

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

上皮細胞極性の異常と遺伝性大腸がん発症機構の関連の解明

研究代表者 田彦 祐喜 (ゲノム医学研究センター)

緒言

大腸がんのおよそ70%は遺伝性を示さない散発性大腸がんであるが、一方で、遺伝的要因が関与するとされる大腸がんもおよそ30%あると推測されている¹⁾。遺伝性大腸がんは、家族性大腸腺腫症 (FAP) に代表されるようなポリポーシスを背景に発症するがんと、リンチ症候群 (LS) に代表されるような非ポリポーシス性に発症する大腸がんに大別される。前者は、さらに組織学的に腺腫性、過誤腫性などに区分される。過誤腫性にはPeutz-Jeghers症候群 (PJS) や若年性ポリポーシス症候群 (JPS) などがある。後者には、LS以外に家族性大腸がんタイプXが挙げられる²⁾。

これらの疾患では相互に表現型が複雑に重複しており、臨床所見や家族歴からのみでは、臨床的な診断そのものが困難な場合がある。そのため、すでに1つ以上の原因遺伝子が特定されている疾患については、遺伝子検査による確定診断が重要となってくる。また、家族歴や発症時年齢等から遺伝性大腸がん疑いとされても、既知原因遺伝子の異常が検出されないことがあり、その他の原因遺伝子の存在が想定されている。

例えば、若年性ポリポーシス症候群 (JPS) は過誤腫である若年性ポリープが胃・小腸・結腸・直腸を主とする消化管に多発する常染色体優性遺伝性疾患である。JPS家系では大腸がん発症リスクの高いこと、また、胃や上部消化管・膵臓でもがん発症例が知られている。これまでJPSの原因遺伝子として、骨形成因子 (BMP) が結合する受容体である *BMPRIA* (Bone Morphogenetic Protein Receptor, type IA) 遺伝子、ならびに、細胞の増殖や分化等に関与することが知られているトランスフォーミング増殖因子 (TGFβ) のシグナルを伝達する *SMAD4* (SMAD family member 4) 遺伝子の生殖細胞変異がすでに確定している。しかしながら、約50%のJPS症例ではこれら既知原因遺伝子の変異が検出されおらず、未知の原因遺伝子の存在を想起させる。

このような問題を解決するために、まず、遺伝性大腸がんの既知原因遺伝子変異を安価で迅速に検出できるシステムを確立することを目的とした。さらに、既知原因

遺伝子では病的変異を認めない遺伝性大腸癌の新たな原因遺伝子を探索・同定することを目的として研究を進めた。

方法と研究対象者

研究対象者

研究対象者は、「遺伝性消化管腫瘍症候群 (ポリポーシス及び関連癌を含む) における原因遺伝子の同定と新たな原因候補遺伝子の探索 - 次世代シーケンシング技術を利用して -」(埼玉医科大学倫理委員会承認 747-IV) に書面で同意した患者およびその血縁者。

ターゲットリシーケンス法

申請者らは先行研究として、これまでのサンガー法などによる遺伝子変異の同定法に比べて安価で迅速・正確な次世代シーケンサーによる遺伝子検査法の開発について学術雑誌 *Familial Cancer* で報告している³⁾。アジレント社の *HaloPlex* を使用して、標的とした20遺伝子をキャプチャし、その後、イルミナ社の高速シーケンサーである *MiSeq* により配列を取得する。事前に病的変異を確定したこれらの検体を使用して、開発したシステムを評価した。さらに、SNVやIndelだけでなくコピー数多型 (CNV) の解析も行い、CNVの病的変異が検出できることを確認した。

全エクソームシーケンス解析

JPSの発端者(母)、その子供2名(いずれもJPS患者)、および発端者の配偶者(健常者)の4名の末梢血リンパ球DNAの全エクソーム解析 (WES) を行った。発端者は生殖細胞系列における既知原因遺伝子 *SMAD4* と *BMPRIA* の異常が検出されないことがすでに確認されている⁴⁻⁷⁾。WESによって得られた結果を、公共のデータベースにあるエクソーム配列 (1000人ゲノムプロジェクト等) と比較検討を行い、各遺伝子に稀な欠失やフレームシフト変異、ナンセンス変異等の異常があるか探索した。さらに3人のJPS患者で共通した遺伝子変異を絞り込み、健常者にはないものを選別し新規原因遺伝子候補を選定した。サンガー法により、見出された変異の確認をした。

