

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462180

研究課題名(和文) 常染色体優性遺伝形式で発症する家族性肺癌家系における原因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Germline mutations causing familial lung cancer

研究代表者

宮崎 拓郎 (MIYAZAKI, Takuro)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：00584749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：家系内の肺癌罹患者3名、非罹患者3名の血液からゲノムDNAを抽出し、Life Technologies社のSOLiD5500を用いてpair-end read sequenceを行なった。Novoalign CSMP1にてmappingを行い、GATK(Genome Analysis ToolKit)を用いて塩基置換、及び塩基欠失挿入リストを作成し、変異候補遺伝子をリストアップした。罹患者に共通して認め、非罹患者に共通して認めない遺伝子と現時点では未発症である、変異を有する非罹患者を考慮し、罹患者と非罹患者に共通して認める遺伝子を選定した。

研究成果の概要(英文)：To identify the gene(s) that cause lung cancer in this pedigree, we extracted DNA from the peripheral blood of three individuals and from the blood of one cancer-free control family member and performed whole-exome sequencing. We identified 41 alterations in 40 genes in all affected family members but not in the unaffected member. These were considered candidate mutations for familial lung cancer. Next, to identify somatic mutations and/or inherited alterations in these 40 genes among sporadic lung cancers, we performed exon target enrichment sequencing using 192 samples from sporadic lung cancer patients. We detected somatic 'candidate' mutations in multiple sporadic lung cancer samples; MAST1, CENPE, CACNB2 and LCT were the most promising candidate genes. In addition, the MAST1 gene was located in a putative cancer-linked locus in the pedigree. Our data suggest that several genes act as oncogenic drivers in this family, and that MAST1 is most likely to cause lung cancer.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：家族性肺癌

1. 研究開始当初の背景

近年、肺癌症例の増加に伴って、肺癌に対する予防的措置として禁煙、食生活の改善などが講じられている。それに加え早期診断のため検診を推進する努力が払われ治療成績は向上してきている。しかしながら、我が国における肺癌の死亡率は年々増加の一途であり、男性では癌死亡の第一位、女性でも大腸癌に次ぎ第二位であるのが現状である。

ヒト癌における細胞生物学的、分子生物学的研究の発展、進歩により様々な臓器における癌の染色体異常、遺伝子異常が次々と解明されてきた。なかでも RB(retinoblastoma) 遺伝子、APC(adenomatous polyposis coli) 遺伝子、BRCA1 遺伝子などをはじめとする種々の癌抑制遺伝子の多くは、遺伝性あるいは家族性腫瘍の研究によって同定され、それを足掛かりに一般にみられる散発性腫瘍における研究が発展し今日に至っている。それ故、癌研究における癌多発家系の解析は極めて重要な研究テーマである。

現在まで、膨大な遺伝情報から原因遺伝子を拾い出す手段は限られており、近年まで、人的、時間的な多大な労力が必要であった。しかし近年、ヒトゲノムや一塩基多型(SNP)のデータベースの充実に加えて、次世代型シーケンサーを用いた高速かつ大規模なヒトゲノム解析も可能となった。

肺癌は通常、遺伝性は知られていない。しかし、我々は3世代に渡って16名に肺癌の発生を認め、常染色体優性遺伝形式が強く疑われる大家系を見出した。

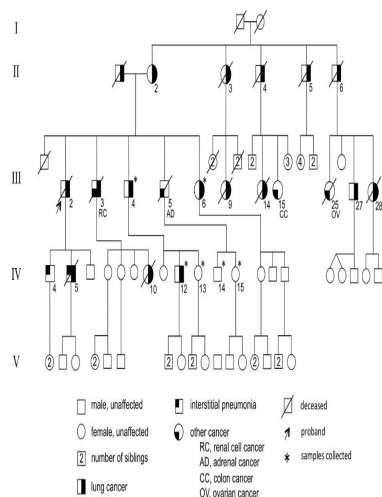


Figure 1 Familial lung cancer pedigree. Seventeen members, 16 of whom were cognate and one who was a spouse, were diagnosed as lung cancer. Three out of the 16 had multicentric lung cancer (III-13, IV-5, IV-12), and one (III-3) also had renal cell cancer. Three members also had other types of cancer (III-5, adrenal cancer; III-14, colon cancer; and III-25, ovarian cancer). Individuals IV-4 and IV-5 had interstitial pneumonia as a respiratory complication.

