

201118032A

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

ゲノム・遺伝子解析に基づく、胃がん、肺腺がん高危険  
度群の補足、及び予防標的分子の同定に資する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 梶村春彦

平成24年6月

## 目 次

- I. 総括研究報告・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
  
- II. 分担研究報告（上記に統合）
  
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・ 1 3
  
- IV. 研究成果の刊行物・別冊・・・・・・・・・・・・ 2 2

# I . 総括研究報告

別紙 3

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

ゲノム・遺伝子解析に基づく、胃がん、肺腺がん高危険度群の補足、  
及び予防標的分子の同定に資する研究

研究代表者	梶村春彦	浜松医科大学・医学部・教授
研究分担者	坂本裕美	国立がん研究センター研究所・ユニット長
研究分担者	河野隆志	国立がん研究センター研究所・分野長

研究要旨

胃がん・肺がんは本邦がん死因の約40%を占めるが、未分化型胃腺がんや肺腺がんはH. pylori感染や喫煙等の既知の危険要因の関与が小さく、十分な高危険度群の捕捉ができていない。特に、生活習慣等のリスク要因の基盤となる安定した確率を提供する遺伝素因に関しては全貌が解明されていない。本研究では①自らの複数の先行ゲノム網羅的関連研究（GWAS）データに基づき複数の遺伝素因の組み合わせを選択、その効果について追加症例を用いて検討する。②既知遺伝子の変異が検出されていない家族性胃がん症例・若年性未分化胃腺がん・若年性非喫煙者肺腺がん症例の代表例に対して、次世代シーケンサー等を用いて遺伝子機能異常を示唆する新規変異を検索し、他の家族性・若年性症例、並びに孤発がん症例における同一変異・同一遺伝子内変異の頻度を解析する。これらの目的のために、一昨年度に発見した家族性胃癌における既知遺伝子CDH1の新たな欠失とその表現型を踏まえ、昨年は本邦の孤立例を含む慢性胃がんの解析を続けたところ予想以上に高率にコピー数異常がみられ解析をすすめた。

また、班員の河野、坂本らは、体細胞の変異(治療標的分子)ではあるが肺がんの新規融合遺伝子発見など画期的な業績をあげ、さらに、生殖細胞系列の変化にも興味ある多型を見いだしつつある。

## A. 研究目的

胃がん、肺がんの遺伝的感受性については、両者ともに環境要因の影響が強いこともあり生活習慣の改善や細菌感染の予防ということでもがん罹患が抑えられるという面もある。しかし、胃がんのなかでも未分化がん、肺がんのなかで腺がんといわれる病理学的 entity は、感染や喫煙といった環境要因の影響が少なく、稀な遺伝的がんの一部である場合もあり(遺伝性慢性胃がん)、リスクの基盤となるような遺伝的素因の存在が予想されてきた。本研究グループは従来から、散發的な家族集積例についての解析や、ゲノム網羅的関連研究、遺伝子多型を用いた関連研究などをおこなってきており、日本人胃がんの遺伝的リスクとして PSCA や MUC1 の多型を、また、肺がんの遺伝的リスクに関係するものとして、CHRNA 遺伝子、HLADR 遺伝子、いくつかの修復遺伝子の多型を精力的に報告してきた。また TP53 など既知の遺伝子も、Li-Fraumeni 症候群といった非常に有名な表現型を示さなくても、胃がんを含む家系において生殖細胞系列の変化があることがある。このような、臨床現場での奇妙な症例がもとになって、あらたな疾患群が発見されることは歴史的には稀ではないが、このような症例の大部分が、解析の手立てがないまま放置

されることが多い。本研究は長年にわたり蓄積してきた原因不明の家族集積例やハイリスク因子の存在が予想されながら特定されていない症例について、全ゲノム解析まで視野にいった state-of-the-arts を適用して本邦の胃がん、肺がんの高危険度群を捕捉するために役立つ情報を得ようというのが目的である。

全ゲノム解析といった技術はコスト的にも現在では無駄が多く、結果の解釈についても Bioinformatics の進歩に頼るところが大きく、慎重な計画が要請される。いっぽう、候補遺伝子には TP53、CDH1、数種の mismatch repair 遺伝子などがあるが、そのエクソン数から考えてもこれらの全塩基配列を決める作業やそれにとりま DNA の消費量を考えるとやみくもにやるわけには行かない。さらに塩基配列の異常だけではなく、Copy number variation の範疇に属するようなゲノム領域の大きな (kbp, 数十 bp など種々の意味合いで使われる) 変化 (欠失、重複) などの解析をする必要がでてくる。開始 2 年目の 23 年度では、蓄積されている症例の DNA のなかに、既知遺伝子の copy number 変異を発見した。これは、手法を変えることになり、いままで長年日本にはなかったと思われていた遺伝性慢性胃がんの潜在的存在を予想されるものであ

