

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

遺伝子不安定性の機能解析及び遺伝子変異推測
モデルの構築による乳癌卵巣癌ハイリスクキャ
リアーの同定と発症予防法の確立に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 田中 憲一

平成22年5月

目次

I 総括研究報告書

遺伝子不安定性の機能解析及び遺伝子変異推測
モデルの構築による乳癌卵巣癌ハイリスクキャリアー
の同定と発症予防法の確立

田中 憲一 1

II 分担研究者報告

1. 卵巣癌特異的染色体異常やヘテロ接合性消失の

ゲノム網羅的同定に関する研究 39

井ノ上 逸朗

2. 遺伝子不安定性の機能解析及び遺伝子変異推測モデルの構築による

乳癌卵巣癌ハイリスクキャリアーの同定と発症予防法の確立

佐伯俊昭 43

III 研究成果の刊行に関する一覧表 46

IV 研究成果の刊行物・別刷 50

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)

総括研究報告書

遺伝子不安定性の機能解析及び遺伝子変異推測モデルの構築による 乳癌卵巣癌ハイリスクキャリアーの同定と発症予防法の確立

主任研究者 : 田中 憲一 新潟大学教育研究院 医歯学系:産科婦人科学 教授

研究要旨

遺伝子不安定性の解析により、乳癌・卵巣癌発症の危険性を有するハイリスクグループを抽出することを目的とする。BRCA1 陽性卵巣がんの臨床病理学的特徴を明らかにするために BRCA1 変異陽性卵巣がん 8 例、孤発性卵巣がん 28 例で網羅的に UPD (Uniparental Disomy) の有無を解析した結果、BRCA1 陽性症例に特異的に観察される UPD 領域が 3 か所認められた。乳癌ゲノムの解析より、癌ゲノム特異的構造変化領域の頻度が低い傾向を示し、癌種によって、染色体構造変化の度合いが異なる可能性を認め、各癌ゲノム特異的な構造異常領域を明らかにし、カタログ化することができた。次いで Germ Line における CNV (Copy Number Variant) 解析を BRCA1 陽性卵巣がん患者 39 家系 51 名、BRCA1 陽性未発症キャリアー 16 家系 30 名、孤発性卵巣がん患者 44 名、65 歳以上の健常者 49 名、合計 174 名で行った。Germ Line における CNV 変化が 50 個以上の症例が孤発性卵巣がん患者で 95.5%と高頻度に認められたが、BRCA1 陽性卵巣がん患者では 33.3%と健常人、BRCA1 未発症者とはほぼ同程度であった。また発症者にだけ共通して認められる CNV 変化がある事、あるいは発症年齢の若年化に伴って CNV の延長が観察されたことなどより、将来のハイリスク群の分離に CNV などの遺伝子不安定性解析が有用であることが示された。

分担研究者

井ノ上 逸朗

東海大学医学部 基礎医学系 教授

佐伯俊昭

埼玉医科大学国際医療センター:外科学 教授

八幡哲郎

新潟大学教育研究院医歯学系:産科婦人科学

講師

関根正幸

新潟大学医歯学総合病院産科婦人科学 助教

研究協力者

野水 整

星総合病院:外科学、副院長

A. 研究目的

これまでの卵巣癌組織でのヒトゲノムコピー数多型CNV解析の結果を踏まえ、がん抑制遺伝子の不活化と同時に、腫瘍組織における活性化した遺伝子変化の集積を説明するメカニズムの一つであるuniparental disomy (UP

D) がSNPタイピング・アレイシグナルの定量的特性を利用することにより可能になったことを利用、UPDの領域を分離、詳細な分子機構の解明を行い、散発性卵巣癌組織と家族性卵巣がん組織両者を解析することにより、BRCA1陽性腫瘍における悪性度、抗がん剤に対する感受性等の病態の特異性を理解する。さらに、BRCA1キャリアーの正常検体でのCNV解析を多数の症例で行い、未発症者、発症者間での比較により、BRCA1キャリアーの中でのハイリスクグループの抽出を可能とし、これらの理解を通して、発症予防管理システムの構築に結びつけることを目的とする。近年、ヒトゲノムコピー数多型の概念が発表され、コピー数が1コピーに減少している遺伝子において発現の低下と疾患感受性への関連が示唆されている。BRCA変異を有するキャリアーでは、BRCA1変異を有しない人々に比較して極めて高い頻度で乳がん、あるいは卵巣がんを発症することより、正常組織においてすでに何らかの遺伝子変化を有していると推察される。近年、Li-Fraumeni症候群の患者では病変の変化に伴って、正常組織のCNV変化が観察される報告 (PNAS: 105, 11264-11269, 2008), 前立腺患者のgerm line CNV変化が2p24.3に認められる報告 (Cancer Res 69, 2176-2179, 2009),