本研究では、次世代型シーケンサーを利用して、家族性肺癌家系構成員（発症および未発症）の塩基配列を解読し、遺伝子変異およびゲノム構造異常を明らかにし、家族性肺癌

の原因を特定すること目的とする。変異解析により得られた結果を用いて、散発性肺癌における遺伝子変異の発生頻度を検討する。また、未発症の家系構成員における遺伝子変異があった場合、定期検査を行い早期発見、早期治療に結びつけることができる。

家族性肺癌家系は世界的に見ても稀で、これまでの報告されている文献では連鎖解析や Fine Mapping 等の手法を用いて研究されている。Bailey らは 6q23-25 におこる変異が肺癌発生と関連があると報告している (Am.J.Hum.Genet. 2004;75:460-474.) が、Liu らは 15q24-25.1 にあるとし (J Natl Cancer Inst 2008;100:1326-1330)、その後 5p15.33、6p21.33、6q23-25/RGS17、15q24-25 にある SNP(Single Nucleotide Polymorphisms) が肺癌と関連する (Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2010;19:517-524) と報告しており原因遺伝子の特定には至っていない。

2. 研究の目的

次世代型シーケンサーを利用して、家族性肺癌家系構成員（発症および未発症）の塩基配列を解読し、遺伝子変異およびゲノム構造異常を明らかにし、家族性肺癌の原因を特定することを第一の目的とする

本研究では、肺癌罹患家系員と非罹患家系員より採取した血液サンプル、または既に当科にて手術にて切除、採取された凍結標本、FFPE 薄切標本から抽出し得られた DNA を用いて変異解析を行う。

1. 次世代型シーケンサーを用い、患者特異的な遺伝子変異、ゲノム構造異常の発見

2 見出された変異や構造異常が散発性肺癌においても同様に認めるのかどうかを検討する。散発性肺癌症例は既に当院当科において手術時に切除、採取された FFPE 薄切標本、またはこれから切除される対象症例に関しては凍結標本を使用して解析を行う。

散発性肺癌においても同様の変異や構造異常を認める場合はその出現頻度がどの程度であるのか、予後との関連があるのか検討する。

3. in vivo(細胞実験、動物実験)における肺癌発生機序の解明と、その抑制

次世代シーケンサーの開発により遺伝学的解析は breakthrough を迎え、近年これまで明らかとなっていなかった遺伝子異常

が続々と解明されつつある。家族性肺癌において、これまでの研究では臨床病理学的な検討が多く、明らかな原因遺伝子は特定されていなかったが、この技術を用いることが可能である。

本研究のような3世代に渡り16人も肺癌を発症しているような家族性肺癌大家系は世界的にも極めて希である。我々は、以前よりこの家系に着目し、家族の同意のもと、データを蓄積していた。近年までは、膨大な遺伝情報から原因遺伝子を拾い出す手段は限られており、これまでフローサイトメトリー、FISH法、CGH法、マイクロサテライト解析等が行われ、本家系に特異的な異常をいく原因遺伝子の特定には至っていないのが現状であった。しかし、次世代シーケンサーが登場したことによって、ようやく同家系の肺癌原因遺伝子の解析が可能となり、患者家族もその遺伝子の同定と、治療の可能性を含めた研究成果に期待している。また、現在も、肺癌発症家系の構成員は増加し、癌発症年齢を迎えつつあり、原因遺伝子の解明が急務である。

3. 研究の方法

1. インフォームド・コンセントおよび血液サンプルからのDNA抽出

本研究の目的・解析法等を事前に十分に説明を行う。同意を得られた研究対象者から、血液サンプルを採取し、フェノール抽出法によりDNAの抽出を行う。

2. Life technology社のSolid®5500(人類遺伝学教室で所有する次世代型シーケンサー)を用いて、全エクソンまたは全ゲノムを対象とした塩基配列の決定を行う。

3. データ解析・原因遺伝子の解明

公開されているデータベースとの比較を行い、本家系の塩基配列、ゲノム構造異常、遺伝子多型を明らかにする。

4. 研究成果

常染色体優性遺伝形式にて発症する肺癌家系において肺癌罹患患者(N=3)と家系内非罹患患者(N=1)を対象に血液からゲノムDNAを抽出し、Life Technologies社のSOLiD5500を用いてpair-end read sequenceを行なった。Novoalign CSMP1にてmappingを行い、GATK(Genome Analysis ToolKit)を用いて塩基置換(SNVs:Single Nucleotide Variants)、及び塩基欠失挿入(INDELS:insertions and/or deletions)リストを作成し、変異候補遺伝子をリストアップした。

【結果】

罹患者に共通して認め、非罹患者には認めない遺伝子変異:69遺伝子、71箇所を抽出した。うち67遺伝子、69箇所はSNVであり、2遺伝子、2箇所がindelであった。これらはダイレクトシーケンスを行い、全ての箇所で見つかった変異であることを確認した。

変異は全てheterozygous changeであった。

症例	診断時年齢	性別	部位	組織型	喫煙歴
II-1	51	F			
II-2	72	F			
II-3	58	M			
II-4	66	M			
II-5	54	M	右下葉	adenocarcinoma,well differentiated	なし
III-2	67	M	右下葉	adenocarcinoma,papillary type	10本×45年
III-3	64	M	左上葉 左腎	adenocarcinoma,well differentiated clear cell carcinoma	10本×40年
III-4 罹患者①	74	M			
III-6 罹患者②	56	F	右下葉 左下葉	adenocarcinoma,papillary type adenocarcinoma,papillary type	なし
III-8	58	F			
III-13	55	F	右下葉	bronchiolo-alveolar carcinoma	なし
III-27	57	M	右下葉	adenocarcinoma,poorly differentiated	30本×20年
III-28	49	F	右下葉	adenocarcinoma,well differentiated	なし
IV-5	39	M	右下葉	adenocarcinoma,well differentiated	20本×15年
IV-10	44	M	左舌区	adenocarcinoma,well differentiated	
IV-12 罹患者③	31	F			
	46	M	左下葉	bronchiolo-alveolar carcinoma	
	58	M	左上葉	adenocarcinoma,well differentiated	10本×38年

罹患者 (-12)の腫瘍部凍結標本からゲノムDNAを抽出し、実験1と同様の手順を用いて塩基置換、及び塩基欠失挿入リストを作成し、実験1の結果と比較検討した。

【結果】

罹患者の血液、腫瘍部DNAに共通し、非罹患者血液DNAには認めない遺伝子変異:64遺伝子、65箇所を抽出した。

腫瘍部において新たにhomozygous changeは認めなかった。

実験1,2にて認めた遺伝子変異が、非罹患者 (-12,14)においても認められるが、ダイレクトシーケンスにて確認した。

【結果】

罹患者のみに共通して認めた遺伝子変異は29遺伝子、29箇所に見つかった。

考察

- ・本家系の肺癌発症年齢は、30代~70代までと幅がある。そのため、非罹患者の中に、原因遺伝子の変異を持っているが、現在は未発症であるという可能性を考慮する必要がある。

- ・ある家族性肺癌家系の解析により、Surfactant Protein A2(SFTPA2)遺伝子の変異が肺癌の原因遺伝子であると報告されている(1)。しかし、本家系の罹患者では

SFTPA2 に変異を認めないものもあった。
少なくとも本家系においては別のドライバー遺伝子変異が肺癌発症に関与していると考えられる。

これらの候補遺伝子変異と散発性肺癌 192 例の腫瘍部における遺伝子変異（体細胞変異）を比較した。そのうち、さらに一般健康人の胚細胞変異の頻度が少ないものを抽出すると 4 つの遺伝子（MAST1, CENPE, CACNB2 and LCT）が挙げられた。家系内の連鎖解析の結果と併せると、MAST1 が最も肺癌発症と関係していると考えられた。（J Hum Genet. 2015 Oct;60(10):597-603.）

そこで MAST1 の 1st. exon start site をターゲットとした CRISPR/Cas9 vector を作成した。ベクターはシングルガイド RNA を pCas-Guide-EF1a-GFP ベクター（Origene Rockville, MD）へ挿入し作成した。このベクターを Lipofectamine 3000（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）を用いて線維芽細胞へ transfect させ、GFP 陽性細胞を FACS sorting にて回収した。現時点ではこれらの GFP 陽性細胞を培養中で、今後 qPCR, Western blotting にて RNA, protein の発現レベルや、細胞増殖、足場依存性の増殖能の評価を migration assay や colony formation assay を用いて行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1) Tomoshige K, Matsumoto K, Tsuchiya T, Oikawa M, Miyazaki T, Yamasaki N, Mishima H, Kinoshita A, Kubo T, Fukushima K, Yoshiura K, Nagayasu T. Germline mutations causing familial lung cancer. J Hum Genet 査読有, 2015;60:597-603.

〔学会発表〕(計 1 件)

1) 朝重耕一 12、及川将弘 1、扇玉秀順 1、渡邊洋之助 1、宮崎拓郎 1、松本桂太郎 1、三嶋博之 2、木下晃 2、土谷智史 1、山崎直哉 1、福島喜代康 3、吉浦孝一郎 2、永安武 1

次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析による家族性肺癌責任遺伝子の同定

第 113 回日本外科学会学術集会, 2013 年 4 月 11 日、福岡国際会議場、福岡県福岡市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/surgery/1/introduction/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 拓郎 (MIYAZAKI, Takuro)

長崎大学・病院 (医学系)・助教

研究者番号: 00584749

(2) 研究分担者

永安 武 (NAGAYASU, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)

教授

研究者番号: 80284686

(3) 研究分担者

土谷 智史 (TSUCHIYA, Tomoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)

准教授

研究者番号: 30437884

(4) 研究分担者

松本 桂太郎 (MATSUMOTO, Keitaro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)

講師

研究者番号: 80404268

(5) 研究分担者

久保 亨 (KUBO, Toru)

長崎大学・熱帯医学研究所・客員研究員

研究者番号: 50444873