

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 2 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460710

研究課題名(和文)環境癌における3p21領域ゲノム構造異常の詳細解析

研究課題名(英文) Analysis of genome structural abnormalities of 3p21 in environment-associated cancers

研究代表者

江見 充 (Emi, Mitsuru)

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90221118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：環境がん(腎がん、悪性中皮腫)における染色体3p21領域でのゲノム構造異常の同定およびその有用な診断法の開発を行なう目的で、高密度CGHアレイ、ターゲット次世代シーケンサー、MLPAなど先端的なゲノム解析手法を総合的に実施した。腎がんではシンプルな全体のLOHの存在が特徴的であったが、悪性中皮腫では33例中20例で微細なゲノムのホモ接合性欠失の多発を特徴的に認めた。ホモ欠失は(平均4.7遺伝子/腫瘍)、SETD2など47-48Mb領域とBAP1など52-53Mb領域に集中していた。これら同定した特徴的なゲノム構造異常の効率的・迅速な診断法としてdigital MLPA法の開発に着手している。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we sought to analyze environment-associated cancers, i.e., kidney cancer and malignant mesothelioma, for genome structural abnormalities with various advanced genome technologies, such as high-density CGH array, targeted NGS, MLPA, to search for copy number alterations in a chromosome region 3p21 that is suspected to be unstable with our previous knowledge. A simple contiguous large deletion of one allele (LOH) was observed as a characteristic event in kidney cancer. On the contrary, we detected multiple minute genome homozygous deletions in 20/33 tumors in malignant mesotheliomas. Those minute deletions were clustered in 47-48 Mb centered by SETD2 and 52-53 Mb region centered by BAP1. Those tumors presented with homozygous deletion of average of 4.7 genes. Therefore, unlike kidney cancer, key-events in mesothelioma development may associated with multiple minute copy number loss resulted by synchronous fragmentation of 3p21 and aberrant repair.

研究分野：ゲノム解析

キーワード：悪性中皮腫 腎細胞がん 3p21 BAP1 biallelic deletion

## 1. 研究開始当初の背景

(1) DNAの変異としては一塩基置換が良く知られ研究も進んでおり、また近年次世代シーケンサーの登場で癌における一塩基置換や数~数十塩基の欠失、挿入については検出が容易になされるようになってきた。一方癌の網羅的ゲノムコピー数解析手法としては、古くは Comparative Genomic Hybridization (CGH)による Mb 単位の欠失・重複の検出、その後数年間までは平均数十 kb 毎に設計されたプローブを用いてコピー数解析する CGH アレイ解析が盛んに行われた。このような手法を用い、3 番染色体短腕(3p)は、20 年以上前から肺癌、乳癌、腎癌他種々の癌で高頻度欠失することが知られるようになった。小細胞癌や腎細胞癌では 90~100%という高頻度欠失の報告もある。特に 3p21 はホモ欠失しやすく、本領域にマッピングされる幾つかの遺伝子が putative tumor suppressor genes と呼ばれ、癌化への関与が推測されてきたが、その詳細はよくわかっていなかった。

(2) そんな中 2010 年から 2012 年にかけて 3p21 マッピング遺伝子の高頻度体細胞変異が相次いで報告され、俄然注目されるようになった。すなわち、2010 年に転移性のブドウ膜黒色腫の 8 割以上で BAP1

(BRCA1-associated protein 1) の体細胞変異が、2011 年に腎臓明細胞癌の 41%に PBRM1 遺伝子の体細胞変異が報告された。2012 年に腎臓明細胞癌に BAP1 の体細胞変異も報告された。我々も 2011 年に悪性中皮腫 (MM) に 3p21 領域の高頻度欠失 (Yoshikawa ら, Int J Onco 1, 39(6), 2011) を見つけ、欠失領域には BAP1 や SEMA3G がマッピングされることを報告した。その後同年 MM の 23%に同遺伝子の体細胞変異が欧米グループより報告された。引き続き別のグループから MM の家族集積例の中に BAP1 の germline(生殖細胞系列)変異を持つ家族が 2 家系報告され、明確なアスベスト高曝露歴なしで多くの家族メンバーが MM や別のタイプの腫瘍を発症しており、新たな“家族性腫瘍”の存在が示唆された。