った。実際に、preliminary であるが、その頻度が、予想以上に高く、また様相も様々であることを見いだしている。生殖細胞系列の copy number 異常の common cancer における意義はまだ不明のことが多いが、1000 人ゲノム data や、大きな施設で遂行されようとしている網羅的 data も利用しつつ解析をすすめたい。全エクソン配列の探索も進行中である。

## B. 研究方法

### 【家族集積・若年性症例からのアプローチ】

次世代シーケンサーを用いた全エクソン塩基配列解析のための基礎データとして、家族性胃がんの発症例と家系内の非発症例、肺腺癌若年性症例について、イルミナHumanOmni1-Quadチップによりゲノム網羅的約100万SNPの遺伝子型データを取得した。

家族性胃癌については既知の遺伝子CDH1のエクソンの全塩基配列決定を行うと同時に、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)解析を適用して、全エクソン塩基配列解析をする症例をさらに絞った。MLPAにて疑わしい症例については、Taqmanのcopy number probeで確認をおこなった。また、RNAの検索が可能な

検体については、異常RNAの存在を確認した。

予備的なDNA試料を用いて、アジレントSureSelect Human All Exon 50Mbを用いたエクソンDNAの濃縮、イルミナHiSeq2000を用いた全エクソンシーケンス解析を行い、当該解析の技術的基盤の構築を行った。Quality control結果では比較的良好である。

### 【GWASからのアプローチ】

1,500例の肺腺がんに対してイルミナOmniチップによりゲノム網羅的100万SNPを対象としたGWAS及び体系的候補遺伝子関連研究のデータ解析を進めた。遺伝子型オッズ比1.3以上、P値10<sup>-5</sup>以下、リスクアレル頻度0.2以上の遺伝素因を抽出し、それらの組み合わせのオッズ比を算出した。

また、このSNP dataおよび、家族性胃がん家系内の発症例非発症例のHumanOmni1-Quad chipによるdataにhaplotype homozygosity (HH) analysis (Hagiwara et al)を適用すること

にし、dataのconversionを行った。Affymetrix 250Kや6.0によって得たSNP data (日本人老齢コントロールなど)についてもHH analysisをおこない、われわれが対象とする家族性胃が

ん、若年性を含む肺腺がんにおいて、特異的にhomozygous stretchの生じるゲノム上の部位の探索を開始した。  
(倫理面への配慮)

ヒト試料への生殖細胞系列の遺伝子解析が含まれる研究については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、それ以外の臨床試料等の観察研究は「疫学研究に関する倫理指針」など、それぞれの研究に応じて求められる国や施設の指針・規定に従い、施設の倫理審査委員会の審査や機関の長の承認を受ける等の上、研究を行った。

### C. 研究結果

#### 【家族集積・若年性症例からのアプローチ】

家族性胃がんの既知遺伝子の関与を除外する最後の検索として、本邦ではじめて発見したCDH1 Exon3 のdeletionのある症例の、切除胃の病理組織ではsubmucosaに多数のsignet ring cell carcinoma のfociがみられ、goblet cellに極高分化といわれたような組織像でさらに、基底膜の内側にも異型細胞のnestがみられ、いわゆるsignet ring cell carcinoma in situ

の像であった。逆に、論文発表のあと、このようなmultipleなsignet ring cell carcinomaのfociが多数ある症例にて、同様の検索を試みると、べつの部分のcopy number変化が検出された。さらに、家族歴の有無にかかわらず、このようなphenotypeは本邦の消化管病理医のあいだでは、話題にはなっていたこともあり、copy number検索という視点で、本研究課題の対象や頻度がさらに明確になると期待される。

肺がんの若年例については、今回、解析対象とした30歳以下の肺がん発症例は21例であり、全症例の約0.5%に相当した。肺腺がんはそのうち17例(81%)であり、10例(71%)が非喫煙者であった。今後、全エクソン塩基配列解析を予定している家族性胃がん32症例と若年発症肺がん21例について、塩基配列解析に先立ってエクソン部分の解析に必要なSNPアレイ(Human Omni1-Quad)の解析を行い、Call rate 99%以上のデータを取得し、全エクソン塩基配列解析のリファレンスコールを得るとともに、各サンプルにおける染色体上の欠失・増幅などの基礎的情報を得た。

これらの全エクソン塩基配列解析に

関しては、予備的なDNA試料を用いて、アジレントSureSelect Human All Exon 50Mbを用いてエクソンDNAの濃縮を行った後、次世代シーケンサー、イルミナHiSeq 2000を用いて75bp paired-end シーケンス解析を行い、exon capture 技術及び自分達の手技の評価・検証を行うと共にreference DNA情報の取得、シーケンスデータの解析スクリプトの比較・検討を行った。約80%の標的エクソン領域が20x以上のカバー率を達成しており、100% identical read (PCR duplication 等) が10%以下と、良好な成績であることが確認できた。

