。実際の手順は全て製造者のプロトコールによった。

(3)塩基置換確認

塩基置換部位に対応するプライマーを作成してPCR法で増幅し、Bigdye terminator (Life Technologies)を用いてサンガー法でシーケンス解析した。一部については Ampliseq, Ion Torrent (Life Technologies)を用いてシーケンス解析した。実際の手順は全て製造者のプロトコールによった。

(4)免疫組織化学法

遺伝子産物に対する抗体を購入し、Histofine キット(ニチレイ)を用いて免疫組織化学染色を行った。実際の手順は全て製造者のプロトコールによった。

(5)統計解析

統計解析にはSPSS統計解析ソフトを使用した。P < 0.05を有意差有りとした。

4. 研究成果

(1)対象家系集積

22家系を集積し、膵臓がん患者23名を含む47名について解析した(表1)。

表1. 解析対象家族性膵臓がん家系

家系#	発端者			家系内罹患者(年齢)
	年齢	性別	診断	
1	69	男	膵管がん	兄(59), 母(90)

2	55	女	膵管がん	妹(52)
K	56	男	膵管がん	父(59)
M	59	男	膵管がん	父
S	74	男	膵管がん	兄(75)
3	73	男	膵管がん	父(67), 兄(59)
		男	膵管がん	叔父(40), 叔母(60),
4	NA			祖父(80)
5	49	男	膵管がん	父(47)
6	NA	男	膵管がん	母(79)
7	65	男	膵管がん	父(54)
8	73	女	膵管がん	姉
9	76	女	膵管がん	兄
10	49	男	膵管がん	父(75)
11	75	女	膵管がん	母(65)
12	75	男	膵管がん	祖母(50)
13	63	男	IPMC	妹
14	81	女	膵管がん	姉(83)
15	52	女	膵管がん	父(71)
16	67	女	膵管がん	父(74)
17	64	男	膵管がん	父(88), 弟(59)
18	71	男	膵管がん	父(76), 兄(69)
19	78	女	IPMC	妹

IPMC, 膵管内乳頭粘液性腺がん. NA, 不明.

(2) 家族性膵臓がんの特徴

東京女子医科大学病院にて診療した膵臓がん患者において家族歴を調査し、連続 288 例中家族性膵臓がん該当するのは 20 例 (7%) で有ることを見出した。この結果は Montreal study (Ghadirian P et al. Int J Pancreatol 10:183-96, 1991) での 179 例中 7.8% とほぼ同様で、Milan study (Fernandez E et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 3: 209-12, 1994) での 362 例中 3.9% よりやや多かった。また、膵臓がん患者を 50 歳未満と 50 歳以上に分けると 50 歳未満の患者では家系内に膵臓がん患者を有する例が多かった。以上の結果は学会発表した。

(3) 全ゲノムエクソン解析

家族性膵臓がん家系内膵臓がん患者と膵臓がん非罹患者の血液有核成分から DNA を抽出し全エクソン解析を行った。全エクソン解析は平均カバレッジ 70 (51-107) でデータを得、非同義性一塩基多様性 (nSNV), スプライスサイト塩基置換を抽出し、1000 Genome データベースで頻度 1% 未満の稀な SNV は平均 1030 個 (468-1393 個)/罹患者、また、翻訳領域内挿入欠失 (cIndel) が平均

315 個 (152-411 個)/罹患者認められた。

(4) 家族性膵臓がん関連遺伝子

上記のゲーティングされた稀な SNV 中で家族性膵臓がんにおける既知の候補遺伝子 (Klein AP. Nat Rev Cancer 13:66-74, 2013) を抽出し、抽出された nSNV について HGVD, dbSNP データベース, 機能予測プログラム SIFT, Polyphen2 を参照し検討した。病原可能性 nSNV として *BRCA2* のフレームシフト cIndel 及びナンセンス SNV が各 1 家系で、*PALB2* のアミノ酸置換性 SNV が 1 家系で抽出された (表 2)。*BRCA1*, *MSH2*, *MRE11A*, *PMS2*, *ATM*, *STK11*, *PALLD*, *CDKN2A*, *PTEN*, *CDH1*, *MEN1*, *APC*, *CHEK2*, *BRIP1*, *TP53*, *NBN*, *BARD1*, *MLH1*, *MSH6*, *MUTYH*, *PMS1*, *RAD50*, *RAD51C* には有意と考えられる稀な SNV は認められなかった。