我々も本邦では初めて BAP1 遺伝子の体細胞変異を報告 (Yoshikawa, Emi ら, Cancer Sci, 103(5), 2012) その変異は組織特異性があり、上皮型 MM の 8 割以上で検出され、また塩基置換より数エクソンにわたるホモ欠失が多いことが特徴であった。

そこで、BAP1 の全エクソンにつき、MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)法を用いて各エクソンのコピー数解析したところ、以前同一検体を用いた PCR 断片の塩基配列解析では検出できなかった新たなコピー数異常が複数見つかった。このように、遺伝子のエクソン単位のゲノムコピー数解析に MLPA 法は有効な手法である。ただ、癌分野では主として家族性腫瘍の原因遺伝子診断用に市販 MLPA キットが利用でき

るが、3p21 にマッピングされるほとんどの遺伝子は残念ながら市販されていない。簡便な遺伝子定量法としてはリアルタイム PCR が思い浮かぶが、ゲノムコピー数を 1 アレル変化まで正確にとらえることは難しく、また標準となる補正遺伝子の設定が困難であるという問題がある。

(3) 我々は MM を対象とした SNP アレイ解析データから 3p21 領域には BAP1 とともに欠失しやすい遺伝子を 10 個以上見つけており、コピー数異常の特徴をとらえたいと考えた。予備実験として限界を承知の上、3p21 にマッピングされる 10 個の遺伝子を選び出し、それぞれ各エクソン 1 対とし複数エクソンを対象とする primer 対を設計し、MM 検体と対象となる末梢血ゲノム DNA を用いてリアルタイム PCR で比較した。SNP アレイ解析結果からは同領域が連結して欠失しているように見えたにもかかわらず、同一遺伝子内でもホモ欠失、ゲノム増幅両方を合わせ持つ遺伝子の存在を示唆する結果が得られた。この結果から、ゲノム上の切断点 2 サイトに挟まれた領域がすべて欠損しているわけではなく、複数の切断点で切れ、重複や組換えが生じ複雑な構造をしている可能性が高い。種々の癌で高頻度の異常がありながらも、本領域の欠失による染色体構造異常の実態はよくわかっていない。そこで、精度良くゲノムコピー数を定量する手法を確立し、3p21 マッピング遺伝子のコピー数異常を全エクソンにわたり詳細に解析する必要性を感じ、本研究を考案した。

## 2. 研究の目的

DNA の変異としては一塩基置換が良く知られ研究も進んでいるが、癌検体を用いて百 bp ~ 数 kb 程度の欠失や重複は検出が難しく、その頻度や癌発生に及ぼす影響、その分子機構も明らかになっていない。

(1) 種々の癌で高頻度欠失することが知られている 3p21 領域内のゲノムコピー数異常を詳細に検討し、癌化に際して本領域のゲノム不安定性が及ぼす影響を明らかにする。

(2) またコピー数異常が起きやすい遺伝子の検出を癌の診断に適用することを目的とする。百 bp ~ 数 kb 程度のゲノムコピー数異常を精度良く検出する手法を確立し、3p21 マッピング遺伝子を定量し、癌診断に適用する。

## 3. 研究の方法

(1) 3p21 領域内で微小なコピー数異常を精度良く検出する手法を確立することを目的とし、アジレント社 CGH カスタムアレイを構築した。リピート配列や GC リッチな配列を避け、3p21 領域ではプローブ間隔平均を 254bp とし 42,125 プローブ、3p21 周辺 (3p22.1, 3p14.3)