#### 【GWAS からのアプローチ】

肺がんについて、これまでの自身や他のグループの研究で同定された既知の肺腺がん感受性遺伝子 TERT、HLA-DQA1、TP63 座では、P 値 10<sup>-5</sup> 未満、リスクアレル頻度 0.2 以上の肺腺がんリスクとの関連がみられた。これら3つの遺伝子の危険アレルのホモ接合体は、日本人の1%に存在し、その肺腺がん罹患へのオッズ比は 3.5(P=5.5x10<sup>-6</sup>)であると算出された。また、別サンプルセットを用いた検証解析により、肺腺がんリスクと関連を示す新規遺伝子座をさらに二座同定した。また、肺扁平上皮がんを対象と

した関連解析を行い、TERT 遺伝子の関連は、肺腺がん特異的であることを確認した。

#### D. 考察

##### 【家族集積・若年性症例からのアプローチ】

広範なゲノム網羅的あるいは、全エクソン、全ゲノムといった解析の前に行った解析により、large deletionの存在が見逃されやすいことであり、とくに本邦の家族性胃がんの遺伝的要因は、環境要因の影響がつよいという先入観やゲノム解析に必要な手続きの煩雑さや、初期の探索のnegative dataもあり、症例の集積自体も最近では活発ではなかった。今回はじめて典型的なHDGCが病理像とともに確認できたことは、諸外国の何千倍もの切除胃や生検胃の組織を検索している本邦の病理医にも特異な症例への手がかりを提案するものであり、網羅的SNP解析や全ゲノム解析を有効に利用するための条件が整った。今回のゲノム網羅的100万SNPデータは、HH analysisなど直接的な利用もできるが、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンス解析のQuality controlにも有用である。当該年度後半、より



安価かつ少量のDNAの解析を可能とするエクソンDNAの濃縮試薬が供出された。価格及び少量のサンプル量での解析には魅力があるが、貴重なサンプルの解析に使用するためには、技術的なスペックの比較検討が必須である。当該研究に使用する家族性及び若年性症例を全て解析するためには、より良いシステムの活用が不可欠である。次年度はその見極めを早急に行い、できるだけ多くの症例を解析し、SNPデータベースに登録のないタンパク質の機能ドメインを改変する変異をカタログ化することが、がん感受性を規定するRare variantsの同定に必須であると考えられる。

#### 【GWASからのアプローチ】

既知の肺腺がん感受性遺伝子の関連が検証され、同遺伝子群の多型は、日本人の肺腺がん罹患高危険度群を特徴付けるCommon variantsであることが確認された。また、同程度の関連を示す遺伝子座が数十か所同定されており、さらなる肺腺がん感受性遺伝子の存在が示唆された。今後、別の症例を用いて関連の検証を行うことで、遺伝子の確定を行う必要がある。また、組織型だけでなく、女性非喫煙者のみ

の解析やEGFR変異がんへの罹患リスクの検討を行うことで、発がん経路に特異的に関わる遺伝子が同定できると考えられた。

#### E. 結論

TERT、HLA-DQA1、TP63の3遺伝子のCommon variantsを用いることにより、日本人の肺腺がん罹患高危険度群の一部を捕捉できることが明らかになった。更なる関連解析を行うことで、新たな感受性遺伝子の同定、より多くの肺腺がん罹患高危険度群の捕捉が可能になると考えられた。

また、がん感受性を規定するRare variants探索のための、全エクソンシーケンス解析の技術的基盤が整いつつある。次年度は、解析システムを完成し、機能ドメインを改変する変異のカタログ化に着手する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sato N, Sato T, Nozawa A, and Sugimura H, Assessment Scales of Nicotine Addiction. Journal of

- Addiction Research & Therapy, 2012 (Methamphetamine and Nicotine Addiction).
2. Yamada H, Shinmura K, Ito H, Kasami M, Sasaki N, Shima H, Ikeda M, Tao H, Goto M, Ozawa T, Tsuneyoshi T, Tanioka F, and Sugimura H, Germline alterations of the CDH1 gene in familial gastric cancer in the Japanese population. *Cancer Sci*, 102(10):1782-88, 2011
  3. Tamaki Y, Honda M, Muroi Y, Arai T, Sugimura H, Matsubara Y, Kanno S, Ishikawa M, Hirasawa N, and Hiratsuka M, Novel Single Nucleotide Polymorphism of the CYP2A13 gene in Japanese individuals. *Drug Metab Pharmacokinet*, 26(5):544-547, 2011
  4. Tamaki Y, Arai T, Sugimura H, Sasaki T, Honda M, Muroi Y, Matsubara Y, Kanno S, Ishikawa M, Hirasawa N, and Hiratsuka M, Association between Cancer Risk and Drug Metabolizing Enzyme Gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) Polymorphisms in Japanese Cases of Lung Cancer. *Drug Metab Pharmacokinet*, 26(5): 516-522, 2011
  5. Sugimura H, Tao H, Suzuki M, Mori H, Tsuboi M, Matsuura S, Goto M, Shinmura K, Ozawa T, Tanioka F, Sato N, Matsushima Y, Kageyama S, Funai K, Chou P H, and Matsuda T, Genetic susceptibility to lung cancer. *Front Biosci (Schol Ed)*, 3:1463-77, 2011
  6. Shinmura K, Igarashi H, Goto M, Tao H, Yamada H, Matsuura S, Tajima M, Matsuda T, Yamane A, Funai K., Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, and Sugimura H, Aberrant Expression and Mutation-Inducing Activity of AID in Human Lung Cancer. *Ann Surg Oncol*, 18(7): 2084-92, 2011
  7. Shinmura K, Goto M, Suzuki M, Tao H, Yamada H, Igarashi H, Matsuura S, Maeda M, Konno H, Matsuda T, and Sugimura, H., Reduced expression of MUTYH with suppressive activity against mutations caused by 8-hydroxyguanine is a novel predictor of a poor prognosis in human gastric cancer. *J Pathol*, 225(3): 414-23, 2011
  8. Setoguchi T, Kikuchi H, Yamamoto M, Baba M, Ohta M, Kamiya K, Tanaka T, Baba S, Goto-Inoue N, Setou M, Sasaki T, Mori H, Sugimura H, and Konno H, Microarray analysis identifies versican and CD9 as potent prognostic markers in gastric gastrointestinal stromal