神経芽腫患者のgerm line CNV が1q21.1に認められる等の報告が相次いでいることよりも、正常組織のCNV解析によるアプローチは有意義かつ急務であろう。BRCAキャリアーは正常対立遺伝子が1本しかないため、ゲノムコピー数多型などの後天的要因による発癌メカニズムの解明に理想的なモデルであり、その点でも本研究は注目し得る。さらに、わが国で乳癌・卵巣癌が増加している今日、家族歴による遺伝子相談の数も増加しているなかで、BRCA1キャリアー中から若年発症のさらなるハイリスク群を抽出するアプローチは必須であり、女性の福祉の点からも家族性乳癌・卵巣癌に関する発症リスクの解明が求められている。以上本研究では、日本人独自の家族性乳癌卵巣癌発症推測モデルおよびBRCA1変異推測モデルを構築すると同時に家系内の構成員全てを対象とした網羅的

ヒトゲノムコピー数多型 (copy number variation:CNV) 解析を行い、コピー数の変化と発症感受性の関連を検討、若年発症関連遺伝子の同定を行う。その結果、若年発症の危険性を有するハイリスクグループの抽出が可能となり、新たな発症予防管理システムの確立が実現すると期待される。

B. 研究方法

1. BRCA1陽性卵巣がん組織における

UPD:Uniparental Disomy解析(担当 八幡哲郎、関根正幸)

BRCA1 陽性上皮性卵巣がん組織8例、孤発性卵巣がん組織28例(漿液性腺がん)よりDNA を抽出する。抽出したDNA に対して種々のクオリティチェックを実施、合格したサンプルでAffymetrix SNP array 5.0 によるCNV解析を腫瘍組織と自己正常部分両者で行い、アレルの変化を測定する。これらのデータをWEB上で公開されているアルゴリズムHidden Markov Model及びPartekソフトで解析、腫瘍組織に存在するUPD 領域を選び出す。

CNV データ解析：SNP QC をクリアしたSNP を用いてコピー数解析を行う。この際、同一症例の正常部分より得られたデータをリファレンスとして使用、腫瘍組織独自のCNV データを取得する。得られたCNV データをHidden Markov Modelアルゴリズムで解析、アレル特異的データを取得する。具体的には二つのアレルそれぞれについてシグナル強度を比較、二つのグループに分けて、プロットすることにより、アレル特異的なコピー数ファイルが得られる。実際(図1)にはトータルのコピー数は右半分が2、左半分が3と示されるが、アレル別にプロットすると右半分はコピー数が0と2の二つのアレル(copy neutral LOH. Uniparental disomy) , 左半分はコピ

ー数が1と2のアレルで構成されていることで示される(図1、下段のプロット線)。

2. BRCA1 キャリアーにおける Germ line CNV 解析(田中憲一、八幡哲郎、関根正幸担当)

CNV 解析(GWAS:Genome Wide Association Study)

CNV 解析はAffymetrix 6.0 でおこなったSNP 解析のデータを用いて行うため、GWAS で解析可能なデータを得るために必要なQuality Check をおこなう。

サンプルQC：サンプルQCは下記の要項で実施、不適な検体は除外した。

① Per-individual Call ratesを95%以上とし、遺伝子型決定におけるコール率が5%未満のサンプルは除外する。

② AB Call rates=21-30%：ヘテロ接合となるSNPの割合[Percentage of SNPs called AB (i.e. the heterozygosity)]が21-30%にあてはまらないサンプルは除外する。

③ Cryptic relatedness：近縁関係の個体対、あるいは同一個体の重複サンプルを抽出、除外する。

④ Population outliers：日本人集団で形成される主要なクラスターから離れた検体を抽出、除外、これらのサンプルQCを通過した検体でGWAS解析を行った。

得られたSNP データより下記の要項

でSNP QC を実施、実験が適切に実施されている事を確認した。

① MAF = $> 1\%$ in Cases & Controls : 低頻度アレルの頻度 (Minor allele frequency) が1%未満のSNP は除外する。

② Per-SNP missing rate (MR) MR $< 2\%$ in cases & controls : Affymetrix 6.0 では各SNP の欠測率が、ケース・コントロール各々で2%以上のSNP は除外する。

③ Exact P = > 0.05 of case/control differences in per-SNP MR : SNP の欠測率に関して、ケース・コントロール間の比較検定 (Fisher's exact P) で、 $P < 0.05$ の有意水準で有意差を示すSNP は除外する。

④ Exact HWE $P = > 10^{-6}$ in cases & controls : Hardy-Weinberg 平衡の検定で、 $P < 10^{-6}$ の有意水準で有意性を示すSNP は除外、SNP QC をクリアした共通SNP を用いCochran-Armitage 傾向性検定を行い、QQ-プロットを作成、評価し、QC が適切に行われていることを確認する。

