

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462010

研究課題名(和文) BAP1変異による食道癌発癌の機構解明と分子標的薬適応の可能性の検討

研究課題名(英文) Somatic alteration and depleted nuclear expression of BAP1 in human esophageal squamous cell carcinoma; survey for molecular targeted medicine

研究代表者

森 隆弘 (Mori, Takahiro)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00323030

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)：食道癌におけるBAP1遺伝子変異およびBAP1遺伝子を含む染色体領域の欠失を初めて確認した。F170I変異例ではBAP1遺伝子座が広汎にLOHを来していることが確認され、両alleleとも不活性化していた。HCF1を基質として脱ユビキチン化能を評価し、wildに比べて有意に低下していた。自己脱ユビキチン化能も評価し、低下していた。wildでは核内に存在しているのに対し、F170Iは細胞質に存在していることが確認した。マイクロアレイ解析で、wildとF170Iでは癌化経路に関する遺伝子発現に有意な差が認められた。切除標本において、食道扁平上皮癌の約40%にBAP1陰性例があることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified a novel somatic non-synonymous BAP1 mutation, F170I, in one of 49 patients with ESC. MLPA of BAP1 gene in this ESC tumor disclosed LOH, suggesting BAP1 alterations on both alleles in this tumor. The deubiquitinase activity and the auto-deubiquitinase activity of F170I-mutant BAP1 were markedly suppressed. In addition, wild-type BAP1 mostly localizes to the nucleus, whereas the F170I mutant preferentially localized in the cytoplasm. Microarray analysis revealed that expression of the F170I mutant drastically altered gene expression profiles compared with expressed wild-type BAP1, genes involved in oncogenic pathways. Furthermore, we found that the level of BAP1 expression in the nucleus was reduced in 44% of ESCs examined by immunohistochemistry (IHC). Because the nuclear localization of BAP1 is important for its tumor suppressor function, BAP1 may be functionally inactivated in substantial portion of ESCs.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：食道扁平上皮癌 BAP1遺伝子 脱ユビキチン化 癌化

1. 研究開始当初の背景

我々は以前より食道癌を対象とした分子生物学的解析を行ってきた。染色体欠失の検討から、染色体3番長腕(3p21付近)が高頻度に欠失している事を見いだした(Aoki, Mori, et al. *Genes Chromosomes Cancer*, 1994; 10(3); 177-82)。この領域の欠失は前癌病変dysplasiaより見られることを明らかにしており、食道癌発症の初期からの変化である可能性が高いことを示した(Mori et al. *Hum. Mol. Genet.* 1994; 3(11); 1969-71)。現在までに、この3p21付近の候補遺伝子で食道癌の発症初期の段階から遺伝子変異が確認された報告はない。

一方、我々は染色体17番長腕の17q21付近の家族性乳がん原因遺伝子BRCA1を含む領域の高頻度の欠失も同定した(Mori et al. *Cancer Res.* 1994; 54(7); 1638-40)。BRCA1自体に食道癌での遺伝子変異は報告されていないが、我々は免疫染色法により検討したところ、発現陽性の食道癌と(39例中24例)と陰性(39例中15例)に分けられる事を見いだした。さらにCaoらはfull lengthのbrca1を欠損させたマウスにおいて酸化ストレスの刺激により高頻度に食道癌を発症することを報告した(Cao et al. *Carcinogenesis*, 2007; 28(7); 1401-7)。以上の結果から、我々は3p21付近に存在する遺伝子の食道癌発症への関与、およびBRCA1の制御機構の破綻による食道癌発症メカニズムを予想した。

2. 研究の目的

BAP1は、BRCA1に結合する分子として同定された脱ユビキチン化酵素で、BRCA1の癌抑制能と考えられているDNA修復能を制御し、その遺伝子は3p21に存在する。これまで悪性黒色腫や悪性中皮腫などでの遺伝子変異の報告はあったが、消化器系の悪性腫瘍での報告はなかった(Goldstein,

A. M. *Nat Genet* 2011)。そこで我々はBAP1に着目し研究を開始した。

3. 研究の方法

本研究期間には新たな凍結標本およびパラフィン包埋標本から抽出済みの正常部・腫瘍部由来のgenomic DNAが計50症例分準備されており、食道扁平上皮癌症例でのMLPA法によるBAP1遺伝子領域の染色体欠失の有無とサンガー法によるBAP1遺伝子変異の有無を検討する。

さらに若年発症の食道癌でgermline mutationが疑われる例を認めた。既に食道癌患者末梢血由来のgenomic DNAは280症例分蓄積されており、BAP1遺伝子変異の有無を検索する。

