

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670532

研究課題名(和文) 沖縄西方に多発する弾性線維腫をモデルとした、家族性腫瘍の原因同定へのアルゴリズム

研究課題名(英文) The algorithm to determine the causative gene of the familial tumor represented by elastofibroma dorsi

研究代表者

上里 博 (UEZATO, Hiroshi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10137721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：弾性線維腫患者の発症の基礎となる新規の癌抑制遺伝子の同定を目的とした。数名の弾性線維腫患者の腫瘍組織と末梢血ゲノムの遺伝子変異を差分することで、腫瘍組織に後天的に生じた遺伝子変異を全て拾い上げた。末梢血ゲノムにおいても生来的に同一の遺伝子内に別個の変異や欠失があることが、目的の原因遺伝子の必須条件である。しかし、粟国島地方出身の患者ゲノムは、患者間で非常に類似して多様性に乏しかった。日本人全体の平均的ゲノムを標準ゲノムとして、通常1%以下の存在率の変異を目標に選択する手法では、簡単には絞り込めないことが判明した。多数の病理固定組織の中に共通する生来的な遺伝子変異を探索中である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify the anti-oncogene, which should be the causative gene of familial cases of elastofibroma dorsi. All gene variations were selected by the subtraction of genome mutations between the tumor tissues and the peripheral-blood genome of several elastofibroma dorsi cases. The target causative gene should have mutated in both peripheral blood genome and tumor cells in the different way. However, the genome variations of the people living in the Aguni Island, where elastofibroma dorsi occurs frequently, were very similar among cases, and lacking in diversity. By the procedure, in which we choose the genome variation of the usual existence coefficient of 1% or less, it became clear by making the whole Japanese's average genome as a standard genome, it could not narrow down easily. We are now looking for the putative causative gene by PCR amplification from previous many pathological paraffin fixed blocks.

研究分野：皮膚科学、皮膚腫瘍学

キーワード：背部弾性線維腫 家族性腫瘍 琉球諸島 軟部腫瘍 良性腫瘍 ヘテロ接合性の喪失

## 1. 研究開始当初の背景

数世代前までの歴史的・地理的な背景からか、沖縄県、島嶼部では日本国内や世界でも稀な腫瘍が地域性に多発する。古典型のカポシ肉腫は宮古島出身者に頻発し、血管肉腫は沖縄県全体に多発する。皮膚リンパ腫型のATL患者は西日本の中でも特に高率に発症する。これら血球・血管内皮系腫瘍以外に、弾性線維腫という特殊な間葉系良性腫瘍の発症も集中する。

この背部弾性線維腫(弾力線維腫: elastofibroma dorsi)は、中年以降の肩甲骨下部に発症する稀な線維芽細胞系譜の良性腫瘍であるが、その発症例の大部分はフィンランドと沖縄県の一部に集中する。沖縄本島の西方近傍に位置する粟国島・渡名喜島・渡嘉敷島の出身者が主で、南方系の宮古、八重山地方では発症しない。琉球大学整形外科の長嶺信夫博士等が戦後に、200例以上の症例をこの小諸島出身者において報告しており、これら諸島は2100名程の島人口でもあり、その患者集積度は非常に高い。この背部弾性線維腫の約3割の患者には家族歴があり、1割の患者には両側性の発症が観察されている。

これら地理的な分布、中年以降の家族性・多発性の良性腫瘍の発症などの特徴より、弾性線維腫に固有の癌抑制遺伝子の1対の欠損・変異を基礎として、加齢に伴うヘテロ接合性の喪失: loss of heterozygosity (LOH)により弾性線維腫が発症すると考える。

## 2. 研究の目的

今回の研究課題は、一義的には弾性線維腫患者の発症の基礎となる新規の癌抑制遺伝子の同定を目的とする。さらに弾性線維腫をモデルとして稀な遺伝性腫瘍・母斑症の原因遺伝子の同定を、ごく少数の患者の参加のみで可能とする解析アルゴリズムを完成したい。ヘテロ接合性の喪失により生じる優性遺

