

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07250

研究課題名（和文）低侵襲でハイスループットな悪性中皮腫の早期診断法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a minimally invasive, high-throughput method for early diagnosis of malignant mesothelioma

研究代表者

吉川 良恵 (Yoshikawa, Yoshie)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10566673

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：悪性中皮腫（malignant mesothelioma: MM）は化学療法等治療抵抗性の極めて予後不良の腫瘍である。塩基配列レベル変異は小児がんレベルと少なく、技術的に捉えにくい微小欠失が複数個所で起こりゲノム再構成（chromothripsis-like patterns: CTLP）が生じ、特定のがん抑制遺伝子の両アレル欠失が高頻度で生じている。このような変化を捉えるため、我々は新規手法digital MLPAを開発し、MM患者予後と関連する変異パターンを捉えた。

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変異解析が普及しても、捉えるのが難しいのがstructural variants (SVs)であり、MMでは腫瘍が散在、もしくはリンパ球が浸潤したものが多いため腫瘍含有率が低くSV解析が極めて難しい。コピー数変化を伴わないSVは検出できないが、MMで高頻度に生じたエクソンや遺伝子単位の欠失や増幅を網羅的に簡便に捉えるため、新規手法digital MLPAを開発し、前処理法も検討することでFFPE切片の解析も可能にした。結果、腫瘍含有率の低い予後良好者の解析が可能となり、予後の良・不良のMM検体間の変異比較を行ったことは、患者予後改善のための基礎データ取得の点で意義深い。

研究成果の概要（英文）：Malignant mesothelioma (MM) is an extremely poor prognosis tumor that is refractory to chemotherapy and other treatments. Sequence-level mutations are low at the level of pediatric cancers, and technically elusive microdeletions occur in multiple locations, resulting in genomic reorganization (chromothripsis-like patterns: CTLPs) and frequent biallelic deletions of specific tumor suppressor genes. To capture these changes, we developed a novel method, digital MLPA, to capture mutation patterns associated with MM patient prognosis.

研究分野：腫瘍の分子生物学的解析

キーワード：悪性中皮腫 変異 ゲノムコピー数解析

## 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫 (MM) は化学療法等治療抵抗性の極めて予後不良 (診断後余命約 1 年) の腫瘍であり、発症要因としてアスベスト暴露が関与する。アスベストは世界中で現在も使用されており、今後さらに患者が増えることが見込まれる。一方、1 割程度であるが *BAP1* などの腫瘍抑制遺伝子の生殖細胞系列変異による発症も知られている。早期発見と患者予後改善は重要課題である。

次世代シーケンス解析 (NGS) が普及し、診断業務にも活用されるようになってきたが、MM の変異は腫瘍抑制遺伝子の機能欠失が主であるため、がんゲノム医療を行ってもほとんどは治療にはつながらない。稀な腫瘍であるため、大規模解析といっても 300 検体未満の解析が主であったが、いくつかのグループが NGS 解析結果を報告し、その結果はよく似かより、検出される MM の患者当たりの体細胞変異数は小児がんレベルで少なかった。共通変異遺伝子として *CDKN2A* (p16), *BAP1*, *NF2*, *TP53* 遺伝子が挙げられた。*BAP1* のシーケンスレベル変異は比較的予後良好者に見られ、予後不良因子として *CDKN2A* (p16) の欠失が挙げられた。我々は *BAP1* 遺伝子の搭載領域 3p21 の高頻度欠失 (Yoshikawa ら, Int J Oncol, 2011) と、本遺伝子体細胞変異を本邦上皮型 MM 特異的に 8 割以上で検出しており (Yoshikawa ら, Cancer Sci, 2012)、上記 NGS による検出より変異頻度が高かった。体細胞変異が低い理由は、MM が NGS で検出されにくいタイプの変異を持つという仮説を立て検証した。兵庫医科大学とハワイ大学がんセンターの共同研究成果として、高解像度 CGH アレイ (染色体 3p21 領域対象、平均プローブ間距離 254bp) を作製し、日米 33 名の MM についてゲノムコピー数 (CN) 解析を実施した。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、そのほとんどが微小なエクソンの両アレル欠失 (~3 Kb) であることが特徴であった。変異頻度が低いとされてきた MM が、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 (chromothripsis-like patterns: CTLP) が生じていることを示した (Yoshikawa ら, PNAS, 2016)。その後、他の染色体でもゲノム再構成 (Structural variants: SVs) が生じていることが報告された。そこで、MM で高頻度に生じた SVs を、網羅的に簡便に検出する手法を開発した。エクソン単位のゲノム CN 変化を精度高く解析可能な MLPA と次世代シーケンス解析を組合せた新規手法 digitalMLPA であり、MM 用にさらに改良する必要があった。すなわち、MM では腫瘍が散在、もしくは偏在していてもリンパ球が浸潤したものが多いため腫瘍含有率が低く SV 解析が極めて難しい。また、患者数が少ないため、formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) 検体でも精度高く解析できる必要がある。前処理も含め一連の手法を開発することが求められた。

