

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捕捉、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・腫瘍病理学講座・教授

研究要旨

家族性に発生する胃がん患者は、その背景として、固定リスクである遺伝素因において高危険度群である可能性がある。研究代表者は本研究の総括を行うとともに、代表者が発見して以来、本邦で漸く明らかになりつつある、*CDH1* の生殖細胞系列の変化による胃癌の解析を行った。その結果、本邦の家族性・若年性胃がんで、コピー数異常が少なからず存在し、とくに *de novo* 発生の例も発見した。これらの変化の陰性例については、分担研究者の坂本らとともにエクソーム解析をし、いくつかの候補遺伝子を同定し詳細は分担報告書に譲るが、今回経験した *CDH1* のコピー数変異の同定や、主として点突然変異の探索に力を発揮する次世代シーケンサーの限界を考慮にいと、*CDH1* 以外の遺伝子領域にコピー数変化がある可能性も考慮する必要があると考えられた。分担研究者の河野らの若年肺がんのエクソーム解析の結果も、有力な候補遺伝子が複数あるが、いっぽうで、全ゲノム領域のコピー数の解析が残っている。本年度は、現存するもっとも解像度の高いプラットフォームである CytoScan™ の導入を試み、いままで同定した *CDH1* のエクソン単位の変化などを確認できた。より広範な領域の探索にはいる予定である。これまで同様の家系の収集・分析、機能解析による検証・絞り込みとともに、ゲノムワイドなコピー数探索を今後行うための準備が整った。

A. 研究目的

我が国の罹患・死因において主要な一を占める胃がん・肺がんの大半の症例においては、発症には生活習慣や感染症の寄与が大きいとされるが、遺伝素因の存在が本研究課題の研究者等の先行研究により明らかになってきた。本総括報告では、胃がん、肺がんをそれぞれ担当する

分担者の内容とともに、代表者の進展させた概略も述べたい。胃がんの遺伝性素因のうちもっとも強く、また有名なものは Hereditary Diffuse Gastric Cancer の名称で確立されているようにみえる遺伝性胃がんである。*CDH1* の生殖細胞系列が発見されていらい、各国でみつきり、遺伝子解析が必要であるという診断基準

が普及している。ただ、この基準はあくまでも全例遺伝子解析をするわけにはいかないという目安であり、基準をみたさない症例も散発的に報告されている。本研究班では、本邦で長年検索しても見つからなかったという事実を踏まえて、MLPA という生殖細胞系列の検討をいれたところ、典型例と思われる病理学的 phenotype をもった症例や、家族歴がないが、未発症の子孫に受け継がれているといった症例を発見した。これらの症例の蓄積とともに、CDH1 以外の遺伝子の寄与を秋あらかにすることを本年度の目的とした。得られた知見を、胃癌高危険群の革新的な予防戦略開発のための基礎的情報として提供することが目的である。

B . 研究方法

CDH1 の解析については、家族性発生例、すでにあつめられていた笹月班例、若年例など日本中の施設からの問い合わせに応じて解析をおこなった結果以下の例についての、コピー数変異と生殖細胞系列の変異を全エクソンの sequence と MLPA によって行った。

これらのうち、特にコピー数変異の見いだされた症例を陽性コントロールとして High Density CytoScan™ (Affymetrix) 解析を行ってその精度を確認した。このアレイには 260 万異常のコピー数マーカーが搭載されており、400kb 以上のコピー数変化について 99%以上の感度で検出できるということになっている。また、gene centric な SNP が 75 万個載っていて切断点の推定にも役立つとされている。本年度は、おもに CDH1 のコピー数の変化が検出されるかについて検証した。

一方、CDH1 の関与が点突然変異の面でも、エクソンのコピー数変異の面でも除外された例で、固定リスクとして持つ可能性が高いと考えられる家族性・若年性の胃癌例を用いた全エクソームシーケンスのデータの基盤を以下の方法で作成した。前年度までに、研究代表者が収集した家族歴のある胃癌罹患者 18 名と、家系内の胃癌非発症者 14 名に対して、Agilent SureSelect All Exon V4+非翻訳領域+lncRNA 遺伝子の計約 80Mb の領域の全エクソームシーケンス(WES)を Illumina HiSeq2000 (75-base paired end)を終了した。前述のように胃癌罹患者 18 名については、研究代表者により、CDH1 変異が認められないことが確認されている。同時に、本研究における若年性肺癌 21 例の WES も行い、53 人分のデータを得た。また、別プロジェクトとして、日本の複数地域にまたがる住民コホートから 192 名について、同じ解析プラットフォームで行った WES のデータも対照集団として活用することとした。分担報告者坂本の報告と重複するが、上記の合計 245 人に対して、BWA によるマッピングと samtools、GATK の UnifiedGenotyper による非リファレンスアレルコールを行い、Annovar で各種注釈 (annotation) 情報を付加した。家族歴のある胃癌罹患者 18 名の中で、Annovar の各種指標のうち少なくとも 1 つで deleterious と判定されるか、COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations in Cancer) データベースに登録のある変異であって、1000 人ゲノムプロジェクトや京都大学の HGVD データベース、さらに当分担研究者らによる、192 名の住民コホート検体の WES デー

