

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19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 田中 憲一

平成22年5月

目次

I 総合研究報告書

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

(資料) 卵巣癌患者様用アンケート用

(資料) 健常人用アンケート用紙

(資料) 乳癌患者様用アンケート用紙

II 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 74

III 研究成果の刊行物・別刷

..... 79

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)

総合研究報告書

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

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に遺伝子不安定性の解析を行う。乳がん・卵巣がん患者の家族歴調査の結果、乳がん・卵巣がんの患者を持つ家族歴の頻度は欧米より低いこと、及びBRCA1, 2キャリアーで若年発症および遺伝要因による発がんが強い傾向が認められた。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た。BRCA1 変異陽性卵巣がん組織で網羅的にUPD(Uniparental Disomy)の有無を解析した結果、特徴的なUPD領域が認められた。さらに Germ Line における CNV (Copy Number Variant) 解析を BRCA1 陽性卵巣がん患者、BRCA1 陽性未発症キャリアー、孤発性卵巣がん患者、65 歳以上の健常者、合計 174 名で行った。Germ Line における CNV 変化は孤発性卵巣がん患者で高頻度に認められるが、BRCA1 陽性卵巣がん患者、BRCA1 未発症者、健常人ではほぼ同程度であった。卵巣がん発症者に共通して認められる CNV 変化、Anticipation に伴った CNV の延長等が観察されたこと等より、BRCA1 特異的な変化が腫瘍組織、正常組織両者に存在することが示唆され、将来のハイリスク群の分離に遺伝子不安定性解析が有用であることが示唆された。卵巣がんの網羅的遺伝子発現と CNV 変化を同一組織で解析したところ、コピー数が増加している 20q13. 13 領域にある、14 遺伝子でコピー数の増加に伴った遺伝子発現の亢進と overall survival の有意の延長が観察され (logranktest $0 < 0.05$)、遺伝子コピー数の変化 (CNV) が病態に影響を与えていることが示された。

分担研究者
井ノ上 逸朗
東海大学医学部 基礎医学系 教授

畠山勝義
新潟大学教育研究院医歯学系:外科学 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

乳癌卵巣癌家系内の癌発症リスクを算出する場合、罹患者の *BRCA1, 2* 変異検索が最も効率的であるが受託遺伝子解析ではコストの点、研究室ベースでは労力と特許の問題があり、*BRCA1, 2* 異常についての遺伝子検査は十分に行われていない。欧米諸国でも事情は同様であり、近年、米国において被験者のがん罹患歴、家族歴などに基づいて *BRCA1, 2* 変異の頻度を推測する Claus モデル、Gail モデルなどが考案され有用性が示されている。しかしながら、欧米人と日本人では *BRCA1, 2* 変異型の種類、頻度が異なっている点を考慮すると、欧米人を対象としたモデルを日本人に適用するのは危険であり、我が国独自のモデルを構築する必要がある。我々はこれまでに家族性乳癌・卵巣癌101家系を全国的に集積し、57家系で *BRCA1* 変異を検出しているが、いまだ患者以外の構成員での正確な予後調査、*BRCA1* 異常についての遺伝子検査は十分に行われておらず、我が国における正確な浸透率は算出されていない。以上よりまず第一に、第2度近親者までの詳細な家系内調査と遺伝子検査を行い、*BRCA1* 変異推測モデルの検証、正確な浸透率の算定を行う。

卵巣癌組織でのヒトゲノムコピー数多型CNV解析を実施すると同時に、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 (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とを利用、UPDの領域を検出する。以上のCNV多型、UPD解析による分子機構の解明を行い、*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。最近、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異常を有していると推察される。事実、近年Li-Fraumeni症候群の患者では発症に伴って、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

V 解析による遺伝子不安定性の解析は重要視されている。正常組織の遺伝子不安定性の理解により、BRCA1キャリアーの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有意義かつ急務と思われる。BRCA1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有意義なものである。さらに、わが国で乳癌・卵巣癌が増加している今日、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BRCA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. 卵巣がん患者の家族歴に関するアンケート調査 (担当 田中憲一、八幡哲郎、関根正幸)

新潟大学医歯学総合病院および新潟県内主要施設*にて治療を行った、上皮性卵巣がん患者に対し、第2度近親者までの血縁者に関する乳癌、卵巣癌の罹病調査を実施した。なお、アンケート調査は主治医による聞き取り調査を行った。

