

腎細胞がんの網羅的なゲノム異常解析

分担研究者 小川 誠司 京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座 教授

研究要旨

腎細胞癌における分子病態の詳細を明らかにするために、全エクソンシーケンスによる網羅的な遺伝子変異の検出を行った。その結果、新規の遺伝子変異である *TCEB1* 変異を同定した。*TCEB1* 変異は VHL の不活化とは完全に排他的に生じており、両者を合わせると 95%の腎細胞癌に VHL 複合体の異常を認めた。*TCEB1* 変異により、VHL 複合体の機能が喪失し、低酸素誘導因子が蓄積することが明らかとなった。

A. 研究目的

腎細胞癌では、VHL 遺伝子の不活化が高頻度に生じることが知られている。VHL は低酸素誘導因子 (HIF) をユビキチン化することによりその分解を促しており、VHL の不活化により HIF が蓄積することが腎細胞癌の発生の主要な要因であると考えられている。一方、低頻度ながら VHL に異常の見られない腎細胞癌が存在することも知られているが、このような症例における分子病態については、これまで明らかとされていない。このように腎細胞癌の分子病態には未だ不明な点もあり、充分には解明されていない。本研究では、全エクソンシーケンスにより、腎細胞癌における新規遺伝子変異を同定し、その機能的な意義を明らかにすること試みた。

B. 研究方法

240例の腎細胞癌に対し、手術時に腫瘍および正常腎組織を採取し、DNAを抽出した。このうち106例について、SureSelect (Agilent Technologies)により全エクソン領域を濃縮し大量並列シーケンス HiSeq2000 (Illumina)にて全エクソンシーケンスを行った。また、メチル化アレイ (Infinium HumanMethylation450) による網羅的なDNAメチル化解析を行いメチル化のプロファイリングを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は東京大学倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

全エクソンシーケンスを行った106例の腎細胞癌のうち、70例がVHLの変異を有していた。また、メチル化アレイの結果、22例にVHLのプロモーター領域のメチル化を認めた。合計92例にVHLの不活化を認め、残りの14例にはVHLの異常が検出されなかった。これら14例のうち、5例に*TCEB1*の変

異を認めた。正確な変異頻度を測定するために全240症例について*TCEB1*の変異解析を行ったところ、8例(3.3%)に変異を認めた。*TCEB1*は8qに存在し、Elongin Cタンパクをコードしている。Elongin Cは、VHLおよびElongin BとともにVHL complexを形成し、HIFのユビキチン化を促している。*TCEB1*変異例は常に8q LOHを伴っており、VHLの不活化とは完全に排他的に生じていた。両者を合わせると、240例中229例(95%)にVHL complexの異常を認めた。*TCEB1*の変異はTyr79(7例)およびAla100(1例)の2か所のアミノ酸に対応する塩基の一塩基置換のみが見られた。これらのアミノ酸は、VHLとの結合部位付近に位置しており、変異によってVHLとの相互作用が失われるためにVHL complexの機能が喪失するものと考えられた。そこで、HEK293T細胞に野生型または変異型のElongin Cを発現させ、免疫沈降を行ったところ、野生型Elongin CはVHLとの複合体形成が確認されたものの、変異型Elongin CはVHLとの結合が阻害されていた。また、HeLa細胞において、内因性に発現しているElongin Cをノックダウンしたうえで、変異型Elongin Cを発現させたところ、HIFの蓄積が観察された。これらの結果から、*TCEB1*の変異と対側アリルの欠失により、VHL complexが形成されず、HIFが蓄積して腎細胞癌が発生すると考えられた。

D. 考察

本研究により、VHL complexの機能喪失とHIFの蓄積に関する新しいメカニズムが明らかとなり、腎細胞癌の分子病態におけるVHL complexの重要性が一層強調される結果となった。VHL complexの異常は腎細胞癌の発生においてほぼ必須のイベントであることが分かり、HIFの蓄積という観点からは、VHLおよび*TCEB1*のどちらが変異しても同様の結果が生じることが示された。一方、VHLとは異なり*TCEB1*

にはナンセンス変異やフレームシフト変異は1例も見られなかった。このことから、Elongin Cの機能が完全に喪失してしまうことは、何らかの理由により腫瘍細胞にとって不利となることが推測された。変異型のElongin Cには、腫瘍細胞の生存に必須となる機能(例えば、まだ知られていない分子との相互作用)が残存しているのかどうか、さらなる検討が必要である。

E. 結論

VHLに異常を認めない腎細胞癌の一部に、TCEB1変異を認めた。VHLの不活化とTCEB1変異は完全に排他的に生じており、両者を合わせると95%の腎細胞癌にVHL complexの異常を認めた。TCEB1変異により、VHL complexの機能が喪失し、HIFが蓄積することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet.* 2013
2. Yoshida K, Sanada M, Ogawa S. Deep sequencing in cancer research. *Jpn J Clin Oncol* 43(2):110-115. 2013
3. Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shiba N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, Ogawa S, Miyano S. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acids Res* 41(4):e89. 2013
4. Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, Shimamura T, Sato-Otsubo A, Nagae G, Suzuki H, Nagata Y, Yoshida K, Kon A, Suzuki Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Fujimoto A, Tsunoda T, Morikawa T, Maeda D, Kume H, Sugano S, Fukayama M, Aburatani H, Sanada M, Miyano S, Homma Y, Ogawa S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell

carcinoma. *Nat Genet.* 2013

5. Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet.* 2013

6. Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T. Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood.* 2013

7. Nishimura R, Takita J, Sato-Otsubo A, Kato M, Koh K, Hanada R, Tanaka Y, Kato K, Maeda D, Fukayama M, Sanada M, Hayashi Y, Ogawa S. Characterization of genetic lesions in rhabdomyosarcoma using a high-density single nucleotide polymorphism array. *Cancer science.* 2013

8. Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Saunthararajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet.* 2013

9. Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet* 92(3):431-438. 2013

10. Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK,

Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet.* 2013

学会発表

1. Yusuke Sato, Shigekatsu Maekawa, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Aiko Sato, Genta Nagae, Teppei Shimamura, Yasunobu Nagata, Kenichi Yosida, Masashi Sanada, Haruki Kume, Hiroyuki Aburatani, Satoru Miyano, Yukio Homma, Seishi Ogawa. Integrative analysis of clear cell renal cell carcinoma, AACR 104nd Annual Meeting, 2013
2. Yusuke Sato, Shigekatsu Maekawa, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Aiko Sato, Genta Nagae, Teppei Shimamura, Yasunobu Nagata, Kenichi Yosida, Masashi Sanada, Haruki Kume, Hiroyuki Aburatani, Satoru Miyano, Seishi Ogawa, Yukio Homma. Integrative analysis of clear cell renal cell carcinoma, 28th Annual EAU Congress, 2013
3. 佐藤悠佑、前川滋克、奥野友介、白石友一、佐藤亜以子、永江玄太、島村徹平、眞田昌、久米春喜、油谷浩幸、宮野悟、小川誠司、本間之夫．淡明細胞型腎細胞癌における統合的ゲノム解析 第101回日本泌尿器科学会総会、2013
4. 佐藤悠佑、吉里哲一、白石友一、前川滋克、奥野友介、嘉村巧、永江玄太、菅野純夫、油谷浩幸、眞田昌、宮野悟、本間之夫、小川誠司．Integrated molecular analysis of clear cell renal cell carcinoma 第72回日本癌学会学術総会、2013

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。