

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：84305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19563

研究課題名(和文)多発性内分泌腫瘍症1型の腫瘍発生機序の分子基盤の解明とiPS細胞の樹立

研究課題名(英文)Molecular analysis of tumorigenesis in multiple endocrine neoplasm type 1.

研究代表者

垣田 真以子(Kakita, Maiko)

独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・内分泌代謝高血圧研究部・研究員

研究者番号：70770220

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文): MEN1(多発性内分泌腫瘍症1型)の発症に寄与する新たなMEN1遺伝子のvariant「IVS5+1G>T」を同定した。MEN1によって生じる多臓器の腫瘍性病変に対して、MEN1遺伝子のコピー数解析をMLPA法に行ったが、ヘテロ接合性の消失(LOH)は全ての腫瘍で確認されたが欠失の範囲は必ずしも全ての腫瘍で一致しなかった。また53個の癌抑制遺伝子について包括的にゲノムコピー数解析およびメチル化解析を行なった。またCASP8遺伝子の過剰メチル化を全ての腫瘍において同定した。これらの結果はMEN1における腫瘍発生におけるsomaticなalterationの機構解明に有益である。

研究成果の概要(英文): We have identified the novel putative splice variant (IVS5+1G>T) of MEN1. RT-PCR analysis demonstrated the variant cause alternative splicing. Loss of heterogeneity of the MEN1 variant had been demonstrated by exome sequencing. MLPA analysis and MS-MLPA was carried out to clarify the copy number and epigenetic alteration of 53 tumor suppressor genes. We have found the copy number alteration of VHL, GSTP1, CHFR, and BRCA1 in every MEN1 related tumor. The CASP9 hyper-methylation was observed in every tumor tissues.

研究分野：内分泌学

キーワード：MEN1 MLPA MS-MLPA エクソーム

1. 研究開始当初の背景

MEN1 は遺伝性腫瘍の一つであり単一遺伝子(MEN1)の variant が複数の内分泌臓器に腫瘍を発生させるという際だった特徴を有している。副甲状腺過形成の生涯浸透率は95%と MEN1 関連病変で最も高いがこれ自身が予後決定病変となることは少なく、膵・消化管の神経内分泌腫瘍(NET)、とりわけガストリノーマが予後規定病変となることが多い。しかし MEN1 では浸透率は低いながらもしばしば胸腺 NET を発症することがあり、胸腺 NET を発症した症例ではこれが予後を規定する重要な病変である(1)。これらの病変に対する治療法は遅れており近年になって膵・消化管 NET に対してソマトスタチンアナログや分子標的薬であるスニチニブ、エペロリムスが治療薬として承認され一定の有効性を認めているが胸腺 NET に対する治療法は手術以外有効な治療がないのが現状である(2-5)。近年の悪性腫瘍に対する(分子標的)治療の戦略は臓器別からゲノム情報による分類から治療法が選択される時代に大きく変容しつつある。有効な治療法の探索のためには MEN1 腫瘍の発生の分子基盤の解明が不可欠である。

2. 研究の目的

申請者の元には MEN1 患者の末梢血と手術で摘出した MEN1 関連腫瘍組織がセットとして保存されている。これらの検体をセットとしてエクソーム解析を行えば腫瘍における somatic な variant は確実に検出可能である。また同一 MEN1 患者における複数の関連病変組織を解析すれば共通の variant、固有の variant を比較的容易に検出することが可能である。本研究では複数名 MEN1 患者の複数の MEN1 関連病変のエクソーム解析を実施し、これらの variant のデータベースを完成させることが研究期間内の当面の目標となり可能であればその知見から重要な variant を絞り込み腫瘍発生機序の解明につなげたい。

また癌抑制遺伝子についてそのメチル化状態を MS-MLPA(Methylation specific Multiplex Ligation dependent Probe Assay)法を用いて解析し MEN1 関連腫瘍組織におけるメチル化状態のデータベース化を構築する。

3. 研究の方法

MEN1 症例を集積し手術組織(凍結あるいはパラフィン包埋組織)を集積する。患者末梢血および手術組織より genomic DNA を抽出する。また一部の検体については RNA を抽出し cDNA を調整する。得られた検体からサンガー法による塩基配列の検討、MLPA 解析による腫瘍関連遺伝子のコピー数解析、MS-MLPA 法によるメチル化解析を行う。またライブラリーを作成し HiSeq2000 を用いてエクソーム解析を行い得られたリード配列を参照配列に対して