- tumors. *Cancer Sci.* 102(4):883-88, 2011
9. Kawahara N, Sugimura H, Nakagawara A, Masui T, Miyake J, Akiyama M, Wahid I A, Hao X, and Akaza H, The 6th Asia Cancer Forum: What Should We Do to Place Cancer on the Global Health Agenda? Sharing Information Leads to Human Security. *Jpn J Clin Oncol*, 41(5):723-9, 2011.
10. Kawahara N, Roh J K, Akaza H, Inoue H, Shibuya K, Iwasaki M, Tsuji T, Nishiyama M, Nakagawara A, Watanabe K, Nozaki S, Inoue M, Sugimura H, Miyake J, and Li F, The 7th Asia Cancer Forum: From the Perspective of Human Security, How Can We Collaborate as Asians in Order to Place Cancer on the Global Health Agenda? How Can We Fill in the Gaps that Exist Among Us? *Jpn J Clin Oncol*, 41(6):825-31, 2011.
11. Kahyo T, Iwaizumi M, Shinmura K, Matsuura S, Nakamura T, Watanabe Y, Yamada H, and Sugimura H, A novel tumor-derived SGOL1 variant causes abnormal mitosis and unstable chromatid cohesion. *Oncogene*, 30(44): 4453-63, 2011
12. Ikematsu Y, Tamura H, Nakata Y, Hayashi T, Kanai T, Hirayama K, Mori, H, Ozawa T, Hasegawa S, Okawada T, Kageyama S, Sugimura H, and Nishiwaki Y, Metachronous multiple adenocarcinomas of the pancreas. *Int J Clin Oncol*, 16(6):726-31, 2011
13. Funai, K., Sugimura, H., Morita, T., Shundo, Y., Shimizu, K., and Shiiya, N., Lymphatic Vessel Invasion is a Significant Prognostic Indicator in Stage IA Lung Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*, 18(10):2968-72, 2011
14. Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, Arai Y, Hosoda F, Ishikawa S, Tsutsumi S, Sonoda K, Totsuka H, Shirakihara T, Sakamoto H, Wang L, Ojima H, Shimada K, Kosuge T, Okusaka T, Kato K, Kusuda J, Yoshida T, Aburatani H, Shibata T. High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet* 43:464-469, 2011
15. Okayama H, Kohno T, Ishii Y, Shimada Y, Shiraishi K, Iwakawa R, Furuta K, Tsuta K, Shibata T, Yamamoto S, Watanabe SI, Sakamoto H, Kumamoto K, Takenoshita S, Gotoh N, Mizuno H, Sarai A, Kawano S, Yamaguchi R, Miyano S, Yokota J. Identification of genes up-regulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. *Cancer Res.*

72:100-111, 2011

16. Ono H, Hiraoka N, Lee YS, Woo SM, Lee WJ, Choi IJ, Saito A, Yanagihara K, Kanai Y, Ohnami S, Chiwaki F, Sasaki H, Sakamoto H, Yoshida T, Saeki N. Prostate stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 51:30-41, 2012
17. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med.* 18(3): 375-377, 2012
18. Yamaji T, Iwasaki M, Sasazuki S, Sakamoto H, Yoshida T, Tsugane S. Association between plasma 25-hydroxyvitamin D and colorectal adenoma according to dietary calcium intake and vitamin D receptor polymorphism. *Am J Epidemiol.* 175(3):236-244, 2012
19. Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Saiura A, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Ueda H, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T, Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. *Genome Res.* 22:208-219, 2012
20. Yoshida A, Tsuta K, Kohno T, et al. Bright-Field Dual-Color Chromogenic In Situ Hybridization for Diagnosing Echinoderm Microtubule-Associated Protein-Like 4-Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Lung Adenocarcinomas. *J Thorac Oncol.* 6:1677-1686, 2011
21. Kohno T, Shiraishi K. Genetic polymorphisms underlying lung cancer susceptibility and therapeutic response. *Gene and Environment* 34: 94-100, 2012
22. Ogiwara H, Kohno T. Essential Factors for Incompatible DNA End Joining at Chromosomal DNA Double Strand Breaks In Vivo *PLoS One* 6(12)

e28756, 2011

23. Okayama H, Kohno T, Sakamoto H et al. Identification of Genes Upregulated in ALK-Positive and EGFR/KRAS/ALK-Negative Lung Adenocarcinomas. Cancer Res. 72:100-11, 2012

