

201438095A

厚生労働科学研究委託費
厚生労働科学研究委託研究事業
(革新的がん医療実用化研究事業)

「ゲノム情報で規定される超高リスク群の診断と、層別化・個別化予防の
ためのエビデンス構築をめざした臨床観察研究」

平成26年度 委託業務成果報告書

独立行政法人 国立がん研究センター
堀田 知光
業務主任者 吉田 輝彦

平成27(2015)年 3月

委託業務成果報告書表紙

厚生労働科学研究委託費

厚生労働科学研究委託研究事業
(革新的がん医療実用化研究事業)

「ゲノム情報で規定される超高リスク群の診断と、層別化・個別化予防のためのエビデンス構築をめざした臨床観察研究」

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 吉田 輝彦

平成27 (2015) 年 3月

委託業務成果報告書への標記について

委託業務に係る成果報告書の表紙裏に、次の標記を行うものとする。

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、独立行政法人国立がん研究センターが実施した平成26年度「ゲノム情報で規定される超高リスク群の診断と、層別化・個別化予防のためのエビデンス構築をめざした臨床観察研究」(契約書第1条で定めた委託業務題目)の成果を取りまとめたものです。

委託業務成果報告書目次

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

「ゲノム情報で規定される超高リスク群の診断と、層別化・個別化予防のためのエビデンス構築をめざした臨床観察研究」

吉田 輝彦 ----- 1

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 「遺伝学的検査とゲノム網羅的解析の分担、登録データベース構築に関する研究」

菅野 康吉 ----- 9

2. 「若年性・家族集積性胃がんの解析」

梶村 春彦 ----- 12

3. 「症例登録、試料・情報の収集と臨床遺伝学的・分子遺伝学的分析」

渡邊 淳 ----- 15

4. 「遺伝性内分泌腫瘍症候群の遺伝子解析に関する研究」

櫻井 晃洋 ----- 17

5. 「症例登録、試料・情報の収集と臨床遺伝学的・分子遺伝学的分析」

青木大輔 ----- 19

6. 「家族性膵癌に関する研究」

森実千種・谷内田真一 ----- 22

7. 「若年性肺がんに関する研究」

白石 航也 ----- 24

III. 学会等発表実績

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

「ゲノム情報で規定される超高リスク群の診断と、層別化・個別化予防のための
エビデンス構築をめざした臨床観察研究」

業務主任者 吉田 輝彦 国立がん研究センター研究所 分野長

研究要旨 本年度の主な研究成果は以下の通り：① s。②次世代シーケンサーによるターゲットシーケンス法では、94 種類の遺伝性腫瘍の原因遺伝子のシーケンスが可能であり、高いスループットが可能である。特に Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法でのみ異常が検出されていた症例について、従来法との関連の検証を進めたところ、ゲノム大領域欠失等の異常の検出も可能であることが示され、最初のスクリーニング検査から NGS による解析を実施する方法の実現が期待された。③家族集積性のある胃がん症例の生殖細胞系列 DNA 試料について、CDH1 全 exon を挟む PCR を行い、Sanger 法で塩基配列を解析した。次に MLPA 法にて CDH1 の全エクソンのコピー数の変化を解析した。本研究により家族集積性の胃がんの生殖細胞系列の変化を発見し、血縁者のキャリアーの早期発見・治療につながった。④ MEN1 遺伝学的検査 14 例、RET 遺伝学的検査 13 例の解析を行った。このうち RET 遺伝子について、これまで単独では病原性はないとされていた Y806C 変異が恐らく浸透率の低い甲状腺様がん原因変異となり得ることを明らかにした。⑤遺伝子型-表現型に関する情報の集積・分析と未知の原因遺伝子の探索を多施設間で行うため、国立がん研究センターにおいて承認された研究プロトコルを参考にして、各施設で登録体制を整備し、既知の原因遺伝子変異の探索を行い、探索的な次世代シーケンサーによる解析の対象となりうる症例を蓄積した。他施設からの遺伝子検査を受託する場合は、必要な標準作業手順と検体と報告書の流れを構築した。

菅野康吉	栃木県立がんセンター 技幹
梶村春彦	浜松医科大学 教授
渡邊 淳	日本医科大学 准教授
櫻井晃洋	札幌医科大学 教授
青木大輔	慶應義塾大学 教授
清水千佳子	国立がん研究センター 医長
森実千種	国立がん研究センター 医員
中島 健	国立がん研究センター 医員
本間義崇	国立がん研究センター 医員
内藤洋一	国立がん研究センター 医員
白石航也	国立がん研究センター 研究員
谷内田真一	国立がん研究センター ユニット長
坂本裕美	国立がん研究センター ユニット長

多くの特徴的な問題を抱える。我が国では保険償還される遺伝子検査はなく、個別化予防・治療のエビデンス基盤となるべき遺伝子型-表現型関連の知見の集積は未だ不十分である。また、20-30%の症例では原因変異が同定できていない。多様な病態は修飾遺伝子の関与を示唆している。

そこで本研究では、遺伝性腫瘍の遺伝診療の現場において多施設共同臨床観察研究を行い、1) 拠点を構築して既知の原因遺伝子変異の探索を行い、我が国における遺伝子型-表現型関連に関する情報の集積・分析と、2) 未知の原因遺伝子・修飾遺伝子の探索を行う。さらにこれらの知見に基づき、3) 遺伝性腫瘍あるいはそれが疑われる症例・家系を的確に捕捉・診断・説明（遺伝カウンセリング）する方法と、4) 個別化された予防医療の確立に貢献することを目的とする。

A.研究目的

遺伝性腫瘍は個人の発がんの固定リスクで規定される超高危険度群である。小児・若年期から生涯続く多発・重複がんリスクや血縁者への遺伝等、

B.研究方法

今年度の主な研究項目について、以下のとおり：

①本多施設共同研究の基本プロトコルに基づき、

家族歴のある膵がんの症例に対して、元々は体細胞遺伝子・ゲノム異常として 90 遺伝子の変異と 10 種の遺伝子融合を検索する NCC oncopanel v2 を適用し、次世代シーケンサー Illumina MiSeq を用いて解析した。また、同一症例について HiSeq2000 を用いて Agilent SureSelect V4+UTR+lincRNA による全エクソームシーケンシングも実施し、両プラットフォームの比較・相互検証を行い、原因遺伝子の同定を試みた。

②次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンス解析を実施する際、全エクソンシーケンス解析 (WES) と同時にゲノムの比較的広範な領域に生じた欠失あるいは重複等の構造異常を検出するための予備的検討を行った。これまでに Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法による解析で MSH2 遺伝子にゲノム欠失を認めた 3 例および MLH1 遺伝子にゲノム欠失を認めた 4 例とこれに正常対照 3 例を加えた 10 例を Illumina 社 MiSeq を用いて遺伝性腫瘍の原因遺伝子として報告されている 94 遺伝子を対象にターゲットシーケンス解析を実施し、各 exon の read 数あるいは平均 coverage 数の比較から、ゲノム欠失の検出感度を検討した。

③先行研究及び本研究により機動的に収集された家族集積性・若年性の胃がんについて、生殖細胞系列の変異を、普通の塩基配列決定の操作では見逃してしまうコピー数異常を含めて検索した。その際、全ゲノム領域をカバーする Affymetrix Cytoscan を用いて、CDH1 以外の遺伝子領域も探索した。コントロールには健康長寿者の DNA などを用いた。

④MEN1 遺伝学的検査において MEN1 遺伝子の exon 2-10 のシーケンス解析を実施し、症例によっては MLPA 法による大領域欠失の検索も行った。RET 遺伝学的検査では、RET 遺伝子の exons 8、10、11、13、14-16 のシーケンス解析を実施した。遺伝学的検査の結果、MEN1 あるいは MEN2 と確定した院内症例については定期検査や追跡調査に伴う登録情報の更新を継続して行った。

⑤本研究の研究分担者の施設における多施設共同研究体の基本プロトコルの導入を進めた。その際、施設による遺伝診療と研究の整理方針や体制の違いを勘案した調整を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝性腫瘍の疑いで各医療機関の遺伝相談外来を受診した症例に対しては「遺伝学的検査に関するガイドライン」(遺伝医学関連 10 学会)、「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」(日本医学会)、「医療介護関係事業者における個