に 93 プローブ, その他染色体に normalization 用プローブ 10,148 個を配置した(図 1)。本 CGH アレイは市販の網羅的 SNP アレイの 5 倍以上高密度である。検証実験として、同一 reference DNA を Cy3 及び Cy5 標識し、競合ハイブリダイゼーションの結果、全プローブの 99.3% が有意にシグナル検出され、99.83% が 1.5 倍差以内に収束した。前後のプローブを含め moving average 処理することで、腫瘍混入率が 20% でもコピー数変動を捉える事ができると判断された。

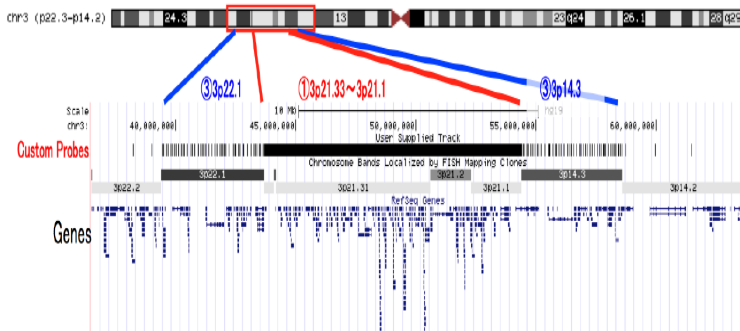


図 1: 3p21 領域と搭載遺伝子マップ

(2) 既に市販 SNP アレイにより BAP1 遺伝子の欠失が検出された MM primary culture 検体を用い CGH アレイ解析を実施し検証を行った。BAP1 遺伝子の欠失は確認されたものの、比較として実施した本遺伝子の Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)によるコピー数解析結果と完全に一致せず、コピー数変化を捉えにくいプローブの存在が判明した。  
 解決策: ハイブリダイゼーション後の洗浄条件を厳しくした。

(3) MM や腎細胞がん(RCC)では 3p21 領域全体が 1 アレル欠損した検体が多いため、normalization 用プローブが存在していても 2 倍体領域の設定が難しい、かつ MM は aneuploidy が多いため 1 コピー相当の変化を検体毎に設定する必要があった。  
 解決策: 3p21 と周辺領域の 13 か所のマイクロサテライト解析 D3S1263 (3p25.3); D3S1266 (3p24.1); D3S1611 (3p22.2); D3S3687 (3p22.1); D3S3678 (3p22.1); D3S2420 (3p21.31); D3S1568 (3p21.31); D3S1573 (3p21.31); D3S3561 (3p21.1); D3S3648 (3p21.1); D3S1289 (3p14.3); D3S1300 (3p14.2); D3S1285 (3p14.1)を実施し、3p21 に LOH が検出されるか否かの把握

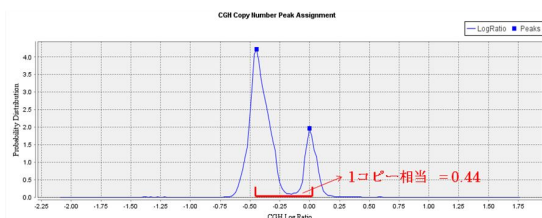


図2: CGHアレイ解析で得られたゲノムコピー数の分布パターンと1コピー相当の変化

と検体中の大凡の正常細胞混入率を把握する

解析に用いた Agilent Cytogenomics 3.0.5.1 が求めた Tumor/Normal コピー数 log<sub>2</sub> ratio の分布パターンから 1 コピーに該当する変化の比率を求めることとした(図 2)

(4) MM 腫瘍組織検体を用いて解析したところ、MM は正常組織の混入率の高い検体が多いためか、コピー数の変化が小さく判定が難しかった。

解決策: 本アレイ解析用腫瘍検体中の正常細胞の混入率を下げるため laser capture microdissection を行うこととした。

(5) MM 腫瘍には激しいゲノム再構成が検出されたため、その内腫瘍発症・進展に関連性が高いと考えられた 4 遺伝子 BAP1, SETD2, PBRM1, SMARCC1 については次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスを実施することとした。Agilent 社 Haloplex custom kit 用に、計 4 6 遺伝子のエクソン領域シーケンス用の probe を設計した。本キットを用いて次世代シーケンスを実施し、塩基配列の変異検出とコピー数解析を実施した。なおコピー数解析時には上記 4 遺伝子を除く 4 2 遺伝子は、ノーマライゼーションとして使用した。