タではコールされない多型・変異を検索し、遺伝子及び変異に関する annotation 情報及び複数症例において再現される (recurrent な) 多型・変異を抽出した。

C . 研究結果

1) CDH1 の関与の現状 :

13 例にて CDH1 の生殖細胞系列の病原性とされている変異がみとめられた。そのなかで、p.Val832Met については、対照群にも同数見つかり、我々は現在では病原的な意義についてまだはっきりしない多型に分類したほうがいいと考えている。

表にはないがさらに 1 例 p/Arg63* が見いだされており、これは、同じ変異による家系がヨーロッパで報告されている (京都大学 小杉真司、堀松高博、武藤学、未発表 ; Gyather SA et al. Cancer Res 1998) この症例は口唇裂をともっているが、いっぽうで CDH1 と口唇裂の関係も報告がある(HMG 22() 919-26)。

Nucleotide change	Amino acid change	N		dbSNP ID	MAF/MinorAlleleCount	
		Case	Unaffected Individual		1000 Genomes	HGVD
c.-49G>T		1	0	-	-	-
c.-8G>A		1	0	-	-	-
c.220C>T	p.Arg74*	1	0	-	-	-
c.546A>C	p.Lys182Asn	1	1	rs201141645	0.0001	0.001/2
c.1018A>G	p.Thr340Ala	1	0	rs116093741 (Pathogenic allele)	0.0001	0.006/6
c.1212delC	p.Asn405Ilefs*12 (predicted)	1	ND	-	-	-
c.2494G>A	p.Val832Met	2	2	rs35572355 (Pathogenic allele)	0.001/2	0.006/14
c.1647_337*7del	p.Val55Glyfs*38	2	0	-	-	-
c.5327_687*7dup	p.Le178_Thr229dup (predicted)	1	0	-	-	-
c.1138-7_1320*7del	p.Ty1380_Lys440del61 (predicted)	1	0	-	-	-
c.1566-7_1711*7del	p.Tyr323Phefs*16	1	0	-	-	-

コピー数変化についてすでに exon 3, 9 11 の変化を見いだしている。それらについて Cytoscan 解析を行い、図のように想定された部分に MLPA で検出された尾コピー数変化を確認できた。

本方法は 250 nanogram の DNA からスタートして、全ゲノム領域のコピー数変異やその周辺の遺伝子との相対的位置などが記述されるソフトウェアを搭載し、産科領域での実績が知られている。



この方法で、胃がん、肺がんを問わず、若年発症例や、家族集積例で原因が未知なものについて、CDH1 以外の遺伝子領域で意味のあるコピー数変化があるかどうかを探索し、さらにその部分を MLPA や copy number Taqman™ 等を用いて確認するというプロセスをすすめるたい。

2) エクソーム解析の展望

家族歴のある胃がん罹患患者 18 名に対し、非発症者 9 名 (計 14 名から 15 歳以下、及び年齢情報が得られなかった者 5 名を除外) と住民コホート 165 名 (計 192 名からがん既往歴・現病歴のある者を除外) に対して、Fisher 正確検定の P 値を算出した。遺伝性腫瘍等の単一遺伝子病における変異アレルの出現様式を考え、common disease のような変異 (アレル) 単位の関連解析と、遺伝子単位に集約した関連解析を行った。

その結果、対照集団に認められない deleterious 変異は 1,376 個あり、対応する遺伝子としては 928 個 (knownGene による) であった。このうち、recurrent な遺伝子は 63 個、COSMIC の Cancer Gene Census (CGC) に登録のある遺伝子は 35 個、recurrent かつ CGC に登録のある遺伝子が 3 個同定された。そのいくつかについて、ノックアウト細胞や変異 plasmid を作成して機能解析の準備を行った。

