

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460757

研究課題名(和文)半導体次世代シーケンサーによる消化器がんリスク集団特異的がん関連遺伝子多型解析

研究課題名(英文) Analysis of digestive organ cancer risk-associated genetic variations by using semiconductor-based next-gen sequencings

研究代表者

三上 春夫 (MIKAMI, Haruo)

千葉県がんセンター(研究所)・がん予防センター・部長

研究者番号：10332355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：県内がん高発症地域の原因究明のため、胃がん発症40例、大腸がん発症43例、非がん33例についてIon Torrent PGM半導体シーケンサーによるゲノム解析を行った。さらに院内症例との比較や体細胞変異を検討することでリスクマーカー体細胞変異Signatureを同定し、がん予防、治療、予後予測への利用を目的とした。その結果アミノ酸変化により遺伝子の蛋白構造に影響を与え機能を変えることが予測される遺伝子として、胃がん2遺伝子、大腸がん3遺伝子に着目し検討を進めている。臨床検体でも上記生殖細胞変異の一部で頻度が高いことが確認された。地域のがん予防、治療、予後予測へ繋がる結果であると期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted the next-gen sequencing approach to identify risk-associated genetic variants primarily in a cancer risk population. In cohort sample, 40 stomach cancer cases and 43 colon cancer cases were identified and considered as a cancer risk group, while 33 healthy individuals who did not develop any cancer by 70 years old were used as a low-risk control. The study revealed to identify more frequent unknown / non-synonymous germ-line mutations including non-sense variants in the risk group. We have identified potential functional non-synonymous germ-line mutations in 2 genes for risk of stomach cancer, 3 genes for colon cancer. Cancer risk markers identified in this study can be useful to apply prevention, health check-up invitation, early-diagnosis for cancer in a regional population. Further analyses are necessary to demonstrate mechanisms involved in the cancer risk, which may be contributed by polymorphic germ-line alleles identified in this study.

研究分野：がんの疫学、がん登録

キーワード：癌 遺伝学 遺伝子 ゲノム 人間生活環境

1. 研究開始当初の背景

千葉県における胃がん大腸がんの罹患率には地域性がある。また進行消化器がんの予後は不良であるが、早期のがんでは、予後が非常に良い。つまり、早期診断されなければ予後不良の疾患であり、予後改善のため早期診断法の開発が必要である。一方、手術・内視鏡治療と化学療法、放射線治療による集学的治療に対する感受性に患者間で差があることも周知であり、予後不良例への治療法選択のマーカーも求められている。一般の消化器がんバイオマーカーとして EGFR、Her2、RAS 変異や CEA、CA19-9 等があるが、予防、診断、治療効果判定、予後評価の改善には、さらに有用なバイオマーカーがもたれている。

そこで、地域内または一般に利用できる新たなリスクマーカーの同定、またリスクマーカーと体細胞変異に相関がみられるか、リスクマーカーの情報を加味して、腫瘍サンプルや血中の細胞もしくは DNA を利用してがん検診の合理化やがん治療、診断改善に利用できないか等を検討する必要があると考えられる。近年の技術革新により、ヒトの全ゲノムを 1000 ドルで調べることができる時代に突入している。

当施設においても、配備された次世代シーケンサー Ion Torrent Proton を利用して、がんゲノム配列の検討が可能となっている。このようなシーケンス技術の進歩により、7000 以上の多くの症例で遺伝子一つ一つではなく、全遺伝子の変異を検討すること（Pan-Cancer analysis）で遺伝子変異の Signature としてそれぞれのがんを分子レベルで細く分類することが可能となり、報告されている。がんのドライバー遺伝子の変異だけを考えるのではなく、これまでパッセンジャー遺伝子としてその変異が重要視されてこなかった遺伝子変異も含めて解析していくことで、変異をパターンとして判断でき、癌種ごとの特徴も検出可能と報告されている。このように直接遺伝子変異を見るのではなく、その変異のパターンから個々のがんによる遺伝子パスウェイの異常を捉えることも可能であることが解ってきた。同様に germline の多型も、アミノ酸変化等を伴う機能的な多型を複数加味した多型間相関による解析が必要である。

