

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460689

研究課題名(和文) 悪性中皮腫の易罹患性を生殖細胞系列ゲノムで診断する方法の考案

研究課題名(英文) Search about germline genetic predisposition to malignant mesothelioma

研究代表者

吉川 良恵 (Yoshikawa, Yoshie)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10566673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫はアスベスト曝露が発症に関与し極めて予後が悪い悪性腫瘍である。患者一人当たりの変異数は成人癌としては極めて少ないと言われてきた。我々は染色体3p21上のBAP1, SETD2, PBRM1, SMARCC1遺伝子にクロモソプシス様の微小領域2アレル欠損が腫瘍に高頻度に生じていることを見出した。一方日本人、米国人散发性患者とも約3%にBAP1の生殖細胞系列変異が検出された。変異の生じやすい後者3遺伝子にも稀な生殖細胞系列ヴァリエントが種々検出されたがいずれもミスセンスで人種により頻度差があった。これらの遺伝子の機能低下が悪性中皮腫発症へ寄与している可能性があり今後検討予定である。

研究成果の概要(英文)：Malignant mesotheliomas are associated to exposure to asbestos and are highly aggressive malignancies in adulthood. To date, only infrequent level of mutations has been reported in this type of tumor. We here detected frequent biallelic deletions, as chromothripsis, in the genes BAP1, SETD2, PBRM1, and SMARCC1 at 3p21 region. We identified germline mutations of BAP1 in Japanese and Caucasian apparently sporadic patients both at frequency of 3%. We also detected missense germline rare variants in SETD2, PBRM1, and SMARCC1; the frequencies differed among ethnicities. These germline mutations may impair gene function and predispose individuals to malignant mesotheliomas.

研究分野：分子生物学

キーワード：悪性中皮腫 ゲノム解析 体細胞変異 生殖細胞系列変異 易罹患性

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性中皮腫 (MM) はその発症にアスベスト曝露が関与し、曝露から MM 発症までの潜伏期間は 30~40 年である。にもかかわらず過去に報告された患者一人当たりの変異数は成人癌としては極めて少なく小児がんに近いレベルである。これは我々がまだ見出だせていない変異が存在する可能性を示唆していた。すなわち、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、その後数年前までは平均数十 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に 1 アレル欠失することが知られている。特に 3p21 は両アレル欠失も報告されており、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。一方、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いため、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おらず、見落とされてきた。

(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 l, 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 BAP1 遺伝子の体細胞変異 (塩基配列解析で検出可能な変異) が欧米グループより報告された。我々も本邦では初めて BAP1 遺伝子の体細胞変異を報告 (Yoshikawa 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。

(3) 2011 年に 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。

本報告は、これまで環境による曝露が主要因と考えられてきた MM が遺伝で発症することを明らかにし大きなインパクトを与えた。BAP1 は遺伝性癌素因症候群の原因遺伝子であり、本遺伝子に 1 アレルの germline 変異をもつことにより優性遺伝形式で MM、ぶどう膜悪性黒色腫、皮膚黒色腫、肺癌、腎細胞がん等の発症リスクが非常に高まることが明らかとなっている。現時点では、機能喪失型 (LOF) 変異 5 種とミスセンス変異 169 種が報告されており、癌家族歴を有する被験者の約 6% に BAP1 の germline 変異が見つかっている。

(4) トルコカップパドキア地方では、天然鉱物繊維エリオナイトの曝露により半数近くが MM で亡くなる家系が存在する。同一エリアで同レベルのエリオナイト曝露にさらされても発症しない家系があることから遺伝的バックグラウンドの差が推測されている。しかし、患者に BAP1 の変異は検出されず、いまだ原因遺伝子は見つかっていない。また MM 集積家系患者が設立した Mesothelioma Applied Research Foundation (MARF) 財団から検体提供を受けた遺伝子解析の報告でも、BAP1 germline 変異を有していない家系も多い。