4. 研究成果

食道癌におけるBAP1遺伝子変異およびBAP1遺伝子を含む染色体領域の欠失を初めて確認した。特にアミノ酸置換を伴うF170I変異を確認した例ではMLPA法によりBAP1遺伝子座が広汎にLOHを来していることが確認され、両alleleとも不活性化していることが示された。転写関連因子であるHCF1を基質として脱ユビキチン化能を評価したところ、本変異例ではwildに比べて有意に低下していることが確認された。自己脱ユビキチン化能も評価し、同様に低下していることを確認した。BAP1の自己脱ユビキチン化はBAP1内の核内移行シグナルのユビキチン化を来し、BAP1を細胞質へ移送することが報告されており、免疫染色法で評価し、wildでは核内に存在しているのに対し、F170Iは細胞質に存在していることが確認出来た。網羅的な遺伝子発現を調べると、wildとF170Iでは癌化経路に関係する遺伝子発現に有意な差が認められた。このように本変異によ

り局在および機能的に喪失することが確認出来た。実際の切除標本において、免疫組織化学的解析を行った結果、食道扁平上皮癌の約 40%に BAP1 陰性例があることを確認した。それらには核および細胞質ともに陰性である例と核陰性だが細胞質強陽性の例があることを発見した。別の腫瘍での報告例から、核と細胞質陰性例は **biallelic loss** である可能性が示唆される。一方で、核陰性で細胞質陽性例では本例のような LOH+脱ユビキチン化能低下を来す変異例であることが示唆された。最近の報告例から BAP1 の脱ユビキチン化能を制御する UBE2O の機能が報告され、公開されている食道癌での遺伝子変異からは UBE2O の遺伝子変異もあることから、BAP1 遺伝子変異のみならず、BAP1 脱ユビキチン化能を制御する遺伝子群の異常も発癌に関与している可能性が示唆された。

一方、**germline** で確認出来た遺伝子変異（あるいは稀な遺伝子多型）については現在、その病的な意義について検討中であるが、ミニジーンを利用したエクソン発現実験では、この変異を導入することで下流のエクソンの発現効率が低下することが示された。現在、東北メディカルメガバンクとの共同研究を提案し受理されており、健常人のゲノム情報との検討を行う予定であるが、発癌リスク因子である可能性もあり、国際特許に出願中である。

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. Takahashi M*, Chiba N*, Shimodaira H, Yoshino Y, Mori T, M Sumii M, T Nomizu T, C Ishioka C. OLA1 gene sequencing in patients with *BRCA1/2* mutation-negative suspected hereditary breast and ovarian cancer. *Breast Cancer in press* 査読有
2. Fujita H, Yoshino Y, and Chiba N. Regulation of centrosome cycle. *Molecular & Cellular Oncology* 査読有 3(2), 2016, e1075643 DOI:10.1080/23723556.2015.1075643
3. Mori T, Sumii M, Fujishima F, Ueno K, Emi M, Nagasaki M, Ishioka C, Chiba N. Somatic alteration and depleted nuclear expression of BAP1 in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 査読有 2015 Jun 17. doi: 10.1111/cas.12722. [Epub ahead of print] Volume 106, Issue 9, pages 1118-1129, September 2015 (Correspond. Author)
4. Masahiro Hiratsuka, Hiroshi Yamashita, Fumika Akai, Hiroki Hosono, Eiji Hishinuma, Noriyasu Hirasawa, Takahiro Mori Genetic Polymorphisms of Dihydropyrimidinase in a Japanese Patient with Capecitabine-Induced Toxicity. *PLOS ONE.* 査読有 Published: April 27, 2015 DOI: 10.1371/journal.pone.0124818 (Co first-author)
5. 千葉 奈津子, BRCA1 結合分子 OLA1 の中心体制御能とゲノム安定性の維持機構 生化学、査読無、87 巻、2015、741-743
6. Shoko Akiyama, Kanako Kumasaka, Mitsunori Miyashita, Makio Gamoh, Seiichi Kobayashi, Seiji Chubachi, Hiroshi Ishii, Yuko Sato, Takahiro Mori and Chikashi Ishioka. A survey of the influence of patients' residential areas on satisfaction levels in cancer care at designated hospitals. *Ann Oncol*(2014) 25 (suppl 5): v67. doi: 10.1093/annonc/mdu435.97 査読無
7. Shukuei Ito, Masanobu Takahashi, Shunsuke Sugiyama, Ken Saijyou, Hiroshi Soeda, Natuko Chiba, Takahiro Mori, Hideki Shimodaira, Shunsuke Katou and Chikashi Ishioka. Efficacy and safety of pazopanib for unresectable soft tissue sarcoma: a retrospective study. *Ann Oncol* (2014) 25 (suppl 5): v75. doi: 10.1093/annonc/mdu436.3 査読無
8. Soeda H, Shimodaira H, Gamoh M, Ando H, Isobe H, Suto T, Takahashi S, Kakudo Y, Amagai K, Mori T, Watanabe M, Yamaguchi T, Kato S, Ishioka C. Phase II trial of cetuximab plus irinotecan for oxaliplatin- and irinotecan-based chemotherapy-refractory patients with advanced and/or metastatic colorectal cancer: evaluation of efficacy and safety based on KRAS mutation status (T-CORE0801). *Oncology.* 2014;87(1):7-20. doi: 10.1159/000360989. Epub 2014 Jun 24. 査読無
9. 千葉 奈津子, BRCA1 とその新規結合分子