※ 新潟県内主要施設は以下の6施設

新潟県立がんセンター
新潟県立新発田病院
新潟市民病院
長岡赤十字病院
厚生連長岡中央病院
済生会新潟第2病院

患者より回収したアンケートを集計し、卵巣癌患者における、第二度近親者までの家族歴の頻度、一般集団との比較、乳癌患者を家系に有する患者の乳癌発症の頻度などについて解析した。

健常者を対象に同様のアンケート調査を行い、一般集団における乳癌・卵巣癌発症リスクを集計し、乳癌患者を乳癌家族歴を有する場合の発症リスクを相対危険度として算出した。

2. 乳がん患者の家族歴に関するアンケート調査 (担当 畠山勝義、佐伯俊昭、八幡哲郎)

新潟大学医歯学総合病院および新潟県内主要施設*にて治療を行った、浸潤乳癌患者に対し、第2度近親者までの血縁

者に関する乳癌、卵巣癌の罹病調査を実施した。

※ 新潟県内主要施設は以下の5施設

新潟県立がんセンター
新潟県立新発田病院
新潟県立中央病院
新潟市民病院
長岡赤十字病院

患者より回収したアンケートを集計し、乳癌患者における、第二度近親者までの家族歴の頻度、一般集団との比較、乳癌患者を家系に有する患者の乳癌発症の頻度などについて解析した。さらに平成20年度は新潟県の調査に、分担研究者である佐伯俊昭が埼玉医大国際医療センターで実施した成績を加えて解析した。

3. 卵巣癌特異的染色体異常やヘテロ接合性消失の同定に関する研究 (担当井ノ上逸朗)

卵巣癌ゲノムにおけるアレル特異的変化も研究対象とするために、Genome-Wide Human SNP Array 5.0 (Affymetrix 社)を用いて解析を行った。卵巣癌および正常組織(43 対)サンプル:孤発性 33 対、BRCA1 キャリアー家族性 10 対)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。また、卵巣癌罹患者の正常ゲノムにおける遺伝性のゲノム構造多型頻

度を推定するために、BRCA1 キャリアー正常ゲノム 10 サンプルも解析に供した。

4. 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 6.0 によるCNV解析を腫瘍組織と自己正常部分両者で行い、アレルの変化を推定する。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。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。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で2、左半分で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が理解される。

(図1、下段のプロット線)。

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

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 をおこなった。

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との比較の結果、検体のCNV 変化を推定する。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。具体的にはリファレンス、検体のアレルを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推定可能とされる。

6. 乳がん組織におけるCNV 解析(担当 井ノ上逸郎)

家族歴を有する患者より提供を受けた血液より、DNA を抽出、ダイレクト シークエンス法により、核酸配列の解析を行い、変異を認めるものを BRCA1/2 陽性症例とした。また一部の検体は委託により、

BRCA1,2 遺伝子の解析を行った。乳がん組織ゲノムにおける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。乳癌および正常組織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。

7. 卵巣がん組織の CNV 領域における遺伝子発現解析 (担当: 田中憲一、八幡哲郎、関根正幸)

CNV解析を施行した組織のなかで、腫瘍組織が保存してある症例を選択、発現プロファイル解析に供した。約4万個の遺伝子に相当するオリゴヌクレオチドがスポットされたマイクロアレイ Agilent Human Genome Oligo Microarray 41Kを用いて蛍光シグナル強度を得る。正常腹膜組織をレファレンスとしてそれぞれの組織の遺伝子発現をindirect法で比較検討する。

8. 乳がん組織におけるBRCA1/2発現とサブクラス解析 (担当佐伯俊昭)

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。Lunima A

は、ERor PgR 陽性、HER2 陰性、低増殖能、B は ERor PgR 陽性、HER2 陰性、高増殖能、Basal like は ER and PgR 陰性、HER2 陰性とした。解析方法は、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. 卵巣がん患者の家族歴に関するアンケート調査(平成19年度)

コントロールとしての健常人より584名のアンケート、卵巣がん患者からは289名のアンケート結果が得られた。卵巣がん患者の年齢分布は20歳から77歳まで分布し、平均年齢は53.4歳であった。乳がん家族歴を有する患者の頻度は第1度近親者で9.0%(289名中26名)、第2度近親者で16.3%(289名中47