(5) 本学 MM 患者末梢血ゲノムでは SNP が有意に homozygous に連続 (run of homozygosity, ROH) することを見いだした。ROH を用いた相関解析で、アスベスト曝露歴を有する MM 非発症者と比較し、MM 発症者と相関するゲノム領域を探索し候補領域を絞り込んだ。本領域は染色体 3p21 に該当し、BAP1 が搭載されている。しかし、これらの患者は BAP1 germline 変異は有していない。欧米では、BAP1 germline 変異 (+) 個体は悪性黒色腫発症者の家系に見つかる例が多いが、本邦では悪性黒色腫患者が少なくいまだに本 germline 変異も MM 集積家系の報告もない。

(6) アスベストがかつて建設資材として多用された時代から概ね 40 年が経過し、MM が急増している。予想以上に早い段階で阪神大震災後のがれき処理に従事した公務員の MM 発症が表面化した。今後東日本大震災の被災エリアでも倒壊したビル・家屋から飛散したアスベストによる発症も予測され、MM 発症者はさらに増大すると考えられる。従って、MM への易罹患性を規定するファクターが見つければ患者の早期発見につながり、有用である。

2. 研究の目的

MM への易罹患性を規定する遺伝子を同定し、易罹患性遺伝子診断法を考案することが本課題の最終目的である。アスベスト曝露歴のある人は日本国内に 600

万人いるといわれる。現時点では罹患率は1万人に2~3人程度と考えられ、罹患しやすい遺伝的バックグラウンドを有する者が発症に至る可能性があるため、MMへの易罹患性を規定するゲノム要因が見つければ患者の早期発見につながり有用である。BAP1は明確なアスベスト曝露歴のない個体においてもMM発症に寄与していることが報告されている。本課題においては、アスベスト曝露によるMM発症を促進する易罹患性因子を同定することを主目的とする。人種にかかわらずMM発症促進に寄与する遺伝子が望ましいため、germline変異解析対象として日本人、アメリカ人、トルコ人でアスベスト、エリオナイト曝露歴のあるMM患者とした。

3. 研究の方法

(1) 3p21 領域体細胞変異解析
上記に述べるとおりMMのsomatic(体細胞)変異に関する情報が乏しく、germline変異の探索対象が極めて限られていた。そこでROHの研究で絞り込んだ3p21領域については、日本人と欧米人患者MM検体のsomatic変異解析を先行実施し、somatic変異の生じやすい遺伝子の絞り込みを行った。

具体的には、これまで解析対象とすることが難しかった百bp~数kb程度の欠失や重複を検出するためアジレント社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領域の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。

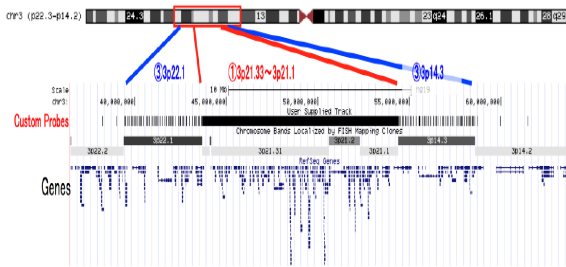


図1: 3p21領域と搭載遺伝子マップ

本CGHアレイを用い日本人およびアメリカ人MM患者33名の腫瘍につき患者末梢血を対照としてゲノムコピー数解析を実施した。

(2) MMで変異を生じやすい遺伝子の腫瘍と対照末梢血ゲノムの塩基配列解析

(1)の結果、並びに過去の塩基配列解析による変異報告データを統合し、MMで変異を生

じやすい遺伝子46個に絞り込み次世代シーケンス(NGS)解析を実施した。somatic変異解析はCGHアレイ解析を実施した腫瘍検体33検体を用いた。germline変異解析は末梢血ゲノムDNAを用い、本学大学病院日本人患者107名、米国ニューヨーク大学病院患者64名を解析した。日本人と欧米人についてはヴァリアントのデータベースが充実しているため、それぞれNGSで検出されたヴァリアントにつき、患者集団頻度とデータベース頻度を比較した。トルコカップドキア患者については検体入手が難しく、16検体の末梢血ゲノムDNAの全エクソンNGS解析を実施した。