結 果

まず我々が開発した方法を用いて、原因遺伝子未同定の遺伝性消化管腫瘍症候群疑い症例31検体を用いた前向き解析を行った結果、FAP、LS疑い、ならびにPJSの9検体において既知遺伝子(*APC*, *MLH1*, *MSH2*, *STK11*)の病的変異を同定した。さらにLS疑いであった2検体においては、LS関連の既知原因遺伝子に異常を認めなかったものの、*STK11* 遺伝子を含む19p13.3領域で(0.3~10Mb長)、コピー数の増加が認められ、生殖細胞系列ではこのようなコピー数の異常の報告は無いことから、新規の原因となる可能性が示された。鋸歯状ポリポーシス症例1検体で*POLD1*の病的変異候補となるミスセンス変異が検出された。2013年に新たな遺伝性大腸がん症候群の原因遺伝子として同定されたDNA polymerase δ (*POLD1*) 遺伝子では、これまでに世界で見てもまだ5個所のミスセンス変異しか報告されておらず、今回新たに同遺伝子産物のブルーフリーディング活性に重要なエクソヌクレアーゼドメイン内で、病的であることが複数の構造予測ツールにより予測される新規のミスセンス変異候補を日本人としては初めて見つけた。またMUTYH関連ポリポーシス疑い症例1例でメチル化CpG結合タンパク質遺伝子の一つでナンセンス変異が検出された。これまでマウスの実験や遺伝子の機能から、同遺伝子は遺伝性大腸がんの原因候補とされながら、実際には原因遺伝子となる症例は報告されてこなかった。我々は世界で初めて生殖細胞系列で同遺伝子にナンセンス変異を有する症例を発見した。新たに見出した病的変異候補については、腫瘍組織における体細胞変異解析等を行う予定である。

さらに、JPSの1家系[母(発端者)、父(健常者)、娘(発症者)、息子(発症者)]における全エクソームシーケンズ解析により、JPS 3症例間で共通なナンセンス変異が存在する3つの新規原因候補遺伝子(遺伝子A、遺伝子B、遺伝子C)を同定した。遺伝子Aは、その産物が遺伝性乳がんの原因遺伝子として知られているがん抑制遺伝子BRCA1タンパク質と直接結合し、DNA二重鎖切断の修復に関与することがすでに実験的に示されている。また、この遺伝子Aの一部の遺伝子多型が乳がんの発症リスクと関連することが報告されている。また、BRCA1がSMAD3を介してTGF β シグナルを制御することが報告されている。さらに、遺伝子Aのノックアウトマウスではリンパ腫の自然発生ならびに発がん剤であるDMBA誘発乳がんの発症頻度が上昇することが報告されているが、腸管への影響については未だ報じられていない。今回解析を行った家系中では、発端者の母(異時両側性)および姉の2名が乳がんを発症しており、またこの姉は悪性リンパ腫も発症していた。以上から遺伝子Aの不活化が同家系におけるがんの発症に関与する事が推察される。これまで遺伝子Aの生殖細胞系列におけるナンセンス変異によるがん多発家系は知られていない。

遺伝子B産物の機能については、最近のノックアウトマウスを用いた解析結果等から、メチル化ヒストンを認識し、転写コアクチベーターとして機能し、染色体の安定性にも関与することが報告されているが、TGF β シグナル系への影響や、腸管における働き等は不明であり、また遺伝子Bの生殖細胞系列ナンセンス変異によるがん多発家系も報告されていない。一方、遺伝子Cは、両アレルに病的変異があるとミトコンドリア病を発症することが分かっているが、大腸がん発症に結びつくような知見は得られていない。

計画を進めていくうえで、申請者は以下に示したような予備的な研究結果を得ている。

予備的な研究結果

- (1) 全エクソーム解析に使用したJPS 3症例において一連の過誤腫症候群の既知原因遺伝子(候補含む)*SMAD4*, *BMPRIA*, *ENG*, *PTEN*, *STK11*において病的変異が検出されないことを確認した。また、既知原因遺伝子のコピー数多型(CNV)が検出されないこともMLPA法で確認した。
- (2) 予備的な免疫染色解析の結果により、JPS患者の若年性ポリープでは、遺伝子A・Bいずれの産物も発現が極めて減弱あるいは完全に消失していた。詳細な追加解析によりこの予備的知見を検証する必要があるが、この結果が事実であるとすれば、両遺伝子の生殖細胞系列変異と併せて、体細胞変異(エピゲノム的変化を含む)により、両遺伝子が不活化したものと推定された。
- (3) 原因候補遺伝子A・Bの機能解析を進めるため、遺伝子A・Bに対するsiRNAを3種類使用し、TGF β シグナル研究で使用されているHeLa細胞におけるsiRNAの効果を調べた。構築した絶対定量系qPCR法(内部標準:*ACTB*)により、すべてのsiRNAは各々の遺伝子A、Bに対して導入後24/72時間後に遺伝子発現量が20%程度にまで抑制することが予備的にではあるが確認されている。
- (4) 遺伝子産物Bのプロモーター領域にはCpGアイランドが存在しており、遺伝子発現不活化に寄与する可能性が示唆されたため、メチル化解析用のプライマーの準備を行った。

今後以下の点について見出した遺伝子Aと遺伝子Bについて解析を進める予定である。

BMP経路によるがん発症機構の解明

JPSの原因遺伝子である*SMAD4*と*BMPRIA*は骨形成タンパク質(BMP)経路で働く。そのため、新規原因遺伝子候補とBMP経路の関連に着目して、大腸がん発症メカニズムの研究を行う。

