

平成 2 8 年 6 月 7 日現在

機関番号： 1 4 4 0 1

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2014 ~ 2015

課題番号： 2 6 8 6 1 0 7 6

研究課題名 (和文) エキソーム解析を用いた遺伝性胃癌の原因遺伝子の探索

研究課題名 (英文) Investigation of germline mutations in familial gastric cancer patients using whole exome sequencing

研究代表者

和田 範子 (Wada, Noriko)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号： 4 0 6 4 5 0 9 0

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) : 先行研究において、1組の家族性胃癌患者とその母(胃癌遺伝素因を持つ)・父(胃癌非発症者)の全血を用いてエキソーム解析を行い、本人と母に共通するgermline mutationを117個認めた。本研究ではそれらの中から5つの遺伝子変異を候補遺伝子として選出した上で、家系内の他の発症者でも共通するものを検索し、発症者に共通する変異を2つ認めた。別の家族性胃癌家系1組でも同様の検索を行ったが、発症者に共通する変異の中に癌との関連が疑われる変異を認めなかったことから、1組目の家系で選出した2つのgermline mutationが家族性胃癌の原因遺伝子である可能性があると考えた。

研究成果の概要 (英文) : We have performed whole exome sequencing using peripheral blood of a gastric cancer patient, her mother (susceptible of harboring genetic factor) and her father (non-susceptible) in a gastric cancer family in a previous study. We have detected 117 germline mutations which were the same between the patients and her mother. In this study, we selected five germline mutations among the 117 mutations based on other studies or the incidence in sporadic gastric cancers. Furthermore, two of the five germline mutations revealed to exist in another gastric cancer patient in the family. Although we performed the similar analysis in another gastric cancer family, we could not detect any suspicious germline mutations which were the same between two gastric cancer patients. Thus, we concluded that the two germline mutations found in one gastric cancer family could be one of the causes that occurred gastric cancer.

研究分野： 消化器外科学

キーワード： 家族性胃癌 エキソーム解析

1. 研究開始当初の背景

日本人において、胃癌の罹患率は1位、死亡率は2位である。近年、検診の普及と内視鏡診断技術の向上にともない、胃癌の早期発見の割合は増加し、根治が広く得られるようになってきている。しかしながら、今日においても高度に進行した状態で発見される胃癌は一定割合で存在し、このような進行症例の予後は現在もなお不良である。治療成績を向上させるためには、原因究明と発症予測、それに基づく早期対応や創薬が重要と考えられる。

疾病の発生では遺伝素因と環境要因の多段階にわたる相互作用が関与しているとされており、胃癌においても同様である。過去の疫学的研究から、胃癌の発生に関する環境要因としては *Helicobacter pylori* 感染や食塩過剰摂取、喫煙などが指摘されている。特に *Helicobacter pylori* 感染による慢性炎症の持続は強いリスクファクターとして周知されるようになり、分子メカニズム解明に向けた研究が進められている。一方、遺伝素因については他の癌と同様、複数の遺伝子の変異の蓄積により発症すると考えられており、遺伝子解析による原因解明が試みられている。

遺伝子性胃癌の原因遺伝子として最も知られているものは、CDH1 (E カドヘリン) 遺伝子であり (Nature 1998) 家族性びまん性胃癌 (hereditary diffuse gastric cancer (HDGC)) の遺伝子診断としてすでに臨床応用が試みられている。予防的胃切除の意義についての臨床研究報告もあるが、HDGC の中で CDH1 に変異が見つかるのは欧米でも約30%にしか満たない (J Med Genet 2004)。本邦は世界的な胃癌の多発国であるものの、CDH1 の germline mutation の割合は0-7.7% (Clin Cancer Res 1999, Carcinogenesis 1999, Jpn J Clin Oncol 2003) と低いことから、CDH1 以外の遺伝素因の解明が必要と考えられる。