人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」(厚生労働省)に従い適切な診療を行なった。

ヒトゲノム・遺伝子解析研究として実施される部分は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省)を遵守し、施設研究倫理審査委員会の承認を得た研究計画に基づき実施した。研究後半において、二次予防に関する観察研究あるいは介入を伴う研究については「疫学研究に関する倫理指針」あるいは「臨床研究に関する倫理指針」等に従う。

新規原因遺伝子を絞り込むための機能解析において遺伝子組換え実験を行う場合は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と施設の定める遺伝子組換え実験安全管理規程を遵守して、動物実験を行う場合は施設の動物実験倫理規程に従って実験を行う。

C. 研究結果

①NCC oncopanel v2 の解析からは 21 遺伝子に変異が認められ、そのうち non-synonymous 変異が 5 遺伝子、indel が 1 遺伝子に認められた。ミスセンス変異のうち 4 遺伝子については WES でも検証できた。その一つが BRCA1 の変異で、リード数 277 のうち、変異アレルが 47%認められ、アミノ酸を Glu (GAA) から Lys (AAA) に変える。PolyPhen2 の評価では HumDiv でも HumVar でもスコア 1 で Probably Damaging であった。しかしこの変異は膵がんの家族歴がより少ない父に認められた。

②各遺伝子の read 数および coverage 数の合計に対する各 exon の read 数あるいは平均 coverage 数の比率を比較したところ、1 カ所あるいは 2 カ所の exon が欠失した場合は、非欠失例に比べて有意に減少していた ($P < 0.01$)。しかし全 exon の過半以上に及ぶ大領域欠失を認めた症例では、欠失部位の exon の read 数あるいは平均 coverage 数の減少は非欠失例に比べ軽度であり、逆に保持されている少数の exon の read 数あるいは平均 coverage 数の増加として検出されることがわかった ($P < 0.01$)。

③家族集積性のある胃がん症例の生殖細胞系列 DNA 試料について CDH1 全 exon を含む PCR を行い、Sanger 法で塩基配列を解析した。次に MLPA 法にて CDH1 の全エクソンのコピー数の変化を解析した。本研究により 1 例家族集積性の胃がんの生殖細胞系列の変化を発見した。本例は血縁者のキャリアーの早期発見及び救命につながった。

④今年度は MEN1 遺伝学的検査 14 例、RET 遺伝学的検査 13 例の解析を行った。このうち MEN1 遺伝子変異は 9 例、RET 遺伝子変異は 6 例に認められ、

MEN の診断が確定した。このうち RET 遺伝子について、これまで良性多型と考えられている塩基置換を持つ症例を認めた。Y806C 変異は同一アレル上に V804M 変異と併存すると MEN2B の原因となるが、単独では病原性はないとされていた。今回解析した症例は甲状腺髄様がんを発症していたために遺伝子解析を行ったが、Y806C 変異はあるが V804M 変異は認められなかった。V804M 以外の未知の変異が併存するために髄様がんを発症する可能性を否定するため、RET 遺伝子の全領域をシーケンシングしたが他に変異はなく、これにより Y806C 変異が恐らく浸透率の低い甲状腺髄様がん原因変異となり得ることを明らかにした。

⑤遺伝子型-表現型に関する情報の集積・分析と未知の原因遺伝子の探索を多施設間で行うため、国立がん研究センターにおいて承認された研究プロトコルを参考にして、施設内での登録体制整備を進めた。既知の原因遺伝子変異の検索を行い、探索的な次世代シーケンサーによる解析の対象となりうる症例を蓄積した。他施設からの遺伝子検査を受託する場合は、必要な標準作業手順と検体と報告書の流れを構築した。

D. 考察

①次世代シーケンサーの普及とともに遺伝性腫瘍においては診療と研究の融合領域が生まれつつあり、両者一体となった説明と同意が適切である。そこで診断と研究の両方について同時に説明し、それぞれ個別に意思表示（同意の有無）を得る「家族性・若年性のがん及び遺伝性腫瘍に関する診断と研究」を本多施設共同研究の基本プロトコルとした。母を含めて母方に第2度近親以内に3名の膵がん、父方に1名の膵がんが発症している発端者の末梢血由来ゲノム DNA に対して2つのプラットフォームでの次世代シーケンサー解析を行い、がんの分子標的薬の標的になり得る (druggable) な体細胞遺伝子変異を起こす遺伝子のうち4個の変異が検証できた。そのうち BRCA1 のミスセンス変異が最も有望と考えられたが、膵がんの家族歴がより少ない父が変異保有者であった。母方の膵がん罹患患者3名はいずれも死亡しているが、第3度近親に50才以下の乳がん罹患患者もおり、病的変異の特定にはさらなる分離分析が必要と考えられた。多くの候補変異を検出する次世代シーケンサーの時代になったからこそ、家系内の採血を積極的に進める必要がある。

②リンチ症候群の主要な原因遺伝子である MSH2 および MLH1 の解析では、各 exon 毎の PCR/direct sequencing 法で異常が認められなかった症例の

10-20%にゲノムの欠失あるいは重複等の構造異常が認められる。RT-PCR 法で exon skip として検出されるか、あるいは MLPA 法によって診断されているが、通常の遺伝子検査の盲点となっており、他の遺伝性腫瘍症候群でも同様の問題が指摘されている。今回の検討で NGS を最初のスクリーニング検査として利用できる可能性が示されたことは有意義な知見である。今回の検討では十分な read 数および coverage 数を得るため10症例を対象に解析したが、本機種では最大24症例の同時解析が可能である。その場合、1症例あたりの解析コストの低減が可能となるが、同時にコピー数の検出感度の低下が危惧される。In silico のシミュレーションでは、対象症例数が2倍に増加した場合、サンプル毎の read 数あるいは coverage 数は半分となる。その場合の95%信頼区間は1.41倍程度に増加するものの、解析の精度には影響を与えないものと推定された。

③我が国での遺伝性胃がんの把握の遅れの大きな一因は、現場の臨床医に、遺伝性症例の認識が少ないことも一因であると言われてきたが、次第に本研究組織のメンバーを通じて、症例の存在自体の認識が広まってくると思われる。特に今回はじめて早期発見に役立つことを実証することができた。若年・壮年におけるがん死を防ぐ事例になる。引き続き、CDH1 の変異が認められない症例についてのコピー数異常の検索を続行する。

④稀少疾患では、検査・解析拠点において集中的にデータを集積することが、国内における疾患の全体像を把握するのに最も有効な方法といえる。MEN に関しては本研究の研究分担者が遺伝子解析及び臨床情報の収集を行うことにより、日本人患者の臨床像や遺伝学的特徴を明らかにできると考える。V804M+Y806C 変異を有する RET タンパクは強いキナーゼ活性を有することが知られているが Y806C の活性は相対的に弱く、これまでに Y806C 変異単独で甲状腺髄様がんや MEN2 を発症した症例は報告されていない。しかしながら Y806 アミノ酸は RET タンパク質の自己リン酸化部位であり、バンデタニブに対する RET キナーゼ活性の感受性にも関与していることが知られている。今回の結果は Y806C の病原性を証明するものであり、国内外の変異データベースにおける本塩基置換の臨床的意義が更新されると考えられる。同じ変異を有する患者に対して提供する情報を一変させるとともに、血縁者への影響も及ぶことからきわめて重要な知見を得た。

⑤本研究により、遺伝性腫瘍の症例を集積し、既知の原因遺伝子の変異解析、その集積を開始することができた。本研究は、発がん超高危険度群に

対する個別化予防・治療のエビデンス構築に有用である。しかしながら、医療機関により、診療体制等が異なるため、遺伝性腫瘍の外来準備ならびに倫理審査については施設ごとに適切に調査された対応が必要と考えられた。

E. 結論

①多施設共同研究体のプロトコールによる次世代シーケンサーを用いた遺伝性腫瘍家系の探索的解析が始動した。異なるプラットフォームによる次世代シーケンサー同士の検証が有用であったが、家系内の分離分析等の基本的な解析の重要性があらためて示された。