CNV データ解析 :

SNP QC をクリアしたSNP を用いてコピー数解析を行う。この際、リファレンスとして使用するデータを取得する必要がある。得られたCNV データをHidden Markov Model アルゴリズムで解析、アレル特異的データを取得する。

具体的には二つのアレルそれぞれについてシグナル強度を比較、二つのグループに分けて、プロットすることにより、アレル特異的なコピー数ファイルが得られる。

3. 乳がんおよび卵巣がん組織におけるCNV 解析(井ノ上逸郎)

ゲノム網羅的検索のために、Genome-Wide Human SNP Array 5.0 (Affymetrix社)およびPartek Genomics Suite 6.4ソフトウェア (Partek社)を使用した。卵巣癌および正常組織(16対対応サンプル)、乳癌および正常組織(BRCA1変異陽性;1対対応サンプル)から抽出したゲノムDNAを用いて、ゲノム構造変化を高密度に分析した

4. 遺伝子不安定性の機能解析及び遺伝子変異推測モデルの構築による乳癌卵巣癌ハイリスクキャリアーの同定と発症予防法の確立 (佐伯俊昭)

2009年当院の手術症例25例を対象に、乳がん組織でのDNA-microarrayによるBRCA1, 2の発現を検討した。また同時に、subtypeに分類するためにEstrogen receptor (ER), PgR (progesterone receptor), HER 2についても同時に測定した。解析方法は、過去に我々が解析した373例の乳がん組織における各遺伝子の発現をlog scaleで求め、対象症例の発現が、373症例のどの分布に位置するかを

relative expression percentile (相対発現率) として求めた。

倫理面への配慮

アンケート調査、遺伝子解析を開始するにあたって、文部科学省・厚生労働省、「疫学研究の倫理指針」、および文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、全ての研究参加施設における倫理委員会の承認を得た後、研究を開始した。

C. 研究結果

1. 卵巣がん組織における UPD:Uniparental Disomy解析

CNV解析に必要なDNAが回収された、BRCA1陽性8例、孤発性症例28例、計36検体を用いて解析を行った(表1)。卵巣がん症例での腫瘍ゲノム、および対応する症例の正常ゲノムにおけるSNP遺伝子型コール率(SNP数440,794)は、それぞれ98.17% ($N=36$)、98.21% ($N=36$)となり、信頼性の高いデータが取得された。次いで、正常ゲノムにおけるゲノム構造多型の出現頻度につき、BRCA1陽性腫瘍群および孤発性群の間で比較したところ、2群間での大きな差は観察されなかった。

癌-正常対サンプルにおける解析から、非常に多くの癌ゲノム特異的構造変化を見いだした。1例をあげると、症例4の

染色体17番の解析ではではBRCA1遺伝子がある17q12領域より単腕側では、欠失を伴うLOHが、BRCA1遺伝子を含む長腕側ではUPDがほぼ全領域に観察された(図2)。染色体17番を全症例で解析すると、BRCA1陽性腫瘍では8例全症例にCNV変化を認め、そのうち大多数でUPDが認められた。孤発性腫瘍群でも6例を除いた22例で遺伝子増幅、欠失、UPD等の多彩な遺伝子異常が観察された(図3)。染色体全体で解析すると、CNV変化を認める部分は孤発性卵巣がん症例28症例中22症例で500Mb~1500Mbの距離でCNVが観察された。UPD変化はBRCA1陽性、孤発性症例全てに共通して観察されたが、BRCA1陽性症例では500Mb以上のUPD領域は1例も認めなかったが、孤発性症例では28例中6例で500Mb以上のUPD領域が認められ、全体としては孤発性症例でUPD領域が広範囲に亘っている傾向を示した(図4)。

BRCA1陽性腫瘍にだけ観察されるUPD領域は6q12, 8p23.3, 16p12.2の3か所認められ、6q12にはEGFL11, 16p12.2ではHS3ST2, USP31, SCNN1G, SCNN1B, COG7等の遺伝子がマップされた(表2)。一方、孤発性症例にだけ認められ、BRCA1陽性症例で認められないUPD領域は4q13, 4q13.3, 10q26.3, 11p14.3, 13q13.3 21q21.3の6領域認められ、UGT2B15, GC,

