

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82713  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2014～2015  
課題番号：26860253  
研究課題名(和文)日本人における前立腺癌の准網羅的遺伝子変異解析

研究課題名(英文)Genetic Analysis of Japanese Prostate Cancer

## 研究代表者

笠島 理加(Kasajima, Rika)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：20630875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：欧米人では前立腺癌の全ゲノム/トランスクリプトーム等を統合的に解析した成果が報告されている。欧米人(白人)と日本人との間で遺伝子異常に「地域差/民族差」があることが解っているが、日本人では大規模な解析の報告が欠如している。本研究では日本人の前立腺癌におけるがん関連遺伝子の変異を準網羅的に解析した。その結果、数種類の前立腺癌に關与すると示唆される遺伝子を見出した。

研究成果の概要(英文)：There exist many integrated analyses of whole-genome, exome, and transcriptome data of Caucasians prostate cancer. However, few reports of analysis on Japanese cases have been available in literature. The tumorigenesis of prostate cancer has been known that there are "regional and/or ethnic differences" between Asians and Caucasians. To clarify the genetic alterations occurred in Japanese prostate cancer, we customized original panels designated as KCC71. In KCC71, 71 genes were selected based on the reported gene-mutation analyses on prostate cancers. In this study, frozen tumor tissues from 21 Japanese prostate cancer patients were subjected to the analyses with the panels using Ion PGM to identify gene alterations. We found several genes to have highly frequent genetic alterations.

研究分野：分子生物学

キーワード：前立腺癌 次世代シーケンサー Ion PGM 遺伝子変異解析

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は欧米人に多くアジア人に少ないがんとされてきたが、近年、本邦においても急増傾向にあり、2020年には罹患者数が約8万人以上、肺癌に次ぐ第2位になると予測されている。2005年 Tomlins らは erythroblastosis virus E26 transformation specific (ETS)ファミリーに属する癌遺伝子である *ERG* (ETS related gene)と *ETV1* (ETS variant gene 1)が染色体改変により、アンドロゲンで発現が誘導される *TMPRSS2* 遺伝子の転写調節領域の下流に転座して生ずる「アンドロゲン誘導性融合がん遺伝子」の形成が50~70%以上の前立腺癌症例で認められることを報告した (Tomlins ら, Science 10: 644-8)。この発見を皮切りに白人の前立腺癌では、*TMPRSS2:ETS* を軸に、核内受容体であるアンドロゲン受容体が染色体の改変に関わる分子機構の解明、次世代シーケンサーやマイクロアレイを用いた大規模なゲノム解析/遺伝子発現解析が精力的に進められている。現時点では、癌遺伝子 *TMPRSS2:ETS* の形成に p53/PTEN 癌抑制経路の不活化を伴う群 (50-70%) と、プロテアゾーム経路でのタンパク質分解に関わる SPOP 変異と染色体 5q21/6q21 が欠損する群 (10%程度) が、遺伝子変異から見た2つの主たる前立腺癌のタイプと考えられている (宮城・病理と臨床 vol.30 no.9 2012)。

一方、神奈川県立がんセンター臨床研究所・がん分子病態学部では、前立腺摘出手術を受けた日本人前立腺癌例を RT-PCR で解析し、28%の症例で *TMPRSS2:ERG* の融合 mRNA を認め欧米よりも出現頻度が低い可能性を指摘した (Miyagi ら, Mod Pathol 2010, 23:1492-1498)。Magi-Galluzzi らは FISH法の解析で *TMPRSS2:ERG* 出現頻度が白人、アフリカ系米国人と比べて16%と有意に低いことを確認している (Magi ら, Prostate 2011, 71: 489-497)。RNA-seq と RT-PCR による解析

で、中国人でも *TMPRSS2:ERG* の頻度が19%と低いことが報告され、アジア人の前立腺癌に共通する特徴と考えられている。一方、白人の10%程度に見られる SPOP 遺伝子変異群の頻度は本邦例でもほぼ同じであることを平成25年度の日本癌学会で当研究室から報告した。癌細胞における体細胞遺伝子変異の出現頻度やスペクトラムに民族差や地域差があることは様々な癌で観察されている。前立腺がんの約2/3が *TMPRSS2:ERG* 融合遺伝子群と SPOP 遺伝子変異群に分類される白人前立腺がんに対して、逆に日本人前立腺がんの遺伝子異常の2/3が black box になっている (図1)。