マウスの遺伝子改変実験において膵臓がん発生に関与する遺伝子が幾つか同定された (Pérez-Mancera PA et al. Nature 486:266-70, 2012) が、この研究で関連性が強い遺伝子としてあげられた 20 個について本研究における全エクソン解析データを解析したところ、アミノ酸置換性 SNV が *PUM1*, *FARP1*, *FAM193A*, *CTNNA1*, *MLL5* に各 1 家系で認められた (表 2)。

表 2. 家族性膵臓がん関連候補遺伝子

Ch	r	Position	Ref	Alt	Gene	Residue	FPC #
1		31465272	T	C	<i>PUM1</i>	T375A	14
4		2664692	G	A	<i>FAM193A</i>	G334R	12
5		138240102	C	A	<i>CTNNA1</i>	A454E	8
7		104730484	A	G	<i>MLL5</i>	K463E	5
7		104746030	C	T	<i>MLL5</i>	P781S	5
13		32912060	A	-	<i>BRCA2</i>	K1191fs	1
13		32954009	C	T	<i>BRCA2</i>	Q3026X	7
13		99076833	C	T	<i>FARP1</i>	R612C	14
16		23640966	C	T	<i>PALB2</i>	E837K	7

Chr, 染色体番号; Position, 位置番号; Ref, 基準; Alt, 置換; Gene, 遺伝子名; Residue, アミノ酸変化; FPC#, 家系番号.

(5) 膵腺房細胞がんにおける *BRCA2*, *FAT* 遺伝子の異常

膵腺房細胞がんは比較的稀な膵臓腫瘍であるが予後が悪いことが知られている。これまでに *BRCA2* 遺伝子の生殖細胞性変異が膵腺房細胞がん症例で報告されており、また、*BRCA2* の生殖細胞変異を持つ家系で膵腺房細胞がんを認めたと報告されている (Dewald GW et al. Mayo Clin Proc 84: 801-10, 2009; Skoulidis F et al. Cancer Cell 18: 499-509, 2010)。よって、膵腺房細胞がんが家族性膵臓がん該当する可能性があるため膵腺房細胞がん 11 例を集積し、内 3 例において全

エクソン解析、4例において標的遺伝子解析を行ったところ、BRCA2の生殖細胞性ナンセンスSNV(S2372X)、フレームシフト欠失cIndel(S1341Qfs)を各1例ずつ認めた。各患者から切除されたがん組織を解析したところ、SNV、cIndelとも対立アレルの喪失を伴っていることが確認され、疾患原性であることが確定された。さらに、集積した11例においてBRCA2蛋白のがん組織における発現を免疫組織化学法で解析したところ、5例においてBRCA2蛋白の発現減弱を認め、BRCA2の機能不全が膵腺房細胞がんの発生進展に深く関与していることが示唆された。また、BRCA2の体細胞性変異を認めた例があったが、この例は肝転移再発したもののcisplatinによる化学療法が著効して完全寛解となって生存中であり、BRCA2の異常を検索することは診断及び治療に極めて重要な情報を与えることが示された。また、腫瘍抑制遺伝子として知られるFAT遺伝子の生殖細胞性ミスセンスSNVを1例に認め、同SNVもがん組織では対立アレルの喪失を伴っていて、膵腺房細胞がんの発生進展に関与していることが明らかとなった。これら生殖細胞性変異が認められた例において家族性発症は認められなかったものの、家族性に発症する可能性は否定できず、慎重に対処すべきものと考えられた。以上の結果は学会発表、論文発表した(Furukawa T et al. Sci Rep 5: 8829, 2015)。

(6) 前がん病変の取扱いについてのコンセンサスレポート

膵臓がんの前がん病変として膵上皮内腫瘍性病変(PanIN)、IPMNが知られている。家族性膵臓がん家系ではこれら前がん病変の頻度が高いことが示され、特に、小型のIPMNとみなされる分枝膵管の限局性の拡張病変をつくる分枝膵管型IPMNが多く観察されている(Canto MI et al. Gastroenterology 142:796-804, 2012)。そのような分枝膵管型IPMNの臨床的取扱いについては明確なコンセンサスは得られていない。2013年にイタリアのペローナにおいて分枝膵管型IPMNの臨床及び病理学的取扱いに関する国際会議が開かれ、その会議に招待されて参加した。同会議において主として病理学的取扱いについて欧・米・韓のエキスパートと討議し、コンセンサスレポートを作成して、論文発表した(Adsay NV et al. Ann Surg DOI: 10.1097/SLA.0000000000001173)。