肺がんでも同様の候補遺伝子の絞り込み

に成功しており、分担研究者の河野の報告にあるように、症例の収集をすすめている。

D . 考察

1)現在のエクソーム解析の結果からは、CDH1 など既知の遺伝子以外に残りの大部分をしめるような遺伝子多型は検出されなかった。いわゆる common disease-common variant 仮説の延長である、集団中に一定頻度で存在する rare variant の存在は、今回の解析のような仮説のない状況下の解析では統計学的には検出されることはなかった。そのような遺伝素因は存在すると考えられるが、本研究の症例・対照数では検出力不足であったと考えられる。そもそも関連遺伝子多型それぞれの頻度がすくない long tail 分布をするような状況であると、単純に統計学的なアプローチではつかまらない。

一方、今回の家族歴のある胃がんの解析では、遺伝性腫瘍等の単一遺伝子病モデルを元々想定しており、その場合は、優性遺伝モデルにおける de novo mutation のように、対照集団中には存在せず、かつ分子経路や既知の変異情報に基づき、発がんメカニズムの観点から重要であると考えられる遺伝子の変異を探索していくことになる。この方法により、recurrent でかつ CGC に登録のある 3 遺伝子が同定されたことは興味深い。しかし健常人の WES でも多くの deleterious 変異が少なくともヘテロ接合で存在することから、家族性胃がんの原因変異と判定するためには、(i) さらなる症例で recurrent に認められること、(ii) 同一家系内で、胃がん罹患と相関すること (segregation analysis)、(iii) より多くの一般集団中に変異を認めないか、ある

いは極めて低頻度であること、(iv) 動物モデル等も含めた機能解析により、胃発がんメカニズムへの関与が示唆されること、が必要であると考えられる。このうち(i)・(iii)等については、国立がん研究センターで2011年5月から分担研究者等ら実務の中心となって開始している、全ゲノムシーケンス解析を含めた包括的同意の生殖細胞系列試料(研究採血)のバイオバンクの活用などが期待される。

2) CDH1 の関与のしかたは臨床所見とあわせて、徐々に明らかになってきている。とくに de novo 例や、再発例ではじめて見つかる例などは、臨床家の認知度が徐々にあがって来ていることが実感される。申請者の班以外でも大きな copy 数変異が報告され、CytoScan のような方法論は有望だと思われる。

E . 結論

CDH1 のコピー数変異が、より広範なゲノム領域を認識するプラットフォームでも検出されうるということがわかり、exome で変異を探索する方法論と平行して、比較的狭い領域のコピー数変異の探索をさらに続ける。

家族歴があり、CDH1 の生殖細胞系列変異が検出されない 18 名の胃がん患者の全エクソーム解析を行い、浸透率が高いが集団中に希少な変異を探索した。住民コホート等 174 人の対照群に対する関連解析では、統計学的に有意な変異・遺伝子は同定されなかったが、単一遺伝子病における遺伝子変異を想定したモデルでは、COSMIC の Cancer Gene Census 登録遺伝子であって、複数の症例に病的変異が認められる候補遺伝子 3 個を同定した。さらなるデータの蓄積を含む、多角的な方法での検証・絞り込みが今後の課

題である。

F . 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G . 研究発表

1 . 論文発表

(梶村春彦)

1. Sugimoto S, Sugimura H. Early-onset diffuse gastric cancer associated with a de novo large genomic deletion of CDH1 gene. *Gastric Cancer*, 2013.
2. Kahyo T, Sugimura H. Identification and association study with lung cancer for novel insertion polymorphisms of human endogenous retrovirus. *Carcinogenesis*, 2531-2538, 2013 3. Matsuura S, Sugimura H. CD74-ROS1 fusion transcripts in resected non-small cell lung carcinoma. 34,1675-1680, 2013.
3. Matsuura S, Shinmura K, Iwaizumi M, Yamada H, Funai K, Kobayashi J, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Takahashi T, Inui N, Suda T, CHida K, Watanabe Y & Sugimura H. CD74-ROS1 fusion transcripts in resected non-small cell lung carcinoma. 34, 1675-1680, 2013.
4. Matsuura S, Kahyo T, Shinmura K, Iwaizumi M, Yamada H, Funai K, Kobayashi J, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Takahashi T, Inui N, Suda T, CHida K, Watanabe Y & Sugimura H. SGOL1 variant B induces abnormal mitosis and resistance to taxane in non-small cell lung cancers. *Sci Rep.*, 2013.
5. Shinmura K, Kato H, Matsuura S, Inoue Y, Igarashi H, Nagura K, Nakamura S, Maruyama K, Tajima M, Funai K, Ogawa H, Tanahashi M, Niwa H & Sugimura H. A novel somatic FGFR3 mutation in primary lung