マッピングし variant のアノテーションを行う。

本邦における MEN1 症例を集積する。症例集積には国立病院機能のネットワークを活用して効率的に行う。一部既に同意を得た上で検体を得ている MEN1 症例について血液、下垂体腫瘍(TSH 産生腺腫)、副甲状腺腫瘍、胸腺神経内分泌腫瘍、肺神経内分泌腫瘍、膵・消化管神経内分泌腫瘍(免疫組織学的にガストリン、インスリン、ソマトスタチンの産生がそれぞれ独立して確認されている複数の腫瘍)から genomic DNA を抽出する。得られた genomic DNA の品質を吸光度測定とアガロースゲル電気泳動にて確認する。一定の品質が確認された genomic DNA についてアジレント社の SureSelect Target Enrichment キットを用いてターゲット領域を濃縮し HiSeq を用いて網羅的シーケンスを行う。取得されたリードシーケンスをヒトのレファレンス配列にマッピングし variant を検出する。得られた variant について同一患者由来の検体について比較検討し末梢血で認めず腫瘍組織でのみ認められる variant を抽出しカタログ化する。上記の作業を複数の MEN1 患者で行いデータベースを構築する。

4. 研究成果

本研究で主として解析に用いた症例は以下の症例である。45歳女性。健康診断で胸部異常陰影を指摘され、全身検索がおこなわれたところ下垂体、副甲状腺、胸腺、肺、十二指腸、膵臓、虫垂に病変が同定された。父親がインスリノーマと診断されている。本症例に対して適切な遺伝カウンセリングが実施され同意を得た上で遺伝学的検査が実施され MEN1 遺伝子に「IVS5+1G>T」の variant をヘテロ接合体で認めた(図1)。Variant はスプ

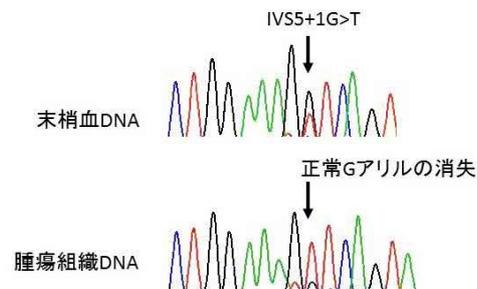


図1

ライス異常を引き起こす可能性が考えられたため患者から摘出された下垂体腫瘍(TSH産生下垂体腺腫)から得られた RNA から合成した cDNA を用いて RT-PCR を行ったところ同部位でのスプライス異常が生じていることが証明された(図2)。従って本症例は MEN1 遺伝子に新規の variant を有する MEN1 と確定診断された。

次に各組織より得られた genomic DNA について MEN1 遺伝子の MLPA 解析を行った。胸腺腫

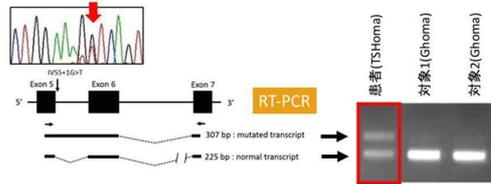


図2

瘍においては exon 1 を含むプロモーター領域の欠失を認めたのに対して肺腫瘍、十二指腸、膵臓、虫垂、下垂体の腫瘍においては MEN1 遺伝子を含む 11q13 領域の欠失が認められた。このことは MEN1 における腫瘍発生において重要なセカンドヒットが腫瘍間によって同一でいることを示している。53 個の癌抑制遺伝子のゲノムコピー数解析 (図 3) とメチル化の状態の解析 (図 4) では全ての腫瘍で共通するコピー数異常は VHL, GSTP1, CHFR, BRCA1 におけるコピー数低下であった。また CASP8 遺伝子の過剰メチル化も全ての腫瘍において共通に認められた。

	胸腺	肺	副甲状腺	十二指腸	膵臓	虫垂	下垂体
TP53	1p36.32						
MSH6	2p16.3						
CASP8	2q33.1						
FHIT	3p14.2						
PASPF1	3p21.31						
CTNNA1	3p21.31						
MLH1	3p22.2						
RARB	3p22.2						
VHL	3p25.3						
CASR	3q21.1						
h2	4q27						
APC	5q22.2						
ESR1	6q25.1						
PARK2	6q26						
CDKN6	7q31.2						
CTF1	7q31.2						
PAAS	9p13.2						
CDKN2A	9p21.3						
CDKN2B	9p21.3						
DAPK1	9p21.33						
PTEN	9q32.32						
CREM	10p11.23						
CELF2	10p14						
ALIN	10q23.31						
PTEN	10q23.31						
MGMT	10q26.3						
PAK6	11p13						
WT1	11p13						
CDK4	12p13						
GSTP1	11q13.2						
ATM	11q22.3						
CDKN1A	12q15.3						
CDKN1B	12q15.3						
TNFRSF1A	12q15.33						
CD27	12p13.31						
PAN	12q23.2						
CHFR	12q24.48						
BRCA2	13q13.3						
h3	13q14.2						
MLH3	14q24.3						
TRPS1	15q14						
PICARD	16q11.2						
TSC2	16q13.3						
CDN1	16q22.1						
CDN13	16q23.3						
PMP22	17p12						
TP53	17q31.31						
h4	17q31.31						
BRCA1	17q21.31						
h5	17q21.31						
STK11	19p13.3						
h6	19q13.3						
GATA5	20q13.33						
TMP3	22q12.3						