②ターゲットシーケンス法では 94 種類の遺伝性腫瘍の原因遺伝子のシーケンスが可能であり、高いスループットが可能である。今回の検討によりゲノム大領域欠失等の異常の検出も可能であることが示され、最初のスクリーニング検査から NGS 解析を実施する方法の実現が期待された。

③コピー数異常の検索は、遺伝性胃がんの生殖細胞系列の変異の同定の重要な要素であることを示し、実際に胃がん集積家系の未発症例を早期発見につながることを実証できた。

④MEN 患者および MEN が疑われる患者を対象に遺伝子解析を進めた。これによりこれまで病原性がないと考えられていたミスセンス塩基置換が病原性変異であることを証明した。

⑤多施設共同研究体で採択した複数の遺伝性腫瘍の汎用型プロトコールにより、複数の医療機関においてがん超高リスク群の診断と、層別化・個別化予防を目指した研究を行う基盤を構築することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Reika Iwakawa, Takashi Kohno, Yasushi Totoki, Tatsuhiro Shibata, Katsuya Tsuchihara, Sachiyu Mimaki, Koji Tsuta, Yoshitaka Narita, Ryo Nishikawa, Masayuki Noguchi, Curtis C. Harris, Ana I. Robles, Rui Yamaguchi, Seiya Imoto, Satoru Miyano, Hirohiko Totsuka, Teruhiko Yoshida, Jun Yokota. Expression and Clinical Significance of Genes Frequently Mutated in

Small Cell Lung Cancers Defined by Whole Exome/RNA Sequencing. *Carcinogenesis*, 2015

2. Gotoh M, Ichikawa H, Arai E, Chiku S, Sakamoto H, Fujimoto H, Hiramoto M, Nammo T, Yasuda K, Yoshida T and Kanai Y. Comprehensive exploration of novel chimeric transcripts in clear cell renal cell carcinomas using whole transcriptome analysis. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 53(12):1018-1032, 2014
3. Anna Takahashi, Robert Nakayama, Nanako Ishibashi, Ayano Doi, Risa Ichinohe, Yoriko Ikuyo, Teruyoshi Takahashi, Shigetaka Marui, Koji Yasuhara, Tetsuro Nakamura, Shintaro Sugita, Hiromi Sakamoto, Teruhiko Yoshida, Tadashi Hasegawa, and Hiro Takahashi. Analysis of gene expression profiles of soft tissue sarcoma using a combination of knowledge-based filtering with integration of multiple statistics. *PLoS ONE*, 9(9): e106801, 2014
4. Hiro Takahashi, Kimie Sai, Yoshiro Saito, Nahoko Kaniwa, Yasuhiro Matsumura, Tetsuya Hamaguchi, Yasuhiro Shimada, Atsushi Ohtsu, Takayuki Yoshino, Toshihiko Doi, Haruhiro Okuda, Risa Ichinohe, Anna Takahashi, Ayano Doi, Yoko Odaka, Misuzu Okuyama, Nagahiro Saijo, Jun-ichi Sawada, Hiromi Sakamoto, and Teruhiko Yoshida. Application of a combination of a knowledge-based algorithm and 2-stage screening to hypothesis-free genomic data on irinotecan-treated patients for identification of a candidate single nucleotide polymorphism related to an adverse effect. *PLoS ONE*, 9(8):e10516 2014
5. Hiroaki Itoh, Motoki Iwasaki, Yoshio Kasuga, Shiro Yokoyama, Hiroshi Onuma, Hideki Nishimura, Ritsu Kusama, Teruhiko Yoshida, Kazuhito Yokoyama, Shoichiro Tsugane. Association between serum organochlorines and global methylation level of leukocyte DNA among Japanese women: a cross-sectional study. *Science of the Total Environment*, 490: 603-609, 2014
6. Tanakaya K, Furukawa Y, Nakamura Y, Hirata K, Tomita N, Tamura K, Sugano K, Ishioka C, Yoshida T, Ishida H, Watanabe T, Sugihara K. Relationship between smoking and multiple colorectal cancers in patients with Japanese Lynch syndrome: a cross-sectional study conducted by the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. *J Clin Oncol*. 45:307-10, 2015
7. Miyakura Y, Tahara M, Lefor AT, Yasuda Y,

- Sugano K. Haplotype defined by the MLH1-93G/A polymorphism is associated with MLH1 promoter hypermethylation in sporadic colorectal cancers. *BMC Res Notes*. 7:835, 2015
8. Yamaguchi T, Furukawa Y, Nakamura Y, Matsubara N, Ishikawa H, Arai M, Tomita N, Tamura K, Sugano K, Ishioka C, Yoshida T, Moriya Y, Ishida H, Watanabe T, Sugihara K. Comparison of clinical features between suspected familial colorectal cancer type X and Lynch syndrome in Japanese patients with colorectal cancer: a cross-sectional study conducted by the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. *Jpn J Clin Oncol*. 45:153-9, 2015.
 9. 菅野康吉：家族性腫瘍コーディネーター・家族性腫瘍カウンセラー(FCC)制度の歩みと今後. *家族性腫瘍* 15: 16-20, 2015
 10. 菅野康吉: 遺伝カウンセリング・遺伝子検査; 乳癌診療アプリケーションノート. 株式会社南山堂; 2014年7月15日 96-101
 11. Kuroda S, Suzuki S, Kurita A, Muraki M, Aoshima Y, Tanioka F, Sugimura H. Cytological Features of a Variant NUT Midline Carcinoma of the Lung Harboring the NSD3-NUT Fusion Gene: A Case Report and Literature Review. *Case Rep Pathol*. 2015;2015:572951. doi: 10.1155/2015/572951. Epub 2015
 12. Sugimura H. Editorial: TCGA output and practice of gastric cancer. *Translational Gastrointestinal Cancer* 4(2) 115-117, 2015
 13. Gurzu S, Kadar Z, Sugimura H, Bara T, Bara T Jr, Halmaciu I, Jung I. Gastric cancer in young vs old Romanian patients: immunoprofile with emphasis on maspin and mena protein reactivity. *APMIS*. 123(3):223-33, 2015
 14. Yamada H, Sakamoto H, Sugimura H. Commentary: Sexy Small Copy Numbers in Hereditary Gastric Carcinogenesis. *J of Gastrointestinal & Digestive System* 4:205. doi: 10.4172/2161-069X.1000205
 15. Suzuki S, Kurabe N, Ohnishi I, Yasuda K, Aoshima Y, Naito M, Tanioka F, Sugimura H. NSD3-NUT-expressing midline carcinoma of the lung: First characterization of primary cancer tissue. *Pathol Res Pract*. 2014 pii: S0344-0338(14)00311-2. doi: 10.1016/j.prp.10.013, 2014
 16. Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Ogai Y, Hasegawa J, Sato N, Yamada H, Tanioka F, Sugimura H, Hayashida M, Ikeda K. Association between KCNJ6 (GIRK2) gene polymorphism rs2835859 and post-operative analgesia, pain sensitivity, and nicotine dependence. *J Pharmacol Sci*. 126(3):253-63, 2014
 17. Tajima S, Kurabe N, Okudela K, Yajima K, Takahashi T, Neyatani H, Sugimura H, Koda K. Extensive goblet cell metaplasia of the peripheral lung may harbor precancerous molecular changes: comparison of two cases. *Pathol Int*. 64(10):533-8, 2014
 18. Goto M, Shinmura K, Matsushima Y, Ishino K, Yamada H, Totsuka Y, Matsuda T, Nakagama H, Sugimura H Human DNA glycosylase enzyme TDG repairs thymine mispaired with exocyclic etheno-DNA adducts. *Free Radic Biol Med*. 76:136-46, 2014
 19. Du C, Kurabe N, Matsushima Y, Suzuki M, Kahyo T, Ohnishi I, Tanioka F, Tajima S, Goto M, Yamada H, Tao H, Shinmura K, Konno H, Sugimura H. Robust quantitative assessments of cytosine modifications and changes in the expressions of related enzymes in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2014 Aug 7. [Epub ahead of print] PMID: 25098926 [PubMed - as supplied by publisher]
 20. Shinmura K, Kurabe N, Goto M, Yamada H, Natsume H, Konno H, Sugimura H. PLK4 overexpression and its effect on centrosome regulation and chromosome stability in human gastric cancer. *Mol Biol Rep*. 41(10):6635-44, 2014
 21. Tajima S, Mochizuki R, Sugimura H, Hoshi S. Radiation-induced breast angiosarcoma with a confirmative feature of c-MYC amplification. *Jpn J Clin Oncol*. 44(7):702-3, 2014
 22. Shinmura K, Kahyo T, Kato H, Igarashi H, Matsuura S, Nakamura S, Kurachi K, Nakamura T, Ogawa H, Funai K, Tanahashi M, Niwa H, Sugimura H. RSPO fusion transcripts in colorectal cancer in Japanese population. *Mol Biol Rep*. 41(8):5375-84, 2014
 23. 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*. 617351, 2014