- cancer. *Oncol Rep.*, 31, 1219-1224, 2014.
6. Natsume H, Shinmura K, Tao H, Igarashi H, Suzuki M, Nagura K, Goto M, Yamada H, Maeda M, Konno H, Nakamura S & Sugimura H. The CRKL gene encoding an adaptor protein is amplified, overexpressed, and a possible therapeutic target in gastric cancer. *J Transl Med.*, 10, 2012.
 7. Sugimura H. How can research fields be integrated with PET imaging? *Gastric Cancer*, 2012.
 8. Suzuki S, Toyoshima M, Nihashi F, Tsukui H, Baba S, Sugimura H & Suda T. An autopsy case of malignant pleural mesothelioma associated with nephrotic syndrome. *Intern Med.*, 53, 243-246, 2014.
 9. Suzuki S, Tanioka F, Minato H, Ayhan A, Kasami M & Sugimura H. Breakages at YWHAE, FAM22A, and FAM22B loci in uterine angiosarcoma: a case report with immunohistochemical and genetic analysis. *Pathol Res Pract.*, 210, 130-134. 2014.
 10. Suzuki S, Kurabe N, Minato H, Ohkubo A, Ohnishi I, Tanioka F & Sugimura H. A rare Japanese case with a NUT midline carcinoma in the nasal cavity: A case report with immunohistochemical and genetic analyses. *Pathol Res Pract.*, 210, 383-388, 2014.
 11. Shinmura K, Goto M, Tao H, Kato H, Suzuki R, Nakamura S, Matsuda T, Yin G, Morita M, Kono S & Sugimura H. Impaired 8-Hydroxyguanine Repair Activity of MUTYH Variant p.Arg109Trp Found in a Japanese Patient with Early-Onset Colorectal Cancer. *Oxid Med Cell Longev.*, 2014.
 12. Harada M, Kotake Y, Ohhata T, Kitagawa K, Niida H, Matsuura S, Funai K, Sugimura H, Suda T & Kitagawa M.

- YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers. *Genes Cells*, 2014.
13. Takayama T, Takaoka N, Nagata M, Johnin K, Okada Y, Tanaka S, Kawamura M, Inokuchi T, Ohse M, Kuhara T, Tanioka F, Yamada H, Sugimura H & Ozono S.
Ethnic differences in GRHPR mutations in patients with primary hyperoxaluria type 2. *Clin Genet.*, 2013.
14. Sugimura H & Osawa S.
Internal frontier: the pathophysiology of the small intestine. *World J Gastroenterol.*, 19, 161-164, 2013.
15. Sugimura H.
An obsession with subtyping gastric cancer. *Gastric Cancer*. 16, 451-453, 2013.
16. Shimizu K, Funai K, Sugimura H, Sekihara K, Kawase A & Shiiya N.
D2-40-positive lymphatic vessel invasion is not a poor prognostic factor in stage I lung adenocarcinoma. *Pathol Int.*, 63, 201-205, 2013.
17. Kurabe N, Hayasaka T, Ogawa M, Masaki N, Ide Y, Waki M, Nakamura T, Kurachi K, Kahyo T, Shinmura K, Midorikawa Y, Sugiyama Y, Setou M & Sugimura H.
Accumulated phosphatidylcholine (16:0/16:1) in human colorectal cancer; possible involvement of LPCAT4. *Cancer ci.*, 104, 1295-1302, 2013.
18. Kurabe N, Hayasaka T, Igarashi H, Mori H, Sekihara K, Tao H, Yamada H, Kahyo T, Onishi I, Tsukui H, Kawase A, Matsuura S, Inoue Y, Shinmura K, Funai K, Setou M & Sugimura H.
Visualization of phosphatidylcholine (16:0/16:0) in type II alveolar epithelial cells in the human lung using imaging mass spectrometry. *Pathol Int.*, 63, 195-200, 2013.
19. Kahyo T, Sugimura H.
Establishment and characterization of a mutagenized cell line exhibiting the 'cell-in-cell' phenotype at a high frequency. *Genes Cells*, 18, 1042-1052, 2013.
20. Shinmura K, Kiyose S, Nagura K, Igarashi H, Inoue Y, Nakamura S, Maeda M, Baba M, Konno H & Sugimura H.
TNK2 gene amplification is a novel predictor of a poor prognosis in patients with gastric cancer. *J Surg Oncol.*, 109, 189-197, 2014.
21. Shinmura K, Goto M, Tao H, Matsuura S, Matsuda T & Sugimura H.
Impaired suppressive activities of human MUTYH variant proteins against oxidative mutagenesis. *World J Gastroenterol.*, 18, 213-223, 2012.
22. Makita R, Yamashita M, Fujie M, Yamaoka M, Kiyofuji K, Yamada M, Yamashita J, Tsunekawa K, Asai K, Suyama T, Toda M, Tanaka Y, Sugimura H, Magata Y, Ohnishi K & Nakamura S.
Research on phospho sugar analogues to develop novel multiple type molecular targeted antitumor drugs against various types of tumor cells. *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 188, 213-223, 2013.
- (坂本裕美)
1. Suzuki T, Shibata T, Takaya K, Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, Tsuta K, Furuta K, Goto K, Hosoda F, Sakamoto H, Motohashi H, Yamamoto M. Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol Cell Biol*. 33(12), 2402-2412, 2013.
2. Mizukami T, Shiraishi K, Shimada Y, Ogiwara H, Tsuta K, Ichikawa H, Sakamoto H, Kato M, Shibata T, Nakano T, Kohno T. Molecular mechanisms underlying oncogenic RET fusion in lung adenocarcinoma. *J Thoracic Oncol*. 9(5),

622-630, 2014.

3. Saeki N, Sakamoto H, Yoshida T. Mucin 1 gene (MUC1) and gastric-cancer susceptibility. *Int J Mol Sci.* 15, 7958-7973, 2014.

4. Arai E, Sakamoto H, Ichikawa H, Totsuka H, Chiku S, Gotoh M, Mori T, Nakatani T, Ohnami S, Nakagawa T, Fujimoto H, Wang L, Aburatani H, Yoshida T, Kanai Y. Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma, including the whole exome, methylome and transcriptome. *Int J Cancer*, in press, 2014.

5. Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, Shiraishi K, Sakamoto H, Enari M, Furuta K, Shimada. Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma. *Clinical Cancer Res.* 2014.

(河野隆志)

1. Suzuki T, Shibata T, Takaya K, Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, Tsuta K, Furuta K, Goto K, Hosoda F, Sakamoto H, Motohashi H, Yamamoto M. Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels.

2. Mizukami T, Shiraishi K, Shimada Y, Ogiwara H, Tsuta K, Ichikawa H, Sakamoto H, Kato M, Shibata T, Nakano T, Kohno T. *Mol Cell Biol.*, 33(12), 2402-2401, 2013.

3. Kohno T et al. RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy. *Cancer Sci.*, 104, 1396-1400, 2013.

4. Oike T, Kohno T et al. A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. *Cancer Res.*, 73, 5508-5518, 2013.

2. 学会発表

1. Tomoaki Kahyo, Hong Tao, Kazuya Shinmura, Hiroki Mori, Kazuhito Funai, Nobuya Kurabe,

Masaya Suzuki, Hiroshi Ogawa, Fumihiko Tanioka, Suminori Kono, Keitaro Matsuo, Haruhiko Sugimura. Analysis of novel insertion polymorphisms of human endogenous retrovirus in lung cancer patients. April 6-13 2013, Washington Convention Center (USA)

2. Chunping Du, Haruhiko Sugimura. Quantitative Analysis of 5-hydroxymethylcytosin in Gastric Cancer by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. The 4th JCA-AACR joint conference. Maihama, Chiba, Japan. December 16-18, 2013.

3. Yamada H, Sugimura H et al. Germline CDH1 mutations and copy number alterations in hereditary and early onset diffuse gastric cancer. The 4th JCA-AACR joint conference. Maihama, Chiba, Japan. December 16-18, 2013

4. Sugimura H The origin of human cancer, a lesson from molecular epidemiology of gastric cancer. The 101st Indian Science Congress, Jammu, India. February 3-7, 2014

5. Sakamoto H, Saeki N, Itoh H, Matsuo K, Yamada H, Sugimura H, Ichikawa H, Sasaki H, Yoshida T. Towards the genetics and genomics of diffuse gastric cancer. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. The Latest Advances in Gastric Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics. The 4th JCA-AACR joint conference. Maihama, Chiba. December 16-18, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. LIX1L 高発現腫瘍細胞の増殖阻害方法、及び腫瘍細胞増殖ペプチド
発明者：中村悟己、梶村春彦

基礎出願番号：特願 2013-082272

出願日：平成 25 年 4 月 10 日

2. LIX1L 高発現腫瘍細胞の増殖阻害方法、
及び腫瘍細胞増殖ペプチド

発明者：中村悟己、梶村春彦

優先権出願番号：特願 2013-173696

出願日：平成 25 年 8 月 23 日