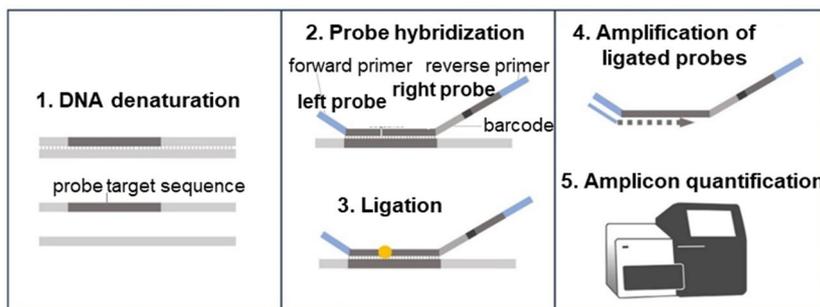
## 2. 研究の目的

高感度・高精度な MM 用 digitalMLPA 法による CN 解析法を確立し、塩基配列解析のみでは変異検出頻度が低い MM の早期発見に役立てる。また、本研究により、MM に特徴的な変異様式を検出し、患者予後との関連解析を実施する。

## 3. 研究の方法

- (1) MM 用 digitalMLPA 法へ改良: digitalMLPA 法の原理を下に示す。患者由来 DNA を熱変性し、左右に分割された target probes (left probe と right probe) をハイブリダイゼーションさせる。その後左右の target probes を ligase で結合させる。target probe の末端に付加されていた forward、reverse primers で全結合 probes を PCR により増幅し、これらの増幅産物を Illumina 社 MiSeq にてシーケンスする。target 毎のシーケンスの本数 (1 target 領域 600 reads 以上) を test と control で比較することで CN 比率を求める。

MM で SV 変異が報告される染色体領域やゲノム不安定領域を網羅的に検出可能な digital MLPA に改良する: 版の digital MLPA では、MM で高頻度変異が検出される *NF2* の 18 exons の内 4 exons しか検出できず、また *LATS2* は検出対象外であった。改良版では *NF2* は上流を含め全 exons 検出、*LATS2* は 8 exons の内 7 exons が解析可能となった。また CN 変化の生じやすい 3p 領域に *MLH1* の 19 exons 全て、種々の腫瘍でゲノム不安定性が報告される *RASSF1*, *FHIT* の検出 probe が追加された。また版では 13 番染色体の検出 probe が sparse であった



め *NBEA*, *LINC00441*, *RB1*, *DLEU1* 等追加された。結果、目的遺伝子の CN 解析用 target probes 344, 染色体腕の CN 解析するための karyotyping probes 126, 品質管理用 probes 31 個となった。