伝性腫瘍・母斑症の原因となる癌抑制遺伝子は、主に網膜芽細胞腫、乳癌、大腸癌、あるいは神経線維腫症などの上皮系腫瘍にのみ報告されてきた。共通して、なにより複数の家系の患者と非罹患家族の協力が必要であり、ある程度頻度の高い疾患を目標とし、多額の費用と複数の領域の研究者の参画が必須であった。本研究課題は、ヘテロ接合性の喪失の発症機序による遺伝性腫瘍においては、極少数の患者のゲノムを効率よいアルゴリズムでスクリーニングすることで、その原因遺伝子の同定を可能とする提案である。

## 3. 研究の方法

非常に狭い生活圏内である沖縄西部諸島に多発する弾性線維腫の原因遺伝子の同定により、1-2例の患者参加のみで、ヘテロ接合性の喪失型変異による優性遺伝性疾患の原因探索を可能とするアルゴリズムの実証を目標とする。今回の研究課題では、CGHアレーとエクソーム解析の利点を相補的に組み合わせ、腫瘍組織と末梢血由来のゲノム情報を差分することで、少数の患者参加のみで可能とする次のアルゴリズムを考えた。

(1) 倫理委員会の承認後に、沖縄西部出身の弾性線維腫の患者の手術機会を待つ。手術後の余剰腫瘍部位と、患者本人の末梢血由来のゲノムDNAを抽出する。

(2) 患者腫瘍と末梢血ゲノムに対し各々、比較ゲノムアレーを行い、腫瘍由来と末梢血由来のゲノムDNAに共通した染色体領域欠損の有無、また腫瘍に新たに生じた欠損部の特定を行う。

(3) 患者腫瘍ゲノムと、末梢血ゲノムのエクソーム解析を行う。標準化日本人ゲノムのデータベースをコントロールとして用いる。

(4) 個人のゲノムに存在する数百の変異より、如何に目的の原因遺伝子を絞り込むかが、この研究課題の成否を担うアイデアである。

(5) 腫瘍由来ゲノムのエクソーム解析により、末梢血ゲノムの遺伝子変異に加え新たに腫瘍組織に生じている変異部位を全て拾い上げる。中年期以降の発症に至る過程で、腫瘍化する細胞にも遺伝子変異は蓄積されているが、その大部分は腫瘍化機序とは関係のない遺伝子損傷である。ここで末梢血由来のエクソーム解析で生来的な遺伝子変異が確認された遺伝子内のいずれかの領域に、新たに後天的な腫瘍特異的な変異も加えられている遺伝子が、まさに目的とする原因遺伝子である。両アレルに複合的な変異を確認された遺伝子が、弾性線維腫の癌抑制遺伝子として働くと考え、この段階のスクリーニングで、真の原因遺伝子を含め単数あるいは複数個の候補遺伝子まで絞り込めると考える。琉球大学に備わる多数の弾性線維腫の切除病理パラフィン固定標本よりゲノム DNA を回収し、候補遺伝子として絞り込んだ複数個の候補遺伝子に関し、その生来的な変異が沖縄地方の弾性線維腫組織に共通している変異を選択する。

#### 4. 研究成果

倫理委員会の承認後に、沖縄西部出身の弾性線維腫の患者の手術機会を得た。ヘテロ接合性の喪失により生じた腫瘍組織は、原因遺伝子の両アレルに生来的な変異と、後天的な獲得性の変異を独立して持つことを基盤として、原因遺伝子のスクリーニングを行った。1名の弾性線維腫患者の腫瘍組織と末梢血単球分画よりゲノム DNA を抽出し、比較ゲノムアレー法と HiSeq レベル次世代シーケンサーによるエクソーム解析を行い、標準化日本人ゲノムのデータベースをコントロールとして用いた。両者のゲノム間の遺伝子変異を差分することで、腫瘍組織に後天的に生じた遺伝子変異を全て拾い上げた。選択した多数の遺伝子の中で、末梢血ゲノムにおいても生来的に同一の遺伝子内に別個の変異や欠