TMEM16C、FREM2、GRIK1 等の遺伝子が存在した(表3)。次いで、BRCA1 陽性腫瘍に $P < 0.05$ の頻度で有意に頻度の高い UPD 領域の検索を行ったところ、8p22 ($p = 0.0026$)、12q24.11 ($p = 0.0033$)、6q14.2 ($p = 0.0064$)、8p21 ($p = 0.0090$) の 4 領域が選出された(表4)。次いで UPD 領域の集積について解析したところ、BRCA1 陽性腫瘍の半数以上に共通して認められる UPD は 3159 (19.8%)、あるのに反し、孤発性腫瘍の 50%以上に共通して認められる UPD は 755 (3.8%) であり、BRCA1 陽性腫瘍では UPD の頻度、数は孤発性と変わらないが、共通の UPD が存在することが示された(表5)。これら、BRCA1 陽性腫瘍に特異的な UPD 変化が存在することあるいは、共通の UPD 領域が孤発性腫瘍に比較し、BRCA1 陽性腫瘍に集積する傾向が認められたことは BRCA1 関連腫瘍の病態を理解する上で重要な知見と思われる。

2. BRCA1 キャリアー、発症患者、孤発性卵巣がん患者、健常人における Germ line CNV 解析

Reference の設定

CNV 解析の場合は観測されたコピーナンバー変化を対象(reference)と比較、CNV 変化として検出する必要がある。腫瘍組織の CNV 解析の場合は同一症例の健常部分(末梢血 DNA あるいは腫瘍

組織に隣接する正常組織)より得られた copy number と比較して遺伝子の変異を検出するが、germ line CNV の場合対象(reference)の設定として定められたものは無い。発表された論文では Hap Map のデータを対象として用いているものも見受けられるが、研究者がそれぞれの対象(reference)を設定しているのが現状であり、まず第一適切な対象(reference)の設定について解析を実施した。GWAS(Genome Wide Association Study)あるいは CNV 解析におけるデータの精度管理の一つとして、Affimetryx 社は SNP Array 6.0 では MAPD (the Median of the Absolute values of all Pairwise Differences between \log_2 ratios for a given chip) の概念を導入、MAPD の値が 3.5 を超えるものは解析から除外するよう明記している。Hap Map から日本人女性 22 人のデータを reference として解析した場合、BRCA1 キャリアー 84 人中 67 名が不適、正常コントロール群では 49 人中 44 人が不適、孤発性卵巣がん症例の場合 42 人中全例が不適とされ、除外された(表6)。次いで Hap Map に記載されている男女 270 人のデータ全てを reference として解析した場合でも BRCA1 キャリアーでは 39 人、健常人では 22 人、孤発性卵巣がん患者では 42 人全員が不適として除外された(表7)。次に当研究室で卵巣がんの既往歴のない子宮内膜症患者を対象に GWAS を実

施した 406 例を reference として、解析したところ、不適として除外される症例は BRCA1 キャリアーで 6 名、孤発性卵巣がん症例で 4 名と少数であり、解析の継続は可能と理解された。以上これより以降の解析は子宮内膜症患者 406 人のデータを reference とし解析を行った(表 8)。

BRCA1 陽性キャリアー特異的な CNV 解析(表 9)

BRCA1 陽性1家系から 1 症例、計 44 症例、正常健常人 49 人、孤発性卵巣がん症例 44 人の CNV 解析を実施した(図5)。CNV 領域が症例あたり 30 個以上認められる症例は BRCA1 陽性症例の 94.5%、正常コントロールの 85.7%、孤発性卵巣がん症例の 100%に認められた。CNV 領域が 50 個以上認められる症例は BRCA1 陽性症例で 31.8%、正常コントロールで 32.7%、孤発性卵巣がん症例で 95.5%認められた。次いで CNV 変化を遺伝子の増幅、欠失に分けて解析したところ、BRCA1 陽性キャリアーと正常コントロール間では増幅、欠失共に有意な変化は認めなかったが、BRCA1 キャリアー群、正常健常群と孤発性卵巣がん症例との比較では孤発性症例で有意に遺伝子増幅が多く、欠失が少ない結果が得られた(図6)。染色体全領域における CNV の比較を BRCA1 症例、孤発性腫瘍症例、健常人で比較したところ、有意差を持って変化する領域が多数認められたが、その殆どは孤発性卵巣がん症

例における遺伝子増幅であった(表。10)

卵巣がん発症症例に特異的な CNV の解析

BRCA 陽性で卵巣がんを発症している症例 39 家系 51 症例、BRCA1 陽性で未発症のキャリアー16 家系 30 症例、健常人 49 症例、孤発性卵巣がん症例 44 症例を対象として CNV 解析を行った(表 11)。BRCA1 未発症キャリアーで 50 個以上の CNV を有する症例の頻度は 33.3%、BRCA1 陽性の卵巣がん患者で 50 個以上の CNV を有する症例の頻度は 25.5%と BRCA1 陽性グループ内での卵巣がん発症、未発症による CNV の変化は認められなかった(図7)。

BRCA1 陽性症例に共通して存在する CNV 領域を孤発性卵巣がん症例、正常健常人との比較において解析した(表 12)。遺伝子増幅が 17 例(21.0%)、欠失が 8 例(9.9%)を認めたが、興味あることは、遺伝子増幅は孤発性卵巣がん症例にも同程度あるいは高頻度に認められたが、欠失の場合、BRCA1 陽性症例に特異的に観察される領域が 3 領域得られた(染色体14, 9, 19)。またこれらの増幅、欠失領域は正常患者群には全く観察されていない。次いで、BRCA1 陽性 81 症例を卵巣がん発症、未発症で分け、解析したところ、発症例に共通して認められる CNV が数か所認められた(表 13)。BRCA1 陽性症例の卵巣がん発症、未

発症間で特徴的な分布を示すCNV領域を下記に示す。

Deletion at 19q13.42 (表 14)

19q13.42 領域のCNV(欠失)が 6 家系(家系 17, 31, 33, A18, B3, B11) 7 人に認められた。家系 31 には BRCA1 陽性卵巣がん患者が 2 名存在するが、1 名には同部位の欠失が認められ、1 名には認められていない。しかし、CNV の認められた 1 名の組織型は BRCA1 陽性卵巣がんの特徴的な漿液性腺癌であったが、CNV 陰性の症例の組織型は未分化型腺癌であり、また転移性腫瘍が疑われたものであった。一方、未発症 BRCA1 キャリアーの CNV 解析が 3 家系(家系 17, 33, B3) の 7 人に実施されたが発症者に認められた同一の欠失は 1 例も認められなかった。

Deletion at 9q31.1 (表 15)

9q31.1 領域における欠失が 4 家系(家系 1, 6, 55, 65) 5 人に認められ、そのうち 4 人はがんを発症、一人(家系 1)は未発症であった。一方、家系 26 の未発症者 3 人の解析では、3 名全員に CNV の欠失は観察されなかった。

Amplification at Xp21.3 (表 16)

X 染色体領域 Xp21.3 に遺伝子増幅が、2 家系(家系 14, B11) 4 人に認められたが、4 人全員が卵巣がんを発症、家系 14 内の二人の未発症キャリアーの解析では同一の CNV 遺伝子増幅は観察されなかった。

Amplification at Xp22.13 (表 17)

X 染色体 Xp22.13 領域に遺伝子増幅が 2 家系(家系 14, B11) 4 人に観察された。家系 14 の構成員 4 人の解析ではがん発症 3 人のうち二人に遺伝子増幅が観察された。未発症の一人とがん発症の一人には CNV 変化は観察されなかった。

Genetic anticipation (図 8)

家系 14 と B11 の 2 世代における X 染色体領域の CNV 解析の結果、世代が進むに伴って CNV の領域が伸長する anticipation が観察された。

3. 乳がんおよび卵巣がん組織における

CNV 解析

乳がん、卵巣がんの癌-正常対サンプルにおける比較解析から、追加サンプルにおいても、多数の癌ゲノム特異的構造変化を見いだした。卵巣癌、乳癌特異的変化はいずれも、1 コピー重複や欠失といったアレル特異的コピー数変化がその多数を占めるという共通性を有することが明らかになった。他方、乳癌ゲノムは、卵巣癌のそれと比し、癌ゲノム特異的構造変化領域の頻度(度数)が低い傾向を示し、同じ固形癌であっても、癌種によって、染色体構造変化の度合いが異なる可能性を認めた。

4. 遺伝子不安定性の機能解析及び遺

伝子変異推測モデルの構築による 乳癌卵巣癌ハイリスクキャリアーの 同定と発症予防法の確立

25 例中 22 例に micro array による解析が可能であった。22 例中、luminal A;5, B;8, HER 2 enrich;4, Basal like;5 であった。各 subtype の BRCA1, 2 の発現率の中央値は、それぞれ A;85.3, 76.4, B;59.3, 51.3, HER 2;82.6, 83.8, Basal like;78.2, 79.0 であった。Basal like 全例が再発 high risk であった。また変異は 2 例に認められたが、症例が少なく intrinsic subtype との関連は不明であった。NSABP/GAIL model の評価が可能であった 2 例ではいずれも BRCA1 の遺伝子発現を有しない症例に比較し、相対危険率が高い傾向にあった。

D. 考察

上皮性卵巣がんは欧米及び我が国で年々増加しつつあるがんの一つで、女性のがんでは乳癌に次いで高い死亡率を示している。これらに鑑み、米国では癌細胞の変異を網羅的に解析する国家戦略 Cancer Genome Atlas プロジェクトの対象の一つに卵巣がんを取り上げ、既に約 750 例の deposit が終了している。一方我が国では分子基盤の理解に基づいた分類による対応を行うことなく、一律に手術療法と化学療法が実施されているのが現状である。BRCA1 陽性卵巣が