24. 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*. 19(6):504-16,2014
25. 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(6):383-8,2014
26. Koeda M, Watanabe A, Tsuda K, Matsumoto M, Ikeda Y, Kim W, Naing BT, Karibe H, Shimada T, Suzuki H, Matsuura M, Okubo Y. Interaction Effect between Handedness and CNTNAP2 Polymorphism (rs7794745 genotype) on Voice-specific Frontotemporal Activity in Healthy Individuals: An fMRI Study. *Front. Behav. Neurosci.* (in press)
27. Oyama S, Funasaka Y, Watanabe A, Takizawa T, Kawana S, Saeki H. BRAF, KIT, and NRAS mutations and expression of c-KIT, pERK and pAKT in Japanese melanoma patients. *J. Dermatol.* (in press)
28. 渡邊 淳. がんを対象としたエクソーム解析の実用化と倫理的課題. *臨床病理レビュー*第 153 号 コンパニオン診断の進展 2014-2015,2014
29. Ogawa R, Watanabe A, Naing BT, Sasaki M, Fujita A, Akaishi S, Hyakusoku H, Shimada T. (These authors contributed equally) Associations Between Keloid Severity and Single Nucleotide Polymorphisms: Importance of rs8032158 as a Biomarker of Keloid Severity. *J. Invest. Dermatol.* 134:2041-2043,2014
30. Yamazaki M, Hanamura T, Ito K-i, Uchino S, Sakurai A, Komatsu M: A newly identified missense mutation in RET codon 666 is associated with the development of medullary thyroid carcinoma. *Endocr J* 61: 1141-1144, 2014
31. 柴田有亮, 石井宏明, 武井真大, 大岩亜子, 熊谷美恵子, 山崎雅則, 佐藤吉彦, 伊藤研一, 吉澤明彦, 内野眞也, 櫻井晃洋, 駒津光久: CDC73 変異で診断された副甲状腺機能亢進症顎腫瘍症候群の一例. *日本内分泌学会雑誌* 90 suppl: 42-44, 2014
32. 櫻井晃洋: 多発性内分泌腫瘍症と遺伝子異常. *B I O Clinica* 29: 1071-1075, 2014.
33. 増田 健太, 阪埜 浩司, 植木 有紗, 平沢 晃, 青木 大輔 【卵巣がん治療の個別化を目指す新たな局面】 遺伝性乳がん卵巣がん(HBOC)への対応 産婦人科の実際 63 巻 7 号 Page973-980(2014.07)
34. Hirasawa A, Masuda K, Akahane T, Ueki A, Yokota M, Tsuruta T, Nomura H, Kataoka F, Tominaga E, Banno K, Makita K, Susumu N, Sugano K, Kosaki K, Kameyama K, Aoki D. Family history and *BRCA1/BRCA2* status among Japanese ovarian cancer patients and occult cancer in a *BRCA1* mutant case. *Jpn J Clin Oncol.* 44(1):49-56.2014
35. Nakamura K, Banno K, Yanokura M, Iida M, Adachi M, Masuda K, Ueki A, Kobayashi Y, Nomura H, Hirasawa A, Tominaga E, Aoki D. Features of ovarian cancer in Lynch syndrome (Review). *Mol Clin Oncol.* Nov,2(6):909-916,2014

2.学会発表

- 後藤政広、市川仁、新井恵吏、知久季倫、坂本裕美、藤元博行、平本正樹、南茂隆生、安田和基、吉田輝彦、金井弥栄. 腎細胞がんに発現する新規融合遺伝子の同定. 第 73 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 J-2011 9/26/2014
- 中奥敬史、市川仁、白石航也、坂本裕美、江成政人、萩原秀明、軒原浩、岡山洋和、金永学、三嶋理晃、横田淳、吉田輝彦、河野隆志. Lung invasive mucinous adenocarcinoma における治療標的となる新規遺伝子融合. 第 73 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 P-2012 9/26/2014
- 菅野康吉、斎藤伸哉、関根茂樹、中島健、牛尼美年子、吉田輝彦. ピューロマイシン処理血液からの long RT-PCR/direct sequencing 法による PMS2 遺伝子変異の検出. 第 73 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 E-2011 9/26/2014
- 齋藤元伸、白石航也、坂本裕美、市川仁、隈元謙介、竹之下誠一、横田淳、吉田輝彦、河野隆志. ALK/RET/ROS1 融合肺腺癌における遺伝子変異プロファイル. 第 73 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 E-2059 9/26/2014
- 新井恵吏、高橋順子、坂本裕美、尾野雅哉、宮田彩香、藤元博之、山田哲司、吉田輝彦、金井弥栄. 逆行分析前方シミュレーションモデルを用いた腎細胞がんのバイオマーカーな

- らびに治療標的分子の同定. 第 73 回日本癌学会学術総会 P-2117 9/26/2014
6. 田原 真紀子、井上 剛志、佐藤 太、宮倉安幸、堀江 久永、安田 是和、菅野 康吉：Rad51 は大腸癌において topoisomeraseI 阻害剤の感受性予測マーカーおよび癌治療のターゲットとなる 第 34 回日本分子腫瘍マーカー研究会 (平成 26 年 9 月 24 日) (横浜)
 7. Makiko Tahara, Takeshi Inoue, Yasuyuki Miyakura, Hisanaga Horie, Yoshikazu Yasuda, Kokichi Sugano: Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib (AZD2281) potentiates SN-38 cytotoxicity in colon cancer cells. 第 73 回日本癌学会学術総会 (平成 26 年 9 月 25 日) (横浜)
 8. Sugano K, Saitou S, Sekine S, Nakajima T, Ushiyama M, Yoshida T: Germline PMS2 mutations detected by long RT-PCR/direct sequencing analysis using puromycin-treated blood samples. 第 73 回日本癌学会学術総会 (平成 26 年 9 月 26 日) (横浜)
 9. 菅野 康吉、斎藤 伸哉、高橋 雅博、松岡 千咲、青木 幸恵、牧島 恵子、田中屋 宏爾、中島 健、牛尼 美年子、吉田 輝彦：遺伝性腫瘍の発症前診断とサーベイランスおよび予防的介入. 日本人類遺伝学会第 59 回大会、日本遺伝子診療学会第 21 回大会 平成 26 年 11 月 21 日 (東京)
 10. 中島 健、関根 茂樹、中島 好美、坂本 琢、松本 美野里、松田 尚久、菅野 康吉、牛尼 美年子、吉田 輝彦、斎藤 豊：リンチ症候群の拾い上げとその後の内視鏡検査によるサーベイランスの実際. 日本人類遺伝学会第 59 回大会、日本遺伝子診療学会第 21 回大会 平成 26 年 11 月 21 日 (東京)
 11. 平沢 晃、増田 健太、赤羽 智子、片岡 史夫、富永 英一郎、阪埜 浩司、進 伸幸、菅野 康吉、小崎 健次郎、青木 大輔:BRCA1/2 遺伝子変異保持者に対するリスク低減卵巣卵管切除術. 日本人類遺伝学会第 59 回大会、日本遺伝子診療学会第 21 回大会 平成 26 年 11 月 21 日 (東京)
 12. 鈴木 茂伸、吉田 輝彦、牛尼 美年子、菅野 康吉：網膜芽細胞腫の早期発見と遺伝子検査の意義. 日本人類遺伝学会第 59 回大会、日本遺伝子診療学会第 21 回大会 平成 26 年 11 月 21 日 (東京)
 13. 菅野康吉：がん家系症候群 (リンチ症候群) の沿革と周縁および現代的意義. 第 1 回リンチ症候群研究会 平成 26 年 11 月 29 日 (東京)
 14. 菅野康吉：家族性腫瘍の診療と研究 2015 -発症前診断、サーベイランス、予防的介入-. 第 20 回信州遺伝子診療研究会 平成 27 年 1 月 30 日 (松本)
 15. Nobuya Kurabe, Toshio Nakamura, Kiyotaka Kurachi, Tomoaki Kahyo, Kazuya Shinmura, Mitsutoshi Setou, Haruhiko Sugimura. Human colorectal cancer marker PC(16:0/16:1) induces cell growth by activating Akt and Erk pathways. The 105th AACR Annual Meeting April 7, 2014, San Diego, USA
 16. 梶村春彦. ヒト腫瘍の原因について病理はなにができるか 103 回日本病理学会総会 シンポジウム 1 腫瘍病理学の真髄 2014 年 4 月 24 日、広島
 17. Haruhiko Sugimura DNA adductomics in human tissue: a clue toward the origin of human cancer? 4th Asian Conference on Environmental Mutagens(India), Dec.12, 2014, Kokata, India
 18. 渡邊 淳. 病院における薬理遺伝学的な取り組み. (口頭・シンポジウム) 第 24 回日本医療薬学会年会 (名古屋) 2014/9
 19. Katai M, Yanagibori R, Horiuchi K, Midorikawa S, Yamazaki M, Okamoto T, Sakurai A: Gender-related differences in MEN1 lesion: analysis of 560 cases from the database of the MEN Consortium of Japan. 14th International Workshop on Multiple Endocrine Neoplasia and other rare endocrine tumors Vienna, Austria, September 25-27.
 20. 内野眞也, 櫻井晃洋, 小杉眞司, MEN コンソーシアム: 遺伝性甲状腺髄様癌の発症前診断と甲状腺全摘の時期. 日本人類遺伝学会第 59 回大会 シンポジウム「遺伝性腫瘍の発症前診断とサーベイランスおよび予防的介入」東京, 2014 年 11 月 20-22 日
 21. 赤羽 智子, 富永 英一郎, 平沢 晃, 片岡 史夫, 野村 弘行, 増田 健太, 阪埜 浩司, 進 伸幸, 吉村 泰典, 青木 大輔 婦人科悪性腫瘍・最近の話題 BRCA1/2 遺伝子変異例における卵管上皮細胞の P53 の特性に関する検討 第 66 回日本産科婦人科学会学術集会(4 月 18 日~20 日 2014 年 東京)
 22. 増田 健太、小林 佑介、植木 有紗、野村 弘行、平沢 晃、阪埜 浩司、青木 大輔、三須 久美子、小崎 健次郎、牛尼 美年子、吉田 輝彦、