細胞極性の破綻によるがん発症機構の解明

大腸がんを含むヒトのがんの多くは上皮由来である。がん細胞の特徴の1つとして、上皮としての細胞極性の破綻が共通に観察されている。それは異常な増殖能の獲得に寄与する。Peutz-Jeghers症候群の原因遺伝子として知られている*STK11*は細胞極性とエネルギー代謝をつなげる分子であり、腫瘍形成に関与していることが報告されている。また、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である*APC*も細胞極性に関与していることが知られている⁸⁾。さらに、BMP経路もまた細胞極性を制御していることが報告された⁹⁾。これらのことから、家族性大腸がんの原因遺伝子が細胞極性に関与していることが示唆される。今後新たに病的変異候補として見つかった各遺伝子が細胞極性に関与するかを解析することで、遺伝性大腸がん発症との関連を調べる予定である。

考 察

本研究で複数の遺伝子が家族性大腸がんの原因であることを証明することにより、稀な疾患であっても確定診断が可能となる。さらに、遺伝性のがんの原因遺伝子は、これまでの研究から散発性大腸がんにおいても重要な働きをもつことが期待され、新規原因遺伝子の発見は大腸がん発症機構を解明するうえで非常に有用な知見になると思われる。

謝 辞

本研究を行うにあたり多大なるご支援・ご協力をいただいたトランスレーショナルリサーチ部門平田智子助手、神田将和助教、江口英孝准教授、岡崎康司教授に深謝いたします。臨床検体や患者情報等をご提供いただいた本学総合医療センター消化管一般外科石田秀行教授に深く感謝致します。埼玉医科大学総合医療センター消化管一般外科非常勤講師・立川哲彦先生には病理学的解析の支援を行っていただき、深く感謝申し上げます。臨床検体や患者情報等をご提供いただいた独立行政法人国立病院機構岩国医療センター外科医長統括診療部長田中屋宏爾先生に深く感謝致します。臨床検体や患者情報等をご提供いただいた、がん・感染症センター都立駒込病院外科山口達郎先生に深謝致します。

参考文献

1) Lynch HT, et al. *Fam. Cancer* 2008.

- 2) Elena MS and Fay K. *Clin. Gastroenterol. Hepatol* 2014.
- 3) Kohda M, Kumamoto K, Eguchi H, Hirata T, Tada Y, Tanakaya K, Akagi K, Takenoshita S, Iwama T, Ishida H, Okazaki Y. Rapid detection of germline mutations for hereditary gastrointestinal polyposis/cancers using HaloPlex target enrichment and high-throughput sequencing technologies. *Fam Cancer* 2016 Feb 2. [Epub ahead of print]
- 4) 樋口, 他. 胃と腸 35巻 第3号 2000年 増刊号
- 5) 石田, 他. 小児外科 29巻 1997年
- 6) 石田, 他. 消化器内視鏡の進歩 34巻 1989年
- 7) 市川, 他. 胃と腸 17巻 9号 1982年
- 8) Fernando MB and Mirna PM. *Nature Rev. Cancer* 2012.
- 9) Saitoh M, et al. *PLoS One* 2013.

研究成果リスト

論文

- 1) Kohda M, Kumamoto K, Eguchi H, Hirata T, Tada Y, Tanakaya K, Akagi K, Takenoshita S, Iwama T, Ishida H, Okazaki Y. Rapid detection of germline mutations for hereditary gastrointestinal polyposis/cancers using HaloPlex target enrichment and high-throughput sequencing technologies. *Fam Cancer* 2016 Feb 2. [Epub ahead of print]
- 2) Eguchi H, Kumamoto K, Suzuki O, Kohda M, Tada Y, Okazaki Y, Ishida H. Identification of a Japanese Lynch syndrome patient with large deletion in the 3' region of the EPCAM gene, *Jpn J Clin Oncol* 2016 Feb; 46(2): 178-84. doi: 10.1093/jjco/hyv172. Epub 2015 Nov 27.

学会発表

- 1) 田彗祐喜, 隈元謙介, 神田将和, 鈴木興秀, 赤木 究, 田中屋宏爾, 江口英孝, 岡崎康司, 竹之下誠一, 石田秀行. 次世代シーケンサーを用いた遺伝性大腸癌の遺伝学的検査の確立に向けて, 第21回日本家族性腫瘍学会学術集会, 2015年6月5-6日, さいたま市
- 2) 鈴木興秀, 江口英孝, 隈元謙介, 近 範泰, 田彗祐喜, 石橋敬一郎, 持木彫人, 岡崎康司, 石田秀行. EPCAM 病的変異を原因とするリンチ症候群の1例, 第70回日本大腸肛門病学会学術集会, 2015年11月13-14日, 名古屋市