んは抗がん剤に高い感受性を示す、或いは孤発性卵巣がんでは稀な脳転移が高頻度に認められる等の多彩な臨床上的特徴を示すことより、組織型が同一の上皮性卵巣がんの病態を理解するには良いモデルといえよう。BRCA1 陽性卵巣がん腫瘍組織における特有の遺伝子不安定性の解析、rare variant マッピング等の基本データの臨床応用が可能となった暁には、BRCA1 陽性腫瘍の解析より得られた分子情報を用いた治療戦略が孤発性卵巣がんに対しても有効と期待される。その一例をあげると、BRCA1 陽性腫瘍で確認された PARP インヒビターの抗腫瘍活性が孤発性卵巣がん症例においても認められ、孤発性卵巣がんに対する分子治療薬としての治験が開始されている。一方で、アレルの欠失と残存アレルの重複により、見掛け上 2 倍体にみえる LOH を UPD と呼んでいるが、ヒトのがんでは LOH の多くが UPD によって生じていることが明らかになり、がん細胞特有の aneuploidy を説明するとされている。がん制遺伝子の不活化と同時に、腫瘍組織における活性化した遺伝子変化の集積を説明するメカニズムの一つである uniparental disomy (UPD) が SNP タイピング・アレイシグナルの定量的特性を利用することにより可能になった。これらの観点より、今回我々は BRCA1 陽性卵巣がん組織と孤発性卵巣がん組織を用いて UPD 解析を行った。

BRCA1 変異陽性卵巣がん 8 例、孤発性卵巣がん 28 例の腫瘍組織で網羅的に UPD の有無を解析した結果、全ての症例で多数の UPD 領域が観察されたことにくわえ、BRCA1 陽性症例に特異的に観察される UPD 領域も 3 か所認められた。染色体 17 番全領域に亘り UPD 領域が極めて多いことより、Validation assay として、UPD 領域の遺伝子が無作為に 3 個選出、taq man 法による解析を実施したところ、解析した全てでホモ結合している事が観察され、UPD の存在が証明された。今回解析した、孤発症例は核酸配列解析が行われていないため、BRCA1 陽性症例が混入している可能性は除外できないが、BRCA1 組織に特異的な UPD 領域が確認されたことは興味ある点であり、BRCA1 陽性腫瘍の特徴的な病態が解明された場合、家族歴の無い孤発性卵巣がんの診断、予防、治療の面でも多大な貢献をする事が期待される。

今回我々は、卵巣癌の腫瘍組織からのゲノム DNA サンプルを用いて、ゲノム構造変化を高密度に分析した。その結果、卵巣癌ゲノムで観察された構造変化のうち、アレル特異的コピー数変化が大多数を占めるという知見は、SNP アレイを使用することで新規に見いだされたものである。従来の比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) 法ではアレル特異的変化を同定し得ないことを考え併せると、ゲノム構造変化解析への SNP アレイの有効性を示す知

見であると考え。

昨年までの研究成果により、BRCA1/2 のキャリアーの正常組織において CNV が存在することを示した結果は BRCA1 遺伝子の変異に加えて遺伝子の不安定性が家族性腫瘍のキャリアーに存在することを示唆するものであり、今年度は症例を追加による解析を行った。従来、正常組織における CNV の変化は統合失調症等の精神科領域の疾患で多く報告され、固形腫瘍の正常組織で報告されることは稀であった。一方、前立腺がんの患者の正常組織の CNV 解析の結果、染色体 2q24-3 領域にがん患者特異的な CNV 変化の存在した報告 (Cancer Res,69:2176-2179,2009C)、Li-Fraumeni 症候群の患者グループで発症、未発症により CNV が変化、発症予知に可能である等の報告 (PNAS、10、11264-11269、2008)、固形腫瘍における CNV の総括レビュー (Genome Medicine 2009, 1:62) 等より、固形がん患者の正常組織の CNV 解析が注目されている。

今回の我々の解析結果より、同一の漿液性腺がんである孤発性、BRCA1 陽性腫瘍を持つ患者間で異なった正常組織 CNV を示す点は、両者間での異なった遺伝子不安定性の存在を示唆するものであり、BRCA1 陽性腫瘍では発症年齢が若い等の疫学、臨床情報の相違点を理解する上で役立つと思われる。今回の解析に