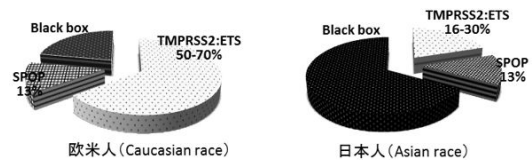


図1. 欧米人 (Caucasian race) の前立腺癌の多くが主たる遺伝子変異が解っているのに対して、日本人前立腺癌では逆に、多くがblack boxにある。

欧米の研究結果がそのまま本邦前立腺癌に適用できないことは明白で、この現状を踏まえ、次世代シーケンサーを用いて前立腺癌における遺伝子変異解析を行い、特に、現在 black box となっている約2/3の症例の遺伝子異常プロファイルを明らかにする。更に、変異解析結果を pathway 解析等を用いて解析し、病理形態学的、また、分子生物学的研究からこれを裏付けると共に、特に日本人前立腺癌の発生、進展に特徴的なメカニズムに着目して、日本人前立腺癌患者の層別化/個別化と、これに対応する診断・治療に有用な標的の探索・確立を進める。

## 2. 研究の目的

### **日本人前立腺癌の准網羅的遺伝子変異解析：発生機序の解明と診断・治療の標的探索**

次世代シーケンサーの進歩に伴う大規模がんゲノミクス研究が加速している。前立腺癌も例外では無く、全ゲノム/全エクソ

ム/トランスクリプトームを統合的に解析した成果が欧米の研究室から報告されている。特筆すべきは、欧米(白人)前立腺癌の50~70%以上で起こる「染色体転座によるアンドロゲン誘導性のがん遺伝子形成」が、日本人前立腺癌では16-30%と有意に低いことで、発がん機構に大きな地位差/民族差がある。日本人前立腺癌の網羅的遺伝子変異解析に立脚した発生機序の解明と診断・治療の標的探索は、我が国の前立腺癌患者のために是非とも必要である。本研究では日本人前立腺癌について半導体次世代シーケンサーを用いてがん関連遺伝子変異を准網羅的に解析し、その結果を基に病理形態学的、分子腫瘍学的解析を加えて、本邦前立腺癌に特徴的な発生機序の解明と診断・治療の標的探索を進め、本邦前立腺癌患者の予後改善に寄与することを目的とする。

明らかとなった遺伝子異常プロファイル pathway 解析等を用いて2次解析すると共に、遺伝子異常から予測される日本人に特徴的な前立腺がん化/悪性進展の分子メカニズムについて、免疫染色、*in situ* hybridization などの病理形態学的手法と分子生物学的実験を組み合わせるの裏付ける。

### 3. 研究の方法

#### (1) 半導体次世代シーケンサー Ion PGM とパネルを用いた遺伝子変異解析

##### ライブラリー合成

抽出されたゲノム DNA における解析パネルに対するライブラリーの合成を Ion Ampliseq™ Library kit2.0 (Thermo Fisher Scientific 社製)を用いて標準プロトコルに従い行った。High Sensitivity DNA Analysis Kits (Agilent 社製)によるライブラリーのクオリティを確認した。合成したライブラリーを Ion PGM により解析を行った。

##### データ解析

Ion PGM 解析により得られたデータを Ion

Reporter™ Software (Thermo Fisher Scientific 社製)を利用し、配列のマッピング、変異 calling およびデータベース情報のアノテーションを行った。

#### (2) がん関連遺伝子 409 個の変異解析パネル (comprehensive cancer panel :CCP) 解析のクオリティの確認

半導体次世代シーケンサー Ion PGM とがん関連遺伝子 409 個の変異解析パネル (comprehensive cancer panel :CCP) を用いて、断片化されていないゲノム DNA におけるパネルのクオリティを確認した。

#### (3) オリジナルパネルの作製

すでに報告されている前立腺癌に関連する遺伝子解析研究(Taylor BS ら, Cancer Cell. 2010 Jul 13;18(1):11-22, Barbieri CE ら, Nat Genet. 2012 May 20;44(6)等) およびデータベース検索などから、前立腺癌に関与し、かつ変異が比較的高頻度に確認されると考えられる 71 種類の遺伝子のエクソン領域について、解析できるオリゴのセット(PCa KCC71)を Thermo Fisher Scientific 社の Ion Ampliseq Designer システムを利用してデザインを行い、パネルを作製した。

#### (4) オリジナルパネルと次世代シーケンサー Ion PGM を用いた日本人前立腺癌の遺伝子変異プロファイル解析

##### HE 染色による癌部の確認

外科切除した前立腺癌 21 例、内 7 症例において左右前立腺癌部採取した合計 28 検体を OCT-compound に包埋凍結し、凍結切片を HE 染色、癌部の確認を行った。

##### ゲノム DNA の抽出

OCT-compound に包埋凍結から癌部組織の一部を取り出し、ゲノム DNA を ZR-Duet™ DNA/RNA MiniPrep kit を用いて抽出し、Qubit dsDNA HS Assay Kit による定量を行った。

半導体次世代シーケンサー Ion PGM と PCa KCC71 による日本人前立腺癌症例における変異解析

( 1 ) と同様の作業を行った .

