

令和元年6月11日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08982

研究課題名(和文) 環境癌における3p21領域ゲノム構造異常の詳細解析と癌遺伝子診断への適用

研究課題名(英文) Detailed analysis of genome structural alteration on 3p21 and clinical application in environment-related cancers.

研究代表者

江見 充 (EMI, Mitsuru)

兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授

研究者番号：90221118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫(MM)においては、Chromosome 3p21に搭載されるBAP1や周辺遺伝子に、非連続で複数のエクソン単位のbiallelic deletionが生じることが、我々の研究で判明している。このようなエクソン単位のゲノム変化を、再現性高く網羅的に解析可能なゲノムコピー数解析手法digitalMLPAを開発した。MMでは、TP53遺伝子においても同様のコピー数変化が生じていることが判明した。一方、腎細胞がん(RCC)では8-9割に3pの欠失が見られるが、そのほとんどはmonoallelic deletionであり、上記変化はMMの特徴であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代シーケンサーによる塩基配列解析は盛んにされているが、ゲノムコピー数解析は市販のCGHアレイを用いたものが大半で、解像度は数十Kb単位である。我々は、エクソン単位のゲノムコピー数解析が精度高くできる網羅的解析手法を開発し、MMのゲノム変化の特徴を見出した。これまで変異の少ないと考えられてきたMMについて、新規手法を用い、新たなゲノム変化を捉えたことは学術的意義がある。digitalMLPAを用い、体液中のMMを検出する手法を開発できれば、いまだに余命が診断後1年未満であるMMの早期診断を可能にすることができ、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We have described that frequent somatic copy number loss throughout the 3p21 region harboring BAP1 and neighbor genes in malignant mesothelioma; many of these minute deletions were not contiguous but rather they alternated with exon segments showing oscillating copy number loss along the 3p21 region. We developed new diagnostic technique, digital MLPA for malignant mesothelioma, that can identify frequent minute biallelic deletions in tumor genome with high accuracy. This technique enabled us to identify frequent minute biallelic deletions in TP53 gene in malignant mesothelioma. In contrast, we found rather large monoallelic deletions encompassing whole short arm of chromosome 3 in renal carcinoma, thus, highlighting these minute oscillating copy number losses as unique features in malignant mesothelioma genome.

研究分野：分子生物学

キーワード：悪性中皮腫 腎細胞がん 環境癌 ゲノム構造異常

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) アスベストがかつて建設資材として多用された時代から概ね 40 年が経過した今日、悪性中皮腫 (Malignant Mesothelioma: MM) が急増している。早期は無症状の場合が多く、進行した手術不可能な状態での診断となり、さらに化学療法や放射線治療に抵抗性で、極めて予後不良な悪性腫瘍である。アスベストは「静かな時限爆弾」と恐れられ、阪神大震災後のがれき処理従事者の MM 発症が表面化した。今後東日本大震災・熊本地震の被災エリアでも飛散したアスベストによる発症も予測され、MM 発症者はさらに増大すると予想される。

(2) 悪性度の高い腫瘍であるにもかかわらず MM のゲノム異常に関しては、p16 遺伝子 (9 番染色体) の欠失と NF2 遺伝子 (22 番染色体) の変異が報告されるのみであった。2011 年に欧米より BAP1 の体細胞変異が MM 検体の 23% で検出され (Bott ら, Nat Genet 43(7), 2011)、我々も BAP1 遺伝子の体細胞変異を上皮型 MM 特異的に 8 割以上で検出した (Yoshikawa ら, Cancer Sci, 103(5), 2012)。

一方、2011 年には BAP1 遺伝子の生殖細胞系列変異を有する家族に、MM とブドウ膜黒色腫が高頻度で発症すると海外の共同研究者らが報告した (Testa, J. R., Carbone, M. ら Nat Genet 43(10), 2011, Wiesner, T. ら, Nat Genet 43(10), 2011)。BAP1 の生殖細胞系列変異は機能喪失型変異で、がん細胞では正常アレルが欠損していた。これらの報告により、環境要因で発症するとされてきた MM が、生殖細胞系列変異による遺伝子の機能喪失が原因でも生じることで着目された。しかし、本遺伝子の生殖細胞系列変異に起因する MM は全 MM の 2~3% 程度である。BAP1 遺伝子の生殖細胞系列変異を有する家族には、腎細胞がん(RCC)の発症頻度も高く、BAP1 によるがん易罹患性症候群の一つである。