より、家系内で共通して保存されている CNV、家系内で発症者にだけ観察される CNV 変化、数世代に亘る家系で共通して観察される CNV 変化等、興味ある結果が得られた。一方、BRCA1 陽性キャリアーに対する、分子病理学的知見に基づいた発症予知法はいまだ欧米各国においてもされてなく、ハイリスク、ロウリスクの区分けなしに一律的な予防的卵巣摘出、ピルの投与等が行われているのが現状である。今回の我々の知見を踏まえ、更なる遺伝子変化、疾患感受性領域の絞り込み、次世代シーケンサーによる rare variant マッピング等により、BRCA1 キャリアーにおける遺伝子不安定性に関与している遺伝子の分離、解析が可能となり、BRCA1 キャリアーの中で若年発症等のハイリスクグループ検出のシステム確立が期待できる。その結果、リスクが高いグループと低いグループの選別、具体的には予防的手術療法が不要の患者群の選択が可能となる。さらに、これら女性における妊孕性の確保につながる。卵巣摘出による更年期障害等の副作用に苦しむ必要もなくなると同時に医療経済の効率化あるいは我が国における少産少子の解消にも寄与することは確実である。さらに米国で本疾患に対する解析が進んでいるとはいえ、日本人特有の解析及び情報が我が国の BRCA1 キャリアー女性を卵巣がんから救うためには必須であることを特筆しておきたい。

E. 結論

腫瘍組織及び正常組織での CNV 解析をゲノムワイドで行ったところ、BRCA1 陽性腫瘍組織で BRCA1 遺伝子以外に孤発性卵巣がん組織とは異なる遺伝子不安定性の存在することが示唆された。また正常組織の CNV 解析では同一家系内でも発症、未発症で CNV 領域が異なり、BRCA1 キャリアーの発症予知、予防に重要な知見がえられた。他方、乳癌ゲノムは、卵巣癌のそれと比し、癌ゲノム特異的構造変化領域の頻度(度数)が低い傾向を示し、同じ固形癌であっても、癌種によって、染色体構造変化の度合いが異なる可能性を認めた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Yahata T. Fujita K. Kashima K. Tanaka K. Conservative treatment of stage IA1 adenocarcinoma of the uterine cervix with long-term follow-up. Int J Gynecol Cancer, in press
2. Isutkaichi M. Yahata T. Fujita K. Kashima K. Tanaka K. Successful Empirical Anti-Tuberculosis Treatment for a Patient with a Massive Ascites: The Role of FDG-PET in the Diagnosis and Monitoring the Treatment Response Obstetrics and Gynecology, in press

3. Kashima K, Yahata T, Fujita K, Tanaka K. Preoperative trans-vaginal ultrasound guided needle biopsy for primary squamous cell carcinoma of the endometrium. *J Obstet Gynaecol Res*, in press
4. Kashima K, Yahata T, Fujita K, Tanaka K. Analysis of the complications after radical hysterectomy for stage IB, IIA, and IIB uterine cervical cancer patients. *J Obstet Gynaecol Res*, in press.
5. Yoshihara K, Tajima A, Yahata T, Kodama S, Fujiwara H, Suzuki M, Onishi Y, Hatae M, Sueyoshi K, Fujiwara H, Kudo Y, Kotera K, Masuzaki H, Tashiro H, Katabuchi H, Inoue I, Tanaka K. Gene expression profile for predicting survival in advanced-stage serous ovarian cancer across two independent databases. *PLoS ONE* 5, e9615, 2010.
6. Yamada K, Fujita K, Quan J, Sekine M, Kashima K, Yahata T, Tanaka K. Increased apoptosis of germ cells in patients with AZFc deletions. *J Assist Reprod Genet* 2010.
7. Yoshihara K, Yahata T, Kashima K, Mikami T, Tanaka K. Association of single nucleotide polymorphisms in adiponectin and its receptor genes with polycystic ovary syndrome. *J Reprod Med* 2009;54: 669-74.
8. Yamaguchi M, Yahata T, Fujita K, Sakurada J, Hasegawa G, Umezu H, Naito M, Tanaka K. Extranodal Rosai-Dorfman disease involving bilateral ovaries in a patient with a ventriculoperitoneal shunt. *J Obstet Gynaecol Res* 2009;35: 1000-3.
9. Quan J, Yahata T, Tamura N, Nagata H, Tanaka K. Relationship between single nucleotide polymorphisms in CYP1A1 and CYP1B1 genes and the bone mineral density and serum lipid profiles in postmenopausal Japanese women taking hormone therapy. *Menopause* 2009;16: 171-6.
10. Komata D, Yahata T, Kodama S, Koyama Y, Takeda N, Tajima K, Makino H, Sato N, Muto I, Hatakeyama K, Tanaka K. The prevalence of hereditary breast/ovarian cancer risk in patients with a history of breast or ovarian cancer in Japanese subjects. *J Obstet Gynaecol Res* 2009;35: 912-7.
11. Banzai C, Yahata T, Fujita K, Ajioka Y, Kawahara M, Okamura H, Tanaka K. Recurrent borderline ovarian tumor presenting as a pedunculated polyp at colonoscopy. *Endoscopy* 2009;42 Suppl 2: E69-70
12. Yoshihara K, Tajima A, Komata D, Yamamoto T, Kodama S, Fujiwara H, Suzuki M, Onishi Y, Hatae M, Sueyoshi K, Fujiwara H, Kudo Y, Inoue I, Tanaka K. Gene expression profiling of advanced-stage serous ovarian cancers

distinguishes novel subclasses and implicates *ZEB2* in tumor progression and prognosis. *Cancer Sci* 100, 1421-1428, 2009.

