

令和元年6月18日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08335

研究課題名(和文) 若年性大腸癌の発症における新規原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) Analysis of responsible genes in early-onset colorectal cancer

研究代表者

赤木 究 (Akagi, Kiwamu)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・病院 腫瘍診断・予防科・科長(兼)部長

研究者番号：30244114

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)：本研究では、当院における40歳以下で発症した大腸癌症例のうち10症例を選択してWhole Transcriptomeを行い、全遺伝子の発現量と発現遺伝子に含まれる変異を解析した。発現量については同時に解析を行ったMSI-H大腸癌と比較してFDR<0.05で有意に発現変動している遺伝子群を抽出した結果、発現上昇しているものにはZinc Finger Protein Familyが多く含まれていた。変異解析では、若年症例ではTP53の変異頻度が非常に高い可能性が示唆された。また、遺伝性腫瘍に関連する変異としてDyskeratosis congenitaの原因遺伝子であるDKC1が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、若年の大腸がん患者においては家族歴やPhenotypeに関係無く、網羅的な遺伝子解析が必要である可能性が示唆された。今回検出されたDKC1遺伝子は、Dyskeratosis congenitaの原因遺伝子として知られており、発端者のバリエーションはより重症例で発見されている。しかし、今回のケースは、貧血と大腸がんはあるものの、その他のPhenotypeが弱く、何年も原因が不明のままであった。本研究により、発端者はすでに死亡していたものの、血縁者に原因を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Early-onset malignant tumors are supposed to have frequently genetic background. In recent study, some sort of pathogenic germline mutations were detected by 8.5% of patients affected malignant tumor under twenty. Moreover, even if limited to the colorectal cancer (CRC), 35% of the patients were diagnosed as hereditary colorectal cancer syndrome. These frequency in two studies was much higher than in the general population and both of them indicated many cases unrelated to familial history and phenotypes. Consequently, some genetic approach was recommended for juveniles affected cancer. In this study, based on the background, 10 cases of early-onset (under 40 years old) CRC was analyzed using RNA-Seq. As a result, compared with typical colon cancers, zinc finger protein family were expressed significantly higher. On the other hand, pathogenic germline mutations was found in DKC1.

研究分野：腫瘍遺伝学

キーワード：若年がん 大腸がん シーケンス DKC1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝性大腸がんについて

大腸癌の発症は年々増加傾向にあり、日本における罹患率は全がんの中でも2位と胃癌に次いで最も高頻度に罹患する腫瘍である。また、その死亡数は男性3位(25,529人)、女性1位(21,747人)であり(癌の統計2013)、大腸癌の予防・診断・治療のさらなる向上が求められている。大腸癌発症要因としては、多くが遺伝性を示さない(あるいは遺伝性が明らかではない)散発性大腸癌であり、一方で遺伝的要因が関与するとされる大腸癌(遺伝性大腸癌)も10%程度であると推計されている。本邦では2012年に「遺伝性大腸癌診療ガイドライン」が発刊され、遺伝性大腸癌のなかでも特に頻度が高く、原因遺伝子が特定されている Lynch 症候群(LS)と家族性大腸腺腫症(FAP)に対する日常診療における指針が示された。これらの遺伝性大腸癌の診療において、典型的な臨床症状や家族歴を有する場合にはこれらの所見に基づく診断で概ね十分な対応が行われているが、多様な臨床所見を示すことがあり、診断に苦慮するケースも少なくない。

(2) 若年大腸がんについて

若年発症の悪性腫瘍はその背景に生殖細胞系列の遺伝的要因が存在する可能性が高いと考えられている。近年、20歳以下で悪性腫瘍を発症した患者のうち、8.5%に何等かの病的変異が検出された事が報告され、一般集団(1000Genome Project)におけるその頻度(1.1%)と比較してはるかに高頻度である事が見いだされた(N Engl J Med. 2015 Dec 10;373(24):2336-46.)。また、大腸癌に限局しても35歳以下で発症した大腸癌患者のうち35%が遺伝性大腸癌症候群と考えられ、一般集団(2-5%)と比較して非常に頻度が高い事が報告されている(J Clin Oncol. 2015 Nov 1;33(31):3544-9.)。当院では大腸がん2129例のうち40歳未満の発症例が30例存在し、このうち4例はリンチ症候群が確定している。残りの26症例は少なくともリンチ症候群では無い可能性が高いことが明らかになっているが、詳細な遺伝的背景については不明である。