(3) RCC は、その発症原因は未解明の部分が多いが、喫煙と肥満が危険因子としてあげられる。また長期間の透析により RCC の発症率が高くなることが知られており、その一部は環境癌に該当する。

(4) 種々の癌で報告される第 3 染色体短腕 (3p) の欠失は、腎細胞がん(RCC)では 7~9 割の検体に認められ、VHL の他 PBRM1, BAP1, SETD2 の変異を伴う例が報告され、本学検体でも確認された (Togo, Yoshikawa ら, Int J Oncol. 2016)。一方我々は、約 2/3 の悪性中皮腫(MM)において 3p21 の高頻度欠失を見出し (Yoshikawa ら, Int J Oncol 1, 39(6), 2011)、RCC と同様上記遺伝子に変異を検出したため、MM と RCC の腫瘍発症と 3p21 領域搭載遺伝子の果たす役割に興味をもたれた。

(5) 最近の次世代シーケンサー(NGS)を用いた全エクソン解析研究から、MM のゲノム変異個数は一 genome あたり平均 23(2~51)程度と少数で、潜伏期間が長く平均発症年齢は 61 歳にもかかわらず、小児がんに近い変異個数と報告される。そこで、我々は次世代シーケンサーでは検出が難しいタイプの変異が生じているのではないかと仮説を立て、H25~27 年度基盤 (C)「環境癌における 3p21 領域ゲノム構造異常の詳細解析」(課題番号 25460710)を行った。本研究では、市販アレイでは得られない高解像度の Comparative Genomic Hybridization (CGH)アレイ (平均プローブ間距離 254bp) を作製し、MM と RCC のゲノムコピー数解析を実施した。結果、両者ではゲノム構造異常の状況が大きく異なっていた。RCC では従来から考えられているように 3 番短腕が単に 1 アレル欠損していた。MM では本領域搭載遺伝子 251 個中 46 遺伝子に両アレル欠失が検出され、そのほとんどが数エクソンの微小な biallelic deletion (~3Kb) であることが特徴であった。このゲノム変化は、コピー数の低下、上昇変化が繰り返し起きており、Chromothripsis (クロモスリプシス・染色体破砕: 癌などで 1 つの染色体において、数十~数千箇所にも及ぶ崩壊と再編成が一度のイベントで発生する現象) が生じているのではないかと推測された。ターゲットシーケンスも実施したところ、シーケンスレベル変異頻度は、前記欠失頻度と同等もしくは低く、他研究者の報告頻度とほぼ一致した。変異頻度が低いとされてきた MM が、実態は技術的に捉えにくい微小欠失が複数個所で起こり、激しいゲノム再構成が生じていることが明らかとなった。これらの成果は、前述課題番号 25460710 研究終了翌年に論文採択された (Yoshikawa ら, PNAS. 113(47), 2016)。

2. 研究の目的

(1) 悪性中皮腫はアスベスト曝露が主要因で、曝露から 30-40 年の経過を経て発症する、極めて予後不良の腫瘍である。腫瘍当たりの変異報告数は成人癌としてはかなり少なく、その発症メカニズムはほとんどわかっておらず、その解明が目的である。

(2) 研究報告の多い RCC と比較することで MM の 3p21 ゲノム欠失・再構成の発生機序の特異性を解明し、環境癌の代表である MM の発症メカニズムに関する知見を得る