24. Iwakawa R, Kohno T. Contribution of Germline Mutations to PARK2 Gene inactivation in Lung Adenocarcinoma Genes, Chromosomes & Cancer 51:462-472, 2012

## 2. 学会発表

梶村春彦 家族性胃がんについて  
2011年4月28日 第100回 日本病理学会 横浜 パシフィコ横浜

梶村春彦 病理研究者側からみたバイオバンク  
2011年4月29日 第100回 日本病理学会

梶村春彦 がんプロ講演 ヒトがんの原因について  
2011年7月17日 金沢大学

梶村春彦 癌研セミナー ヒトのcommonながんの遺伝的感受性について-病理の立場から  
2011年8月3日 がん研 吉田講堂

梶村春彦 日本癌学会 ランチョンセミナー 非喫煙者の細気管支肺胞上皮癌の相関研究, 10月5日 名古屋国際会議場

梶村春彦 2011年9月14日 遺伝性大腸腫瘍の missing heritability の解明, 東京大学医科学研究所 講堂

梶村春彦・新村和也  
酸化的DNA損傷修復に関わる遺伝子多型とヒト発がん 日本環境変異原学第40回大会 シンポジウム 学術総合センター 2011年11月21日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 別紙4

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Sugimura H et al.	Glioblastoma: Germline mutation of TP53.	Hayat MA	Tumors of the central nervous system	Springer	Heidelberg	2011	31-38
Shinmura K and Sugimura H	Centrosome Abnormality and Human Lung Cancer	Irusen EM	Lung Diseases - Selected State of the Art Reviews,	InTech	Rijeka, Croatia	2012	171-188

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada, H., Sugimura, H. et al.	Germline alterations of the CDH1 gene in familial gastric cancer in the Japanese population.	Cancer Science	102	1782 - 88	2011
Sugimura H. et al.	Genetic susceptibility to lung cancer.	Front Biosci (Schol Ed)	3	1463 - 77	2011
Kohno T, Sakamoto H et al.	KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma.	Nature Medicine	18	375 - 377	2012
Okayama H, Kohno T, Sakamoto H et al.	Identification of Genes Upregulated in ALK-Positive and EGFR/KRAS/ALK-Negative Lung Adenocarcinomas.	Cancer Res.	72	100 - 111	2012
Kahyo T, Sugimura H et al.	A novel tumor-derived SGO1 variant causes abnormal mitosis and unstable chromatid cohesion.	Oncogene	30	4453 - 63	2011

## IV. 研究成果の刊行物・別冊



## Chapter 4

# Glioblastoma: Germline Mutation of *TP53*

Haruhiko Sugimura, Hidetaka Yamada, Shinji Kageyama, Yasuhiro Yamamura, Naoki Yokota, Hiroki Mori, Moriya Iwaizumi, Kazuya Shinmura, Kiyotaka Kurachi, Toshio Nakamura, Masaru Tsuboi, Masato Maekawa, and Tomoaki Kahyo

**Abstract** Various brain tumors are components of familial cancer syndromes, and Li-Fraumeni syndrome and Li-Fraumeni-like syndromes are the most famous entities. A rare, sporadic occurrence of brain tumor in peculiarly young subjects, however, sometimes provides a clue to understanding of carcinogenesis due to germline mutations. In this section, two cases of glial tumors in subjects having germline mutation of *TP53* are presented, and genetic etiology of brain tumor is discussed. The first case is a 41 year-old father of a fatal adrenocortical carcinoma case of a 4-years-old daughter, 16 years prior to the occurrence of astrocytoma of himself. The search for family history and previous clinical records in the four different community hospitals for the last three decades and the follow-ups of his family members disclosed cancer of urinary bladder, cancer of pancreas, hepatoblastoma, and thymoma in the relatives. Germline mutation E286A of *TP53* was identified in the affected members. Another case is a 21-year-old male, without any family history of cancer, who suffered from brain tumor and colorectal cancer. An attending physician was sticky to find an etiology in this unusual occurrence of cancer. After several attempts in vain, an I195T germline mutation was identified and functional analysis was performed. These anecdotes highlight importance of genetic analysis in case of glial tumors in relatively young adult or in adolescence whether or not they have family history of cancer. The problems and strategies to find

*TP53* mutation carriers and to prevent or to delay the occurrence of the tumors in them are discussed.