2. 研究の目的

当院の若年者(40歳未満)に発症した大腸がんを解析し、その分子生物学的特徴と、新たな胚細胞変異を明らかにする。

3. 研究の方法

大腸がん凍結組織サンプルより、Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてDNAとRNAを抽出した。抽出したRNAから、TruSeq RNA Access Library Prep Kit (Illumina)を用いてライブラリを作成し、NextSeq500 High Output v2 Kit (150 Cycles)によりシーケンスを行った。シーケンスデータは、CLC Genomics Workbenchを用いて解析し、Germlineバリエーションが疑われる場合には、DNAを用いて検証を行った。

解析は40歳未満の症例のうち、再発や転移をきたした症例を10症例選択して行った。(表1)

症例	年齢	性別	部位	Stage	深達度	組織型	Muc	MSI	KRAS	BRAF	NRAS
1	32	M	Ra	4	SS	tub2	-	L	0	0	0
2	23	F	T	4	SS	tub2	-	S	0	0	0
3	35	F	T	4	SS	tub2	-	S	0	1	0
4	39	M	RS	3	SE	tub2	+	S	1	0	0
5	26	F	S	3	SE	muc	+	S	0	0	0
6	16	M	Rb	3	A	tub2	+	S	0	0	0
7	36	F	Rb,P	4	A	tub2	-	S	0	0	0
8	36	F	Rb,P	3	AI	tub2	-	S	1	0	0
9	30	F	S	4	SS	tub2	-	S	0	0	0
10	39	F	S	3	SE	tub2	-	S	1	0	0

表1: 解析に用いた症例

4. 研究成果

(1) シーケンス結果

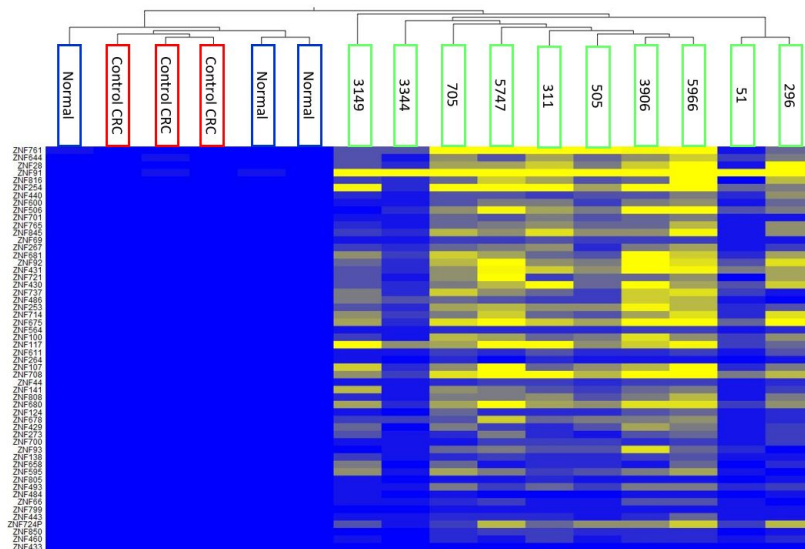
Case No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Number of reads	50M	26M	50M	56M	36M	77M	13M	74M	35M	69M
Total Exon Mapped (%)	91.81	87.3	91.29	91.31	85.97	94.64	51.57	89.37	68.26	86.08
No. of variants	5199	5412	5224	5336	3880	5803	3294	7730	4938	5011

シーケンス結果の概要を上表に示す。

一部にマッピング効率の悪いデータがあるが、これはサンプルクオリティ由来である。

バリエーションデータは、Populationデータを用いてフィルタリングを行い、10%以上、バリエーションアレルカウント5以上のものを抽出した結果、概ね3000から8000程度のバリエーションが検出された。

(2) 若年大腸がんの特徴的な遺伝子発現プロファイル



上図は若年大腸がん 10 症例の遺伝子発現データと SRA より得た正常大腸粘膜、60 歳以上の MSS 大腸がん 3 症例ずつの遺伝子発現データをクラスター解析した結果、Zinc finger family 遺伝子の発現が若年大腸がんで高い傾向にあった。

(3) 若年大腸がんにおいて活性化されている Pathway

Term	PValue
hsa05322:Systemic lupus erythematosus	1.38E-06
hsa04510:Focal adhesion	4.11E-06
hsa04512:ECM-receptor interaction	1.75E-05
hsa04120:Ubiquitin mediated proteolysis	4.57E-05
hsa05412:Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	2.00E-04
hsa05130:Pathogenic Escherichia coli infection	3.45E-04
hsa03440:Homologous recombination	1.01E-03
hsa05414:Dilated cardiomyopathy	1.82E-03
hsa05410:Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	2.16E-03
hsa05222:Small cell lung cancer	5.13E-03
hsa03430:Mismatch repair	7.10E-03
hsa05200:Pathways in cancer	8.03E-03
hsa04540:Gap junction	8.62E-03
hsa05215:Prostate cancer	8.62E-03
hsa04520:Adherens junction	1.55E-02