名)であった。卵巣がん家族歴を有する患者の頻度は第1度近親者で1.6%(289名中5名)、第2度近親者で4.2%(289名中12名)であった。

次いで家族歴の有無により、発症年齢を比較したところ、乳がんの家族歴ありの患者の平均発症年齢は52.3歳であり、家族歴なしの患者の平均発症年齢53.7歳と同一であった。卵巣がん患者では家族歴なしの患者の平均発症年齢が53.7歳であるのに比較し、家族歴ありの患者の平均発症年齢が49.0歳と有意($p=0.037$)に低下していた。

卵巣がん患者の同胞内発症について解析を行った。卵巣がん患者289名は348名の同胞を有し、348名中19名(5.5%)の乳がん患者が認められたが、卵巣がん患者は1名も認められなかった。同胞内の乳がん発症の危険率を検証するために、正常コントロールとの比較を行った。正常コントロールでは686名の同胞を有し、8名(1.2%)の頻度で乳がん患者が観察された。以上、卵巣がん患者同胞における乳がん発症危険率は(卵巣がん患者の発症率 / 正常コントロール発症率) = $5.5\% / 1.2\% = 4.68$ 約5倍高いことが示された。

卵巣がん患者の母親における乳がんおよび卵巣がんの発症率は289名中、11名(3.8%)、5名(1.6%)であり、一般集団では乳がんおよび卵巣がんの頻度は、21名(3.8%)、4名(0.7%)であつ

た。これら母親における発症危険率は乳がんでは変わらない(患者群=3.8%、一般集団=3.8%)のに反し、卵巣がんでは2.37倍(1.6/0.7=2.37)発症危険率が高いことが示された。

2. 乳がん患者の家族歴に関するアンケート(平成19年度、20年度)

新潟大学医歯学総合病院および各協力施設より、626名の乳がん患者アンケートが集積された。平成20年度は新潟県内のアンケート情報に加え、埼玉医科大学国際医療センターで実施されたアンケートの結果を加えて解析した。第1度近親者に乳がん家族歴を有する乳がん患者は1328名中109名でその頻度は8.2%であった。次に第2度近親者までの乳がんの家族歴を有する患者の頻度は1328名中152名、11.4%であり、第1度、第2度近親者に乳がんの家族歴を持つ患者の数は261名、その頻度は19.7%であった。対象群(非乳がん・卵巣がん患者)での乳がん家族歴を持つ数は548名中25名、その頻度は4.6%であり、乳がん患者における家族歴を持つ頻度が明らかに高いことが示された。家族歴の頻度を欧米人集団と比較すると、健常人における乳がん家族歴の頻度が高く、それに伴って乳がん患者の家族歴も日本人集団に比較すると明らかに高いと推察される。(表1)乳がんあるいは卵巣がんの家族歴を持つ女性にお

ける、乳がん、卵巣がんの生涯発症リスク(Odds Ratio)を家族歴を持たない女性と比較すると、乳がん発症のリスクは2.3(95%CI: 1.5-3.7)、卵巣がんの発症リスクは2.2(95%CI: 1.3-3.8)であり、家族歴を認めない女性に対して2倍の危険率を示した。さらにわれわれのデータをミリアド社から発表されているBRCA1/2 遺伝子変異推測モデルに当てはめ、計測したところ、日本人乳がん患者の7.0%、卵巣がん患者の8.7%で、BRCA1/2 遺伝子の変異を持つ可能性がしめされ、欧米と一致した値をしめし、ミリアドモデルが日本人でも有効であることが示された(表2)。

3. 卵巣癌特異的染色体異常やヘテロ接合性消失の同定に関する研究(平成19年度)

癌-正常対サンプルにおける解析から、非常に多くの卵巣癌ゲノム特異的構造変化を見いだした(図2、3)。興味深いことに、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、全体の約88%を占めることが明らかになった。一方、BRCA1 キャリアーと孤発性の比較からは、癌ゲノムにおける構造変化パターンや変化数に顕著な差異を認めなかったものの、数多くの共通性が見いだされた。全43サンプルのうち、40%以上で共通した癌ゲノム特異的構造変化領域(0.1Mbp以上)は全部で9カ所あり、その