**Keywords** Glioblastoma · Germline mutation · *TP53* · Mismatch deficiencies · Inhibitors · Tumors

## Introduction

Traditional epidemiological studies have identified few environmental risk factors for malignant brain tumors (Osborne et al., 2001), but genetic components of the etiology of brain tumors, although rare, have been relatively well-defined for glial tumors (Schwartzbaum et al., 2006). Brain tumors are often accompanied by a genetic cancer syndrome such as Li-Fraumeni syndrome (LFS1, OMIM accession 151623), CHEK2-related syndrome (LFS2, OMIM accession 609265), Li-Fraumeni-like syndrome (LFLS), Maffucci syndrome (OMIM accession 166000), Olier syndrome (OMIM accession 166000), tuberous sclerosis (OMIM accession 191100), or von Hippel-Lindau syndrome (OMIM accession 193300). The last two of these syndromes are usually related to tumors having specific histopathology, subependymal giant astrocytoma and hemangioblastoma, respectively, but the other syndromes accompany a variety of glial tumors and choroid plexus tumors. *TP53* is undoubtedly the most influential genetic factor related to the occurrence of human brain tumors. In this review, we report two cases in which a glial tumors was caused by a germline mutation of *TP53*. The first case one was diagnosed in a family in which several members had suffered from various malignancies for decades and consulted different community hospitals in the county where they lived, which had a population of 700,000.

---

H. Sugimura (✉)

Department of Investigative Pathology I, Hamamatsu University School of Medicine, Higashi-ward, Hamamatsu 431-3192, Japan  
e-mail: hsugimur@hama-med.ac.jp

A definitive diagnosis of Li-Fraumeni syndrome was finally made by identifying the germline mutation of *TP53* (Sameshima et al., 1992), 20 years after the first cancer occurred in the family. The second case was a sporadic case of synchronous colon cancer and glioblastoma multiforme. *TP53* sequencing is not routine in such cases, and subsequent identification of the mutation was a very unexpected positive finding. In this chapter we review the *TP53* germline mutations identified in glial tumor cases that have been reported in the literature, and we discuss the importance of functional assessment of the variants. We also address the issue of genetic testing for *TP53* mutations in patients with glial tumors in situations that would arouse suspicion in most experienced clinicians, such as their occurrence in particularly young persons or clustered in a family, especially in routine clinical practice, and we offer perspectives in regard to the management of *TP53* mutant carriers, that may seem bold at the moment.

## Case Reports

### Case 1

A 41-year-old male was diagnosed with a gemistocytic astrocytoma (Fig. 4.1a), and a retrospective and follow-up study of his family over a 40-year period revealed cases of hepatoblastoma, adrenocortical carcinoma, thymoma, pancreatic cancer, and stomach cancer (Fig. 4.1b). A germline *TP53* E286A mutation was identified (Sameshima et al., 1992), and there was marked *TP53* overexpression in the astrocytoma (Fig. 4.1c). The functional significance of the E286A mutation is not definitively recapitulated *in vitro*, but the DNA-damage-associated dysregulation of the cell cycle has been investigated in cells derived from carriers (Goi et al., 1997). The spectrum of cancers in this family is typical of Li-Fraumeni syndrome.