(6) 本プロジェクトで設計した CGH アレイは有用だが、解析に必要な DNA 量が多く、解析コストも高額である。  
 解決策: 将来少量の DNA で簡便にコピー数解析を実施するため、MRC-Holland 社と共同研究として digital MLPA 解析キットの構築に着手した。digital MLPA とは MLPA と次世代シーケンサーを組合せ、網羅的にエクソン単位のコピー数解析を行う手法である。解析対象遺伝子は、本プロジェクトでコピー数変化が大きかった遺伝子 BAP1, SETD2, PBRM1, SMARCC1 や、CDKN2A/2B, NF2, TP53 を含む 228 遺伝子 377 領域を対象としている。細胞株を用いて、アレイ解析の結果と比較検討中である。

#### 4. 研究成果

腎細胞がんの検体 6 検体、MM 検体 33 検体の合計 48 解析(検証用実験、再解析を含む)実施した。

両腫瘍のゲノム再構成の状況は大きく異なった。

腎細胞癌では 3p21 全体に及ぶと思われる 1 アレル欠損が見られるのみであった。

MM 検体では oscillating copy-number patterns が観察され、61%(20/33)の検体に 2 アレル欠損(図 3)が観察された。2 アレル欠損が見られた 20 検体内では 1 検体でのみ欠損が観察された遺伝子を含め合計 46 遺伝子の欠損が検出され、欠損は平均 4.7 ± 4.1 genes/tumor で、多くは個々に独

立に欠損していた。

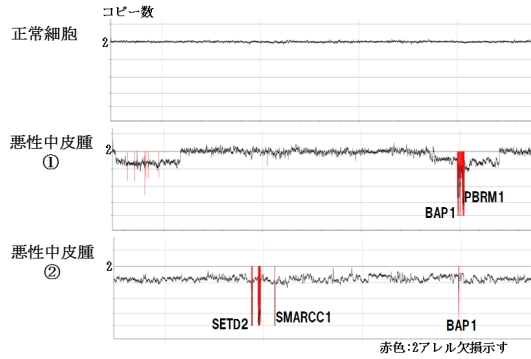


図3: 悪性中皮腫の3p21領域コピー数変化と2アレル欠損

3p21 領域内の 2 アレル欠損位置には 2 つのクラスターが見られ 47-48 Mb (SETD2, SMARCC1 を含む) と 52-53 Mb (BAP1, PBRM1 を含む) に集中していた(図 4)。

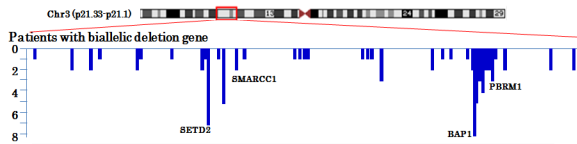


図 4 : 悪性中皮腫33検体における3p21領域内2アレル欠損とその頻度

ほとんどの遺伝子では欠損位置は検体間で異なった。腫瘍発症・進展に関連性が高いと考えられた4遺伝子について実施したターゲットシーケンスの結果、これらの遺伝子に検出された4遺伝子の2アレル欠損はすべて確認できた。またこれら遺伝子は複数検体で点突然変異や数塩基の挿入/欠失などの変異も検出されたが、2アレル欠損頻度は塩基配列レベル変異頻度より多いか、同等であった(図 5)。

