

令和3年度シニア・リサーチフェロー
研究成果報告書

2022年5月6日提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理 事 長 堀 田 知 光 殿

報告者氏名： 張 萌琳

研究課題：若年発症大腸がんの発症リスクに関する臨床的特徴と遺伝要因の同定

研究期間：自 2021年 4月 1日

至 2022年 3月 31日

研究指導者：氏名 河野 隆志

公益財団法人 がん研究振興財団

(1) シニア・リサーチフェローペリオード中の研究について

1) 要旨

若年発症の大腸がんに対する治療や予防に関するエビデンスは少なく、生存率の改善も乏しい。生殖細胞系列バリアントは、若年世代発症がんの重要なリスク要因の一つと考えられるが、病的意義について未解明なバリアントも多い。本研究では若年発症大腸がん症例に対して、多施設で収集した血液DNAの全ゲノムシークエンスデータ等を用いて、若年発症大腸がんの発症に関わる遺伝性腫瘍関連遺伝子のバリアントの頻度、および新規バリアントの候補を同定した。本研究を通して同定された既知の遺伝性腫瘍関連遺伝子のバリアントや中等度リスクとなりうる新規バリアントについて、今後は生涯発症リスクの推定やがん組織検体を用いた体細胞変異解析を行い、予防法や治療選択に関する基盤的情報の構築を目指す。

2) 序

ゲノム医療の普及によって、二次的所見として発見される遺伝性腫瘍症候群への対応は、今後ますます重要になると考えられる。しかし、現時点では病的意義不明 (VUS) とされる遺伝子変異、特に遺伝子型と表現型の関連が十分明らかではない遺伝子変異も多く、継続的なエビデンスの構築が必要である。

近年欧米において若年成人発症大腸がんの増加が注目されているが、アジアでも日本を含む4つの国と地域の大規模研究より、この20年で特に若年男性における直腸がん発症率の増加が指摘されている[1]。AYA世代発症大腸がんの要因として、遺伝性腫瘍は重要な背景因子の一つと考えられている。既知の遺伝性腫瘍関連の生殖細胞系列病的バリアントは、欧米の報告において概ね20%程度認められているが[2]、アジア人を対象とした研究は限られている。高齢発症大腸がんの死亡率が漸減しているのに比し、AYA世代発症大腸がんは進行がんで発見される割合が高く、かつ予後が悪いことから[3]、早期発見と二次的予防法の確立が求められている。

我々の研究室では、発がん要因に未解明な部分の多い若年成人（AYA: Adolescent and Young Adult）発症がんに注目し、がん発症リスクに関わる遺伝要因と臨床的特徴について研究を行っている。本研究では、AYA世代発症大腸がん患者を対象として、発症リスクに関連する遺伝的要因について、(1) 既知の遺伝性腫瘍関連遺伝子のバリアント頻度、(2) 中等度リスクに寄与するバリアントを同定することを目的として研究を行った。

3) 実験方法

3-1) 症例選択

国立がん研究センター中央病院 (NCCH, 102例)、国立がん研究センター東病院 (NCCHE, 88例)、バイオバンク・ジャパン (BBJ, 189例) の3施設からなるAYA世代（19-44歳）に発症した大腸がん379例を対象に、血液由来DNAを用いて全ゲノムシークエンス (WGS) を実施した。BBJ症例については既報で報告されているデータを使用した[4]。ライブラリ調整キットは、illumina社 TruSeq DNA PCR-Free High Throughput Library Prep Kitを用い、シークエンサーはNovaSeq6000を用いて実施した。シークエンステータ量は、90GB以上を取得した。

3-2) 解析対象遺伝子の選定

リスクバリアントの検出感度を高めるため、対象遺伝子を選定して解析を実施した。過去の文献報告等より、(1) 大腸がんで生殖細胞系列病的バリアントの既報がある遺伝子[5-8]、(2) がん種横断的に生殖細胞系列バリアントの既報がある遺伝子[9-11]および、(3) DNA 修復関連遺伝子[12]を含む 581 遺伝子を抽出した。上記のうち、大腸がんおよびがん種横断的に遺伝性腫瘍の原因遺伝子として関連が多く報告されている 36 遺伝子（表 1）を、既知の遺伝性腫瘍関連遺伝子と定義した。その他の遺伝子については、中等度リスクバリアント候補として関連解析を実施した。