### Case 2

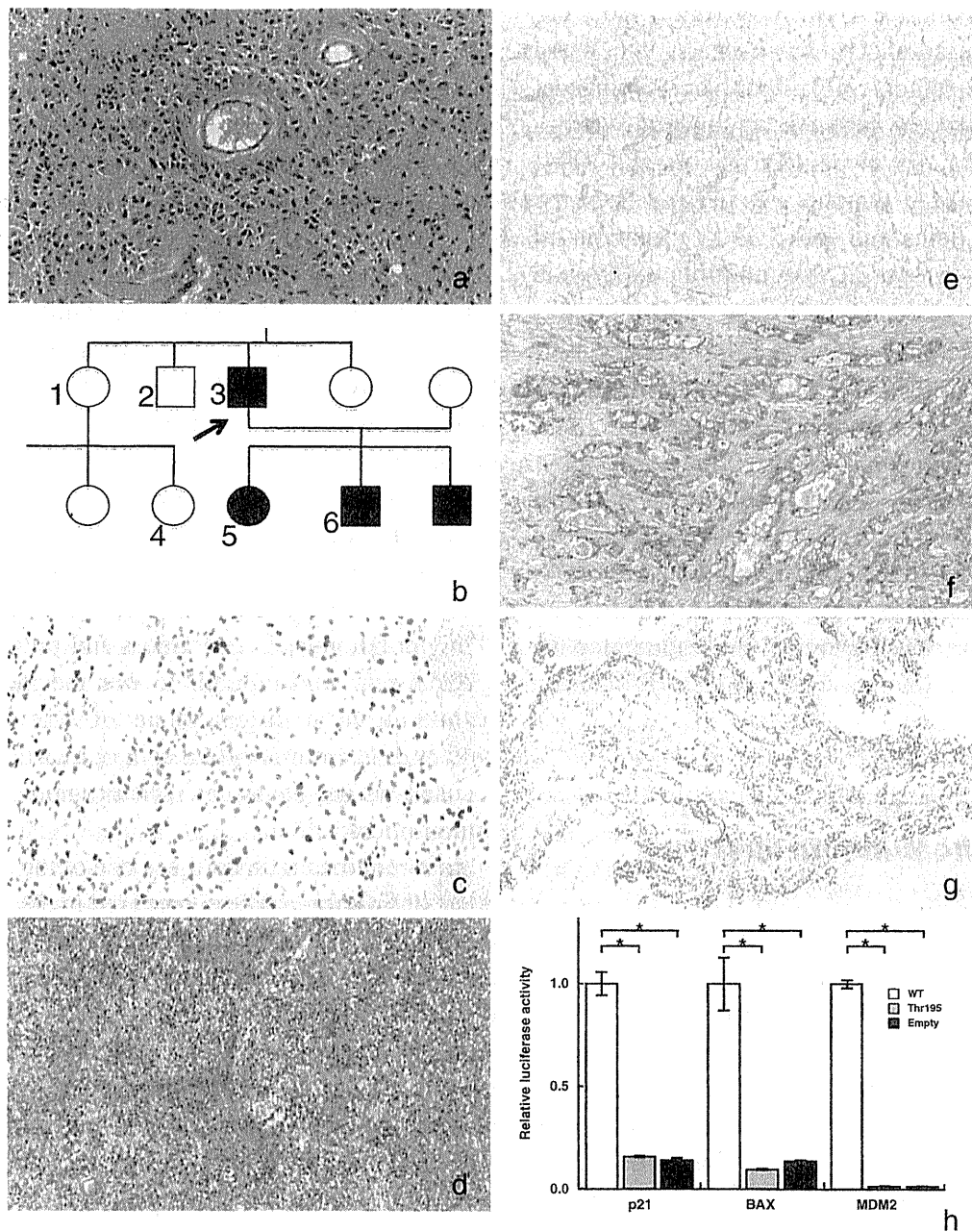
A 21-year-old male with no family history of cancer simultaneously developed symptoms of colorectal cancer and a brain tumor at the same time. The brain tumor was diagnosed as a glioblastoma multiforme

(Fig. 4.1d, e), and marked *TP53* overexpression was detected in the glioblastoma cells. The histological diagnosis of the colon cancer was well-differentiated adenocarcinoma (Fig. 4.1f), and *TP53* was detected in the tumor cells (Fig. 4.1g). The curiosity of the attending physician was aroused by the clinical phenotype of this patient, and the physician suspected one of the genetic syndromes. A tentative diagnosis of Turcot syndrome was made, but the colon cancer did not exhibit microsatellite instability. The patient and his family were very cooperative in regard to further attempts to determine the etiology of his disease. A genetic counselor explained several possible etiologies of the patient's clinical phenotype and the importance of conducting a genetic analysis. DNA from the blood cells of the patient and his healthy parents was used to sequence the entire germline *TP53*, including all of the exons, and an I195T mutation, which has been known as a hot spot for somatic mutations, was found as *de novo* germline mutation in the patient's gene but not in his parents'. This missense variant *TP53* is a well-known somatic mutation but has never been recorded in Li-Fraumeni syndrome. The locus at the codon 195 has been found to alter transcriptional activity in a yeast system (Petitjean et al., 2007), and deficient transactivation capacity has been demonstrated in a mammalian cell system *in vitro* by co-transfection with p53 target molecules (Fig. 4.1h) (Yamada et al., 2009).

## *TP53* and Glial Tumors

Glial tumors of varying biological grades are often encountered in both Li-Fraumeni syndrome and Li-Fraumeni-like syndrome (Pearson et al., 1982; Santibanez-Koref et al., 1991). Li's early collection included 14 brain tumors, 9 of which were gliomas. All of the patients were under age 45 years old, and the mode was 15–29 years old (Li et al., 1988).

Germline mutations of *TP53* have been one of the best-known genetic etiologies of human cancers, including brain tumors. Cases of human cancer consistent with and not consistent with Li-Fraumeni syndrome have been investigated for germline mutations of *TP53*. The latest database of *TP53* germline mutations (IARC *TP53* database, an R14 release, November, 2009) indicates that 138 of the 1053 recorded germline mutations of *TP53* have occurred



**Fig. 4.1** (a) Astrocytoma, grade 2, gemistocytic, of Case 1. Hematoxylin-eosin stain; (b) A family pedigree of the Case 1. An arrow indicates a case of astrocytoma. 1, pancreas cancer at age 36. 2, bladder cancer at age 20. 3, astrocytoma at 41. 4, hepatoblastoma at 2. 5, hepatoblastoma at 2. 6, thymoma at 17. Members 3, 5 and 6 were revealed to be carriers of the *TP53* mutation (Sameshima et al., 1992). Closed circles and rectangles are carriers identified. The other members were not tested for *TP53* mutation; (c) *TP53* immunostaining of astrocytoma of the Case 1. Nuclear staining is prominent; (d) Glioblastoma multiforme of the Case 2. Hematoxylin eosin stain; (e) Glioblastoma multiforme, anti-gliofibrillary acidic protein