- 齋藤 伸哉、菅野 康吉 Peutz-Jeghers syndrome 患者に認められた *STK11* 遺伝子スプライシング異常の病的意義についての検討 第20回日本家族性腫瘍学会学術集会 (6月13日~14日 2014年福島市)
23. 中村 加奈子, 阪埜 浩司, 小林 佑介, 野村 弘行, 矢野倉 恵, 飯田 美穂, 安達 将隆, 野上 侑哉, 梅根 紀代子, 増田 健太, 植木 有紗, 山上 亘, 平沢 晃, 進 伸幸, 青木 大輔 子宮体部・卵巣同時発生重複癌における DNA ミスマッチ修復タンパクの免疫組織化学染色による解析 第20回日本家族性腫瘍学会学術集会 (6月13日~14日 2014年福島市)
24. 安達 将隆, 阪埜 浩司, 矢野倉 恵, 飯田 美穂, 中村 加奈子, 梅根 紀代子, 野上 侑哉, 増田 健太, 植木 有紗, 木須 伊織, 山上 亘, 富永 英一郎, 進 伸幸, 青木 大輔 乳がん術後の選択的エストロゲン受容体調節薬(SERM)投与後に発症した子宮体がんの臨床病理学的特徴 第20回日本家族性腫瘍学会学術集会 (6月13日~14日 2014年福島市)
25. 中村 加奈子, 阪埜 浩司, 小林 佑介, 野村 弘行, 矢野倉 恵, 飯田 美穂, 安達 将隆, 野上 侑哉, 梅根 紀代子, 増田 健太, 植木 有紗, 山上 亘, 平沢 晃, 富永 英一郎, 進 伸幸, 青木 大輔 DNA ミスマッチ修復タンパクの免疫組織化学による子宮体部・卵巣同時発生重複癌の検討 第55回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (9月27日~29日 2014年松本市)
26. 赤羽 智子, 平沢 晃, 片岡 史夫, 増田 健太, 富永 英一郎, 阪埜 浩司, 進 伸幸, 亀山 香織, 青木 大輔 *BRCA1/2* 遺伝子変異保持者の卵管上皮細胞における p53 と MDM2 の発現の検討 第55回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (9月27日~29日 2014年松本市)
27. 平沢 晃, 増田 健太, 赤羽 智子, 片岡 史夫, 富永 英一郎, 阪埜 浩司, 進 伸幸, 菅野 康吉, 小崎 健次郎, 青木 大輔 *BRCA1/2* 遺伝子変異保持者に対するリスク低減卵巣卵管切除術 第59回日本人類遺伝学会(11月19日~22日 2014年)
28. 第20回日本家族性腫瘍学会学術集会 07-5 わが国における家族性膵癌登録制度立ち上げにむけた Johns Hopkins 大学病院研修の報告 鳥嶋 雅子, 村上裕美, 高折恭一, 森実千種, 谷内田真一, 和田慶太, 水本雅巳, 鈴木雅美, 細井寛子, 小杉真司
29. 第12回日本臨床腫瘍学会学術集会
- O3-13-5 Clinical features of young patients (age≤40 years) with pancreatic ductal adeno-carcinoma, Ohmoto A, Morizane C, Kubo E, Shimada K, Okusaka T, Yachida S
30. 2014 Gastrointestinal Cancers Symposium abstr 199, Clinical features of young patients (below age 40) with pancreatic ductal adenocarcinoma. Ohmoto A, Morizane C, Kubo E, Shimada K, Okusaka T, Yachida S
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 発明の名称：家族性大動脈瘤の遺伝子変異スクリーニング方法
出願番号：特願 2009-200768
出願日：平成 21 年 8 月 31 日
公開番号：特開 2011-050284
公開日：平成 23 年 3 月 17 日
特許番号：特許第 5648949 号
登録日：平成 26 年 11 月 21 日
権利者：学校法人日本医科大学
発明者：渡邊 淳、島田 隆
2. 発明の名称：低フォスファターゼ症の遺伝子変異スクリーニング方法
出願番号：特願 2009-200612
出願日：平成 21 年 8 月 31 日
公開番号：特開 2011-050283
公開日：平成 23 年 3 月 17 日
特許番号：特許第 5648948 号
登録日：平成 26 年 11 月 21 日
権利者：学校法人日本医科大学
発明者：渡邊 淳、島田 隆、折茂英生

厚生労働科学研究依託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

「ゲノム情報で規定される超高リスク群の診断と、層別化・個別化予防のためのエビデンス構築をめざした臨床観察研究」における
遺伝学的検査とゲノム網羅的解析の分担、登録データベース構築に関する研究
担当責任者 菅野康吉 栃木県立がんセンター研究所 技幹

研究要旨 次世代シーケンサーを使用するターゲットシーケンス解析の際に、ゲノムの広範な領域に生じた欠失等の異常を解析する場合の感度、特異性は不明であり、従来の MLPA 法による解析の併用が必要となることが想定されていた。今回、ゲノム欠失の有無が明らかかなサンプルを用いた予備的検討によりターゲットシーケンス解析でも、ゲノム欠失等の異常をスクリーニング可能であることが明らかとなった。その結果、最初のスクリーニング検査から NGS による解析を実施する方法の実現可能性が期待される。多施設共同研究のプロトコールが 2014 年 12 月に当院の IRB で承認後、多施設間で遺伝子検査に伴うサンプルの運搬と検体処理等を円滑に進めるための作業手順を決定し、さらに連結可能匿名化された症例の登録情報、臨床情報、家系情報、遺伝情報を管理するためのデータベースの構築作業を進めている。