3-3) シークエンスデータのマッピング、バリアントコール、アノテーション、およびフィルタリング

シークエンスデータは University of California, Santa Cruz (UCSC) GRCh38 を参照ゲノム配列として、マッピングを行った。生殖細胞系列バリアントは、The Genome Analysis Toolkit (GATK) の Haplotypecaller を用いて、塩基置換および短い挿入、欠失バリアントを検出した。検出したバリアントについて、ANNOVAR および SnpEff を用いてアノテーションを行った。一般集団におけるバリアント頻度は、東北メディカル・メガバンク機構の日本人バリアントデータ (ToMMo, 4.7KJPN) (<https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/>) および、The Exome Aggregation Consortium (ExAC) の多人種データを使用した。

3-4) 既知の遺伝性腫瘍関連遺伝子における病的バリアント頻度の同定

前述の 36 遺伝子（表 1）について、AYA 大腸がん集団における病的バリアント頻度を同定した。バリアントの病的意義については原則、Clinvar で pathogenic または likely pathogenic と評価されているバリアントを病的バリアントと定義した。このうち、日本および多人種での一般集団バリアント頻度が 1%以上のバリアントは病的バリアントから除外した。

3-5) 対照群におけるバリアント頻度の同定

ナショナルセンター・バイオバンクネットワーク (NCBN) が中心となり 5 つのナショナルセンターで WGS が実施された 898 人を対照群として用いた。対照

群についても、大腸がん症例群と同じ条件でバリアントコールを実施し、遺伝子型を決定した。

3-6) 中等度リスクバリアント候補の抽出と、対照群に対するオッズ比の算出

解析対象とした 581 遺伝子のうち、既知の遺伝性腫瘍関連 36 遺伝子以外の 535 遺伝子を対象として、AYA 世代大腸がんの中等度リスクの候補バリアントを検索した。条件として、(1) 一般集団頻度が 5%未満のバリアント、(2) 機能欠失型バリアント、(3) AYA 大腸がんで対照群に比してオッズ比 1.5 倍以上、(4) AYA 大腸がんで反復して 3 症例以上みられるバリアントの条件を満たすものとした。機能欠失型バリアントは、フレームシフト変異、ストッププロス変異、スタートロス変異、ストップゲイン変異、スプライス部位変異を含めた。

4) 結果

解析対照となった 44 歳以下で大腸がんを発症した 379 人の患者背景を表 2 に示す。症例群の年齢の内訳は、19-29 歳が 10%、30-39 歳が 63%、40-44 歳が 27% であった。男女比は男性が 218 人 (58%)、女性が 161 人 (42%) であった。本人に大腸がん以外の重複がんがあったのは 20 人 (5%)、家族歴は、第二度近親者までに大腸がん、胃がんの既往がある症例が各々 16% 見られた。病変の部位は、右側結腸 (盲腸から横行結腸まで) が 80 例 (21%)、左側結腸 (下行結腸から S 状結腸まで) が 115 例 (30%)、直腸が 155 例 (41%) であった。また多発病変が 8 例 (2%) に見られた。主組織型が判明している 267 例のうち、245 例 (92%) と大部分が分化型がんであり、低分化型がん/粘液がん/印環細胞がんは 21 例 (6%) であった。

4-1) 遺伝性腫瘍関連 36 遺伝子の病的バリアント頻度

AYA 大腸がん症例のうち 23 人 (6%) に 24 種類の、既知の遺伝性腫瘍関連遺伝子の病的バリアントが同定された (図 1)。同定された病的バリアントは、*APC* 4 例 (1.1%)、ミスマッチ修復遺伝子 11 症例 (2.9%)、*BRCA1/BRCA2* 4 例 (1.1%)、その他相同修復組換関連遺伝子 6 例 (1.6%)、*TP53* 2 例 (0.5%)、*BLM* 1 例 (0.3%) でいずれもヘテロ接合であった。