- (2) FFPE 検体の解析：凍結切片の解析では、腫瘍含量が低く CN 変化が検出できない検体が 4 割近くあった。そこで、FFPE 検体を用いて Laser Capture Microdissection (LCM) を行い、腫瘍細胞を採取し解析する手法を確立した。CN 変化を求めるためには比較対象になる reference control が必要なため、検討した。まず転移のない 10 名の MM 患者リンパ節で FFPE 固定後数年以上経過した検体をかき取り抽出 DNA を混ぜ、共通 control として使えないか試みた。digitalMLPA は、DNA 検体中の塩濃度や、ホルマリン固定による脱プリン化の影響を顕著に受けるため、保存状態の異なる他人の検体は control として使えないことが判明した。同一日に腫瘍と同時に摘出された同一患者由来リンパ節を control として試みたが、異なる容器で保存されていたことから固定化の影響が異なるようで、やはり CN 比率のベースラインのばらつきが大きかった。結局、各患者腫瘍と同一切片からリンパ球、もしくは肺組織を採取して control とするのがベースラインの安定性に不可欠であることが判明した。また DNA 抽出は、組織片を proteinase K で処理し、界面活性剤入りの粗抽出液で 55 オーバーナイト抽出した。その後 NucleoSpin gDNA Clean-up (Takara Bio) を用いた精製の有無による影響も検討した。精製により不純物の影響を低下できると期待したが、固定化による脱プリン化や DNA 断片化は結果に大きな影響を与え、LCM 採取組織量が低い検体では DNA 収量の大幅低下が生じるため、粗抽出液で解析する方が得策と判断した。FFPE 検体では、ばらつきが大きい検体もあり、結果の検証のため exon レベルの変化を示した一部検体について qPCR により false positive ではないことの確認も行った。
- (3) シーケンスレベル変異の検出：MM で変異が報告される top 8 遺伝子、*BAP1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *NF2*, *TP53*, *SETD2*, *PBRM1*, *LATS2* の全 coding exon を target NGS の解析対象とし、Integrated DNA Technologies 社に capture probe 合成を依頼した。Library 調製は、凍結切片の場合 100ng DNA から Lotus DNA Library Prep kit を用い、または FFPE の場合は 50ng DNA を用いて xGen cDNA&FFPE Library Prep v2 kit にて調製した。プローブ濃縮は xGen Hybridization and Wash Kit を用いて target region を回収した。Illumina 社 MiSeq にて 150 bp pair-end で target NGS を行い、1 塩基置換や数塩基の欠失/挿入を検出した。

#### 4. 研究成果

- (1) 3 番染色体に検出される激しい SVs：高解像度 custom CGH アレイでは遺伝子間領域やイントロン領域にも probe を設計して連続して CN 変化を検出できるようにしていたが、digitalMLPA では probe 設計は大半が exon 領域で非連続のため、検出できる CTLP は当然少なくなる。悪性中皮腫患者腫瘍 3 番染色体の典型的な CN 変化を次ページ図 1 に示す。横線が 2 アレル ( $\log_2 \text{ratio} = 0$ ) を示しており、線より上が増幅、下が欠失を示している。検体(a)~(b)が *BAP1*, 検体(c)~(d)は *BAP1* と *PBRM1*, 検体(e)は *SETD2* と *BAP1*, 検体(i)は *RASSF1* と *BAP1* に両アレル欠失が検出された。本染色体の CN 変化の特徴としては 3p21 領域に 1 アレル欠失が生じ(検体によっては 3p22.2 の *MLH1* も欠失) 加えて上記 3 遺伝子の内 1~2 個が欠失して CTLP 様の CN 変化となるケースが多い。特に *BAP1* 近傍、もしくは *RASSF1*-*BAP1* の近傍で CN 変化が生じやすいことがわかり、検体(g)のように欠失ではなく周辺領域より CN 増幅している検体もある。検体(f)~(h)のように、波打った CN 変化が見られたケースもあり、ゲノムの断片化・再結合が生じた結果と思われる。すなわち CN 変化を伴わない逆位や転座が周辺で生じた場合、probe とのハイブリダイゼーション効率が野生型とは異なることから、このような CN 変化が生じると推定される
- (2) 両アレル欠失が見られる遺伝子：*CDKN2A*, *CDKN2B* は高頻度で両アレル欠失が見られることが知られており、我々の解析でも 24/49(49%) で両アレル欠失しており、そのほとんどが両遺伝子で連続した欠失であったが、2 検体は一部 exon に限定していた。*BAP1* と同様に exon レベルで両アレル欠損が見られた遺伝子が *NF2* であり、11/49(22.4%) すべてにおいてであった。*BAP1* は coding 領域が 9Kb の小さな遺伝子であるため、遺伝子全体両アレル欠失が見られる検体もあったが、*NF2* は 95Kb に及ぶ大きい遺伝子であるため、MM の CTLP が微小領域で生じた結果かもしれない。*LATS2* (coding 領域：88.5 Kb) では遺伝子全域に及ぶ、*RB1* (coding 領域：178.1 Kb) と *TP53* (coding 領域：19.0 Kb) は一部 exon に両アレル欠失が各 1 検体見られた。