失があることが、目的の原因遺伝子の必須条件である。次にアミノ酸置換のない同義的変異等をソフト解析で除き、既にヒトの疾患原因として既知の遺伝子における変異を除外すると、その病態的意義付けが不明な新規の遺伝子変異は、この1人の背部弾性線維腫患者より、既に7つの候補遺伝子に絞ることが出来た。さらに2名の弾性線維腫患者の腫瘍組織より、腫瘍細胞の単層培養に成功し、これらより、弾性線維腫培養細胞由来の DNA と RNA を抽出した。この中で1例の腫瘍細胞に関しては、比較ゲノムアレー法と全エクソーム解析を行い相補的に解釈した。さらに3名の弾性線維腫の患者の末梢血単球分画よりゲノム DNA を抽出し、各患者個人のもつ SNP や、変異ゲノムを網羅的に拾い上げ、粟国島出身患者に共通する変異ゲノムをまとめた。しかし、粟国島地方出身の患者ゲノムは、患者間で非常に類似して多様に乏しく、日本人全体の平均的ゲノムを標準ゲノムとして、通常の1%以下の存在率の変異を目標に選択する手法では、簡単には絞り込めないことが判明した。即ち、本州の日本人とはヒトの進化、東アジアへのホモサピエンスの定着過程で若干異なる琉球人のゲノムのコントロールとするには、平均的な相違が大きく、in-house ゲノムデータベースの必要性を感じた。上の条件で絞り込まれた候補遺伝子に関し、これまでに集積した多数の病理固定組織の中に共通する生来的な遺伝子変異と、独立した獲得性のアレルの変異の確認を継続している。

#### 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27件)

1 Primary cutaneous mucormycosis caused by *Mucor irregularis* in an elderly person. Yamaguchi S, Okubo Y, Katano A, Sano A,

Uezato H, Takahashi K. J Dermatol, 査読有, 2015 Vol 42 : 210-214.  
doi: 10.1111/1346-8138.12736.

2 A Novel Chromosomal Translocation Associated With COL1A2-PDGFB Gene Fusion in Dermatofibrosarcoma Protuberans: PDGF Expression as a New Diagnostic Tool. Nakamura I, Kariya Y, Okada E, Yasuda M, Matori S, Ishikawa O, Uezato H, Takahashi K. JAMA Dermatol, 査読有, Vol 151,2015, 1330-1337  
doi: 10.1001/jamadermatol.2015.2389.

3 Ayadualin, a novel RGD peptide with dual antihemostatic activities from the sand fly *Lutzomyia ayacuchensis*, a vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis. Kato H, Gomez EA, Fujita M, Ishimaru Y, Uezato H, Mimori T, Iwata H, Hashiguchi Y. Biochimie. 査読有, 2015, Vol 112 : 49-56.  
doi: 10.1016/j.biochi.2015.02.011.

4 Genetic divergence in populations of *Lutzomyia ayacuchensis*, a vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis, in Ecuador and Peru. Kato H, Cáceres AG, Gomez EA, Mimori T, Uezato H, Hashiguchi Y. Acta Trop. 査読有, 2015 ;141:79-87.  
doi:10.1016/j.actatropica.2014.10.004.

5 Case of bilateral acroangiokeratosis due to symmetrical arteriovenous fistulas of the soles. Horiguchi Y, Takahashi K, Tanizaki H, Miyachi Y. J Dermatol. 査読有 2015 ;42:989-91.  
doi: 10.1111/1346-8138.12934.

6 Increasing trends in cervical cancer mortality among young Japanese women below the age of 50 years: an analysis using the Kanagawa population-based Cancer Registry, 1975-2012. Motoki Y, Mizushima S, Taguri M, Takahashi K, Asano R, Kato H, Asai-Sato M, Katayama K, Okamoto N, Hirahara F,

Miyagi E. Cancer Epidemiol. 査読有 2015, 39:700-706.  
doi: 10.1016/j.canep.2015.08.001.