(GFAP) (f) Adenocarcinoma of the colon in the Case 2; (g) *TP53* immunostaining of colon cancer in the Case 2; (h) Transcription repression by mutant *TP53* in the Case 2. Evaluation of the transcriptional activation function of p53 by luciferase assay. p21-, BAX-, and MDM2-luciferase activities were measured in p53-null H1299 cells transiently transfected with a p53 expression vector, the firefly luciferase reporter vector pGL4.10, and the transcription control vector pGL4.74. Values for luciferase activity are means  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. For each p53-responsive gene, the luciferase activity of cells transfected with wild-type (wt) p53 was set at 1.0

in patients with a brain tumor. Even in the absence of characteristic tumors, such as breast cancer, soft tissue sarcoma, and adrenocortical cancers, which are the characteristic tumors of Li-Fraumeni syndrome, there are the cases of familial aggregation, particularly of brain tumors alone (Kyritsis et al., 1994) surveyed immortalized lymphocytes derived from the gliomas of 51 patients and found *TP53* mutations in 6 of them. They proposed that multiplicity (in the brain and other organs) and a familial history implies the presence of a *TP53* germline mutation, and they pointed out that 6 subjects in 9 pedigrees were in their 30's when their glial tumors were diagnosed. These reports are instructive when we encounter brain tumor cases in adolescents and young adults in our practice. More than 20 different germline missense mutations have been reported in the germline of patients with glial tumors of various biological grades, ranging from oligodendroglioma to astrocytoma and to glioblastoma multiforme.

### ***Is Any Specific Mutation Spectrum Associated with Brain Tumors?***

Examination of the updated IARC database, suggests two questions in regard to the relation between germline *TP53* mutations and brain tumors. The first question concerns whether there are germline *TP53* mutations that specify the occurrence of a tumor in a particular organ. Lubbe et al. reported a familial brain tumor syndrome associated with codon 236 (Lubbe et al., 1995), and Vital et al. (1998) reported two families with a cluster of astrocytomas and choroid plexus tumors caused by codon 248 mutations. The specific significance of this mutation in these families seems to have drawn a great deal of attention since then, but these mutations have never been particularly questioned as brain tumor-causing germline mutations (Kleihues et al., 1997) reviewed 91 families with germline mutations and brain tumors and found an earlier age of onset of their brain tumors than in families with brain tumors but no germline mutations, but they were not able to identify any particular spectrum of germline mutations that tended to be more common in patients with brain tumors than in patients with tumors at other sites. The spectrum of somatic *TP53* mutations has been extensively investigated and widely accepted

as carcinogen fingerprints of the tumors (Hussain et al., 2000), but there has been little assessment of the spectrum of germline *TP53* mutations in terms of a possible relationship to the specific phenotype of the proband and the proband's descendants. Varley summarized the germline mutations in Li-Fraumeni syndrome and other syndromes, and claimed to have detected a mutation specificity preferentially associated with adrenocortical carcinoma (Varley, 2003). That claim requires validation by thorough testing of family members, but the concept of specific germline mutations deserves further corroboration. In any event, no spectrum of germline mutations has ever been identified in brain tumors patients.

The second question concerns whether the brain tumors that develop in persons with a germline *TP53* mutation have any specific characteristics in common. Bogler (Bogler et al., 1995) reviewed the spectrum of *TP53* mutations in brain tumors and found that loss of a remaining wild-type allele was the most important second hit in tumorigenesis and loss of the remaining wild-type allele was detected in our case 2. His review focused on the nature of somatic genetic changes in brain tumors.

Glioblastoma multiforme is one of the targets of The Atlas of Cancer Genome, prepared in the United States (Ledford, 2010). Watanabe (Watanabe et al., 2009) recently reported identifying an R132C mutation of the *IDH1* gene in an astrocytoma in a patient with the Li-Fraumeni syndrome. The recent "next" generation sequencing has generated tremendous information on genetic changes in glioblastoma (Verhaak et al., 2010). *IDH* gene mutations are one of the most remarkable discoveries of high-throughput sequencing projects in regard to glioblastoma in general (Yan et al., 2009), and since 12% of glioblastomas have been found to harbor a *IDH1* mutation (Parsons et al., 2008), the *IDH1* mutations discovered by Watanabe are not specific for glioblastoma multiforme associated with Li-Fraumeni syndrome. The *TP53* mutations often coincide found in germline cells are often the same as those found in somatic cells. With few exceptions, the genotype-phenotype relationship in genetic cancer diseases has not been extensively studied. The landscape of somatic genetic changes, including mutations and copy number amplifications, in tumors that occur in persons with a particular genetic background will soon become available, and it will be necessary to wait until enough cases accumulate to draw conclusions as