若年大腸がんで活性化されている Pathway を上図に示す。

HR 関連や MMR 関連の Pathway が活性化されており、遺伝子修復が活発に行われている可能性が伺える。

(4) 若年大腸がんにおいて不活化されている Pathway

Term	PValue
hsa04080:Neuroactive ligand-receptor interaction	1.85E-04
hsa05014:Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	7.00E-03
hsa04210:Apoptosis	1.08E-02
hsa04722:Neurotrophin signaling pathway	1.56E-02
hsa05223:Non-small cell lung cancer	2.17E-02
hsa00533:Keratan sulfate biosynthesis	3.23E-02
hsa00565:Ether lipid metabolism	3.50E-02
hsa04012:ErbB signaling pathway	4.90E-02

若年大腸がんで不活化されている Pathway を上図に示す。

アポトーシスシグナルが抑制されており、後述の TP53 バリエーションデータと比較しても矛盾の無いデータである。

(5) 若年大腸がんで検出された稀な融合遺伝子

若年大腸がんの 1 症例に、PIPRKT-RSP03 癒合遺伝子が検出された。RSP03 (R-spondin3) は WNT シグナルを活性化させる因子であり、近年の研究で大腸がんの数%に R-spondin の融合遺伝子が存在すると報告されている (Nature. 2012 Aug 30;488(7413):660-4.)。

(6) 遺伝性腫瘍症候群の原因遺伝子バリエント

Case	TP53	BARD1	RAD50	MBD4	SMARCA4	ATM	BMPR1A	TSC2	MSH6	MRE11A	FH	SMAD4	APC	NBN	NF1	PTEN
1	100	67.5	42.3	14	41.7							76.9				
2	96.3		10				91.9							15.9		
3	91.9	21.9		10.9	21.4	12.1				15.4	95.5		53.8			
4	84.6	66.7														
5	84.1	66.7		31.6				38.5	23.1							
6	80		14.5			12		23.8	16.7							10.9
7	78.8	61.5														
8	35.7	100	25.8	16.1	29.2					15					11.5	
9			12	18		33.3	15.4									
10																

既知 (NEJM 2015 Dec 10; 373(24) : 2336-46.) の遺伝性腫瘍症候群バリエントについて解析を行った結果、10 症例中 8 症例で TP53 遺伝子に機能に影響のあるバリエントが存在する事が明らかとなった。これは遺伝子発現解析でのアポトーシスシグナルの影響と矛盾しない。40%以上の頻度のバリエントについては、それぞれの症例の大腸粘膜と大腸がんから抽出された DNA を用いて検証を行ったが、TP53 についてはすべて Somatic な変化であった。BMPR1A については ClinVar に登録のないバリエントであり、原因遺伝子の可能性がある。

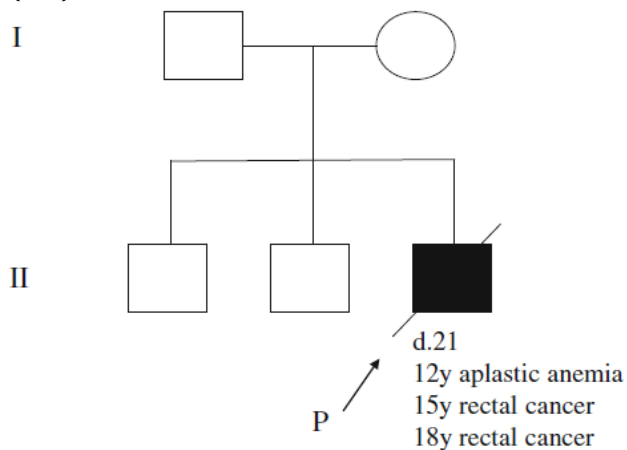
(7) ClinVar で Pathogenic のアノテーションが付いているバリエント

Gene	AA change	Coding region change	Clin Var	HGVD/dbSNP
PROS1	p.Lys196Glu	c.586A>G	5	0.50%
CFB		c.530-1292G>C	5	2.10%
MCPH1	p.Thr143fs	c.421_422insA	5	-
RBBP8	p.Arg100Trp	c.298C>T	5	-
OFD1	p.Lys97fs	c.282delA	5	-
DKC1	p.Ser121Gly	c.361A>G	5	-
OFD1	p.Tyr98fs	c.281_282insA	5	-