内訳は、1コピー重複5カ所(3q, 5p, 7q, 8q, 20p)、1コピー欠失4カ所(4q, 5q, 17p, 18q)であった。

BRCA1遺伝子の存在する染色体17番、17q12領域の解析ではBRCA1 遺伝子キャリアーから得られた腫瘍組織の解析では、100%にLOH が観察された、一方でBRCA1 非キャリアーより得られた腫瘍組織でも、32.6%にLOHが観察された。このことは17q12領域そのものが遺伝子不安定性を示す領域であると推察された。一方で、BRCA2 遺伝子の存在する染色体13番、13q12.3領域ではLOH の頻度はBRCA2キャリアー、非キャリアーの両者において10%以下であった。

4. 卵巣がん組織におけるUPD:Uniparental Disomy解析(平成21年度)

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 3)。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。

同一個人の正常組織をリファレンスとした UPD 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 を含む長腕側では UPD がほぼ全領域に観察された(図 4)。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、大多数が 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 5)。染色体全体で解析すると、UPD を含めた CNV 変化は孤発性の 6 症例を除いた全症例で 500Mb~1500Mb の距離で観察された。UPD 変化は BRCA1 陽性、孤発性症例全てに観察されたが、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、全体としては孤発症例で UPD 領域が多い傾向を示した(図 6)。

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 等の遺伝子が存在した(表 4)。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 5)。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6)。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7)。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、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。

5. BRCA1 キャリアーにおける Germ line CNV 解析(平成19, 20, 21年度)

1) Reference の設定

CNV解析の場合は観測されたCNV変化を対象(reference)と比較、変化を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(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推定する。一方、germ line CNVの場合対象(reference)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る。我々は最初に適切な対象(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、Affimetrics社はversion 6.0ではMAPD(the Median of the Absolute values of all Pairwise Differences between log₂ 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。まず最初に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名が不適とされ、正常コントロール群では49人中44名が不適、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8)。次いでHap Mapに記載されている男女270人のデータを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9)。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行った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名と少数であった(表10)。以上この後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。

2) BRCA1 陽性キャリアー特異的な CNV 解析(表 11)

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7)。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。次いで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8)。染色体全領域におけるCNVの比較を行ったところ多数の領域で有意な変化が認められたが、全て孤発性卵巣がん症例における遺伝子増幅であった(表。14)

3) 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。

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9)。

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14)。遺伝子増幅が17例(21.0%)、欠失が8例(9.9%)が認められたが、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見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15)。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 16)

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 17)

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 18)

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 19)

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 10)

家系14とB11の2世代における CNV 解析の結果、いずれも X 染色体領域であるが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。

6. 乳がん組織における CNV 解析(平成 20 年度)

41 症例中、BRCA1 遺伝子の異常が4例、BRCA2 遺伝子の異常が5例認められた。

	計	BRCA1	BRCA2
埼玉医大	31 例	3 例	1 例
星総合病院	5 例	1 例	4 例

提供していただいた BRCA1/2 陽性検体とコントロールに使用する陰性検体のうち、19 検体を用いて解析を行った(表 20)。

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。興味深いことに、乳がん組織では、卵巣がん組織と異なり、1コピー欠失よりコピー数の増加が多く認められた。また乳がん組織では卵巣がん組織に比較して、コピー数の増減にかかわらず、低率な CNV 頻度が観察された(図 11、図 12)。一方、BRCA1 キャリアーと孤発性の比較からは、癌ゲノムにおける構造変化パターンや変化数に顕著な差異を認めなかったものの、数多くの共通性が見いだされた。全19サンプルのうち、

40%以上で共通した癌ゲノム特異的構造変化領域(0.1Mbp以上)は全部で3カ所あり、そのすべては、1コピー数の増加であり、1コピー欠失の個所は認められなかった(1q, 8q, 17q) (表21)。BRCA1、2 キャリアーと孤発性の腫瘍組織の比較からは、症例数が少ないため、有意差は認めないが、BRCA1、2 キャリアーの組織で CNV の頻度が高い傾向を示した。

BRCA1遺伝子の存在する染色体17番、17q12領域の解析ではBRCA1 遺伝子キャリアーから得られた腫瘍組織の解析では、100%にLOH が観察された、一方でBRCA1 非キャリアーより得られた腫瘍組織でも、約20%にLOHが観察された。このことは17q12領域そのものが遺伝子不安定性を示す領域であると推察された。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。

7. 卵巣がん組織の CNV 領域における遺伝子発現解析 (平成 20 年度)

RNA抽出が可能であった34例を用いて遺伝子発現プロファイルの解析を行った。34例の内訳は散発性症例が31例、家族歴を持つBRCA1陽性症例が3例である(表22)。卵巣がん腫瘍組織中、症例の40%以上で、0.2Mb以上の範囲で