ことを第一目的とする。

(3) また、MM, RCC とも早期診断が難しいことから、高頻度で生じる 3p21 ゲノム欠失を利用し、がん遺伝子診断への適用を試みるのが第二の目的である。RCC に関しては、低侵襲性検体である尿や血清等液体中の cell-free DNA を用いたリキッドバイオプシーによる非侵襲的癌存在遺伝子診断法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) MM と RCC に共通して変異しやすい遺伝子を対象とし、網羅的に変異解析可能な手法を構築した。エクソン単位のゲノムコピー数解析手法とし、高解像度 CGH アレイは高額で多数の検体を解析するには不向きである。そこで、オランダ企業 MRC-Holland と共同で MM と RCC に共通で変異しやすい遺伝子を対象とした digitalMLPA を開発した。digitalMLPA は既存の MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法と次世代シーケンサーを組合せた網羅的解析手法である。対照となる遺伝子領域につき、一領域当たり約 35bp のプローブ 2 種とハイブリダイゼーションさせ、ライゲーション後、プローブ両末端に付加した共通配列で増幅し、ライブラリーを調製する。本ライブラリーを次世代シーケンサーで配列解析し、一領域当たり平均 600 本読み、リード数を reference 検体(健康人、もしくは患者末梢血)と比較することにより、腫瘍のゲノムコピー数を求める(図 1)。

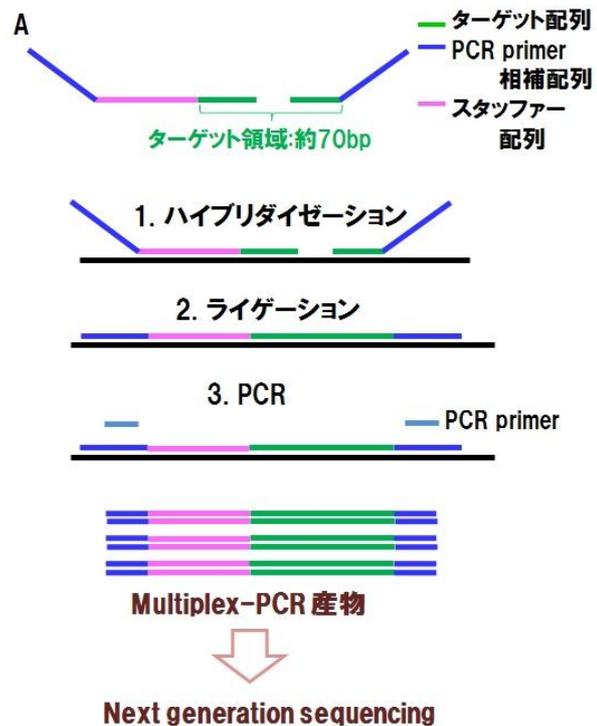


図1 digitalMLPAの原理

(2) digitalMLPA によるゲノムコピー数解析対象遺伝子として、234 遺伝子約 380 エクソンを対象とした。まず 40 歳未満健康男性末梢血ゲノム DNA を混合し、N=4 で実験し再現性を検証したところ、ゲノムコピー比(コピー比 1=2 コピー)のばらつきは 0.06 であった。腫瘍検体では 3p21 領域を含め一部領域に高頻度でコピー数変化が生じていたが、2 回の実験のコピー比の差は平均 0.1 - 0.15 であった。ばらつきが生じやすいプローブが数個存在するが、1.25 倍のコピー変動を捉える事が可能であった。まず CGH アレイ解析済みの検体を用いて、digitalMLPA でゲノムコピー数解析することで、結果の信頼性を検証した。

(3) シーケンスレベル変異は両腫瘍で変異が生じやすいことが知られている 81 遺伝子を対象とし、ターゲット NGS により解析を行った。digitalMLPA 解析対象すべてはカバーできていないが、Chromothripsis 様のゲノム変化しやすい遺伝子につき、シーケンスレベルの変異も捉えるようにした。

(4) RCC については、腫瘍で 3p の欠失は 9 割近い検体で確認できる。低侵襲的癌存在遺伝子診断法の確立を目指すため、尿や血清中の cell-free DNA を用いて検出するため、まず cell-free DNA の抽出法を検討した。市販の cell-free DNA 抽出キットを 3 種類比較した。末梢血、cell-free DNA、腫瘍 DNA の 3 種 DNA でコピー数比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) 3p21 領域の BAP1、SETD2、PBRM 遺伝子を含む周辺遺伝子や CDKN2A/2B は全エクソンを、TP53 や HIF1A 遺伝子は複数エクソンを対象とし、1 エクソンのみ対象の遺伝子も合わせて 234 遺伝子約 380 エクソンを一度にゲノムコピー数解析可能な手法を開発した。すでに CGH アレイ解析済みの検体で検証したところ、欠失が確認されている領域(図 2A 中赤で示したコピー比が大きく低下した領域、本図は我々の論文(Yoshikawa ら, PNAS. 113(47), 2016)の Figure 1 より転載)で、数エクソンから遺伝子単位で biallelic deletion が非連続で生じていた(Chromothripsis 様コピー数変化)。digitalMLPA では、特定の遺伝子エクソンを選択して解析しているため、biallelic deletion が連続しているように見えるが、それぞれ該当する遺伝子の欠失がエクソン単位で確認された。(図 2B)。2 回の実験結果を標記しているが、コピー比はほぼ一致しており、再現性が高いことも示された。よって digitalMLPA は微小なゲノムコピー数