7 Novel compound heterozygous DNA ligase IV mutations in an adolescent with a slowly-progressing radiosensitive-severe combined immunodeficiency. Tamura S, Higuchi K, Tamaki M, Inoue C, Awazawa R, Mitsuki N, Nakazawa Y, Mishima H, Takahashi K, Kondo O, Imai K, Morio T, Ohara O, Ogi T, Furukawa F, Inoue M, Yoshiura K, Kanazawa N. Clin Immunol. 査読有 2015,160:255-60.  
doi: 10.1016/j.clim.2015.07.004.

8 園崎 哲、山口さやか、大久保優子、山本雄一、高橋健造、上里 博、佐野文子：ウサギからの感染が疑われた *Microsporium csnis* による頭部・体部白癬の小児例。日本小児皮膚科学会雑誌、査読有、Vol34、2015、222-226。  
<http://ci.nii.ac.jp/ncid/AN10042842>

9 大平 葵、山口さやか、新嘉喜長、大久保優子、宮城拓也、高橋健造、上里 博：日本人高齢者に発症した BL ヤハンセン病の1例。西日本皮膚科、査読有、Vol177、2015、497-502。  
<http://doi.org/10.2336/nishinohonhifu.77.497>

10 栗澤 剛、栗澤遼子、山口さやか、宮城拓也、苅谷嘉之、高橋健造、上里 博：右鼻翼部に血管拡張性肉芽腫様結節が生じた医原性カボジ肉腫の1例。西日本皮膚科、査読有、Vol177、2015、492-496。  
<http://doi.org/10.2336/nishinohonhifu.77.492>

11 林 健太郎、宮城拓也、園崎 哲、山口さやか、山本雄一、高橋健造、西 由希子、仲地佐和子、友寄毅昭、益崎裕章、上里 博：著明な両側眼瞼腫脹を生じた皮下脂肪織炎様 T 細胞リンパ腫の1例。西日本皮膚科、査

読有、Vol77、2015、487-491.

<http://doi.org/10.2336/nishinohonhifu.77.487>

12 崎枝 薫、栗澤 剛、林 健太郎、苅谷嘉之、眞鳥繁隆、川畑有香、高橋健造、上里 博：先天性異所爪の1例。西日本皮膚科、査読有、Vol77、2015、473-478.

<http://doi.org/10.2336/nishinohonhifu.77.473>

13 栗澤 剛、林 健太郎、苅谷嘉之、眞鳥繁隆、新嘉喜 長、高橋健造、上里 博：下肢の皮膚外科手術における伝達麻酔の有用性。日本皮膚科学会雑誌、査読有、Vol125、2015、1409-1417.

<http://doi.org/10.14924/dermatol.125.1409>

14 大平 葵、山口さやか、大久保優子、佐久川裕行、高橋健造、上里 博：皮膚・皮下型のプロトテコーシスの1例。西日本皮膚科、査読有、Vol77、2015、378-384.

<http://doi.org/10.2336/nishinohonhifu.77.378>

15 山口さやか、大久保優子、高橋健造、上里博、佐野文子：家族内に集岡発生がみられた *Trichophyton violaceum* による皮膚真菌症。西日本皮膚科、査読有、Vol77、2015、239-243.

<http://doi.org/10.2336/nishinohonhifu.77.239>

16 栗澤 剛、栗澤遼子、林 健太郎、眞鳥繁隆、山本雄一、高橋健造、上里 博：進行期の肛門部有軟細胞癌に同時化学放射線療法が奏効した1例。西日本皮膚科、査読有、Vol77、2015、230-234.

<http://doi.org/10.2336/nishinohonhifu.77.230>

17 粕谷百合子、大久保優子、眞鳥繁隆、苅谷嘉之、高橋健造、上里 博、浜田 聡、百名伸之、太田孝男：診断に難渋した

T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma の小児例。日本小児皮膚科学会雑誌、査読有、Vol34、2015、137-142.

<http://ci.nii.ac.jp/ncid/AN10042842>

18 林 健太郎、仲村郁心、眞鳥繁隆、栗澤剛、山本雄一、苅谷嘉之、高橋健造、上里 博：先天性 Bednar 腫瘍の1例。日本小児皮膚科学会雑誌、査読有、Vol34、2015、131-135.

<http://ci.nii.ac.jp/ncid/AN10042842>

19 大久保優子、内海大介、平良清人、高橋健造、上里 博：サメハダテナガダコ咬症の1例。皮膚科の臨床、査読有、Vol57、2015、480-481.

<http://ci.nii.ac.jp/ncid/40020682834>

20 川瀬史恵、山口さやか、佐野文子、金野俊洋、兼島 孝、玉城祐一郎、上里 博：野生オオコウモリによる外傷後、狂犬病暴露後ワクチンを接種した1事例。獣医畜産新報、査読有、Vol68、2015、276-278.

<http://ci.nii.ac.jp/ncid/AN00407628>

21 宮城拓也、上里 博【日常皮膚診療に役立つアレルギー百科】アスピリン不耐症。Derma、査読無、Vol229、2015、163-169.

[http://www.zenniti.com/f/b/list/zc01/2/oa\\_table/b\\_z.html](http://www.zenniti.com/f/b/list/zc01/2/oa_table/b_z.html)

22 白瀬春奈、栗澤遼子、栗澤 剛、山本雄一、高橋健造、上里 博：後天性免疫不全症候群に合併した Bowen 様丘疹症の1例。皮膚科の臨床、査読有、Vol69、2015、74-77.

<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalPortal.do?journalPortalId=412>

23 片野あずさ、内海大介、大平 葵、粕谷百合子、苅谷嘉之、崎枝 薫、眞鳥繁隆、平良清人、高橋健造、上里 博：西日本皮膚科、査読有、Vol76、2014、469-472.

<http://doi.org/10.2336/nishinohonhifu.76.469>

24 眞鳥繁隆、栗澤遼子、林 健太郎、栗澤

剛、平良清人、高橋健造、上里 博：仙骨部の褥瘡 褥瘡癬痕に生じた有棘細胞癌の3例。臨床皮膚科、査読有、Vol68、2014、815-819。  
<http://dx.doi.org/10.11477/mf.1412104129>

25 大久保優子、内海大介、苅谷嘉之、林 健太郎、栗澤 剛、眞鳥繁隆、高橋健造、上里博：筋緊張性ジストロフィーに合併し、有棘細胞癌が疑われた毛母腫の1例西日本皮膚科、査読有、Vol76、2014、353-356。  
<http://doi.org/10.2336/nishinihonhifu.76.353>

26 仲宗根尚子、仲村郁心、山田智史、平良清人、高橋健造、上里博：アルプチンによる接触皮膚炎の1例。臨床皮膚科、査読有、Vol68、2014、484-488。  
<http://medicalfinder.jp/doi/pdf/10.11477/mf.1412104043>

27 Kasuya Y, Yamaguchi S, Yamamoto Y, Uezato H, Takahashi K. Glossal pigmentation caused by the simultaneous uptake of iron and tea. Eur J Dermatol. 査読有、2014 24:493-4。  
<http://doi: 10.1684/ejd.2014.2371>.

〔学会発表〕(計4件)

1 高橋健造、交代製剤時代の乾癬の外用治療 外用薬による長期副作用の理解、第114回日本皮膚科学会総会、2015年5月29日～2015年5月31日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

2 高橋健造、石井則久、スミスリン抵抗性の沖縄のアタマジラミ症への対応、第114回日本皮膚科学会総会、2015年5月29日～2015年5月31日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

3 高橋健造、沖縄の地理と公衆衛生上の課題から再認識する、乾癬の病態と治療選択、第114回日本皮膚科学会総会、2015年5月29日～2015年5月31日、パシフィコ横浜(神

奈川県横浜市)

4 高橋健造、須賀 康、遺伝性角化症患者の表皮と毛、毛包の観察、第114回日本皮膚科学会総会、2015年5月29日～2015年5月31日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計1件)

1 眞鳥繁隆、上里 博：リーシュマニア症の診断と治療。マンスリーデルマ，塩原哲夫，照井 正(編)，17-23，全日本病院出版会，東京，2014。

6. 研究組織

(1)研究代表者

上里 博(UEZATO, Hiroshi)  
琉球大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：10137721

(2)研究分担者

高橋健造(TAKAHASHI, Kenzo)  
琉球大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：80291425