4-2) 中等度リスクバリアント候補

AYA 大腸がん症例全体 ($n = 379$) を対象とした場合、前述の条件に合致する NCBN 非がん対照群に対するオッズ比 (OR) が 1.5 倍以上のバリアントとして *SLC25A13* p. M285Pfs*2 (OR: 1.90)、*LIMK2* p. G574Rfs*12 (OR: 1.87)、*MYH8* p. C675Vfs*22 (OR: 1.65)、*ZSWIM7* p. C78Ffs*21 (OR: 31.4)、*NSMCE2* p. Q132* (OR: 3.30)、*XPA* c. 390-1G>C (OR: 2.02 倍)、*RECQL* p. Met1? (OR: 1.79) が抽出された (表)。また、39 歳以下の症例 ($n = 278$) では、*SLC25A13* p. M285Pfs*2 (OR: 1.94)、*LIMK2* p. G574Rfs*12 (OR: 2.04)、*RECQL* p. Met1? (OR: 2.44) が、左側結腸および直腸の症例 ($n = 271$) では、*LIMK2* p. G574Rfs*12 (OR: 1.56)、*RECQL* p. Met1Thr (OR: 2.51) が抽出された。

5) 考察

本研究で抽出された既知の遺伝性腫瘍関連遺伝子の病的バリアントを有する AYA 大腸がん症例は 6% であった。今回我々は 44 歳以下のより若年の大腸がん症例のみを対象として研究を行ったため、より多くの病的バリアント保持者が抽出されると想定していたが、結果としては既報と同等であった [2, 13, 14]。その要因として、今回の研究ではバリアントコードは塩基置換や短い挿入、欠失のみを対象としており、エキソン単位での大きな欠失や、構造異常を拾えていない点が挙げられる。過去の報告では、複数エキソンの欠失や、構造異常も遺伝性腫瘍の原因として報告されているため、これらを抽出できなかったことは本研究の限界として挙げられる。

AYA 大腸がんに対する中等度リスクの候補として、複数遺伝子のバリアントが抽出された。ミスセンスバリアントの場合には、変異が遺伝子の機能に与える影響を想定することが容易でないことから、今回我々は機能欠失型バリアントに着目して研究を行った。なかでも、既報や遺伝子の機能からいくつかのバリアントに着目している。抽出されたバリアントの 1 つである *SLC25A13* はシトリンをコードする遺伝子であり、シトリンはアスパラギン酸、グルタミン酸代謝経路に関わり、細胞質で生じた NADH の還元エネルギーをミトコンドリア内へ輸送し、ミトコンドリア内に NADH を產生する反応に関与する。*SLC25A13* の両アレルの機能欠失型バリアントはシトリン欠損症の原因となることが知られている。Solute carrier (SLC) 蛋白は、細胞増殖やアポトーシスなどに重要な機能を果たすことから、その恒常性の破綻ががんにおける悪性度や浸潤能などに関連す

