

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04978

研究課題名(和文)日本人標準ゲノムとジャポニカアレイを用いた子宮内膜症発症の遺伝要因解明

研究課題名(英文)Clarification of genetic factors of endometriosis onset using Japanese standard genome reference and Japonica array

研究代表者

八重樫 伸生 (YAEGASHI, Nobuo)

東北大学・大学病院・教授

研究者番号：00241597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症の悪性化病変である卵巣明細胞癌を対象にZNF217遺伝子を含む領域のコピー数増加、HNF1B遺伝子領域のコピー数増加、CDKN2A遺伝子、ARID3A遺伝子領域のコピー数減少ならびに8番染色体長腕に有意なピークを認めた。血栓塞栓症を発症した群としなかった群でコピー数に有意な差を認めた血液凝固関連遺伝子3遺伝子を特定した。これらの遺伝子の増幅は、明細胞癌に特徴的な変化であることを確認した。WEAではAPOBEC関連塩基変異が明細胞癌において特徴的な変化であることを発見し、明細胞癌の発生にAPOBECによる塩基変異が寄与することを初めて報告した。

研究成果の概要(英文)：We clarified that increase of copy number of the region containing ZNF217 gene and HNF1B gene region, decrease of copy number of CDKN2A gene and ARID3A gene region in ovarian clear cell carcinoma (OCCC). A significant peak on long arm of chromosome 8 was also observed in OCCC. We confirmed that amplification of three coagulation - related genes in OCCC. We discovered that APOBEC-related base mutation is a characteristic change in OCCC and reported for the first time that base mutation by APOBEC contributes to the development of OCCC.

研究分野：産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学 子宮内膜症 卵巣明細胞癌 遺伝要因 遺伝子異常

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は月経困難症ならびに骨盤痛を生じる良性疾患であり、その頻度は有経女性の35~50%(Giudice LC. Lancet, 2004)に認められる。我々は、子宮内膜症組織においては正常子宮内膜と異なり、erythropoietinならびにerythropoietin receptorの高発現が認められること(Matsusaki S, Hum Reprod 2003)、60-kD stress-responsive proteinの活性化が確認されること(Noda T, Am J Reprod Immunol 2003)、cyclooxygenase-2 inhibitor が抑制的に作用していること(Ozawa Y, Fertil Steril 2006)、さらにsteroidogenic acute regulatory proteinならびにtranscription factor steroidogenic factor-1が高発現していること(Attar E, JCEM 2009, Utsunomiya H, Mol Endocrinol 2008)などの細胞生物学的特徴を報告してきた。このような子宮内膜症で観察される特徴の多くは患者本来が持っている遺伝的要因に深く関与するといわれているが詳細は不明のままである。子宮内膜症発生に関する遺伝的形質の検討としては genome-wide association study (GWAS)を用いた報告(Uno S. Nat Genet, 2010)がなされているが、これはアリル頻度5%以上の遺伝子多型のみを検出する手法であるため、報告された遺伝子CDK2BAS中のSNP(一塩基多型)が子宮内膜症発生に關するオッズ比は高々1.44に留まっており、GWAS解析ではこれ以上の遺伝的要因を解明するには限界があるとされている。東北メディカルメガバンク事業(ToMMo)は被災地の長期健康調査と次世代医療開発を目標とする現在進行中の国家プロジェクトであるが、われわれはその遂行の中心的役割を担っている。特にToMMo事業では地域住民健康診査の受診者からリクルートした一般健康人の血液検体を対象として、深度30以上という極めて高精度の全ゲノム遺伝子解析を次世代シーケンサーを用いて進めてきた。2013年秋には健康な日本人1,000人の全ゲノム塩基配列の解読終了を報告し、その結果の一部はすでに日本人標準ゲノムリファレンスパネルとして一般公開されている(<http://www.megabank.tohoku.ac.jp/news/5696>)。それによると一般健康人のアリルには頻度1%未満という低頻度の遺伝子変異を含めると2,200万箇所に一塩基多型が確認され、そのうち1,200万箇所が全く新規の変異として検出された。この結果を受けてToMMoでは日本人に適したカスタムアレイを開発し、2014年中にはジャポニカアレイV.1として実装予定となっている。本アレイは連鎖不均衡の概念を利用することで次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を行わなくとも全ゲノムの90%以上の領域の遺伝子多型をカバーできるように設計されたImputation arrayである。ジャポニカアレイの開発により、次世代シーケンサーを用いた解析に比べ遺伝子変異の検出が大幅にコ