変化を再現性よく捉えることが可能な有用な手法であることが示された。

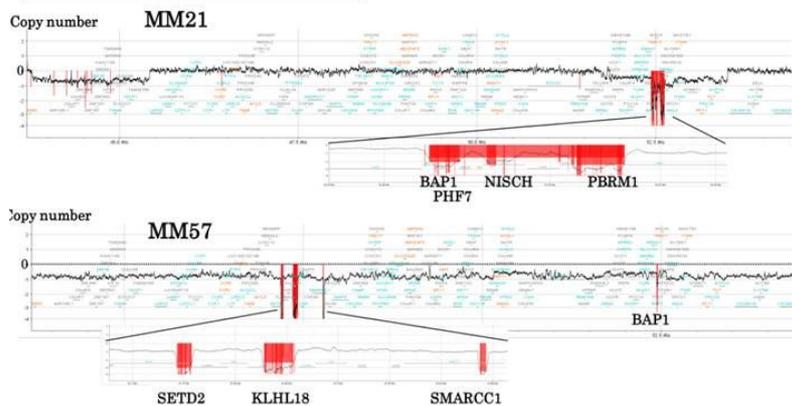
(2) MM については、70 検体解析した。本学では早期の MM しか外科手術の適応対象とならないため、手術摘出検体の腫瘍含量が少なくコピー数変化が小さいため、変化が monoallelic か biallelic かの判定が難しい検体が多かった。いずれの遺伝子も全くコピー数変化が検出されなかった検体も 1 割存在した。判断可能な検体内、BAP1 は biallelic deletion が 15 検体に検出された。これらの検体は、さらに PBRM1 と重複欠失が 4 検体、SETD2 との重複 3 検体、SMARCC1 とは 1 検体であった。これまで、MM では TP53 は変異しにくいと言われていたが、BAP1 と同様エクソン単位のコピー数変化が 7 検体に観察された。代表的な例を図 3 に示す。このエクソン単位の

コピー数変化が検出された検体については BAP1 領域と TP53 ではお互い排他的であった。MM では p16 コード遺伝子 CDKN2A(9p21)の欠失が良く知られており、我々の解析においても最も高頻度で biallelic deletion が確認された。このように 3p21, 9p21 に加え、TP53 でも Chromothripsis 様コピー数変化が生じており、激しいゲノムの分断と再構成が特定領域で生じていることが判明した。

(3) BAP1 の上流で細胞内局在を調節する遺伝子 X、また BAP1 の脱ユビキチン化ターゲット遺伝子で Y, Z も 10~20%程度でゲノムコピー数変化が確認された。一部は BAP1 には変異が確認されなかった。このことは、BAP1 に変異が無くても、本遺伝子の signal pathway に異常が生じている可能性を示しており、現在 X, Y, Z と BAP1 発現の相互作用や MM 発症への寄与を調べるプロジェクトを始めている。

(4) RCC については、尿からの cell-free DNA の回収量がいずれのキットを用いても少ないため断念した。血清から PME free-circulating DNA Extraction Kit(analytik Jena