るという報告もある[15]が、片アレルの生殖細胞系列バリアントが発がんに与える意義はよく分かっておらず、今後の検討が求められる。

39歳以下の症例や、若年大腸がんで多い左側結腸および直腸に限定した群で抽出された中等度リスク候補バリアントとして、*LIMK2*と*RECQL*のバリアントがある。*LIMK2*は*LIMK1*とともにLIMキナーゼファミリーを構成し、アクチン脱重合因子であるコフィリンをリン酸化することで、アクチン重合を制御する機能を有する。細胞骨格形成との関連から、がん細胞の浸潤能や転移との関連が示唆されている。過去には、進行大腸がんで *LIMK2* 発現低下が予後不良に関連したという報告もあるが [16]、機能欠失型バリアントと発がんメカニズムとの関連は十分明らかではない。Chubb らの 55 歳以下の大腸がん患者 1006 人と 1609 人の対照群を比較した検討では、我々の研究で抽出されたものと同じ *LIMK2* p. p. G574Rfs*12 が大腸がん易罹患性バリアントの候補として挙げられており、注目すべき点である [17]。*RECQL* は RECQL ファミリーに属する DNA ヘリカーゼの 1 種であり、DNA 修復、細胞周期、テロメアの維持などに関与すると考えられている。同じ RECQL ファミリーに属する *BLM*, *WRN* は常染色体劣性遺伝性疾患として、特徴的な表現型やがん易罹患性との関連が知られている。*RECQL* については、複数の症例対照研究で *RECQL* のバリアントが乳がんのリスク因子として報告されているものの [18, 19]、他がん種についてはエビデンスが乏しく、検討が必要である。

今回我々は、AYA 大腸がんのみを対象として中等度リスクバリアントの候補を抽出した。今後は、当院で保有する AYA 世代以外の大腸がん症例についても Taqman 法でタイピングを行うことにより、着目したバリアントが全大腸がんに共通して認められるものか、若年発症特異的であるのかを検討していく予定である。また、腫瘍検体がある症例については、体細胞変異解析やシグネチャー解析などを組み合わせることにより、今回同定したバリアントの腫瘍形成におけるメカニズムを検討し、AYA 世代発症大腸がんの予防法の構築や治療選択へ応用していきたい。

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

現在、腫瘍の診療において包括的ゲノムプロファイリングをはじめとして、ゲノム医療は盛んに行われるようになっている。一方、保険診療となった Foundation One Cdx や NCC Oncoguide を行っても治療標的となる遺伝子変異が見つかる症例は 1 割程度とされ、実際に検出される多くのバリアントは VUS と評価されるか、治療標的とならないのが現状である。今後、多くの症例を集積することで、発がんに寄与する生殖細胞系列バリアントの意義解明につなげていきたい。

表1 既知の遺伝性腫瘍と関連の強い36遺伝子

APC	ATM	AXIN2	BARD1	BLM	BMPR1A
BRCA1	BRCA2	BRIP1	CDH1	CDK4	CDKN2A
CHEK2	EPCAM	FLCN	GREM1	HOXB13	MLH1
MLH3	MSH2	MSH3	MSH6	MUTYH	NBN
NF1	NTHL1	PALB2	PMS2	POLD1	POLE
PTEN	RAD51C	RAD51D	SMAD4	STK11	TP53

表 2 患者病変背景

患者背景 (n = 379)	
診断年齢、中央値 (範囲)	37 (19-44)
19-24 歳	13 (3%)
25-29 歳	28 (7%)
30-34 歳	71 (19%)
35-39 歳	166 (44%)
40-44 歳	101 (27%)
性別	
男性	218 (58%)
女性	161 (42%)
本人既往歴 (重複あり)	
胃がん	4 (1%)
子宮体がん	2 (0.5%)
子宮頸がん	4 (1%)
乳がん	3 (0.8%)
その他	7 (2%)
家族歴 (第二度近親者まで)	
大腸がん	61 (16%)
胃がん	61 (16%)
子宮体がん	4 (1%)
乳がん	11 (3%)
卵巣/卵管がん	4 (1%)
前立腺がん	4 (1%)
膵がん	15 (4%)
病変特徴	
部位	
虫垂	7 (2%)
盲腸	4 (1%)
上行結腸	33 (9%)
横行結腸	36 (9%)
下行結腸	19 (5%)
S 状結腸	96 (25%)
直腸	155 (41%)
複数部位	8 (2%)