我々は、がんとの関連が文献報告され、がん変異のデータベース COSMIC で体細胞変異の頻度が高いがん関連遺伝子 409 を選択し、全エクソン解析を行う系を確立した。がんリスクと関わる多型とがん体細胞変異の両方

を解析できれば、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が可能と成る。

2. 研究の目的

1000 ドルゲノムプロジェクトの進行に合わせて、超マルチプレックスの PCR 技術と半導体シーケンス技術を応用することで、より少ない DNA 量 (数十ナノグラム) で、400 以上の主ながん関連遺伝子の全エクソン配列情報を短時間で検討できる比較的安価なゲノムシーケンスプラットフォームを我々は施設内で確立し、消化器がんでも体細胞変異を確認している。

本研究では、千葉県で行われているゲノムコホート研究に応用し、70 歳未満で消化器がんを発症したリスクグループ及び 70 歳までがんの発症を認めていない非リスクグループの解析を行い、県内のがん高発症地区のがん発症原因を究明を図る。さらに、院内患者集団の生殖細胞多型、体細胞変異の解析データと比較検討することで、リスクマーカー、体細胞変異 Signature を同定し、がん予防、治療、予後予測への利用を試みる。

3. 研究の方法

Ion Torrent PGM 半導体シーケンサーによる 400 以上のがん関連遺伝子のエクソーム解析をコホート検体で行う。比較的早期に消化器がん（胃がん、大腸がん）を発症したリスクグループ及び 70 歳までがん発症を認めていない非リスクグループの血液検体より DNA を抽出し、Ion AmpliSeq と CCP (Comprehensive Cancer Panel) を使用しがん関連遺伝子 409 個の全エクソン部分のゲノム配列解析を行い、リスクグループと非リスクグループのゲノム配列を比較検討した。

遺伝子解読は、当施設で確立した一ヶ所の配列を平均 1000 回のリード数で安価に解読できる解析系を使用し、遺伝子変異・多型・コピー数解析を一度に進めた。

また、院内症例のリスク候補のゲノム解析も行った。この結果と、臨床症状や既存の臨床所見などとの相関について多変量解析等を用いて検討を行い、消化器がん予防・診断法の確立を目指し検討を進めている。

4. 研究成果

コホート検体のうち消化器がん（胃がん、大腸がん）を発症した 83 症例、及び 70 歳ま

でがんの発症を認めていない 33 症例について CCP (Comprehensive Cancer Panel) のがん関連遺伝子 409 遺伝子の全エクソン部分のゲノム配列解析を行った結果、リスクグループは非リスクグループに比べ、より多くの未報告の遺伝子多型が検出され、ナンセンスやミスセンス変異を示す多型も多く検出された。また、アミノ酸の変化により遺伝子の蛋白構造に影響を与え、蛋白質の機能に影響を与えると考えられる 2 遺伝子の多型を胃がんで、3 遺伝子の多型を大腸がんで認めたため、さらに検討を加えることとし、胃がん及び大腸がんの臨床症例の検体を用いてこれら遺伝子の多型解析を行った。その結果、一つの遺伝子多型は胃がん 105 症例中 9 例で、大腸がん 70 症例中 5 症例で、この生殖細胞変異が認められ、がん発症リスクに関与する可能性が示唆された。さらに検討を加え、がん発症メカニズムの解明とがん予防、治療、予後予測バイオマーカーに繋がる研究成果となることを期待している。

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 11 件)