図 3

	胸腺	肺	副甲状腺	十二指腸	膵臓	虫垂	下垂体
TP53	1p36.32						
MSH6	2p16.3						
CASP8	2q33.1						
FHIT	3p14.2						
PASPF1	3p21.31						
CTNNA1	3p21.31						
MLH1	3p22.2						
RARB	3p22.2						
VHL	3p25.3						
CASR	3q21.1						
h2	4q27						
APC	5q22.2						
ESR1	6q25.1						
PARK2	6q26						
CDN6	7q31.2						
CTF1	7q31.2						
PAAS	9p13.2						
CDKN2A	9p21.3						
CDKN2B	9p21.3						
DAPK1	9p21.33						
PTEN	9q32.32						
CREM	10p11.23						
CELF2	10p14						
ALIN	10q23.31						
PTEN	10q23.31						
MGMT	10q26.3						
PAK6	11p13						
WT1	11p13						
CDK4	12p13						
GSTP1	11q13.2						
ATM	11q22.3						
CDKN1A	12q15.3						
CDKN1B	12q15.3						
TNFRSF1A	12q15.33						
CD27	12p13.31						
PAN	12q23.2						
CHFR	12q24.48						
BRCA2	13q13.3						
h3	13q14.2						
MLH3	14q24.3						
TRPS1	15q14						
PICARD	16q11.2						
TSC2	16q13.3						
CDN1	16q22.1						
CDN13	16q23.3						
PMP22	17p12						
TP53	17q31.31						
h4	17q31.31						
BRCA1	17q21.31						
h5	17q21.31						
STK11	19p13.3						
h6	19q13.3						
GATA5	20q13.33						
TMP3	22q12.3						

図 4

エクソーム解析で得られた variant について既知の SNP の除外、3 検体で共通する variant

の除外を行った上で、機能に影響を与える可能性が高い variant の絞り込みを行った。これらの絞り込みの結果、下垂体腫瘍に特異的な variant は 1106 個、胸腺腫瘍に特異的な variant が 2029 個同定された。更に両者に共通する variant は 17 遺伝子に絞られた。今後これらの知見をデータベース化し今後の研究の基盤として活用できる。

引用文献

- de Laat JM, Pieterman CR, van den Broek MF, Twisk JW, Hermus AR, Dekkers OM, de Herder WW, van der Horst-Schrivers AN, Drent ML, Bisschop PH, Havekes B, Vriens MR, Valk GD 2014 Natural course and survival of neuroendocrine tumors of thymus and lung in MEN1 patients. J Clin Endocrinol Metab 99:3325-3333
- Pavel ME, Hainsworth JD, Baudin E, Peeters M, Horsch D, Winkler RE, Klimovsky J, Lebwohl D, Jehl V, Wolin EM, Oberg K, Van Cutsem E, Yao JC 2011 Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet 378:2005-2012
- Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, Valle J, Metrakos P, Smith D, Vinik A, Chen JS, Horsch D, Hammel P, Wiedenmann B, Van Cutsem E, Patyna S, Lu DR, Blanckmeister C, Chao R, Ruszniewski P 2011 Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. N Engl J Med 364:501-513
- Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Oberg K 2011 Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. N Engl J Med 364:514-523
- Bousquet C, Lasfargues C, Chalabi M, Billah SM, Susini C, Vezzosi D, Caron P, Pyronnet S 2012 Clinical review: Current scientific rationale for the use of somatostatin analogs and mTOR inhibitors in neuroendocrine tumor therapy. J Clin Endocrinol Metab 97:727-737

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)

Rieko Nakatani, Takashi Murata, Takeshi Usui, Koki Moriyoshi, Toshiki

Komeda, Yuichi Masuda, Maiko Kakita-Kobayashi, Tetsuya Tagami, Shinsaku Imashuku, Shigeo Kono, Kazunori Yamada, and Akira Shimatsu 2017 Importance of the average glucose level and estimated glycosylated hemoglobin in a diabetic patient with hereditary hemolytic anemia and liver cirrhosis. Internal Medicine 57:137-541

〔学会発表〕(計 2 件)

小川達雄、臼井 健、畠山 寛、小杉理英子、米本崇子、川口真矢、鈴木 誠、森 潔、垣田真以子、井上達秀 2017 MEN1 遺伝子に無発表 variant を認めた高齢 MEN1 の 1 例 第 27 回臨床内分泌代謝 update
小林 真以子、木田 尚子、木戸 健陽、村田 紘未、岡野 友美、吉田 彩、小野 淑子、岡田 園子、都築 朋子、岡田 英孝 2017 当科における甲状腺機能スクリーニングの重要性と治療介入への務め 第 69 回日本産婦人科学会

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

垣田真以子 (Kakita, Maiko)

独立行政法人国立病院機構京都医療センター臨床研究センター、研究員

研究者番号：70770220