4. 研究成果

(1) MM腫瘍における3p21領域内4遺伝子の高頻度2アレル欠損検出

MM検体33検体にoscillating copy-number patternsが観察され、61%(20/33)の検体に2アレル欠損(図2)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。

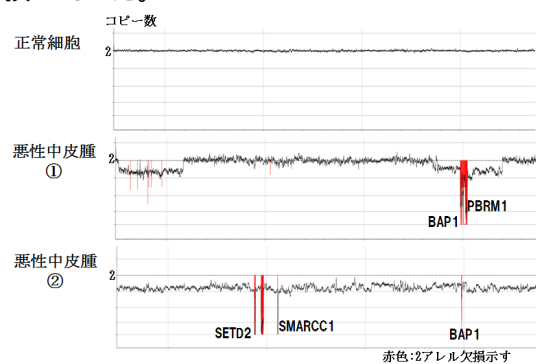


図2: 悪性中皮腫検体の3p21領域で検出された2アレル欠損(赤色領域)例

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(下記図3)。

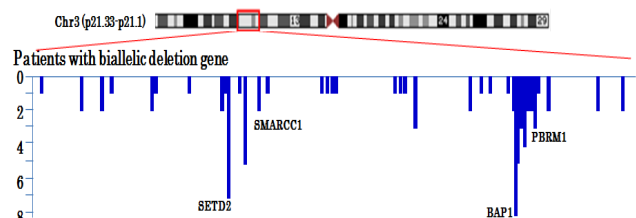


図3: 悪性中皮腫33検体における3p21領域内2アレル欠損とその頻度

ほとんどの遺伝子では欠損位置は検体間で異なった。頻度が高く腫瘍発症・進展に関連性が高いと考えられた4遺伝子の2アレル欠損はNGS解析でも確認できた。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。両者を合わせた変異頻度は BAP1, SETD2, PBRM1, SMARCC1 それぞれ 16/33 (48%), 9/33 (27%), 5/33 (15%), 2/33 (6%)であった。

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 で最近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。

(2) 高頻度で somatic 変異が生じる遺伝子や DNA 修復遺伝子に種々の稀な germline ヴァリアントを検出

BAP1 の germline 変異は散発性 MM 患者日本人 107 名の内 3 名、NYU 大 64 名患者中 2 名 (1 名は異なる 2 種を所有) に検出された、頻度はそれぞれ約 3%であった。見つかった変異の 4 種は機能喪失 (LOF) 型で、2 種がミスセンス (MS) 型であった。家系内の癌集積性については不明である。トルコ人患者には全く検出されなかった。

表 1 : 悪性中皮腫に変異が生じやすい 4 遺伝子に検出される稀な (集団での頻度 1%未満) germline ヴァリアント

Variant ID	Hospital	Gene_ symbol	Effect	Malignant mesothelioma patients				Allele frequency in Database	
				Patients with variant	Patients with homozygous variant	Allele number of variants	Freq of variant	HGVD	ExAC
1	HMC	BAP1	LOF	1	0	1	4.67E-03		
2	HMC		LOF	1	0	1	4.67E-03		
3	HMC		MS	1	0	1	4.67E-03		
4	NYU		LOF	1	0	1	1.56E-02		
5	NYU		MS	1	0	1	1.56E-02		
6	NYU	LOF	1	0	1	1.56E-02			
7	HMC	SETD2	MS	4	1	5	2.34E-02	9.67E-03	1.73E-04
8	HMC		MS	1	0	1	4.67E-03	1.34E-03	1.65E-05
9	HMC		MS	1	0	1	4.67E-03		
10	HMC		MS	1	0	1	4.67E-03	7.13E-03	3.21E-04
11	HMC		MS	1	0	1	4.67E-03	5.46E-03	1.74E-04
12	HMC		MS	1	0	1	4.67E-03		
13	HMC		MS	1	0	1	4.67E-03		
14	NYU		MS	1	0	1	1.56E-02	9.98E-04	1.03E-03
15	NYU		MS	1	0	1	1.56E-02	2.00E-04	
16	HMC		PBRM1	MS	1	0	1	4.67E-03	1.67E-03
17	HMC	MS		1	0	1	4.67E-03		
18	NYU	MS		1	0	1	1.56E-02	2.00E-04	2.47E-05
19	HMC	SMARCC1	MS	6	0	6	2.80E-02	9.58E-03	1.977e-04, 7.414e-05
20	HMC		MS	3	1	4	1.87E-02	9.22E-03	9.88E-05
21	HMC		MS	1	0	1	4.67E-03	1.79E-03	4.94E-04
22	HMC		MS	1	0	1	4.67E-03	3.06E-03	3.21E-04
23	HMC		MS	1	0	1	4.67E-03		2.47E-05
24	NYU		MS	1	0	1	1.56E-02	5.00E-04	1.06E-03