A.研究目的

遺伝性腫瘍の診療では、受診者の既往歴と家族歴から遺伝的リスク評価を実施し、その結果により既知の遺伝性腫瘍の原因遺伝子について遺伝子検査を実施し、検査結果をクライアントや家族に伝え、必要に応じてサーベイランス等の予防対策が行われる。本研究では成人に発症する遺伝性腫瘍の多施設共同臨床観察研究を行い、①我が国における遺伝子型-表現型関連に関する情報の集積・解析と、②ゲノム網羅的解析による未知の原因遺伝子・修飾遺伝子の探索を行う。これらの知見に基づき、③個々の遺伝性腫瘍あるいはそれが疑われる症例・家系を的確に捕捉・診断・説明（遺伝カウンセリング）する方法と、④個別化された予防医療の確立に貢献することを目的とする。

B.研究方法

本年度は以下の研究を行った。

1) 次世代シーケンサー(NGS)を用いたターゲットシーケンス解析を実施する際、全エクソンのシーケンス解析と同時にゲノムの比較的広範な領域に生じた欠失あるいは重複等の構造異常を検出するための予備的検討を行った。これまでに Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法による解析でリンチ症候群（遺伝性非ポリポーシス大腸がん：HNPCC）の原因遺伝子である MSH2 遺伝子にゲノム欠失を認めた 3 例および MLH1 遺伝子にゲノム欠失を認めた 4 例とこれに

正常対照 3 例を加えた 10 例を illumina 社の次世代シーケンサーである MiSeq を用いて遺伝性腫瘍の原因遺伝子として報告されている 94 遺伝子を対象にターゲットシーケンス解析を実施した。MSH2 のゲノム欠失の評価には、MLH1 にゲノム欠失を認めた 4 例も正常対照に加え、逆に MLH1 のゲノム欠失の評価には MSH2 にゲノム欠失を認めた 3 例を正常対照に加えて比較検討した。

2) 多施設共同研究の実施に際して、事務局として症例登録と検体の送付、報告書作成等の業務の作業手順の検討を行った。

3) 登録症例の遺伝情報、臨床情報、家系情報を含めたデータベースの構築を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、『ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針』（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）、『遺伝学的検査に関するガイドライン』（遺伝医学関連 10 学会）および『医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン』（日本医学会）等を遵守して行われる。

C. 研究結果

1) 対象は MSH2 の Exon9,10 の欠失 1 例、Exon7-14 の欠失 2 例、MLH1 遺伝子の Exon5 の欠失 2 例、Exon4-19 の欠失 2 例、ゲノム欠失を認めない 3 例の合計 10 例である。MSH2 遺伝子および MLH1 遺伝子の各 exon の read 数あるいは平均 coverage 数の

比較からゲノム欠失の検出感度を検討した。各遺伝子の read 数および coverage 数の合計に対する各 exon の read 数あるいは平均 coverage 数の比率を比較したところ、1カ所あるいは2カ所のエクソンが欠失した場合の read 数および平均 coverage 数は、欠失例では非欠失例に比べて有意に減少していた ($p < 0.01$)。全エクソンの過半以上に及ぶ大領域欠失を認めた症例では、欠失部位の exon の read 数あるいは平均 coverage 数の減少は非欠失例に比べ軽度であり、逆に保持されている少数の exon の read 数あるいは平均 coverage 数の増加として検出された ($p < 0.01$)。

2) 国立がん研究センターで承認されたプロトコールを多施設共同研究として実施するため、栃木県立がんセンターの臨床研究審査委員会に申請し、2014年12月11日付けで承認された。

3) 多施設共同研究に登録された症例について、連結可能匿名化された状態で臨床情報、家系情報、遺伝情報を統合し、管理するためのデータベースを構築中である。

D. 考察

1) リンチ症候群（遺伝性非ポリポーシス大腸がん：HNPCC）の主要な原因遺伝子である MSH2 および MLH1 の解析では、ゲノムの欠失あるいは重複等の構造異常が各 exon 毎の PCR/direct sequencing 法で異常が認められなかった症例の 10-20%で認められ、RT-PCR 法で exon skip として検出されるか、あるいは MLPA 法によって診断されている。このようなゲノムの比較的大きな領域の構造異常は Lynch 症候群以外の遺伝性腫瘍の原因遺伝子でも報告されており、各 exon 毎の PCR 法/direct sequencing 法による解析では検出されないことから、通常の遺伝子検査の盲点となっており、NGS による解析をルーチン検査として使用する場合にも同様の問題が生じる。今回の検討で NGS を最初のスクリーニング検査として利用できる可能性が明らかとなったことは有意義な知見である。さらに、今回のターゲットシーケンスでは遺伝性腫瘍の原因となるその他の遺伝子の解析も行われているため、適当な解析プログラムを開発することによって、その他の遺伝子についても、各エクソンのコピー数の定量が可能となる事が期待される。今回の検討では十分な read 数および coverage 数を得るため 10 症例を対象に解析したが、本機種では最大 24 症例の同時解析が可能である。その場合、1 症例あたりの解析コストの低減が可能となるが、同時にコピー数の検出感度の低下が危惧される。In silico のシミュレーションでは、対象症例

数が 2 倍に増加した場合、サンプル毎の read 数あるいは coverage 数は半分となる。その場合の 95% 信頼区間は 1.41 倍程度に増加するものの、解析の精度には影響を与えないものと推定された。

2) 多施設共同研究の開始に際して、各参加施設からの検体の送付等に関する標準作業手順の作成を進めている。本研究では従来の PCR/direct sequencing 法に加え、NGS による遺伝子変異のターゲットシーケンスと末梢血をピューロマイシン処理後に抽出したリンパ球より抽出した RNA を鋳型とする RT-PCR/direct sequencing 法による解析を計画している。末梢血のピューロマイシン処理により蛋白質合成が阻害され、ナンセンス変異を有する mRNA の分解が阻害される結果、病的変異の検出能の向上が期待される。本法はこれまでミスマッチ修復遺伝子の病的変異の検出に利用されていたが、今後はその他の原因遺伝子変異のスクリーニングにも応用する予定である。

3) 多施設共同研究に登録された検体について、症例登録から登録例の臨床情報、家系情報と遺伝子検査の結果を入力するためのデータベースを構築している。

E. 結論

今回の実験に使用したターゲットシーケンス法では、94 種類の遺伝性腫瘍の原因遺伝子のシーケンスが可能であり、高いスループットが期待される。しかし、ゲノムの広範な領域に生じたエクソンの欠失等の異常を解析する場合の感度、特異性は不明であり、従来の MLPA 法による解析の併用が必要となることが想定されていた。今回の検討によりターゲットシーケンス解析でも、ゲノム欠失等の異常をスクリーニング可能であることが明らかとなり、最初のスクリーニング検査から NGS による解析を実施する方法の実現の可能性が期待される。

その他、多施設共同研究のプロトコールが 2014 年 12 月に IRB で承認され、多施設間で遺伝子検査に伴うサンプルの運搬と検体処理等を円滑に進めるための作業手順の決定、連結可能匿名化された症例の臨床情報、家系情報、遺伝情報を管理するためのデータベースの構築等の作業が進められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanakaya K, Furukawa Y, Nakamura Y, Hirata K, Tomita N, Tamura K, Sugano K, Ishioka C, Yoshida T, Ishida H, Watanabe T, Sugihara K. Relationship between smoking and multiple colorectal cancers in patients with Japanese Lynch syndrome: a cross-sectional study conducted by the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. *Jpn J Clin Oncol.* 45:307-10, 2015.
2. Miyakura Y, Tahara M, Lefor AT, Yasuda Y, Sugano K. Haplotype defined by the MLH1-93G/A polymorphism is associated with MLH1 promoter hypermethylation in sporadic colorectal cancers. *BMC Res Notes.* 7:835, 2015.
3. Yamaguchi T, Furukawa Y, Nakamura Y, Matsubara N, Ishikawa H, Arai M, Tomita N, Tamura K, Sugano K, Ishioka C, Yoshida T, Moriya Y, Ishida H, Watanabe T, Sugihara K. Comparison of clinical features between suspected familial colorectal cancer type X and Lynch syndrome in Japanese patients with colorectal cancer: a cross-sectional study conducted by the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. *Jpn J Clin Oncol.* 45:153-9, 2015.
4. 菅野康吉: 家族性腫瘍コーディネーター・家族性腫瘍カウンセラー(FCC)制度の歩みと今後. *家族性腫瘍* 15: 16-20, 2015.
5. 菅野康吉: 遺伝カウンセリング・遺伝子検査; 乳癌診療アプリケーションノート. 株式会社南山堂; 2014年7月15日 96-101