A. 3p21領域のCGHアレイ解析



B. 3p搭載遺伝子のdigitalMLPA解析

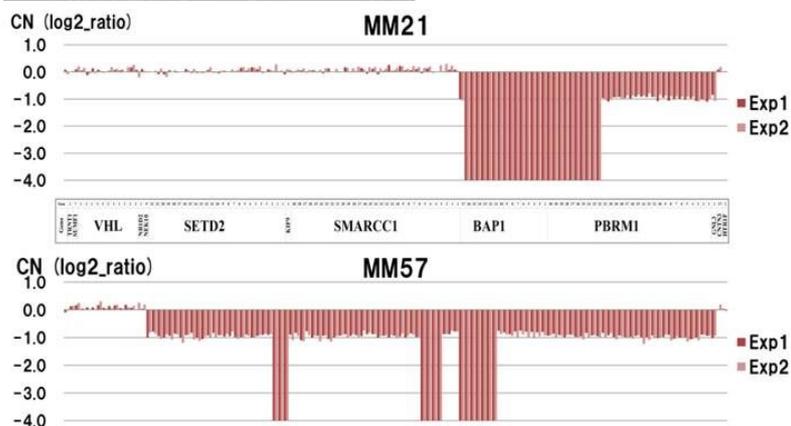


図2 悪性中皮腫2検体につき、高解像度CGHアレイ (A) と digitalMLPA (B) でゲノムコピー数解析した結果を比較。

このように 3p21, 9p21 に加え、TP53 でも Chromothripsis 様コピー数変化が生じており、激しいゲノムの分断と再構成が特定領域で生じていることが判明した。

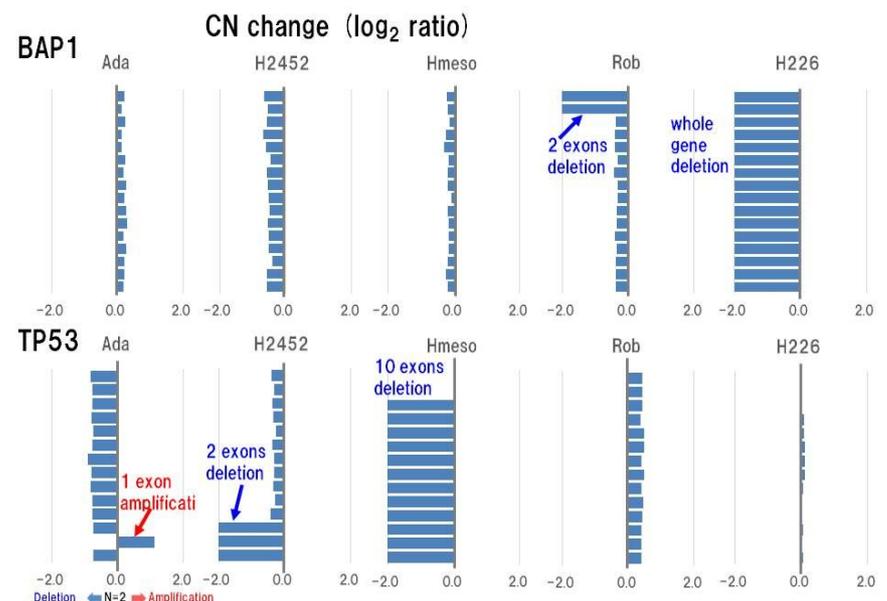


図3 BAP1 とTP53遺伝子に検出されたchromothripsis様欠失

社製)を用い、解析に必要な量の DNA が 6 割の患者から回収できた。24 名の患者末梢血、血清 cell-free DNA、腫瘍 DNA を用い 3 者比較を行った。腫瘍において、大半の検体の 3p は monoallelic deletion と判断され、MM とはコピー数変動状況が異なった。血清 cell-free DNA においても、BAP1 や特定遺伝子の軽度の欠失が確認されたが、腫瘍で検出された RCC に特徴的な VHL の欠失は確認されなかった。血清 cell-free DNA のコピー数変化は末梢血 DNA のコピー数変化(モザイク様の欠失と推定)に近かった。血清で検出されたコピー数変化の意味については、今後の検討課題である。

(5) MM で検出された Chromothripsis 様コピー数変化は、アスベスト曝露後の継続的な酸化ストレスによって生じた特徴的なパターンと推測された。本ゲノム変化は、遺伝子融合や逆位を生じさせた結果、異常な転写産物を生む。実際、BAP1 の一部エクソンの biallelic deletion 検体では、欠失エクソン以外からなる異常な転写産物を大量に発現していることが判明している。これら転写産物が、単なる BAP1 の loss of function のみならず、他の遺伝子の発現調節に関与している可能性がある。