CNVが観察される高頻度領域が10領域認められた(表23)。この10領域内(合計9.74Mb)に存在する71遺伝子(gain 59 genes, loss 12 genes)全てをData baseにより検索、それぞれの遺伝子のmicro array expression dataを解析ソフトGene Spring GX7.3.1(Agilent)より抽出した。この数値をLog₂に変換、Copy Number =2を基準値とし、発現差について比較したところ、10個のCNV領域のうち染色体部分20q13.33だけにCopy Numberの違いによる有意な発現差を認める遺伝子が観察された(表24)。20q13.33領域にはマイクロチップアレイ上38の遺伝子が認められるため(図13)、それぞれすべての遺伝子について、コピー数が2の症例と3以上の症例で発現量を比較したところ、コピー数が3以上の症例で0.05以下の有意差をもって発現が亢進している遺伝子が14個、観察された(表25)。次にこの14遺伝子のコピー数を2個、3個、4個の症例に分け、それぞれ3群間での発現差を比較したところ、1遺伝子STMN3の有意差が消失した(表26)。20q13.33領域でコピー数が2の症例とコピー数が3以上の症例2群間での臨床、病理学的な変化、BRCA1遺伝子異常の有無、発症年齢、臨床進行期、手術完遂度、リンパ節転移の有無、腹水の有無、組織分化度、等それぞれについて、2群間で解析を加えたが、いずれも有意差を持つ指標は観察されな

かった(表 27)。次に、この 2 群間での予後を Logrank Test を用いて解析した結果、Overall Survival で コピー数が 3 以上の群で良好な予後が観察された ($P=0.012$) (図 14)。14 遺伝子それぞれの発現量と 34 症例すべての予後について、Cox Proportional Hazard を用いて単変量解析の結果、UCLK1, YTHCF の 2 遺伝子のコピー数増加が、有意な生存率の延命に寄与することが認められた(表 28)。上記 UCLK1, YTHCF の 2 遺伝子の発現に関して、RT-PCR による検証実験を行った。実際にはマイクロチップ発現解析に用いたのと同じの RNA を対象に ABI プリズム 7900 を用いた定量的リアルタイム PCR による遺伝子発現量の精密な定量を行ったところ、UCLK1 遺伝子は Pearson $r=0.5992, p=0.0012$, YTHCF 遺伝子は Pearson $r=0.6473, p=0.0004$ の強さで PCR とアレイのデータの強い相関が示された。(図 15)。次いで、CNV 解析についても RT-PCR による Validation Assay を行った。UCLK1 遺伝子について、CNV 解析でコピー数が 2 の症例(7 症例)、3 の症例(4 症例)、4 の症例(1 症例)合計 12 症例を選択、RT-PCR により、コピー数の確認実験を行ったところ、CNV の結果と一致するコピー数の増加が観察された(表 29)

8. 乳がん組織における BRCA1/2 発現とサブクラス解析 (平成 20 年度)

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。乳癌の発症リスクに対する可能性のある遺伝的寄与は、家族歴を有する女性の間でこれらの癌の発生増大があることにより示される。これ

までの国内の調査では、乳癌患者の5～10%は第一度近親者である、母親または姉妹が乳癌に罹患しており、約2倍の数の女性が、第1度近親か第2度近親のどちらかに乳癌の罹患者がいたと報告されている。今回のこれまでの調査結果では、乳癌患者において、第一度近親者に乳癌家族歴を有する頻度は8.2%であり、第二度近親者までの家族歴を有する頻度を加えるとおよそ5人に1人が乳癌家族歴を有しており、これまでの報告とほぼ一致している。卵巣癌についても生殖因子、疾患の家族歴は最も大きな危険因子とされている。卵巣癌患者において、第二度近親者までに乳癌家族歴あるいは卵巣癌家族歴を有する患者の頻度は、それぞれ25.3%、5.9%であり、これは乳癌患者における家族歴の頻度より高い傾向にあった。これら乳がんと卵巣がんにおける家族歴の差は、欧米諸国との比較でも観察されている。すなわち、欧米諸国の乳がん患者では第1度近親者における乳がんの家族歴が17.9%と日本人集団における8.2%より2倍以上高度であるのに反し、卵巣がん患者における家族歴の頻度はほぼ同一であった。この差は人種の差に起因するのかあるいは、卵巣がんの発症年齢が乳がんより高いため、より高齢化の進んでいるわが国において、家族歴の頻度が高い可能性が考えられる。以上の研究結果より、若年発症の乳がん、および