予後との関連解析は、患者の 5 年経過後の予後を確認後、改めて報告予定である。

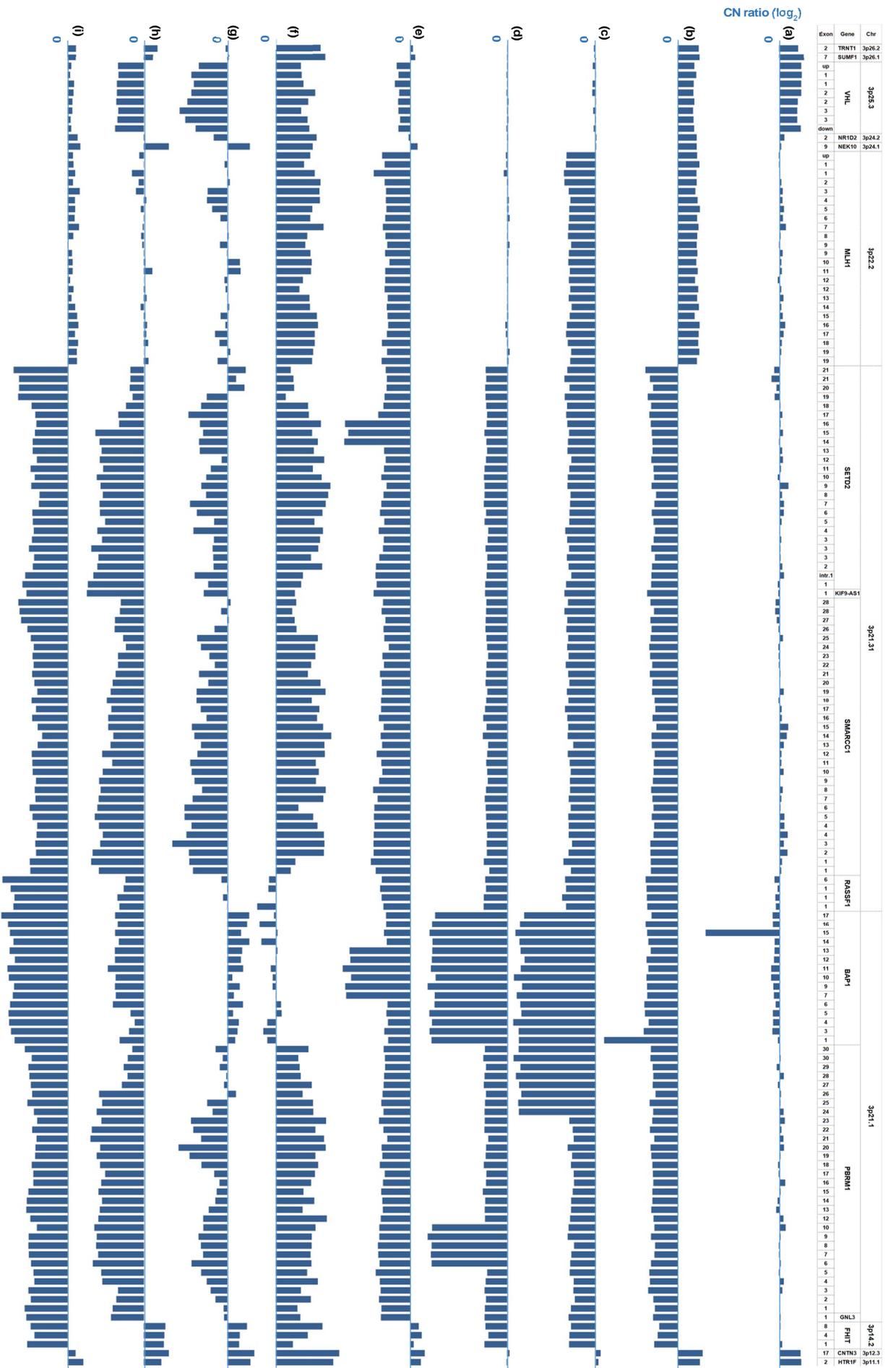


図 1 悪性中皮腫患者腫瘍 3 番染色体の典型的な CN 変化

<引用文献>

- Frequent deletion of 3p21.1 region carrying semaphorin 3G and aberrant expression of the genes participating in semaphorin signaling in the epithelioid type of malignant mesothelioma cells. Yoshikawa Y, Nakano T et al., Int J Oncol. 2011 Dec;39(6):1365-74.
- Frequent inactivation of the BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma. Yoshikawa Y, Nakano T, Hashimoto-Tamaoki T. et al. Cancer Sci. 2012 May;103(5):868-74.
- High-density array-CGH with targeted NGS unmask multiple non-contiguous minute deletions on chromosome 3p21 in mesothelioma. Yoshikawa Y, Emi M, Yang H and Carbone M et al. et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Nov 22;113(47):13432-13437.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Flavia Novelli, Yoshie Yoshikawa, Veronica Angela Maria Vitto, Lorenzo Modesti, Michael Minaai, Sandra Pastorino, Mitsuru Emi, Haining Yang, Michele Carbone et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Germline BARD1 variants predispose to mesothelioma by impairing DNA repair and Calcium signaling	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 吉川良恵	4. 巻 47
2. 論文標題 デジタルMLPAを用いた腫瘍のゲノムコピー数解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 兵庫医科大学医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 33-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takagi-Kimura M, Tada A, Kijima T, Kubo S, Ohmuraya M, Yoshikawa Y	4. 巻 27 (12)
2. 論文標題 BAP1 depletion in human B-lymphoblast cells affects the production of innate immune cytokines and chemokines.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells.	6. 最初と最後の頁 731-740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12988	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Carbone M, Pass HI, Ak G, Yang H, Yoshikawa Y, Zolondick A, Schrupp DS, Hassan R. et al.	4. 巻 17 (7)