OLA1 による中心体制御能と乳がん発症機構 実験医学、査読無、32 巻、2014、908-910

10. 松澤 綾子、千葉 奈津子、家族性乳がん原因遺伝子産物 BRCA1 の新規結合分子 OLA1 の中心体制御機構、細胞工学、査読無、33 巻、2014、432-433
11. Matsuzawa A, Kanno S, Nakayama M, Mochiduki H, Wei L, Shimaoka T, Furukawa Y, Kato K, Shibata S, Yasui A, Ishioka C, and Chiba N. The BRCA1/BARD1-interacting protein OLA1 functions in centrosome regulation. *Molecular Cell*, 査読有 53(1), 2014, 101-114, DOI:10.1016/j.molcel.2013.10.028

[学会発表](計 33 件)

1. 吉野 優樹、千葉 奈津子 他、BRCA1 結合分子 OLA1 の中心体制御機構の解析、第 33 回染色体ワークショップ 第 14 回核ダイナミクス研究会、2016 年 1 月 13 日、松島一の坊(宮城県・松島町)
2. Fujita H, Chiba N et al, OLA1 and BRCA1/BARD1 heterodimer cooperatively regulate centrosome replication and carcinogenesis. 第 38 回分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
3. 小峰啓吾, 小林輝大, 伊藤祝栄, 大石隆之, 岡田佳也, 今井源, 西條憲, 高橋昌宏, 高橋雅信, 高橋信, 城田英和, 千葉奈津子, 下平秀樹, 森隆弘, 石岡千加史: 切除不能進行再発大腸癌に対する regorafenib と TAS102 の治療効果に関する後方視的検討. 第 53 回日本癌治療学会学術集会(京都、国立京都国際会館)2015 年 10 月 31 日. ポスター
4. 藤田 拓樹、千葉 奈津子 他、BRCA1 結合分子 OLA1 の中心体制御能の破綻による発がん機構、第 23 回 DNA 複製・組み換え・修復ワークショップ、2015 年 10 月 21 日、焼津グランドホテル(静岡県・焼津市)
5. 森隆弘, 千葉奈津子, 江見充, 石岡千加史, 藤島史喜: ヒト食道扁平上皮癌での BAP1 遺伝子変異は脱ユビキチン化能を低下させ細胞内局在を変化させる. 第 74 回日本癌学会学術総会(名古屋、名古屋国際会議場)2015 年 10 月 8 日.
6. 沖田啓, 大石隆之, 高橋雅信, 岡田佳也, 小峰啓吾, 今井源, 西條憲, 高橋昌宏, 城田英和, 高橋信, 森隆弘, 下平秀樹, 石岡千加史: 神経内分泌腫瘍に対してエベロリムスを投与した 6 例の安全性に関する

後方視的検討. 第 3 回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会(仙台、仙台市民会館)2015 年 9 月 12 日. ポスター