(7) IPMNの分子バイオマーカーの同定

家族性膵臓がん家系該当者を含むIPMN患者について腫瘍の進展に関与する分子マーカーを同定するべく、東京女子医科大学病院にて切除された172例について腫瘍部における遺伝子異常、分子発現異常を検索した。検索したIPMNの48%にGNAS変異、56%にKRAS変異を認めた。これら遺伝子変異およびリン酸化MAPK(pMAPK)、リン酸化

AKT(pAKT)、また、 β カテニン、SMAD4、TP53発現異常がIPMNの組織型と関与し、EGFR、pMAPK、pAKT発現、 β カテニン、SMAD4、TP53発現異常が組織異型度と、KRAS変異、 β カテニン、SMAD4発現異常が浸潤状態と、さらに、SMAD4、TP53発現異常が予後と関連していた。これら遺伝子異常、発現異常を検索することにより、腫瘍発生進展様式及び予後がある確率で推測できることが明らかとなった。以上の結果は学会発表、論文発表した(Kuboki Y et al. Pancreas 44: 227-35, 2015)。

(8) IPMNにおけるRNF43の解析

IPMNにおいてfrizzled受容体を標的とするユビキチンリガーゼであるRNF43に体細胞性変異が認められることが近年明らかにされた(Furukawa T et al. Sci Rep 1:161, 2011)。家族性膵臓がん家系該当例を含む多数のIPMN症例におけるRNF43の臨床病理学的意義を明らかにするため次世代シーケンサーによりRNF43のエクソン全域を凍結組織が入手できた57例で解析した。結果、8例(14%)に体細胞性変異を認め、うち5例がフレームシフト変異、1例がノンセンス変異、2例がミスセンス変異であり、機能喪失性変異が大部分を占めていた。免疫組織化学法によりIPMN176例においてRNF43蛋白の発現を検索し、発現の減弱を52例(29.5%)に認めた。RNF43変異はRNF43蛋白発現減弱、GNAS変異、画像診断上の腫瘍結節検出と関連していた。RNF43はGNAS変異と関連してIPMNの発生進展に重要な役割を担うことが明らかとなった。以上の結果は学会発表、論文発表した(Sakamoto H et al. Mod Pathol 28: 261-7, 2015)。

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 9件)

Adsay NV, Furukawa T, 他 25名、3番目. Pathologic evaluation and reporting of intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) of the pancreas and other tumoral intraepithelial neoplasms of pancreatobiliary tract: Recommendations of Verona consensus meeting. Ann Surg 査読有、in press. DOI: 10.1097/SLA.0000000000001173.

Furukawa T, Yamamoto M, Sugiyama M, Shimizu K, 他 11名、1番目. Whole exome sequencing reveals recurrent mutations in BRCA2 and FAT genes in acinar cell carcinomas of the pancreas. Sci Rep 査読有、5: 8829, 2015. DOI: 10.1038/srep08829

Kuboki Y, Shimizu K, Yamamoto M, Furukawa T, 他 3名、7番目. Molecular biomarkers for progression of intraductal

papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Pancreas* 査読有、44(2): 227-235, 2015. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000253

Sakamoto H, Yamamoto M, Sugiyama M, Shimizu K, Furukawa T, 他4名、9番目. Clinicopathological significance of somatic *RNF43* mutation and aberrant expression of ring finger protein 43 in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol* 査読有、28(2): 261-267, 2015. DOI: 10.1038/modpathol.2014.98

Yamaguchi H, Yamamoto M, Shimizu K, Furukawa T, 他5名、9番目. The discrete nature and distinguishing molecular features of pancreatic intraductal tubulopapillary neoplasms and intraductal papillary mucinous neoplasms of the gastric type, pyloric gland variant. *J Pathol* 査読有、231(3): 335-341, 2013. DOI: 10.1002/path.4242

Wada K, Furukawa T, 他9名、5番目. Clinical importance of familial pancreatic cancer registry in Japan: a report from kick-off meeting at international symposium on pancreas cancer 2012. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 査読有、20(6): 557-566, 2013. DOI: 10.1007/s00534-013-0611-5

Matthaei H, Furukawa T, 他24名14番目. Clinicopathological characteristics and molecular analyses of multifocal intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Ann Surg* 査読有、255(2): 326-333, 2012. DOI: 10.1097/SLA.0b013e3182378a18

古川徹 膵がんのバイオマーカー 腫瘍内科 査読無、12(3): 309-313, 2013

古川徹 家族性膵臓癌の病理学的特徴 胆と膵 査読無、34(7):529-532, 2013.