卵巣がん患者は家族内に集積する可能性が強いことが示唆され、加えて我が国において、乳がん、卵巣がんともに増加していることより、これらハイリスク集団に対する、積極的なアプローチは将来的に必要であろう。

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の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、孤発性卵巣がんに対しても個人の分子情報に基づいた治療戦略の確立が可能と期待される。一例をあげると、BRCA1 陽性腫瘍で確認された PARP インヒターの抗腫瘍活性が孤発性卵巣がん症例においても求められ、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、UPD 領域の遺伝子を受作為に 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 の存在が確認された。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。

CNV の変化と遺伝子発現は関連しないという報告が多数されてきたが、今回の卵巣癌組織における遺伝子発現量解析とゲノム構造変化(CNV)を同一検体で行った今回の我々の成績により、遺伝子コピー数の増加が予後等の臨床病理学的な病態に関与することが示された点は、

新しく、興味ある知見であり、コピー数が増幅している領域内の遺伝子の機能解析を通じた、発がん、腫瘍の浸潤等への関わりについてさらに解析が必要と思われる。これらの成果は、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变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える。

乳がん組織の CNV 解析の結果、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。

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 (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、固形がん発症における同一個体のさらなる正常組織の CNV 解析が注目され

ている。

同一の漿液性腺がんである孤発性、BRCA1 陽性腫瘍の患者間で異なった正常組織 CNV を示す点は、それぞれが異なった遺伝子不安定性を示唆するものであり、BRCA1 陽性腫瘍の特徴を理解する上で役立つと思われる。家系内で数世代にわたり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、疾患感受性領域絞り込み、世代シーケンサーで全ての遺伝子配列を解明、rare variant マッピングを行い、疾患感受性遺伝子の分離、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。その結果、これら女性における妊孕性の確保につながる。さらには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

家族歴アンケートの結果、家族内の乳がん、卵巣がんの頻度は卵巣がんは欧米と同様であったが、乳がんでは欧米より低い傾向であった。腫瘍組織における乳癌ゲノムは、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。

腫瘍組織でのゲノムワイド CNV 解析の結果、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および、遺伝子コピー数の増加が遺伝子発現の変化等腫瘍組織の病態形成に影響を与えてい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、予防管理に重要な知見がえられた。

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.
13. Sekigawa T, Tajima A, Hasegawa T, Hasegawa Y, Inoue H, Sano Y, Matsune S, Kurono Y, Inoue I. Gene-expression profiles in human nasal polyp tissues and identification of genetic susceptibility in aspirin intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* 39, 972-981, 2009.
14. Kang E-H, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Tomoyasu Y, Watanabe M, Yamaguchi M, Park S-B, Maki K, Inoue I. Association of the growth hormone receptor gene polymorphisms with mandibular height in a Korean population. *Arch Oral Biol* 54, 556-562, 2009.
15. Tomoyasu Y, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Inoue I, Maki K. Further evidence for an association between mandibular height and the growth hormone receptor genes in a Japanese population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 136, 536-541, 2009.
16. Koike A, Nishida N, Inoue I, Tsuji S, Tokunaga K. Genome-wide association database developed in the Japanese Integrated Database Project. *J Hum Genet* 54, 543-546, 2009.
17. Ruigrok YM, Rinkel GJ, Wijmenga C, Kasuya H, Tajima A, Takahashi T, Hata A, Inoue I, Krischek B. Association analysis of genes involved in the maintenance of the integrity of the extracellular matrix with intracranial aneurysms in a Japanese cohort. *Cerebrovasc Dis* 28, 131-134, 2009.
18. Brookes AJ, Lehvaslaiho H, Muilu J, Shigemoto Y, Oroguchi T, Tomiki T, Mukaiyama A, Konagaya A, Kojima T, Inoue I, Kuroda M, Mizushima H, Thorisson GA, Dash D, Rajeevan H, Darlison MW, Woon M, Fredman D, Smith AV, Senger M, Naito K, Sugawara H. The phenotype and genotype experiment object model (PaGE-OM): a robust data structure for information related to DNA variation. *Hum Mutat* 30, 968-977, 2009.