2. 学会発表

1. 田原 真紀子, 井上 剛志, 佐藤 太, 宮倉 安幸, 堀江 久永, 安田 是和, 菅野 康吉: Rad51は大腸癌において topoisomeraseI 阻害剤の感受性予測マーカーおよび癌治療のターゲットとなる第34回日本分子腫瘍マーカー研究会(平成26年9月24日)(横浜)
2. Makiko Tahara, Takeshi Inoue, Yasuyuki Miyakura, Hisanaga Horie, Yoshikazu Yasuda, Kokichi Sugano: Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib (AZD2281) potentiates SN-38 cytotoxicity

in colon cancer cells. 第73回日本癌学会学術総会(平成26年9月25日)(横浜)

3. Sugano K, Saitou S, Sekine S, Nakajima T, Ushiyama M, Yoshida T: Germline PMS2 mutations detected by long RT-PCR/direct sequencing analysis using puromycin-treated blood samples. 第73回日本癌学会学術総会(平成26年9月26日)(横浜)
4. 菅野 康吉, 斎藤 伸哉, 高橋 雅博, 松岡 千咲, 青木 幸恵, 牧島 恵子, 田中屋 宏爾, 中島 健, 牛尼 美年子, 吉田 輝彦: 遺伝性腫瘍の発症前診断とサーベイランスおよび予防的介入. 日本人類遺伝学会第59回大会, 日本遺伝子診療学会第21回大会 平成26年11月21日(東京)
5. 中島 健, 関根 茂樹, 中島 好美, 坂本 琢, 松本 美野里, 松田 尚久, 菅野 康吉, 牛尼 美年子, 吉田 輝彦, 斎藤 豊: リンチ症候群の拾い上げとその後の内視鏡検査によるサーベイランスの実際. 日本人類遺伝学会第59回大会, 日本遺伝子診療学会第21回大会 平成26年11月21日(東京)
6. 平沢 晃, 増田 健太, 赤羽 智子, 片岡 史夫, 富永 英一郎, 阪埜 浩司, 進 伸幸, 菅野康吉, 小崎 健次郎, 青木 大輔: BRCA1/2 遺伝子変異保持者に対するリスク低減卵巣卵管切除術. 日本人類遺伝学会第59回大会, 日本遺伝子診療学会第21回大会 平成26年11月21日(東京)
7. 鈴木 茂伸, 吉田 輝彦, 牛尼 美年子, 菅野 康吉: 網膜芽細胞腫の早期発見と遺伝子検査の意義. 日本人類遺伝学会第59回大会, 日本遺伝子診療学会第21回大会 平成26年11月21日(東京)
8. 菅野康吉: がん家系症候群(リンチ症候群)の沿革と周縁および現代的意義. 第1回リンチ症候群研究会 平成26年11月29日(東京)
9. 菅野康吉: 家族性腫瘍の診療と研究2015 -発症前診断, サーベイランス, 予防的介入-. 第20回信州遺伝子診療研究会 平成27年1月30日(松本)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

「ゲノム情報で規定される超高リスク群の診断と、層別化・個別化予防のための
エビデンス構築をめざした臨床観察研究」における
若年性・家族集積性胃がんの解析

担当責任者 梶村春彦 浜松医科大学 教授

研究要旨： ゲノム情報で規定される超高リスク群として、若年胃がん及び家族集積性胃がんの収集と解析を行った。今年度は、すでに解析済みの Exon 3 のコピー数変異などがみられる症例について、ゲノムワイドにコピー数を検出する Cytoscan というシステムが動くかどうかを確認し、十分に検出可能であることがわかった。また、あらたな CDH1 の変異として p.(Arg63Ter) を発見した(京都大学小杉・堀松と共同)。

A. 研究目的

胃がんの家族集積は遺伝的に規定されているものが存在することは世界的にも有名であり、もっとも頻度の高いものは CDH1 の生殖細胞系列の点突然変異である。我が国は、背景となる胃がんの頻度が極めて高いために、環境要因の集積による家族内発症のかげに、遺伝性の胃がんの同定が遅れた。近年ようやく、本邦でも生殖細胞系列の遺伝的变化による若年発症や、家族性発症が見いだされるようになった。とくに、点突然変異ではなく、普通の塩基配列決定の操作では見逃してしまう、exon 単位のコピー数の変化や、de novo の発生などが知られるようになった。本担当の目的は、本班により機動的に収集された家族集積性・若年性の胃がんについて、生殖細胞系列の変異を、コピー数異常を含めて検索することを目的とする。とくに、コピー数については、全ゲノム領域をカバーする Cytoscan を用いて、CDH1 以外の遺伝子領域を探索する。

B. 研究方法

DNA は、CDH1 全エクソンを挟む PCR を行い、Sanger 法で塩基配列をきめる。つぎに MLPA (multiplex ligation dependent probe amplification) 法にて CDH1 の全エクソンのコピー数の変化をみる。コントロールには、健康長寿者の DNA などを用いる。そのあと、Affymetrix の Cytoscan にて、全ゲノム範囲のコピー数変化をみる。

そのあと、本研究組織のリソースで、次世代シーケンスを試みる。上記の candidate gene の CDH1 以外の遺伝子（第一期エクソーム解析ででてきた候補遺伝子も含む）について同様の作業をするか、コストと DNA 量に応じて決める。

C. 研究結果

本組織により早くも 1 例家族集積性の胃がんの生殖細胞系列の変化を発見した。本例は親族のキャリアーの早期発見一救命につながった（堀松・小杉ら）。ひきつづき、とくに CDH1 の変化がみられない例について検索を続行している。

D. 考察

我が国での、遺伝性胃がんの把握の遅れの大きな一因は、現場の臨床医に、遺伝性の認識が少ないこともあると言われてきたが、次第に本組織のメンバーを通じて、症例の存在自体の認識が広まってくると思われる。とくに今回、はじめて早期発見に役立ち、本邦の高い内視鏡・胃がん手術のレベルを考えると、遺伝性の胃がんがそれによる若年・壮年における死をふせぐことが出来る事例になる。

E. 結論

遺伝性胃がんの生殖細胞系列の変化の同定によ

り、胃がん集積家系の未発症例を早期発見できることができ、引き続き、CDH1 以外の原因遺伝子の探索もつづけ、遺伝的に規定される超高リスク群の同定とそれにもとづく癌死の予防に役立てたい。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuroda S, Suzuki S, Kurita A, Muraki M, Aoshima Y, Tanioka F, Sugimura H. Cytological Features of a Variant NUT Midline Carcinoma of the Lung Harboring the NSD3-NUT Fusion Gene: A Case Report and Literature Review. *Case Rep Pathol*. 2015;2015:572951. doi: 10.1155/2015/572951. Epub 2015 Jan 19.
2. Sugimura H. Editorial: TCGA output and practice of gastric cancer. *Translational Gastrointestinal Cancer* 4(2) 115-117, 2015,
3. Gurzu S, Kadar Z, Sugimura H, Bara T, Bara T Jr, Halmaciu I, Jung I. Gastric cancer in young vs old Romanian patients: immunoprofile with emphasis on maspin and mena protein reactivity. *APMIS*. 2015 ;123(3):223-33.
4. Yamada H, Sakamoto H, Sugimura H. Commentary: Sexy Small Copy Numbers in Hereditary Gastric Carcinogenesis. *J of Gastrointestinal & Digestive System* 4:205. doi: 10.4172/2161-069X.1000205
5. Suzuki S, Kurabe N, Ohnishi I, Yasuda K, Aoshima Y, Naito M, Tanioka F, Sugimura H. NSD3-NUT-expressing midline carcinoma of the lung: First characterization of primary cancer tissue. *Pathol Res Pract*. 2014 pii:S0344-0338(14)00311-2. doi:10.1016/j.prp.2014.10.013.
6. Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Ogai Y, Hasegawa J, Sato N, Yamada H, Tanioka F, Sugimura H, Hayashida M, Ikeda K. Association between KCNJ6 (GIRK2) gene polymorphism rs2835859 and post-operative analgesia, pain sensitivity, and nicotine dependence. *J Pharmacol Sci*. 2014;126(3):253-63.
7. Tajima S, Kurabe N, Okudela K, Yajima K, Takahashi T, Neyatani H, Sugimura H, Koda K. Extensive goblet cell metaplasia of the peripheral lung may harbor precancerous molecular changes: comparison of two cases. *Pathol Int*. 2014 Oct;64(10):533-8.
8. Goto M, Shinmura K, Matsushima Y, Ishino K, Yamada H, Totsuka Y, Matsuda T, Nakagama H, Sugimura H. Human DNA glycosylase enzyme TDG repairs thymine mispaired with exocyclic etheno-DNA adducts. *Free Radic Biol Med*. 2014 ;76:136-46.
9. Du C, Kurabe N, Matsushima Y, Suzuki M, Kahyo T, Ohnishi I, Tanioka F, Tajima S, Goto M, Yamada H, Tao H, Shinmura K, Konno H, Sugimura H. Robust quantitative assessments of cytosine modifications and changes in the expressions of related enzymes in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2014 Aug 7. [Epub ahead of print] PMID: 25098926 [PubMed - as supplied by publisher]
10. Shinmura K, Kurabe N, Goto M, Yamada H, Natsume H, Konno H, Sugimura H. PLK4 overexpression and its effect on centrosome regulation and chromosome stability in human gastric cancer. *Mol Biol Rep*. 2014;41(10):6635-44.
11. Tajima S, Mochizuki R, Sugimura H, Hoshi S. Radiation-induced breast angiosarcoma with a confirmative feature of c-MYC amplification. *Jpn J Clin Oncol*. 2014 ;44(7):702-3.
12. Shinmura K, Kahyo T, Kato H, Igarashi H, Matsuura S, Nakamura S, Kurachi K, Nakamura T, Ogawa H, Funai K, Tanahashi M, Niwa H, Sugimura H. RSPO fusion transcripts in colorectal cancer in Japanese population. *Mol Biol Rep*. 2014;41(8):5375-84.
13. 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;2014:617351.
14. 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;19(6):504-16.

15. 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. 2014 Jun;210(6):383-8.

2. 学会発表

1. Nobuya Kurabe, Toshio Nakamura, Kiyotaka Kurachi, Tomoaki Kahyo, Kazuya Shinmura, Mitsutoshi Setou, Haruhiko Sugimura. Human colorectal cancer marker PC(16:0/16:1) induces cell growth by activating Akt and Erk pathways. The 105th AACR Annual Meeting April 7, 2014, San Diego, USA
2. 梶村春彦. ヒト腫瘍の原因について病理はなにができるか. 103 回日本病理学会総会 シンポジウム 1 腫瘍病理学の真髄 2014 年 4 月 24 日、広島
3. Haruhiko Sugimura. DNA adductomics in human tissue: a clue toward the origin of human cancer? 4th Asian Conference on Environmental Mutagens(India), Dec.12, 2014, Kokata, India

H. 知的所有権その他

なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

「ゲノム情報で規定される超高リスク群の診断と、層別化・個別化予防のための
エビデンス構築をめざした臨床観察研究」における
症例登録、試料・情報の収集と臨床遺伝学的・分子遺伝学的分析

担当責任者 渡邊 淳 日本医科大学付属病院 遺伝診療科

研究要旨 平成 26 年度は、ゲノム情報で規定される超高リスク群の診断と、層別化・個別化
予防のためのエビデンス構築をめざした臨床観察研究において、所属施設である日本医科大学
付属病院、国立がん研究センター東病院が症例登録、試料・情報の収集が出来る施設として構
築することを目標とした。日本医科大学においては、本研究の倫理的な側面からの検討を行い、
平成 27 年 1 月に倫理審査の承認を得た。日本医科大学付属病院遺伝診療科はがん診療センタ
ー家族性腫瘍外来も含めると年間外来数約 700 名（うち新患 200 名）となる医療機関であり、
がん診療に関わる各診療科との連携が含まれた研究が出来る基盤が整った。

A. 研究目的

平成26年度は、ゲノム情報で規定される超高リスク群の診断と、層別化・個別化予防のためのエビデンス構築をめざした臨床観察研究における基盤を日本医科大学付属病院、国立がん研究センター東病院に構築することを目的とする。

B. 研究方法

日本医科大学付属病院、国立がん研究センター東病院における外来診療体制を確認し、がん超高リスク群の診断と、層別化・個別化予防を目指した研究を行うための課題を抽出した。

(倫理面への配慮)

また、本研究に関わる研究課題『家族性・若年性のがん及び遺伝性腫瘍に関する診断と研究』を日本医科大学遺伝子研究倫理審査委員会に提出し、承認された。

C. 研究結果

日本医科大学付属病院は、遺伝カウンセリング部門を行う部署として、遺伝診療科とともにがん診療センターに家族性腫瘍外来を設けている。遺伝という名称に抵抗がある方、がん診療センターに直属している診療科からは、家族性腫瘍外来受診を希望される方も多い。

両外来を合わせると平成26年は年間約700名（うち新患200名）の方が外来を受診された。

従来、診療内で行われている遺伝学的検査は、研究扱いで対応しない施設であり、『家族性・若年性のがん及び遺伝性腫瘍に関する診断と研究』の審査においては、研究内容に局限して日本医科大学遺伝子研究倫理審査委員会に申請し27年1月に承認された。

D. 考察

医療機関により、診療体制が異なり、外来準備ならびに倫理審査については施設ごとの対応が必要と考えられた。

E. 結論

国立がん研究センター東病院ならびに日本医科大学付属病院遺伝診療科、がん診療センターにおいて、がん超高リスク群の診断と層別化・個別化予防を目指した研究を行う基盤を構築した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会年会 (名古屋) 2014/9

1. 論文発表

1. Koeda M, Watanabe A, Tsuda K, Matsumoto M, Ikeda Y, Kim W, Naing BT, Karibe H, Shimada T, Suzuki H, Matsuura M, Okubo Y. Interaction Effect between Handedness and CNTNAP2 Polymorphism (rs7794745 genotype) on Voice-specific Frontotemporal Activity in Healthy Individuals: An fMRI Study. *Front. Behav. Neurosci.* (in press)
2. Oyama S, Funasaka Y, Watanabe A, Takizawa T, Kawana S, Saeki H. BRAF, KIT, and NRAS mutations and expression of c-KIT, pERK and pAKT in Japanese melanoma patients. *J. Dermatol.* (in press)
3. 渡邊 淳. がんを対象としたエクソーム解析の実用化と倫理的課題. *臨床病理レビュー*第153号 コンパニオン診断の進展 2014-2015 (2014)
4. Ogawa R*, Watanabe A*, Naing BT, Sasaki M, Fujita A, Akaishi S, Hyakusoku H, Shimada T. (* These authors contributed equally) Associations Between Keloid Severity and Single Nucleotide Polymorphisms: Importance of rs8032158 as a Biomarker of Keloid Severity. *J. Invest. Dermatol.* 134:2041-2043 (2014)

2. 学会発表

1. 渡邊 淳. 病院における薬理遺伝学的な取り組み. (口頭・シンポジウム) 第24回日本医療薬

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 発明の名称 : 家族性大動脈瘤の遺伝子変異スクリーニング方法

出願番号 : 特願2009-200768
出願日 : 平成21年8月31日
公開番号 : 特開2011-050284
公開日 : 平成23年3月17日
特許番号 : 特許第5648949号
登録日 : 平成26年11月21日
権利者 : 学校法人日本医科大学
発明者 : 渡邊 淳、島田 隆

2. 発明の名称 : 低フォスファターゼ症の遺伝子変異スクリーニング方法

出願番号 : 特願2009-200612
出願日 : 平成21年8月31日
公開番号 : 特開2011-050283
公開日 : 平成23年3月17日
特許番号 : 特許第5648948号
登録日 : 平成26年11月21日
権利者 : 学校法人日本医科大学
発明者 : 渡邊 淳、島田 隆、折茂英生