7. 森隆弘: 現在のがんの標準治療(外科療法・化学療法・放射線療法). がんの標準治療とがん患者ケアに関する研修会(気仙沼、気仙沼保健所)2015 年 8 月 20 日. 講演
8. 大石隆之, 高橋雅信, 大内康太, 高橋秀和, 今井源, 高橋昌宏, 森隆弘, 加藤俊介, 下平秀樹, 石岡千加史: 東北大学病院腫瘍内科においてエベロリムスを投与した 8 例の有効性と安全性に関する後方視的検討. 第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会(札幌、札幌市教育文化会館)2015 年 7 月 16 日. ポスター
9. Mori, T., Sumii, M., Fujishima, F., Ueno, K., Emi, M., Nagasaki, M., Ishioka, C., Chiba, N.: Somatic alteration and depleted nuclear expression of BAP1 in human esophageal squamous cell carcinoma. AACR Annual Meeting 2015, Apr. 22, 2015. Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, USA).
10. 大石隆之, 高橋雅信, 塩野雅俊, 高橋昌宏, 角道祐一, 森隆弘, 加藤俊介, 下平秀樹, 石岡千加史: 東北大学病院腫瘍内科におけるエベロリムス投与例 6 例の安全性に関する後方視的検討. 第 112 回日本内科学会講演会(京都、みやこめせ)2015 年 4 月 11 日.
11. 松澤 綾子、千葉 奈津子 他、家族性乳がん原因遺伝子産物 BRCA1 の新規関連分子の中心体制御能の解析、第 32 回染色体ワークショップ 第 13 回核ダイナミクス研究会、2014 年 12 月 16 日、安芸グランドホテル(広島県・廿日市)
12. 千葉 奈津子 他、新規 BRCA1/BARD1 結合分子 OLA1 は中心体複製機構に関与する、第 37 回分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
13. 藤田 拓樹、千葉 奈津子 他、BRCA1 の新規結合分子 OLA1 の中心体制御能の破綻と発がん機構、第 37 回分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
14. 千葉 奈津子、BRCA1 の新規結合分子 OLA1 の機能破綻と発がん機構、遺伝性腫瘍 基礎と臨床の懸け橋 第 73 回日本がん学会学術総会、2014 年 9 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
15. 平塚真弘、山下洋、赤井文香、細野寛貴、平澤典保、森隆弘 カペシタビン投与により重篤副作用を発現した患者及びその家族のジヒドロピリミジナーゼ遺伝子多型と尿中ピリミジン解析 第 24 回日本医療薬学会年