2. 論文標題 Medical and Surgical Care of Patients With Mesothelioma and Their Relatives Carrying Germline BAP1 Mutations.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Oncology	6. 最初と最後の頁 873-889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtho.2022.03.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshie Yoshikawa, Yusuke Yamada, Mitsuru Emi, Lilit Atanesyan, Jan Smout, Karel de Groot, Suvi Savola, Yukako Nakanishi-Shinkai, Akihiro Kanematsu, Michio Nojima, Masaki Ohmuraya, Tomoko Hashimoto-Tamaoki, Shingo Yamamoto	4. 巻 113
2. 論文標題 Risk prediction for metastasis of clear cell renal cell carcinoma using digital multiplex ligation-dependent probe amplification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 297-307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yoshie Yoshikawa, Kazue Yoneda, Misato Kimura, Masaki Ohmuraya, Masaki Hashimoto, Nobuyuki Kondo, Ayuko Sato, Seiki Hasegawa, Tohru Tsujimura
2. 発表標題 Detection of characteristic copy number alterations for malignant pleural mesothelioma using digitalMLPA
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshie Yoshikawa, Kazue Yoneda, Mitsuru Emi, Masaki Ohmuraya, Masaki Hashimoto, Nobuyuki Kondo, Seiki Hasegawa, Ayuko Sato, Tohru Tsujimura
2. 発表標題 Copy number analysis of long-term preserved FFPE specimens from patients with malignant mesothelioma using digitalMLPA
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshie Yoshikawa, Mitsuru Emi, Kazue Yoneda, Masaki Ohmuraya, Masaki Hashimoto, Nobuyuki Kondo, Ayuko Sato, Seiki Hasegawa, Tohru Tsujimura
2. 発表標題 Landscape of copy number alteration using digital MLPA in malignant mesothelioma; correlation with patient's prognosis
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	米田 和恵  (Yoneda Kazue)  (80724806)	兵庫医科大学・医学部・講師   (34519)	
研究 分担者	江見 充  (Emi Mitsuru)  (90221118)	兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授   (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ハワイ大学がんセンター			
オランダ	MRC-Holland			