(2) 学会発表

1. Yoshihara K, Tajima A, Adachi S, Komata D, Yamamoto T, Kodama S, Fujiwara H, Suzuki M, Onishi Y, Hatae M, Sueyoshi K, Fujiwara H, Kudo Y, Inoue I, Tanaka K: Gene expression profile identified novel subclasses in advanced-stage serous ovarian cancers and revealed *ZEB2* expression as the prognostic marker. AACR 100th Annual Meeting 2009, Denver, USA. April 18-22, 2009.

2. 吉原 弘祐、山口 雅幸、安達 聡介、田中 憲一、子宮内胎児発育遅延の病態解明を目的とした胎盤血管での発現遺伝子群の解析。
2009年4月5日日本産科婦人科学会(京都市)

3. Kosuke Yoshihara, Atsushi Tajima, Mitsuaki Suzuki, Yoshitaka Onishi, Masayuki Hatae, Kazunobu Sueyoshi, Kenichi Tanaka. Gene expression profiling of advanced-stage serous ovarian cancers revealed *ZEB2* expression as the prognostic marker. 2009年10月2日 日本癌学会 第68回学術集会

H. 知的財産権の出願、登録状況

- 1.特許取得
なし。
- 2.実用新案登録
なし。
- 3.その他
なし。

腫瘍組織における片親性ダイソミーの同定(表1)

1. 同一人における正常と腫瘍の比較 : T&N paired analysis
2. Affymetrix GeneChip SNP array 5.0
3. Software: Partek Genomic Suite v6.4
4. アルゴリズム: Hidden Markov Model
(genomic marker >3、Copy Number Variation > 1kb Nature Rev Genet 2006)

BRCA1 mutation
8 samples (8 families)

【1家系に対し1サンプル】

VS

Sporadic ov. ca.
28 samples

BRCA1 ovarian cancer-related UPD (表2)

Cytoband	Start (Mb)	Length (Kb)	BRCA1	Sporadic	Overlapping genes
6q12	65.8	1482.0	3/8 (37.5%)	0/28 (0%)	<i>EGFL11</i>
8p23.3	0.2	20.5	3/8 (37.5%)	0/28 (0%)	-
16p12.2	22.5	848.8	3/8 (37.5%)	0/28 (0%)	<i>HS3ST2,</i> <i>USP31,</i> <i>SCNN1G,</i> <i>SCNN1B,</i> <i>COG7</i>

Sporadic ovarian cancer-related UPD(表3)

Cytoband	Start (Mb)	Length (Kb)	BRCA1	Sporadic	Overlapping genes
4q13.2	69.2	193.0	0/8 (0%)	9/28 (32.1%)	<i>UGT2B15</i>
4q13.3	72.8	67.8	0/8 (0%)	11/28 (39.3%)	<i>GC</i>
10q26.3	131.9	104.4	0/8 (0%)	9/28 (32.1%)	-
11p14.3	25.6	395.6	0/8 (0%)	7/28 (25.0%)	<i>TMEM16C</i>
13q13.3	36.8	280	0/8 (0%)	8/28 (28.6%)	<i>FREM2</i>
21q21.3	30.2	77.6	0/8 (0%)	9/28 (32.1%)	<i>GRIK1</i>

BRCA1 vs Sporadic (表4)

Cytoband	Start (Mb)	Length (Kb)	BRCA1 (n = 8)	Sporadic (n = 28)	P-value
8p22	15.1	6.3	5/8 (62.5%)	2/28 (7.1%)	0.0026
12q24.11	107.5	153.4	8/8 (100%)	11/28 (39.2%)	0.0033
6q14.2	84.1	62.5	5/8 (62.5%)	3/28 (10.7%)	0.0064
8p21	28.7	44.2	6/8 (75.0%)	6/28 (21.4%)	0.0090

表5 50%以上の症例で共通して認めるUPD領域

4例以上のBRCA1症例で共通して認められるUPD領域 3159 regions (19.8%)

14例以上のSporadic症例で共通して認められるUPD領域群 755 regions (3.8%)