#### データ解析

Ion PGM 解析により得られたデータを Ion Reporter™ Software ( Thermo Fisher Scientific 社製 ) を利用し , 配列のマッピング , 変異 calling および幾つかのデータベース情報のアノテーションを行った . Ion Reporter の解析結果から , coverage 20 以下 , synonymous mutation を除いた . 更に dbSNPs や COSMIC データベースや文献検索による SNP の除外と変異の同定を行った .

#### PCa KCC71 パネルのクオリティ確認

作製した PCa KCC71 パネルのクオリティを確認した .

### 4 . 研究成果

#### ( 1 ) CCP による解析

409 種類のがん関連遺伝子変異解析パネル CCP を用いた遺伝子変異解析結果から , TP53 など数種類の重要ながん関連遺伝子を含む遺伝子において , No call や coverage 0 の領域が非常に多く見られた . よって , 409 遺伝子全てのエクソン領域を網羅的に解析できない可能性が高いと示唆されたため , 前立腺癌変異解析に特化したオリジナルパネルを作製することにした .

#### ( 2 ) オリジナルパネルによる解析

すでに報告されている前立腺癌に関連する遺伝子解析研究およびデータベース検索などから前立腺癌に関与し , 変異が比較的高頻度に出現すると考えられる 71 種類の遺伝子のエクソン領域について解析できるオリゴのセット (PCa KCC71) を Thermo Fisher Scientific 社製の Ion Ampliseq Designer システムを利用してデザインを行い , 作製した . また , 作製した PCa KCC71 を用いて 71 種類

の前立腺癌関連遺伝子の Ion PGM による配列解析が行えるかどうかを前立腺癌凍結検体について解析および確認を行った . その結果 , 平均 Total reads 3902663bp , 平均 coverage 1850 , 平均 Map reads 97.64% , であり , 充分配列解析を行えるクオリティであった ( 表 1 ) .

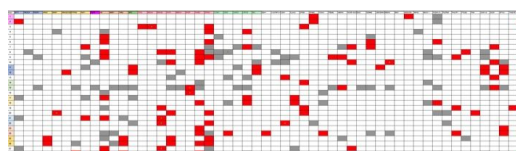
表 1 . PCa KCC71 の解析クオリティ

Total reads	平均 coverage	平均 Map reads
3902663bp	1850	97.64%

#### ( 3 ) KCC71 による遺伝子変異解析について

前立腺癌に関与する 71 種類の前立腺癌関連遺伝子の配列解析を 21 症例の前立腺癌凍結検体について行った . その結果 , アレル頻度が 10%未満の変異を含め , 54 種類の遺伝子上に変異が検出された ( 図 2 ) . その中で , 日本人前立腺癌に関係が深いと示唆される遺伝子を数種類見出した .

図 2 . PCa KCC71 変異解析結果



赤 : アレル頻度 10%以上 , 灰 : アレル頻度 10%未満

#### ( 4 ) まとめ

本研究により , 日本人前立腺癌 21 症例の遺伝子変異解析から日本人前立腺癌に関係が深いと示唆される遺伝子を数種類見出した . 現在 , 見出された変異のパリテーションを行っている . 今後の解析として , 既に多く網羅的遺伝子変異 / 発現解析結果が報告されている白人 (Caucasian race) 前立腺癌と比較し , 日本人前立腺癌に特有な遺伝子変異 , 癌化や悪性進展との関与が予想される pathway を予測や症例の層別化 , 更に , 日本人前立腺癌の遺伝子診断を行うためのパネルの作製などを行いたいと考えている .

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

笠島理加、Driver gene-mutation profile of anaplastic thyroid cancer cells with a highly multiplexed target sequence amplicon、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25～27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

笠島理加、Ion PGMにおけるターゲットシーケンスの凍結組織とFFPEサンプルの評価、NGS現場の会第四回研究会、2015年7月1～3日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

笠島理加、Verification of frozen tissues and FFPE samples for targeted sequencing with the Ion Torrent technology、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8～10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)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

笠島 理加 (KASAJIMA RIKA)

神奈川県立がんセンター・臨床研究所・がん分子病態学部・特別研究員

研究者番号: 20630875

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: