

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(分担報告書も統合)

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
分担研究者	坂本裕美	国立がん研究センター研究所・ユニット長
分担研究者	河野隆志	国立がん研究センター研究所・分野長

研究要旨

胃がんや肺がんは、頻度からいっても、死亡数からいっても本邦でもっとも重要ながんと言っても良いが、その原因については、喫煙習慣、ヘリコバクター感染などの外的要因がよく知られているが、遺伝性慢性胃がんを極型としてこれらの外的要因と独立あるいは相関して遺伝的素因の存在が従来から想定されてきた。本研究班は分担研究者の全ゲノム領域をカバーする胃がんや肺がんの相関研究、研究代表者の家族集積性胃がん例の解析をもとに、ゲノム・遺伝子解析により胃がんや肺がんとともに肺腺がんの高危険度群を抽出することを狙ってきた。これまで、胃がんにおいて、ときに de novo の形で生じる copy number 変異が若年発症の胃がんに見られたこと、epigenetic な変化を修飾する遺伝子の多型が肺腺がんのリスクに関与することなどを示したが、引き続き、濃厚な遺伝的要因が想定される若年あるいは家族性胃がんの症例を重ねるとともに、今回エクソーム解析により、未知の遺伝的变化を抽出した。その変化についても上記の症例で確認をしていきたい。

A. 研究目的

胃がんや肺がんの原因については、喫煙習慣、ヘリコバクター感染などの外的要因がよく知られているが、遺伝性慢性胃がんを極型としてこれらの外的要因と独立あるいは相関して遺伝的素因の存在が従来から想定されてきた。本研究班は分担研究者の全ゲノム領域をカバーする胃がんや肺がんの相関研究、研究代表者の家族集積性胃がん例の解析をもとに、ゲノム・遺伝子解析により胃がんや肺がんとともに肺腺がんの高危険度群を抽出することを目的とする。

B. 研究方法

[既存の家族集積例、若年発症例からのアプ

ローチ] 家族集積例、あるいは若年発症で組織像が signet ring cell type の症例を引き続き、内視鏡医などの協力を得て収集している。そのなかで、CDH1 の塩基配列や copy number を前年度と同様に Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA) 法によるスクリーニングを続けた。その際、いくつかの陽性例の経験から、組織像の特徴つまり粘膜内に多発していること、signet ring cell in situ などの所見があることを伝え、現場の臨床医と広く連携をしながら症例を収集している。また、文献にあるコンソーシアムの基準に必ずしも合致しない例でも見つかることがあること

を周知せしめて、たとえば家族歴のまったくない症例なども検索の協力を要請した。

[GWAS からのアプローチ] 500 例の肺腺がんについての網羅的解析により、クロマチン修飾遺伝子などの多型が新たに見つかり、一部は Nature Genetics などに発表しているが、それらで見いだされつつある候補遺伝子について、後述の極めて稀な若年肺がんのエクソーム解析所見とあわせて、検討をはじめた。

[エクソーム解析からのアプローチ] アジレント SureSelect を用いエクソン DNA を濃縮し、イルミナの次世代シーケンサー HiSeq 2000 を用い、全エクソンの塩基配列解析(Whole exon sequence, WES)を行った。Bioinformatics の面からの分析として、WES の pair-end の read data を BWA で hg19+ decoy 5 にマップし、PCR duplicate 疑いを samtools で削除。既知の indel 周辺の realign, Q-value の付け替えを GATK で実施。ゲノムコホート 192 人と当班の 53 人(家族性胃がんと若年性肺がん)をまとめ、GATK の UnifiedGenotyper を用いて multiple sample で bait ターゲット領域内の mutation call を実行した。また更に sensitivity をあげるために個別に single sample でも同様の call を行い、Cancer Gene Census に登録されている遺伝子領域において multiple sample では call されなかった変異を追加した。そのうち、PhyloP, SIFT, PolyPhen2, LRT, Mutation Taster などにより、deleterious と判定された変異(多型)を、さらに、胃がん例、肺がん例で有意に頻度の高いものを検出していった。

(倫理面への配慮)

ゲノム解析研究を含む研究であり、浜松

医科大学医の倫理委員会、浜松医科大学遺伝子解析研究倫理委員会の審議を経てエクソーム解析も含め承認を得ている(23-91)。またコントロールとして、JHPC の検体を用いる承認も国立がん研究センターから得ている(課題 2011-044)。

C. 研究結果

[若年性家族性胃がん例] CDH1 の生殖細胞系列のうち機能差のありそうなものとして、ミスセンスバリエントが 4 つ、ナンセンスバリエントが 1 つ、フレームシフトバリエントが 1 つ、5' UTR のバリエントが 2 つ遺伝性びまん性胃がんおよびびまん性胃がんの若年孤発例で見つかった。MLPA 法では、遺伝性びまん性胃がんおよびびまん性胃がんの若年孤発例で 5 つのコピー数変化が見つかった。これらのコピー数変化については胃がんを発症していない検体について TaqMan コピー数解析法を用いて探索したが見つからなかった。つまり、対照群には存在する可能性の低い多型である。1 例については家族内の構成員の検索が可能であり、その結果、コピー数変異がある世代で新たに生じ、次の世代にうけつられていくものであることを確認した。また、その組織像の詳細な観察から signet ring cell carcinoma in situ の多発が確認され、欧米で報告されている組織像と同様のものであった。

[肺がんの GWAS と若年肺がんのエクソーム] 肺腺がんの GWAS により、従来いわれていた locus 以外に、クロマチン修飾に関わる遺伝子座など新たなものも見だし、さらにこれらの遺伝子群についてエクソームデータとあわせて注視しており、一般的

な肺がん集団あるいは対象群での分布の解析の準備もすすめている。

[エクソーム解析] single sample の解析で call された変異および多型は 47134 種類であった。これらのうち胃がん例のみで見つかり、PhyloP, SIFT, PolyPhen2, LRT, Mutation Taster, GERP++ すべてで deleterious と判定された変異および多型は 187 種類であり、その多くは、Cancer Gene Census に登録されていない新規なものであった。登録されていた遺伝子としては CHEK2, ARID1A, APC などがあった。CHEK2 については同一家系内の胃がん発症者 2 例で同じ変異が見つかった。

D. 考察

胃がんのリスクについて、ヘリコバクターの感染などがよく知られており、その除菌が、胃がん予防の対策として有効である。また肺がんについても喫煙という大きな因子があり、両疾患とも環境要因の強い癌であるとされ、逆にいえば preventable な癌とされてきた。しかし、遺伝性慢性胃がんのような劣性遺伝病として認識されてきたいわば極型ともいえる phenotype の存在、また本班で収集してきた若年や家族性の胃がん・肺がんの本邦における実態を鑑みるとおそらくは遺伝的要因がつよい未知の entity が存在すると考えられた。また、遺伝性慢性胃がんと同一遺伝子が原因でも、比較的大きな遺伝子領域の欠落という現象がいまままで同定されてこなかったことが明らかになり、しかも、家族歴がない症例で de novo で生じ得るということがわかった。胃がんについては、従来から、一定の割合で 20 代、30 代、40 代といった発症が知られており、

いわゆるスキラスといわれる病理学的な特徴や、発見が遅れた場合の予後の悪さなど、100 年近く前の山極勝三郎の胃癌発生論にもスケッチがある。本班のいままでの研究により、この日本人の胃がんのこの phenotype の少なくとも一部が遺伝的要因であるという認識をもたらした。また、エクソーム解析は非常に有用な方法で、多数の候補遺伝子の検証が必要であるにせよ、理論的に機能的障害のあるような遺伝子多型が見いだされている。ヒトは誰でも複数の有害な遺伝子の変異を持っているといわれているが、これらのうちあるものが、preventable な胃癌や肺癌といった疾患と関係するという期待は本班の趣旨そのものである。おりしも、別の臓器ではあるが遺伝性乳癌の感受性遺伝子のキャリアーが予防的乳房切除を受けたというニュースが、全国紙にもとりあげられた(朝日新聞、2013 年 5 月 20 日朝刊)。ハイリスクグループがわかった場合、その確度によりどのような臨臨床的、倫理的、社会的対応が適切であるかという議論がますます進むと思われる。これまで、とくに本邦の場合、遺伝的感受性という言葉がしばしば、研究者の概念的な話題にとどまるところがあったが、ある程度の患者数がおり、surveillance や、治療が確立されている common cancer での実態を、海外の情報をそのまま適応するのではなく(現実的に人種差などがあり、種々の遺伝子多型の分布も意義も大変異なる)本邦の基礎的 data をさらに臨床家の認識と協力を得てすすめたいと思う。

一方肺癌のリスクは組織像や喫煙者に発生したかどうか、喫煙量との用量反応関係などを考慮する必要があるが、本班の収集し

ている若年肺癌は極めて貴重な例であり、そのエクソームデータがでたことは非常に意義がある。さらに、これまで多くの実績を積んできた班員の河野博士のグループの GWAS による data との比較、関連が非常に興味深い。

E. 結論

ゲノム解析によるデータは、胃癌や肺癌の高リスク群の同定に極めて有用であり、とくに塩基変異ばかりでなく、copy number の変異や、家族歴の有無に関わらない遺伝的リスクの存在を明らかにできる。そのような変化は、前もって検索あるいはサーベイランスが可能であり、胃癌や肺癌は早期に発見されると非常に予後が良い疾患になっている現状を考えると、若年や壮年におけるこの疾患による死亡をふくめた重篤な損失を防ぐことができる基礎的知見であると思われる。

F. 健康危険情報

ゲノム変化による胃癌のリスクについて、特に現在は広報していず、マスコミなどにみられる胃癌の予防については、保険収載という昨今の状況もあり、ヘリコバクターの除菌をすすめている。若年胃癌についての、現状（頻度、割合、検査の簡便さ）をさらに確度の高いものにする必要があるが、すくなくとも胃癌の臨床にたずさわっている医師にとっては、本邦の胃癌の遺伝的要因の存在が現実的に考え得るものとして明確になり（以前はほとんどないという報告があったため、検索意欲も現場では少なかった）あらたな症例の発掘や、その症例の早期治療が行われだしたというのが現状で

ある。

研究発表

1. 論文発表

1. Ella, E., Sato, N., Nishizawa, D., Kageyama, S., Yamada, H., Kurabe, N., Ishino, K., Tao, H., Tanioka, F., Nozawa, A., Renyin, C., Shinmura, K., Ikeda, K., Sugimura, H. (2012). Association between dopamine beta hydroxylase rs5320 polymorphism and smoking behaviour in elderly Japanese. *J Hum Genet* 57, 385-390.
2. Kiyose, S., Igarashi, H., Nagura, K., Kamo, T., Kawane, K., Mori, H., Ozawa, T., Maeda, M., Konno, K., Hoshino, H., Konno, H., Ogura, H., Shinmura, K., Hattori, N., Sugimura, H. (2012). Chromogenic in situ hybridization (CISH) to detect HER2 gene amplification in breast and gastric cancer: comparison with immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH). *Pathol Int* 62, 728-734
3. Kiyose, S., Nagura, K., Tao, H., Igarashi, H., Yamada, H., Goto, M., Maeda, M., Kurabe, N., Suzuki, M., Tsuboi, M., Kahyo, T., Shinmura, K., Hattori, N., Sugimura, H. (2012). Detection of kinase amplifications in gastric cancer archives using fluorescence in situ hybridization. *Pathol Int* 62, 477-484.
4. Natsume, H., Shinmura, K., Tao, H., Igarashi, H., Suzuki, M., Nagura,

- K., Goto, M., Yamada, H., Maeda, M., Konno, H., Nakamura, S., Sugimura, H. (2012). The CRKL gene encoding an adaptor protein is amplified, overexpressed, and a possible therapeutic target in gastric cancer. *J Transl Med* 10, 97.
5. Sato, N., Sato, T., Nozawa, A., and Sugimura, H. (2012). Assessment Scales of Nicotine Addiction. *Journal of Addiction Research & Therapy*.S1-008
6. Toyoshima, M., Chida, K., Suda, T., Sugimura, H., and Sato, M. (2012). Endobronchial metastasis from gastrinoma of the pancreas. *Am J Respir Crit Care Med* 185, 590-591.
7. Inaba, K., Sakaguchi, T., Kurachi, K., Mori, H., Tao, H., Nakamura, T., Takehara, Y., Baba, S., Maekawa, M., Sugimura, H., and Konno, H. (2013). Hepatocellular adenoma associated with familial adenomatous polyposis coli. *World J Hepatol* 4, 322-326.
8. Matsuda, T., Tao, H., Goto, M., Yamada, H., Suzuki, M., Wu, Y., Xiao, N., He, Q., Guo, W., Cai, Z., Kurabe, N., Ishino, K., Matsushima, Y., Shinmura, K., Konno, H., Maekawa, M., Wang, Y., Sugimura, H. (2013). Lipid Peroxidation-Induced DNA Adducts in Human Gastric Mucosa. *Carcinogenesis*, 71:4628-4639.
9. Sugimura H, Yamada H, Tao H, Shinmura K, Iwaizumi M, Kasami M. (2013) Familial gastric cancer - an update of Japanese cases. *Gan To Kagaku Ryoho*. 40(2):154-8. (in Japanese with English abstract)
- 2.学会発表
1. 梶村春彦 ヒトアダクトームについて
日本分子生物学会総会、福岡、2012, 12月
2. Haruhiko Sugimura, Tao Hong, Nobuya Kurabe, Masanori Goto, Yoshitaka Matsushima, Hidetaka Yamada, Kazuya Shinmura, Yohei Miyagi, Yukari Totsuka, Hitoshi Nakagama, Yaping Wang, Tomonari Matsuda. DNA Adductome, an ultimate exposome of human tissue. AACR special conference, post GWAS horizon. Hollywood, FL, USA, 2012, 11月
3. 梶村春彦 ヒトがんの原因について
第20回静岡 Cancer Therapy Conference, 浜松、2012年8月
- G. 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