ClinVar において Class5 (Pathogenic) のバリエントを抽出した。

このなかで DKC1 の変異が若年大腸がんの原因遺伝子の可能性が高いと考えられた。

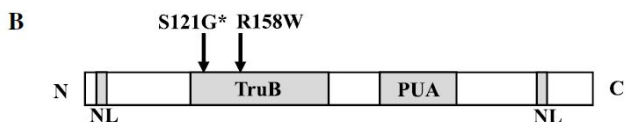
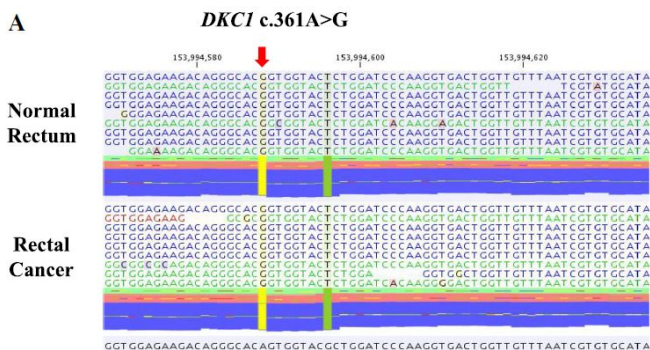
(8) DKC1 の解析



症例 6 (DKC1 バリエント保有者) の家系図。

両親には Phenotype は無いが、Proband は再生不良性貧血と若年大腸がんを発症している。

(9) DKC1 遺伝子の変異



DKC1 のバリエント (S121G) は過去に報告があり、Hoyeraal-Hreidarsson 症候群の原因遺伝子とされている。しかし今回の症例では既報とは異なり、比較的弱い Phenotype を取っていた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Watanabe M, Yamamoto G, Fujiyoshi K, Akagi Y, Kakuta M, Nishimura Y, Akagi K.
Development of metachronous rectal cancers in a young man with dyskeratosis congenita: a case report.
J Med Case Rep. 2019 Apr 27;13(1):117. doi: 10.1186/s13256-019-2044-5.

Yamamoto G, Kikuchi M, Kobayashi S, Arai Y, Fujiyoshi K, Wakatsuki T, Kakuta M, Yamane Y, Iijima Y, Mizutani H, Nakajima Y, Sudo J, Kinoshita H, Kurimoto F, Akiyama H, Uramoto H, Sakai H, Akagi Y, Akagi K.
Routine genetic testing of lung cancer specimens derived from surgery, bronchoscopy and fluid aspiration by next generation sequencing.
Int J Oncol. 2017 May;50(5):1579-1589. doi: 10.3892/ijo.2017.3935.

[学会発表](計 5 件)

Whole transcriptome Analysis in early-onset colorectal cancer as an effective method to identify responsible gene.
Kenji Fujiyoshi, Gou Yamamoto, Miho Kakuta, Tomokazu Wakatsuki, Yoshiko Arai, Akemi Takahashi, Mari Kikuchi, Mina Yamada, Shiho Kobayashi, Tetsuhiko Tachikawa, Yoshito Akagi, Kiwamu Akagi.
InSiGHT 7TH BIENNIAL meeting July5-8th2017 Palazzo dei Congressi, Firenze, Italy.

Analysis of responsible gene in early-onset colorectal cancer

山本 剛 新井 吉子 立川 哲彦 赤木 究
第 75 回日本癌学会学術総会 2016.10.6 ~ 8 横浜(ポスター)

若年性大腸癌の原因遺伝子検索-Lynch 症候群を中心に-

藤吉健司 赤木究 山本剛 角田美穂
高橋朱実 新井吉子 小林志帆 若月智和 菊地茉莉 山田身奈 立川哲彦
第 85 回大腸癌研究会 2016.07.01 大阪 (口演)

若年性大腸がんの Transcriptome 解析

山本剛、藤吉健司、角田美穂、竹ノ谷隆、小林志帆、新井吉子
若月智和、菊地茉莉、立川哲彦、青木美保、高橋朱実、山田身奈、赤木究
第 22 回日本家族性腫瘍学会学術集会 2016.06.03-04 愛媛

Mutation spectrum of Japanese Lynch syndrome patients diagnosed by Universal tumor screening for colorectal cancer

Kiwamu Akagi, Miho Kakuta, Akemi Takahashi, Tetsuhiko Tachikawa,
Gou Yamamoto, Yoshiko Arai, Shiho Kobayashi, Kenji Fujiyoshi,
Yoshito Akagi, Takashi Takenoya, yoji Nishimura, Yoshiyuki Kawashima,

Hirohiko Sakamoto
ICHG2016 2016.04.03-07 京都
〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：角田 美穂

ローマ字氏名：(KAKUTA, miho)

所属研究機関名：埼玉県立がんセンター（臨床腫瘍研究所）

部局名：病院 腫瘍診断・予防科

職名：看護師

研究者番号(8桁)：60347359

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山本 剛

ローマ字氏名：(YAMAMOTO, gou)

研究協力者氏名：高橋 朱実

ローマ字氏名：(TAKAHASHI, akemi)

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。