HMC: 兵庫医科大学日本人患者,
NYU: ニューヨーク大患者

Somatic 変異が生じやすい SETD2, PBRM1, SMARCC1 遺伝子には集団での頻度が 1%未満のヴァリアントがそれぞれ 12 名, 3 名, 13 名に検出された (表 1)。その多くが 1 名に

のみ検出されており、また稀なヴァリアントについては多くはヘテロで検出され、ホモで有する患者は SETD2 と SMARCC1 で各 1 名ずつであった。いずれの遺伝子についても日本人に稀なヴァリアントが多く検出された。データベースにおける頻度も日本人のヴァリアントデータベース HGVD での頻度は、アフリカ人、欧米人や東アジア人を含む 6 万人以上のデータベース ExAC より高かった。トルコ人にはいずれも検出されなかったことから、人種による頻度差がある。検出されたヴァリアントすべてがミスセンスタイプであり、遺伝子機能への影響は、その多くが in silico では damaging と推定されているが、不明である。現在その機能変化を証明するための実験系を構築中である。

また興味深いのが、一人の日本人患者がクロマチンリモデリングの 3 種のサブユニット遺伝子に稀なヴァリアントを有していた。それぞれの機能低下が大きくなってでもヴァリアント組合せにより発症に寄与している可能性がある。

トルコカッパドキアの患者には遺伝性癌症候群として知られる遺伝子の germline ミスセンスヴァリアントが検出された。ただそれぞれの家系毎に遺伝子が異なった。エリオナイト曝露による酸化ストレスで染色体破砕が生じ、生まれつき DNA 修復機構が低下している個体においては、染色体破砕後の修復の異常が蓄積され MM 発症に至ると推測され興味深い。問題点はトルコ人の大規模ヴァリアントデータベースが存在しないため、これらのヴァリアントのトルコ人集団頻度が不明な点である。現在単なる多型でないか確認作業中である。

候補遺伝子に見出されるヴァリアントが LOF ではなく、ほとんどがミスセンスなのは、著しい機能低下を生まれつき有していれば MM 発症以前に別の重篤な疾患発症の可能性が高いと考えれば理解できる。現在多くの候補ヴァリアントが見つかっており、今後その遺伝子機能へ及ぼす影響を丁寧に調べていくことで MM 発症の分子機構の解明につなげていきたい。

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 2 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

〔学会発表〕(計 4 件)

吉川良恵、江見充、玉置(橋本)知子 BAP1 mutations in malignant mesotheliomas: a comparison between Japanese and Caucasian patients 日本癌学会、2016年10月6日～10月8日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

玉置(橋本)知子、吉川良恵、佐藤智佳、福岡和也、辻村亨、中野孝司 日本人悪性中皮腫のゲノム解析、日本人類遺伝学会、2015年10月14日～10月17日、京王プラザホテル(東京都)

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)

吉川良恵、大搦泰一郎、久保秀司、佐藤鮎子、辻村亨、江見充、中野孝司、玉置(橋本)知子 Rare germline variants of transcription regulator genes in malignant mesothelioma 日本癌学会、2014年9月25日～9月27日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

〔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

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

(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