[学会発表](計12件)

Kaise T, Shimizu K, Furukawa T, 他9名、12番目. Increased risk of pancreatic cancer in patients with intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas and a family history or past history of cancer of the pancreas or other organs. 45th Anniversary Meeting of American Pancreatic Association and Japan Pancreas Society. 2014年11月5-8日 コナ市(アメリカ合衆国).

Furukawa T, Shimizu K, Furuse J, Sugiyama M, 他1名、1番目. Molecular pathology of the familial pancreatic cancer in Japan. 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2014年9月25-27日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

坂本仁美、山本雅一、杉山政則、清水京子、古川徹、他4名、9番目. 膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)における *RNF43* 体細胞変異の臨床病理学的意義 第45回日本膵臓学会大会 2014年7月11-12日 北九州国際会議場(福岡県・北九州市).

Sakamoto H, Yamamoto M, Sugiyama M, Shimizu K, Furukawa T, 他4名、9番目. Somatic mutations of *RNF43* are associated with its aberrant expression and *GNAS* mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. The 46th meeting of the European Pancreatic Club combined with the International Association of Pancreatology. 2014年6月24-28日 サザンプトン市(イギリス).

古川徹、杉山政則、山本雅一、清水京子、他4名、1番目. 膵腺房細胞癌は *BRCA2*, *FAT* 遺伝子異常を持つ 第103回日本病理学会総会 2014年4月24-26日 広島国際会議場(広島県・広島市).

Sakamoto H, Yamamoto M, Sugiyama M, Shimizu K, Furukawa T, 他4名9番目. Somatic mutations and aberrant expression of *RNF43* are recurrently found in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. 105th Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2014年4月5-9日 サンディエゴ市(アメリカ合衆国).

山口浩、清水京子、山本雅一、古川徹、他4名、8番目. 膵管内管状乳頭腫瘍と膵管内管状腺腫の分子病理学的相違 第44回日本膵臓学会大会 2013年7月25-26日 仙台国際センター(宮城県・仙台市).

山口浩、古川徹、他3名、4番目. 膵 intraductal tubulopapillary neoplasm と intraductal tubular adenoma の分子病理学的相違 第102回日本病理学会総会 2013年6月6-8日 ロイトン札幌(北海道・札幌市).

Yamaguchi H, Furukawa T, 他2名、4番目. Molecular comparison between intraductal tubulopapillary neoplasms and intraductal tubular adenomas of the pancreas indicates their distinctive nature. 102nd Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology 2013年3月2-8日 ボルチモア市(アメリカ合衆国).

Adsay V, Furukawa T, 他22名、7番目. International consensus study on the terminology and diagnosis of tumoral intraepithelial neoplasms (“adenomas” and “intracystic papillary neoplasms” of WHO-2010) of the gallbladder. 102nd Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology 2013年3月2-8日 ボルチモア市(アメリカ合衆国).

Furukawa T. Pathology of familial pancreatic cancer. Pancreas Cancer 2012 2012年10月4-6日 京都国際会館(京都府・京都市).

Furukawa T, Yamamoto M, Shimizu K. 他4名、1番目. Whole exome sequencing of acinar cell carcinoma of the pancreas 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19-21日 ロイトン札幌(北海道・札幌市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 徹 (FURUKAWA, Toru)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：30282122

(2) 研究分担者

清水 京子 (SHIMIZU, Kyoko)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90187451

(3) 連携研究者

古瀬 純司 (FURUSE, Junji)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号：10501869

杉山 政則 (SUGIYAMA, Masanori)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号：20192825

山本 雅一 (YAMAMOTO, Masakazu)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：60220498

(4) 研究協力者

齋藤 加代子 (SAITO, Kayoko)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：90138834

鎌谷 直之 (KAMATANI, Naoyuki)
東京女子医科大学・医学部・客員教授
研究者番号：00114447