ストダウンされ、かつ迅速に行えるようになった。

一方で、子宮内膜症は表層上皮性卵巣癌である類内膜腺癌および明細胞腺癌の発生母地である可能性が指摘されている(Cuesta RS. Gynecol Oncol, 1996; Somigliana E. Gynecol Oncol, 2006)。特に明細胞腺癌は複数の臨床研究成績のmeta-analysis結果から化学療法抵抗性の予後不良な組織型であることが確認されており(Lee YY. Gynecol Oncol, 2011)。我々が行った多施設共同後方視的解析においても、卵巣明細胞腺癌は若年者に対する妊孕能温存治療の積極的適応が困難である事実を報告している(Satoh T, JCO 2010)。従って子宮内膜症との関連性が示唆される表層上皮性卵巣癌では、特に卵巣明細胞腺癌の発生との関連性を詳細に検討することが臨床上也極めて重要な研究であると考えた。しかし、子宮内膜症が悪性転化する詳細な遺伝学的メカニズムに関してはいまだ不明である。現在のところ、子宮内膜症組織においては卵巣腫瘍抑制性遺伝子の27.5%にLOHが確認され(Jian X. Cancer Res, 1996)。代表的なLOHおよびmutationはPTEN遺伝子領域である10q23.3(Sato N. Cancer Res, 2000)、TP53遺伝子領域である17p13.1(Schuijjer M. Hum Mutant, 2003)およびARID1A(Wiegand KC, N Engl J Med, 2010)領域に高頻度であることが報告されているが、全ゲノム領域を対象とした総合的解析は行われていない。近年、悪性腫瘍の発生過程における新たな遺伝子学的異常としてsomatic copy-number alteration (SCNAs)(Beroukhi R. Nature 2010)が特に注目されている。OncoScanは全ゲノム領域でのコピー数増減を比較的簡便に検出することができる最近開発された機器であるが、子宮内膜症や明細胞腺癌での解析は報告されていない。OncoScan解析とジャポニカアレイ解析を組み合わせることで子宮内膜症の癌化過程における遺伝子の数的異常と変異による異常を総合的に同定することが可能である。

あらゆる疾患が、程度の差こそあれ“遺伝的要因と環境要因の両者が絡み合って発症する”と言われている。従来の子宮内膜症の発症から癌化への過程を検討した研究では両者を同時並行で解析したものはほとんどなかった。

2. 研究の目的

子宮内膜症の発生とその癌化の一連の過程には遺伝的要因と環境要因の双方が関与していると考えられる。子宮内膜症患者の血液の全ゲノム配列を東北メディカルメガバンクで開発したジャポニカアレイによって疑似フルシーケンシングし、日本人標準ゲノムリファレンスパネルと比較することで、子宮内膜症発症の遺伝的要因を明らかにする。さらに子宮内膜症の癌化過程で変化するsomatic copy-number alteration (SCNAs)をOncoScan

で解析し、ジャポニカアレイ解析と組み合わせることで、全ゲノム領域での遺伝子上の変化を解明し、内膜症発症から癌化に至る環境要因を推定する基盤を提供する。個人が生来持っている遺伝的要因と環境によって変化する遺伝子変異を総合的に解析することで、子宮内膜症の予防法、治療法、予知法の開発につながる。

3. 研究の方法

東北大学病院産婦人科で手術した子宮内膜症患者の血液検体、子宮内膜症および卵巣明細胞腺癌の手術摘出組織検体を用いて以下の遺伝子解析を行う。東北メディカルメガバンク事業で開発されたジャポニカアレイを用いた高精度遺伝子多型変異解析(疑似フルシーケンス) OncoScan を用いた全ゲノム上の遺伝子コピー数増減 somatic copy-number alteration (SCNAs)解析を行う。東北メディカルメガバンク事業の成果である日本人標準ゲノムレファレンスパネルとの比較をバイオインフォマティクス解析することで子宮内膜症発症の遺伝的要因を解明するとともに、子宮内膜症の癌化に関する遺伝子変異を総合的に解明する。

4. 研究成果

本研究においては、子宮内膜症の発生機序ならびに子宮内膜症の悪性転化による卵巣明細胞癌の発生機序について、患者血液を対象にジャポニカアレイを用いた疑似フルシーケンスおよび OncoScan を用いた copy number alteration(CAN)の両面からの解析を行い、両疾患の遺伝子学的特徴と遺伝的関連性について解明することを目的とした。29年度は28年度に引き続き卵巣明細胞癌のジャポニカアレイを用いた遺伝子コピー数解析ならびに somatic mutation の解析を行った。卵巣明細胞癌 69 症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本からゲノム DNA を抽出し、ジャポニカアレイによる CNA 解析と全エクソーム(WEA)解析を行った。53 症例の遺伝子コピー数解析の結果、最も有意なコピー数増加のピークを認めたゲノム座標は ZNF217 遺伝子を含む領域であった。この遺伝子の発現は卵巣明細胞癌で増加していることが報告されており、同遺伝子の増幅をピンポイントで抽出できたことは、日本人ゲノムに最適化されたジャポニカアレイの優位性を示していると考えられる。その他、HNF1B 遺伝子領域のコピー数増加、CDKN2A 遺伝子、ARID3A 遺伝子領域のコピー数減少ならびに8番染色体長腕に有意なピークを認めた。また、卵巣明細胞癌で特に合併することが多い血栓塞栓症を発症した群としなかった群でコピー数に有意な差を認めた血液凝固関連遺伝子3遺伝子を特定した。これらの遺伝子の増幅は、TCGA データベース上、明細胞癌以外の上皮性卵巣悪性腫瘍の組織型では確認できておらず、明細胞癌に特徴的な変化であることを確