近年 DNA シーケンス技術の飛躍的進歩に伴い、大量の遺伝子配列を短時間、低コストで解読可能となってきた。この技術を活用して、全ゲノム/全エクソンの解析という研究手法が登場した。エキソーム解析は、ゲノム上でタンパク質をコードしているエクソン領域の全てを解読する研究手法で、希少な単一遺伝子疾患の原因遺伝子探索や、一般的な疾患の遺伝素因探索に有用と考えられている。すでにこの方法を用いた研究により、Bartter syndrome (PNAS 2009)、Kabuki syndrome (Nat Genet 2010)、Mental retardation (Nature Genet 2010) などの原因遺伝子が報告されている。癌の領域においても、エキソーム解析による網羅的な遺伝子解析は、発癌

に関わる原因遺伝子究明のための方法として重要な位置づけとなりつつある (Nature 2011, Nat Genet 2011)。悪性黒色腫では、腫瘍もしくは血液の計 28 検体に対してエキソーム解析を行うことで、既知の癌遺伝子 1 つのほかに、複数検体で共通する新たな遺伝子変異を検出し、癌遺伝子の一つと結論づけている (Nat Genet 2011)。胃癌においても、22 の胃癌組織でエキソーム解析を用いて遺伝子変異の網羅的検索を行い、共通する遺伝子変異を絞り込むことで原因遺伝子の一つである ARID1A 遺伝子を同定したとの報告もなされたが (Nat Genet 2010)、本邦におけるエキソーム解析を用いた胃癌の研究はほとんど報告されていないのが現状である。

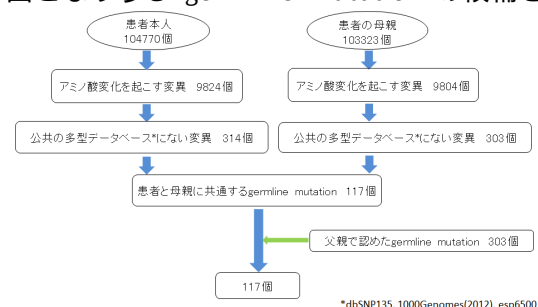
2. 研究の目的

本研究は、エキソーム解析にて得られた家族性胃癌の患者とその両親に共通する germline mutation の中から、他の家族性胃癌患者でも共通するものを検索することで、家族性胃癌の原因となりうる遺伝子変異を同定し、遺伝素因の一部を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

我々はすでに先行研究として、当科における家族性胃癌患者とその母(胃癌遺伝素因を持つ)・父(胃癌非発症者) 1 組の家族性胃癌患者とその親から全血を採取し、白血球ゲノムを抽出、次世代シーケンサーで全エクソン配列を決定した。

得られた塩基配列データを既知のゲノム配列と比較し変異部位を網羅的に検出した。この際 SNP やアミノ酸変化を起こさないものは除外した。そうして得られた変異のうち、サンプル間に共通してみられる変異を絞り込み、下図のシェーマに示す手順で遺伝性胃癌の原因となりうる germline mutation の候補を



117 個選出した。

今回の研究では、他の家族性胃癌患者の胃癌組織および非癌部において、既に認めている遺伝子変異と共通してみられる変異があるかを調べ、胃癌発症の原因となる germline mutation を同定する。

4 . 研究成果

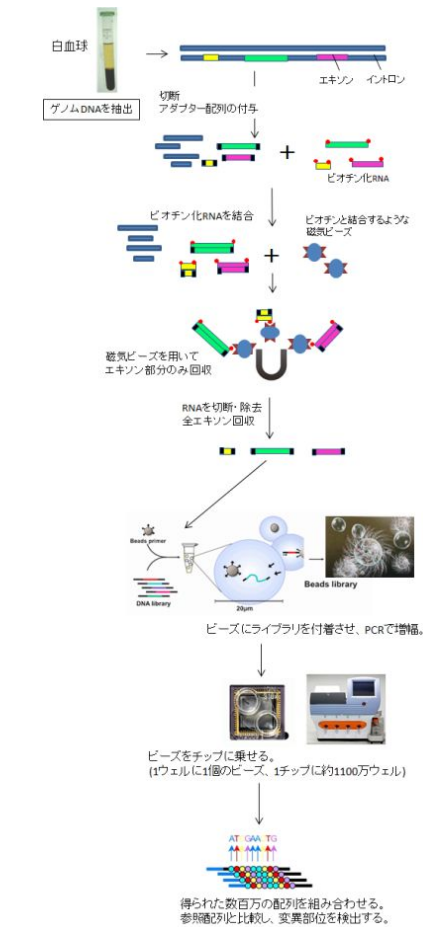
先行研究において認めた 117 個の候補遺伝子の中から文献的報告や孤発性胃癌での変異頻度を基に、候補遺伝子をさらに 16 個に絞り込んだ。
まずはそれらのうちの 5 つの遺伝子変異についてはダイレクトシーケンスを行い、エキソーム解析の結果が正しかったことを確認した。さらにこのうち 2 つの変異は家系内の別の胃癌発症者 1 人(叔父)においても同じ germline mutation が存在することが判明した。