- 会 名古屋国際会議場(名古屋) (2014年9月) 優秀演題賞受賞
16. 伊藤祝栄, 高橋雅信, 杉山俊輔, 小峰啓吾, 添田大司, 千葉奈津子, 森隆弘, 下平秀樹, 加藤俊介, 石岡千加史: 切除不能軟部肉腫に対する pazopanib の効果と忍容性に関する後方視的解析. 第52回日本癌治療学会学術集会(パシフィコ横浜、横浜市)2014年8月29日. 口演
 17. 下平秀樹, 高橋信, 高橋雅信, 高橋昌宏, 西條憲, 城田英和, 小峰啓吾, 今井源, 森隆弘, 石岡千加史: 進行再発胆道癌におけるゲムシタピン+シスプラチン併用療法の治療効果と安全性. 第52回日本癌治療学会学術集会(パシフィコ横浜、横浜市)2014年8月29日. 口演
 18. 佐藤悠子, 西條憲, 井上正広, 添田大司, 坂本康寛, 塩野雅俊, 高橋雅信, 高橋信, 角道祐一, 城田英和, 秋山聖子, 下平秀樹, 森隆弘, 加藤俊介, 石岡千加史: 骨転移を有する進行癌35例に対するデノスマブの有効性と安全性に関する後ろ向き解析. 第52回日本癌治療学会学術集会(パシフィコ横浜、横浜市)2014年8月29日. ポスター
 19. 高橋雅信, 千葉奈津子, 野水整, 住井真紀子, 森隆弘, 下平秀樹, 石岡千加史: BRCA1/2 遺伝子変異陰性の家系内集積を認める乳がん・卵巣がん患者におけるOLA1 遺伝子の変異解析. 第12回日本臨床腫瘍学会学術集会(福岡国際会議場、福岡市)2014年7月19日. ポスター
 20. 秋山聖子, 熊坂夏菜子, 宮下光令, 蒲生真紀夫, 小林誠一, 中鉢誠司, 石井洋, 佐藤悠子, 森隆弘, 石岡千加史: がん薬物療法中のがん患者の意識調査研究—患者居住地と医療機関所在地の二次医療圏が同一である患者と相違する患者との比較検討. 第12回日本臨床腫瘍学会学術集会(福岡国際会議場、福岡市)2014年7月19日. 一般口演
 21. 伊藤祝栄, 高橋雅信, 杉山俊輔, 西條憲, 添田大司, 千葉奈津子, 森隆弘, 下平秀樹, 加藤俊介, 石岡千加史: 切除不能軟部肉腫に対するパゾパニブ効果と安全性に関する後方視的解析. 第12回日本臨床腫瘍学会学術集会(福岡国際会議場、福岡市)2014年7月17日. ポスター
 22. 熊坂夏菜子, 秋山聖子, 森隆弘, 石岡千加史: 居住地医療圏外のがん診療連携拠点病院で化学療法を受けるがん患者の意識調査. 第16回日本医療マネジメント学会学術総会(岡山コンベンションセンター、岡山市)2014年6月14日. 口演
 23. 秋山聖子, 熊坂夏菜子, 宮下光令, 森隆弘, 石岡千加史: 宮城県医師会員を対象としたがん地域医療連携に関する意識調査. 第111回日本内科学会講演会(東京国際フォーラム、東京)2014年4月13日. ポスター
 24. Chiba N. Functional analysis of the tumor suppressor BRCA1. Symposium on Genome Integrity in Cancer and Aging under Academic Agreement with Center for Healthy Aging (CEHA) University of Copenhagen Denmark, 2014年3月10日、加齢医学研究所(宮城県・仙台市)
 25. 千葉 奈津子, HBOC 基礎研究 BRCA1 の機能評価法の開発と新規 BRCA1 の結合分子 OLA1 の機能の破綻による発がんメカニズム、第2回日本 HBOC コンソーシアム学術集会、2014年1月18日、東京医科歯科大学 鈴木章夫記念講堂(東京都・文京区)
 26. 森隆弘: 地域がん医療における病診連携の必要性と課題. 第4回がん治療病診連携セミナー(TKPガーデンシティ仙台、仙台市)2013年11月14日.
 27. 千葉 奈津子, 家族性乳がん原因遺伝子 BRCA1 の新規結合分子の同定とそのがん抑制能の解明、乳がんにおける基礎・臨床の最前線、第72回日本がん学会学術総会、2013年10月4日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
 28. 森隆弘, 住井真紀子, 佐藤秀則, 江見充, 石岡千加史, 千葉奈津子 食道扁平上皮癌でのBAP1遺伝子変異により脱ユビキチン化酵素活性が低下する 第72回日本癌学会学術総会(2013年10月3日、パシフィコ横浜、横浜市)
 29. 佐藤悠子, 秋山聖子, 伊藤祝栄, 古澤義人, 宮下光令, 中野弘枝, 小笠原喜美代, 小幡泉, 森隆弘, 石岡千加史 第11回日本臨床腫瘍学会学術集会(2013年8月30日、仙台国際センター、仙台市) がん患者の利用できるシンボルマークの必要性と外出に対する意識調査。
 30. 森隆弘, 根本建二, 吉岡孝志, 石田卓, 阿部正文, 西條康夫, 青山英史, 石岡千加史 第11回日本臨床腫瘍学会学術集会(2013年8月30日、仙台国際センター、仙台市) Tohoku Cancer Professional Training Promotion Plan / 東北がんプロフェッショナル養成推進プランによる地域がん医療再生
 31. 森隆弘, 木皿重樹, 久道周彦, 石岡千加史 Clinical trial using cancer/testis antigen- and/or VEGFR1/2-derived peptide-vaccine cocktails 第11回日本臨床腫瘍学会学術集会(2013年8月29日、仙台国際センター、仙台市)
 32. 秋山聖子, 上原厚子, 菅原しのぶ, 小笠原喜美代, 柴田弘子, 河原正典, 三浦正悦, 武藤真祐, 森隆弘, 石岡千加史 A workshop promoting and spreading team medical care and regional collaboration for cancer patients / 厚生労働省平成24年度チーム医療普及推進事業による「がん薬物療法地域連携チーム医療」ワークショップ 第11回日本臨床腫瘍学会学術集会(2013年8月29日、仙台国際センター、仙台市)
 33. 秋山聖子, 木皿重樹, 佐藤悠子, 瀬谷裕貴子, 菊地正史, 蒲生真紀夫, 小林誠一,

西和哉, 森隆弘, 石岡千加史 An effective educational strategy to promote and spread team medical care and regional collaboration / 「がん薬物療法地域連携チーム医療」ワークショップー厚生労働省平成24年度チーム医療普及推進事業活動報告ー第11回日本臨床腫瘍学会学術集会 (2013年8月29日, 仙台国際センター、仙台市)

〔図書〕 (計 1 件)

1, 吉野 優樹, 千葉 奈津子. 医薬ジャーナル社 インフォームドコンセントのための図説シリーズ 抗悪性腫瘍薬-分子標的治療薬-改訂版 V. 分子標的治療薬を含む標準的治療 4) 乳がん 2015 p173-174

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 食道癌の発症リスクを判定する方法及びキット

発明者: 森 隆弘

権利者: 東北大学

種類: 特許権

番号: 2015-508225

出願年月日: 平成 27 年 10 月 27 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 隆弘 (Mori Takahiro)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 00323030

(2) 研究分担者

千葉 奈津子 (CHIBA Natsuko)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号: 50361192

(3) 連携研究者

()

研究者番号: