

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月12日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310123

研究課題名（和文） 乳癌の個別化医療実現のための遺伝子異常の探索

研究課題名（英文） Studies on cancer genomics to develop personalized therapy and medicine in breast cancer: Whole exome sequencing analysis of primary breast cancer and its metastatic tumor.

研究代表者

細田 文恵 (HOSODA FUMIE)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：30219191

研究成果の概要（和文）：

次世代シーケンス技術を用いて乳癌の遺伝子異常を探索し、個別化医療実現のための新規治療標的分子または診断マーカーの開発を目指す目的で研究を行なった。乳癌6症例のペア12サンプル（原発腫瘍、非癌乳腺組織）と14症例のトリオ42サンプル（原発腫瘍、転移リンパ節腫瘍、非癌リンパ節）の全エクソンシーケンスを解析し、アミノ酸置換やスプライシング異常を生じる一塩基配列変異を抽出した。乳癌においてリンパ節転移の有無は予後不良とよく相関する。特にリンパ節転移を解析対象に含めたトリオ比較解析に重点を置き、原発腫瘍、転移リンパ節腫瘍それぞれにおける遺伝子変異の特徴を調べた。各症例における突然変異数（原発腫瘍+転移リンパ節腫瘍）は多いもの（1710個）から少ないもの（34個）まで様々であった。原発腫瘍と転移リンパ節腫瘍間で突然変異の多く（89%）を共有する症例は1症例のみで、他症例では30%以下であった。統計学的解析から、乳癌原発腫瘍の発生に重要と考えられる遺伝子132個、リンパ節転移に重要と考えられる遺伝子189個をそれぞれ絞り込んだ。これらの遺伝子は乳癌の治療標的候補であるとともに、早期に乳癌の悪性度を予測または悪性化を予防する医薬品開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Metastasis is the main cause of therapeutic failure and death in cancer patients. A number of genetic alterations have been identified in primary breast tumors, but genetic changes particular to the metastatic tumors have not been well studied. To investigate critical genetic changes that occur during the metastatic process, we performed whole exome sequencing of 14 trio-specimens: the primary breast cancer, its metastatic lymph node tumor and matched non-cancerous tissue from the same patient by massively parallel sequencing. Comparing the three genomes, we identified a wide variety of somatic variations, 26-676 (median=46) mutations in the primary tumors and 8-1034 (median=37) mutations in the metastatic lymph node tumors. The differences of mutation rates (34 single nucleotide variations (SNVs) at the lowest to 1710 SNVs at the highest) in individual patients suggested that various processes of tumor development and distinct selective pressures are present within the tumor environment. We identified 132 and 189 recurrent mutations specific to the primary and lymph node tumors, respectively, and evaluated its significance with a statistical ranking method. Our findings will provide new insights for the mechanism of breast tumor metastasis and future personalized therapy and molecular medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：乳癌、リンパ節転移、エクソンシーケンス、個別化医療

1. 研究開始当初の背景

アレイ CGH (comparative genomic hybridization: 比較ゲノムハイブリダイゼーション)法を用いた乳癌のゲノム解析を行い、ゲノムワイドにコピー数異常部位を同定した。また、乳癌原発巣と転移リンパ節腫瘍のゲノムコピー数異常を比較すると、異常のパターンが異なる症例が多いことを見出した。乳癌における遺伝子異常の報告は多くあるが、リンパ節転移腫瘍における遺伝子異常はほとんど解析されていない。リンパ節転移は乳癌の予後不良と強く相関しており、同一症例における原発腫瘍と転移リンパ節腫瘍の詳細な遺伝子変異比較はリンパ節転移機構の解明に重要であるとともに、乳癌の個別化医療実現に資する情報を得ることができると考えた。そこで、新たに技術開発され、研究代表者が所属する研究室において国内でいち早く使用が可能になった次世代シーケンサーを用いて、乳癌の全エクソンシーケンス解析に取り組む計画を立てた。

2. 研究の目的

コピー数解析と合わせて、ゲノム増幅部位または欠失部位に含まれる機能性遺伝子群の塩基配列変異を網羅的に探索することにより、乳癌の発生に重要な遺伝子を効果的に単離同定する。また、乳癌の予後不良と相関するリンパ節転移に重要な遺伝子変異を、乳癌原発巣と転移リンパ節腫瘍のシーケンス比較によって探索する。これらの解析により、乳癌の新規治療標的分子や早期に乳癌の悪性化を予測できる分子を同定し、医薬品開発に繋がる研究を行なうことを目的とする。

3. 研究の方法

凍結標本またはメタノール固定パラフィン包埋組織標本から、乳癌原発巣、非癌乳腺組織、リンパ節腫瘍、非癌リンパ節のDNAを調製した。ダメージを受けたアーカイブDNA

試料からでもシーケンスが読めるように工夫した方法を用いて、アジレント社製ヒト全エクソンキット (ターゲット領域 38 Mb または 50 Mb) によるエクソン領域の濃縮を行なった。イルミナ社 GAIIX または HiSeq2000 シークエンサーを用いて大量並列末端塩基配列決定法による塩基配列解析を行なった。

独自に開発した塩基配列変異予測プログラムを用いて、アミノ酸置換やスプライシング異常を生じる塩基配列変異を抽出した。原発腫瘍と転移リンパ節腫瘍における遺伝子変異の特徴を調べ、統計学的手法を用いて、乳癌のリンパ節転移に重要な遺伝子候補の絞り込みを行なった。

4. 研究成果

乳癌 14 症例のトリオサンプル(原発腫瘍、転移リンパ節腫瘍、非癌リンパ節) および、乳癌 6 症例のペアサンプル (原発腫瘍、非癌乳腺組織) の全エクソンシーケンスを実施した。

乳癌の予後不良と相関するリンパ節転移を解析対象に含めたトリオ解析に重点を置き、独自に開発したパイプラインを用いて、詳細なシーケンスデータ解析を行なった。予測された変異数は症例によって大きく異なり、症例当り最少 34〜最多 1710 (原発+転移リンパ節) であった。変異数中央値は、原発 46 (26〜676)、転移リンパ節 37 (8〜1034)、両者の共通変異数は 7 (1〜604) であった。共通変異保持率が高かったのは 1 症例のみ(原発腫瘍変異の 89%を転移リンパ節で保持)であり、その他の症例では 3〜30%であった。この結果は、乳癌腫瘍細胞の不均一性と転移能獲得における進展機構、また環境適応機構の多様性を示すものと考えられる。

遺伝子サイズとランダムな突然変異出現率を考慮して、原発腫瘍と転移リンパ節腫瘍それぞれに特異的で、かつ統計学的に意味のある重要な、132 個と 189 個の変異遺伝子を

ランキングした。これらの遺伝子は、乳癌の発生に重要な遺伝子と、リンパ節転移に重要な遺伝子である。転移リンパ節腫瘍特異的変異遺伝子については乳癌の予後予測に役立つ可能性があり、多検体（50 症例の 50 原発腫瘍検体、100 リンパ節腫瘍検体、50 非腫瘍検体）を用いた頻度観測を実施する予定である。また、特に需要と思われる候補遺伝子について機能解析を進めており、本研究成果を乳癌の新規治療標的分子、予後予測分子の同定研究として近々論文にまとめる予定である。

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 4 件)

① Arai Y, Totoki Y, Takahashi H, Nakamura H, Hama N, Kohno T, Tsuta K, Yoshida A, Asamura H, Mutoh M, Hosoda F, Tsuda H, Shibata T. Mouse Model for ROS1-Rearranged Lung Cancer. PLoS One. 2013;8(2):e56010. doi: 10.1371/journal.pone.0056010.

② Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, Aoki M, Hosono N, Kubo M, Miya F, Arai Y, Takahashi H, Shirakihara T, Nagasaki M, Shibuya T, Nakano K, Watanabe-Makino K, Tanaka H, Nakamura H, Kusuda J, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Ueno M, Shigekawa Y, Kawakami Y, Arihiro K, Ohdan H, Gotoh K, Ishikawa O, Ariizumi S, Yamamoto M, Yamada T, Chayama K, Kosuge T, Yamaue H, Kamatani N, Miyano S, Nakagama H, Nakamura Y, Tsunoda T, Shibata T, Nakagawa H. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. Nature Genetics 査読有 2012, 44, 760-764. DOI:10.1038/ng.2291.

③ Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, Arai Y, Hosoda F, Ishikawa S, Tsutsumi S, Sonoda K, Totsuka H, Shirakihara T, Sakamoto H, Wang L, Ojima H, Shimada K, Kosuge T, Okusaka T, Kato K, Kusuda J, Yoshida T, Aburatani H, Shibata T. High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. Nature Genetics 査読有 2011, 43, 464-469. DOI: 10.1038/ng.804.

④ Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Hosoda E, Gotoh M, Tsuta K, Asamura H, Matsuno Y, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S. DEK oncoprotein regulates transcriptional

modifiers and sustains tumor initiation activity in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung. Oncogene 査読有 2010, 29, 4671-4681. DOI: 0.1038/onc.217.

[学会発表] (計 4 件)

① 細田文恵、十時 泰、新井康仁、津田 均、井本逸勢、稲澤譲治、大木 操、柴田龍弘、乳がん原発巣とリンパ節転移巣における遺伝的変異の解析、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 21 日、ロイトン札幌 (札幌市)

② Hosoda F, Totoki Y, Arai Y, Tsuda H, Imoto I, Inazawa J, Ohki M, Shibata T. Comparison of genetic alterations in primary breast cancer and its metastatic tumor. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

③ 新井康仁、細田文恵、島 豊、中西幸浩、柳原五吉、北林一生、大木 操、広橋説雄、柴田龍弘、F-box and leucine-repeat protein 17 (FBXL17) は新規のがん抑制遺伝子である、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 23 日、大阪国際会議場 (大阪市)

④ 山本尚吾、十時 泰、藺田幸太郎、細田文恵、白木原琢哉、辰野健二、柴田龍弘、油谷浩幸、全ゲノムシーケンスによる肝癌のゲノム構造異常解析、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 23 日、大阪国際会議場 (大阪市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/19genom/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細田 文恵 (HOSODA FUMIE)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：30219191

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

柴田 龍弘 (SHIBATA TATSUHIRO)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：90311414
十時 泰 (TOTOKI YASUSHI)
独立行政法人国立がん研究センター・研究
所・ユニット長
研究者番号：10373333
津田 均 (TSUDA HITOSHI)
防衛医科大学校・病態病理学講座・教授
研究者番号：70217321