認した。WEA では APOBEC 関連塩基変異が明細胞癌において特徴的な変化であることを発見し、明細胞癌の発生に APOBEC による塩基変異が寄与することを初めて報告した。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Shibuya Y, Tokunaga H, Saito S, Shimokawa K, Katsuoka F, Bin L, Kojima K, Nagasaki M, Yamamoto M, Yaegashi N, Yasuda J.

Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinoma with next generation sequencing.

Genes Chromosomes Cancer. 2018

Feb;57(2):51-60. (査読有)

doi: 10.1002/gcc.22507. Epub 2017 Oct 30.

[学会発表](計 8 件)

Yusuke Shibuya, Sakae Saito, Kaname Kojima, Bin Li, Hideki Tokunaga, Masao Nagasaki, Jun Yasuda, Nobuo Yaegashi

Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinomas with next generation sequencing

SRI 65th Annual Scientific Meeting

(Orlando, USA Mar. 2018)

Yusuke Shibuya, Sakae Saito, Kaname Kojima, Bin Li, Hideki Tokunaga, Masao Nagasaki, Jun Yasuda, Nobuo Yaegashi

Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinomas with next generation sequencing

第59回 日本婦人科腫瘍学会 学術講演会 (くまもと県民交流会パレオ、熊本市、2017年7月28日)

Yusuke Shibuya, Sakae Saito, Kaname Kojima, Bin Li, Hideki Tokunaga, Masao Nagasaki, Jun Yasuda, Nobuo Yaegashi

Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinomas with next generation sequencing

第69回 日本産婦人科学会 学術講演会 (広島グリーンアリーナ、広島市、2017年4月14日)

Yusuke Shibuya, Hideki Tokunaga, Sakae Saito, Kaname Kojima, Bin Li, Masao Nagasaki, Jun Yasuda, Nobuo Yaegashi

Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell

carcinomas with next generation sequencing (poster)
SRI 64th Annual Scientific Meeting
(Orlando, Mar 2017)

Yusuke Shibuya, Hideki Tokunaga, Sakae Saito, Kaname Kojima, Bin Li, Masao Nagasaki, Jun Yasuda, Nobuo Yaegashi
Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinomas with next generation sequencing (poster)
NIH-Japan-JSPS Symposium (東北大学星陵キャンパス星陵オーデトリウム、宮城県仙台市、2017年2月15-17日)

Yusuke Shibuya, Hideki Tokunaga, Sakae Saito, Kaname Kojima, Bin Li, Masao Nagasaki, Jun Yasuda, Nobuo Yaegashi
Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinomas with next generation sequencing (poster)
第75回日本癌学会総会(パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2016年10月6日)

Yusuke Shibuya, Hideki Tokunaga, Sakae Saito, Kaname Kojima, Bin Li, Masao Nagasaki, Jun Yasuda, Nobuo Yaegashi
Discovery of gene alterations causing ovarian clear cell carcinoma (poster)
第85回日本婦人科腫瘍学会学術講演会(米子コンベンションセンター、鳥取県米子市、2016年7月9日)

Yusuke Shibuya, Jun Yasuda, Hideki Tokunaga, Sakae Saito, Bin Li, Nobuo Yaegashi
Discovery of gene alterations causing ovarian clear cell carcinoma. (poster)
13th International Congress of Human Genetics (国立京都国際会館、京都市、2016年4月3-7日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八重樫 伸生 (YAEGASHI, Nobuo)

東北大学・大学病院・教授

研究者番号: 00241597

(2) 研究分担者

安田 純 (YASUDA, Jun)
東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授
研究者番号: 00281684

高橋 史朗 (TAKAHASHI, Fumiaki)
東北大学・大学病院・特任准教授
研究者番号: 20365183

鈴木 史彦 (SUZUKI, Fumihiko)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 20400343

(3) 連携研究者

渡部 洋 (WATANABE, Yoh)
東北医科薬科大学・医学部・教授
研究者番号: 80231009

(4) 研究協力者

徳永 英樹 (TOKUNAGA, Hideki)
渋谷 祐介 (SHIBUYA, Yusuke)