遺伝子変異	本人 全血	本人 癌部	本人 非癌部	母 全血	父 全血	叔父 癌部	叔父 非癌部
CSMD1	あり	あり	あり	あり	なし	なし	なし
CELSR3	あり	あり	あり	あり	なし	なし	なし
CDH23	あり	あり	あり	あり	なし	なし	なし
CHD5	あり	あり	あり	あり	なし	あり	あり
HSPG2	あり	あり	あり	あり	なし	あり	あり

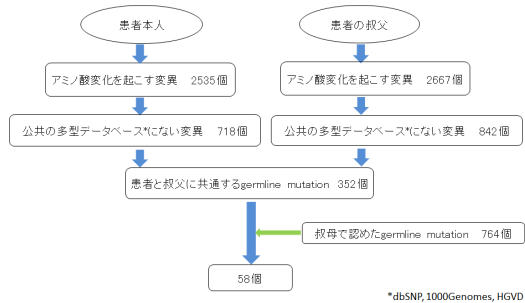
この家系とは別に、2012-2014 年に当科で胃癌に対し切除術を施行した患者の中から、「第 2 度近親者内に胃癌発症者が 3 人以上」、もしくは、「第 2 度近親者内に胃癌発症者が 2 人以上、うち 1 人は 50 歳以下で発症」という基準を用いて家族性胃癌患者をスクリーニングしたところ、下記の 8 家系を認めた。

症例	年齢	人数	第二度近親者内の発症者		T	Stage	組織型
			内訳	他癌発症者			
1	49	3人	叔父3人、祖父	父(白血病)	SS	IIIA	por2>tub2
2	39	3人	叔父、叔母		SE	IV	por1>sig
3	64	2人	兄、叔父		SS	IIA	tub2
4	73	2人	父、姉	兄(肝臓癌) 母方伯母(胃癌or大腸癌)	M	IA	por>sig
5	66	3人	父、兄弟		SM	IA	tub2
6	68	1人	姉(48歳発症)		SM	IA	tub2-por
7	75	1人	兄(48歳死亡)		M	IA	tub1
8	68	2人	長女、叔父		M	IA	Por>sig>tub2

この中から 50 歳未満かつ未分化型の患者(上図、家系 1)を選出し、本人および叔父(胃癌発症者)・叔母(胃癌非発症者)の白血球ゲノム DNA を用いて、次世代シーケンサーで全エキソン領域内の germline mutation を網羅的に検出した。



得られた変異のうち、発症者である本人と叔父のみに共通してみられる変異を選出し、遺伝性胃癌の原因となりうる遺伝子変異の候補を下図のシェーマに示す手順で 58 個選出した。



エキソーム解析を行った 2 家系の発症者間で

は共通する germline mutation を認めず、また2組目で認めた58個の変異の中には癌との関連が疑われる変異を認めなかったことから、1組目の家系で選出した2つの germline mutation(CHD5、HSPG2)が家族性胃癌の原因遺伝子である可能性があると考えた。

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)

6．研究組織

(1)研究代表者

和田範子 (WADA, Noriko)

大阪大学医学部附属病院・医員

研究者番号：40645090

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：