- ① Yin G, Naito M, Wakai K, Morita E, Kawai S, Hamajima N, Suzuki S, Kita Y, Takezaki T, Tanaka K, Morita M, Uemura H, Ozaki E, Hosono S, Mikami H, Kubo M, Tanaka H; Japan Multi-institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study Group. ALDH2 polymorphism is associated with fasting blood glucose through alcohol consumption in Japanese men. *Nagoya J Med Sci.* 78(2):183-193. 2016. 査読有 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4885818/>
- ② Nishida Y, Hara M, Sakamoto T, Shinchi K, Kawai S, Naito M, Hamajima N, Kadota A, Suzuki S, Ibusuki R, Hirata A, Yamaguchi M, Kuriyama N, Oze I, Mikami H, Kubo M, Tanaka H; Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study Group. Influence of cigarette smoking and inflammatory gene polymorphisms on glycosylated hemoglobin in the Japanese general population. *Prev Med Rep.* 3:288-295. doi:10.1016/j.pmedr.2016. 査読有
- ③ Nanri H, Nishida Y, Nakamura K, Tanaka K, Naito M, Yin G, Hamajima N, Takashima N, Suzuki S, Nindita Y, Kohno M, Uemura H, Koyama T, Hosono S, Mikami H, Kubo M, Tanaka H. Associations between Dietary Patterns, ADR β 2 Gln27Glu and ADR β 3 Trp64Arg with Regard to Serum Triglyceride Levels: J-MICC Study. *Nutrients.* 8(9). pii: E545. doi: 10.3390/nu8090545. PMID: 27608039. 2016. 査読有
- ④ Yamaguchi M, Uemura H, Arisawa K, Katsuura-Kamano S, Hamajima N, Hishida A, Suma S, Oze I, Nakamura K, Takashima N, Suzuki S, Ibusuki R, Mikami H, Ohnaka K, Kuriyama N, Kubo M, Tanaka H; Japan Multi-institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study Group. Association between brain-muscle-ARNT-like protein-2 (BMAL2) gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus in obese Japanese individuals: A cross-sectional analysis of the Japan Multi-institutional Collaborative Cohort Study. *Diabetes Res Clin Pract.* 110(3):301-308. 2015. DOI: 10.1016/j.diabres.2015.10.009 査読有
- ⑤ Uemura H, Katsuura-Kamano S, Yamaguchi M, Arisawa K, Hamajima N, Hishida A, Kawai S, Oze I, Shinchi K, Takashima N, Suzuki S, Nakahata N, Mikami H, Ohnaka K, Kuriyama N, Kubo M, Tanaka H. Japan Multi-institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study Group. A variant of the CLOCK gene and related haplotypes are associated with the prevalence of type 2 diabetes in the Japanese population. *J Diabetes.* doi: 10.1111/1753-0407.12344. [Epub ahead of print]2015 査読有
- ⑥ Hosono S, Ito H, Oze I, Higaki Y, Morita E, Takashima N, Suzuki S, Shimatani K, Mikami H, Ohnaka K, Ozaki E, Katsuura-Kamano S, Kubo M, Nagata C, Naito M, Hamajima N, Tanaka H. Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study Group. Polymorphisms in CYP19A1, HSD17B1 and HSD17B2 genes and serum sex hormone level among postmenopausal Japanese women. *Maturitas.* 82, 394-401, 2015. DOI: 10.1016/j.maturitas.2015.08.003 査読有

- ⑦ Sugimoto Y, Wakai K, Nakagawa H, Suma S, Sasakabe T, Sakamoto T, Takashima N, Suzuki S, Ogawa S, Ohnaka K, Kuriyama N, Arisawa K, Mikami H, Kubo M, Hosono S, Hamajima N, Tanaka H; J-MICC Study Group. Associations between polymorphisms of interleukin-6 and related cytokine genes and serum liver damage markers: a cross-sectional study in the Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study. *Gene*. 557:158-162. 2015. DOI: 10.1016/j.gene.2014.12.025 査読有
- ⑧ Hishida A, Takashima N, Turin TC, Kawai S, Wakai K, Hamajima N, Hosono S, Nishida Y, Suzuki S, Nakahata N, Mikami H, Ohnaka K, Matsui D, Katsuura-Kamano S, Kubo M, Tanaka H, Kita Y. GCK, GCKR polymorphisms and risk of chronic kidney disease in Japanese individuals: data from the J-MICC Study. *J. Nephrol.* 27:143-149. 2014. DOI: 10.1007/s40620-013-0025-0 査読有
- ⑨ Katsuura-Kamano S, Uemura H, Arisawa K, Yamaguchi M, Hamajima N, Wakai K, Okada R, Suzuki S, Taguchi N, Kita Y, Ohnaka K, Kairupan TS, Matsui D, Oze I, Mikami H, Kubo M, Tanaka H. A polymorphism near MC4R gene (rs17782313) is associated with serum triglyceride levels in the general Japanese population: the J-MICC Study. *Endocrine*. 47:81-89. 2014. DOI: 10.1007/s12020-014-0306-y 査読有
- ⑩ Hara M, Nakamura K, Nanri H, Nishida Y, Hishida A, Kawai S, Hamajima N, Kita Y, Suzuki S, Mantjoro EM, Ohnaka K, Uemura H, Matsui D, Oze I, Mikami H, Kubo M, Tanaka H; Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study Group. Associations between hGG1 Ser326Cys polymorphism and increased body mass index and fasting glucose level in the Japanese general population. *J. Epidemiol.* 24:379-384. 2014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4150008/> 査読有
- ⑪ Hishida A, Wakai K, Naito M, Suma S, Sasakabe T, Hamajima N, Hosono S, Horita M, Turin TC, Suzuki S, Kairupan TS, Mikami H, Ohnaka K, Watanabe I, Uemura H, Kubo M, Tanaka H; J-MICC

Study Group. Polymorphisms of genes involved in lipid metabolism and risk of chronic kidney disease in Japanese - cross-sectional data from the J-MICC study. *Lipids Health Dis.* 13:162. 2014. DOI: 10.1186/1476-511X-13-162 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① Yohko Nakamura, Yoshiaki Maru, Yasutoshi Tatsumi, Kazuhiro Okumura, Sana Yokoi, Miki Ohira, Yoshihiro Nabeya, Satoshi Fukasawa, Jin Katayama Hiroki Nagase, Haruo Mikami Analysis of non-synonymous genetic variations associated with cancer risk by a prospective cohort study 前向きコホート研究によるがんの高リスク群でのアミノ酸変化を伴う多型の解析
第75回日本癌学会学術総会、2016年10月8日、「パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）」
- ② 中村洋子、丸喜明、巽康年、横井左奈、大平美紀、中村友紀、高山喜美子、稲田潤子、片山稔、永瀬浩喜、三上春夫
半導体次世代シーケンサーによるリスク集団特異的がん関連遺伝子多型解析
第53回日本癌治療学会学術集会、2015年10月29日、「国立京都国際会館（京都府京都市）」
- ③ 中村洋子、丸喜明、巽康年、横井左奈、大平美紀、中村友紀、高山喜美子、稲田潤子、田中尚武、山本尚人、鍋谷圭宏、滝口伸浩、植田健、片山稔、永瀬浩喜、三上春夫
半導体次世代シーケンサーによるリスク集団特異的がん関連遺伝子多型解析
日本人類遺伝学会第60回大会、2015年10月16日、「京王プラザホテル（東京都新宿区）」
- ④ Yohko Nakamura, Yoshiaki Maru, Yasutoshi Tatsumi, Sana Yokoi, Miki Ohira, Yuki Nakamura, Kimiko Takayama, Junko Inada, Jin Katayama, Hiroki Nagase, Haruo Mikami Analysis of cancer risk-associated genetic variations by using semiconductor-based next-gen sequencings in J-MICC study
コンプリヘンシブがんパネルとイオントレントプロトン次世代シーケンサーによる千葉県ゲノムコホート解析
第74回日本癌学会学術総会、2015年10月10日、「名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）」

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ：
<http://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 春夫 (MIKAMI Haruo)
千葉県がんセンター（研究所）・
がん予防センター・部長
研究者番号：10332355

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

永瀬 浩喜 (NAGASE Hiroki)
千葉県がんセンター（研究所）・所長
研究者番号：90322073

(4) 研究協力者

()