| Mutation           | Gene Name | MM1A | MM2A | MM2B | MM3A | MM4B | MM5B | NYU0081 | NYU0082 | NYU0083 | NYU0084 | NYU0085 | NYU0086 | NYU0087 | NYU0088 | NYU0089 | NYU0090 | NYU0091 | NYU0092 | NYU0093 | NYU0094 | NYU0095 | NYU0096 | NYU0097 | NYU0098 | NYU0099 | NYU0100 | NYU0101 | NYU0102 | NYU0103 | NYU0104 | NYU0105 | NYU0106 | NYU0107 | NYU0108 | NYU0109 | NYU0110 |  |
|--------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--|
| Copy number change | NBEAL2    |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
|                    | SETD2     |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
|                    | KLHL18    |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
|                    | SCAP      |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
|                    | SMARCC1   |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
|                    | DNAH1     |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
|                    | BAP1      |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
|                    | PHF7      |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
|                    | NISCH     |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
|                    | PBRM1     |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
| SFMBT1             |           |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
| Sequencing level   | SETD2     |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
|                    | SMARCC1   |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
|                    | BAP1      |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
|                    | PBRM1     |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |
|                    |           |      |      |      |      |      |      |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |

図 5 : 悪性中皮腫33検体における3p21領域内欠損とシーケンスレベル変異の比較 (PNAS 2016 Nov 22;113(47):13432-13437, Fig. 2より)

これらの結果より、MM では 3p21 にクロモソリプシスと呼ばれる染色体破砕が生じていると推測される。染色体破砕後の修復工程で 3p21 領域内遺伝子間の融合が生じると考えられ、他の研究者より MM で報告された融合遺伝子やスプライシング異常 (Bueno et al. Nat Genet. 2016 Apr;48(4):407-16.)は、我々の知見と合致する。

現在ゲノム変異解析が次世代シーケンス一辺倒であり、腫瘍では 30bp 程度からエクソン単位の欠損はほとんど検出されていないと思われる。我々の知見は、検出しにく

いエクソン単位のコピー数変化も解析対象にすることにより腫瘍変異に関する新たな知見が得られる可能性を示唆している。

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 3 件)

Yoshikawa Y, Emi M, Hashimoto-Tamaoki T, Ohmuraya M, Sato A, Tsujimura T, Hasegawa S, Nakano T, Nasu M, Pastorino S, Szymiczek A, Bononi A, Tanji M, Pagano I, Gaudino G, Napolitano A, Goparaju C, Pass HI, Yang H, Carbone M. High-density array-CGH with targeted NGS unmask multiple noncontiguous minute deletions on chromosome 3p21 in mesothelioma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Nov 22;113(47):13432-13437, DOI: 10.1073/pnas.1612074113 査読あり

Emi M, Yoshikawa Y, Sato C, Sato A, Sato H, Kato T, Tsujimura T, Hasegawa S, Nakano T, Hashimoto-Tamaoki T. Frequent genomic rearrangements of BRCA1 associated protein-1 (BAP1) gene in Japanese malignant mesothelioma-characterization of deletions at exon level. J Hum Genet. 2015 Oct;60(10):647-9. doi: 10.1038/jhg.2015.91. 査読あり

Nasu M, Emi M, Pastorino S, Tanji M, Powers A, Luk H, Baumann F, Zhang YA, Gazdar A, Kanodia S, Tiirikainen M, Flores E, Gaudino G, Becich MJ, Pass HI, Yang H, Carbone M. High Incidence of Somatic BAP1 alterations in sporadic malignant mesothelioma. J Thorac Oncol. 2015 Apr;10(4):565-76. doi: 10.1097/JTO.0000000000000471. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

吉川良恵、江見充、佐藤鮎子、大搦泰一郎、辻村亨、中野孝司、玉置(橋本)知子 Differences with BAP1- and PBRM1-mutations among malignant mesotheliomas and renal cell carcinomas 日本癌学会、2015年10月8日~10月10日、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

江見 充 (EMI, MITSURU )  
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号： 9 0 2 2 1 1 1 8

(2)研究分担者

玉置 知子 (TAMAOKI, TOMOKO )  
兵庫医科大学・医学部・名誉教授  
研究者番号： 1 0 1 7 2 8 6 8

(3)連携研究者

吉川 良恵 (YOSHIKAWA, YOSHIE )  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号： 1 0 5 6 6 6 7 3