(6) 胸水や腹水中の MM 細胞を濃縮し、MM の特徴的なゲノム変化を捉えることで、MM の補助診断への適用を目指している。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 03 件)

Pastorino, S., Yoshikawa, Y., Pass, H.I., Emi, M., Nasu, M., Pagano, I., Takinishi, Y., Yamamoto, R., Minaai, M., Hashimoto-Tamaoki, T., Ohmuraya, M., Goto, K., Goparaju, C., Sarin, K.Y., Tanji, M., Bononi, A., Napolitano, A., Gaudino, G., Hesdorffer, M., Yang, H., Carbone, M., A Subset of Mesotheliomas With Improved Survival Occurring in Carriers of BAP1 and Other Germline Mutations, J Clin Oncol (in Press), DOI 10.1200/JCO.2018.79.0352 査読有

Koyama S, Sato H, Wada M, Kawanami T, Emi M, Kato T., Whole-exome sequencing and digital PCR identified a novel compound heterozygous mutation in the NPHP1 gene in a case of Joubert syndrome and related disorders., BMC Med Genet. 18(1) 2017 37-41., doi: 10.1186/s12881-017-0399-2. 査読有

Yoshikawa Y, Emi M, Hashimoto-Tamaoki T, Ohmuraya M, Sato A, Tsujimura T, Hasegawa S, Nakano T, Nasu M, Pastorino S, Szymiczek A, Bononi A, Tanji M, Pagano I, Gaudino G, Napolitano A, Goparaju C, Pass HI, Yang H, Carbone M., High-density array-CGH with targeted NGS unmask multiple noncontiguous minute deletions on chromosome 3p21 in mesothelioma., Proc Natl Acad Sci U S A. 113(47) 2016 13432-13437. DOI: 10.1073/pnas.1612074113 査読有

[学会発表] (計 09 件)

江見充, 吉川良恵, 玉置(橋本)知子, 大村谷昌樹, Digital MLPA identifies large difference of frequency with homozygous deletion at CDK2A (p16) gene between in cultured cells and malignant mesothelioma tissues, 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年

吉川良恵, 大村谷昌樹, 玉置(橋本)知子, 江見充, Frequent detection of structural variations in TP53 gene of malignant mesothelioma by digital MLPA, 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年

江見充, 吉川良恵, 佐藤秀則, 大村谷昌樹, Yang Haining, Carbone Michele, 悪性中皮腫での高頻度なホモ接合性欠失: 環境がんでの観察, 日本人類遺伝学会第 62 回大会, 2017 年

吉川良恵, 江見充, 佐藤秀則, 大村谷昌樹, Carbone Michele, 悪性中皮腫集積家系患者の生殖細胞系列ゲノム DNA 解析, 日本人類遺伝学会第 62 回大会, 2017 年

江見充, 吉川良恵, 辻村亨, 長谷川誠紀, 中野孝司, Pass Harvey, Yang Haining, Carbone Michele, Multiple minute homozygous deletions on 3p12 in malignant mesothelioma, 第 76 回日本癌学会総会, 2017 年

吉川良恵, 大村谷昌樹, 玉置知子, 江見充, Detection of multiple minute genomic deletions by digital MLPA and target NGS in tumors, 第 76 回日本癌学会総会, 2017 年

江見充, BAP1 がん症候群、分子遺伝学および家系学による患者の同定, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年

吉川良恵, 江見充, 玉置知子, 悪性中皮腫における BAP1 遺伝子変異の日米比較, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年

Mitsuru Emi, Haining Yang, Michele Carbone, Founder BAP1 Mutation in Four American Families Predisposes to Malignant Peritoneal Mesothelioma, Uveal

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：玉置(橋本) 知子

ローマ字氏名：HASHIMOTO-TAMAOKI, tomoko

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：名誉教授

研究者番号(8桁): 10172868

研究分担者氏名：吉川 良恵

ローマ字氏名：YOSHIKAWA, yoshie

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 10566673

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山本 新吾

ローマ字氏名：YAMAMOTO, shingo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。