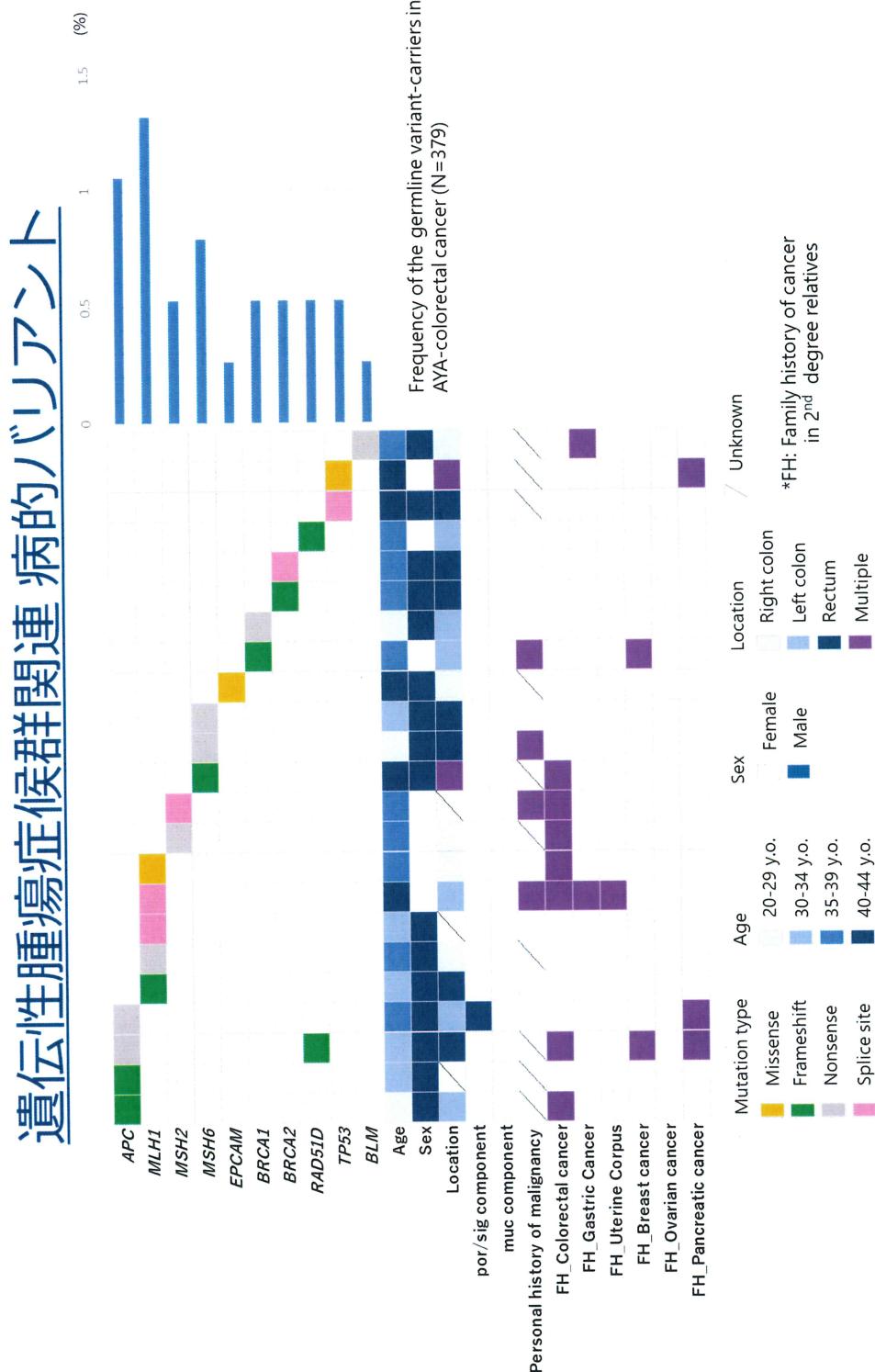
不明	21 (6%)
主組織型	
tub1/tub2/pap	245 (65%)
por/mic/sig	21 (6%)
adenosquamous	1 (0.3%)
不明	112 (30%)

表 2 AYA 世代大腸がんの中等度リスク候補バリアント

Gene name	Chr	Start	Ref	Alt	AYA 大腸がん バリアントアレル数			対照群 オッズ比 [†]		
					HGVSp (HGVSc)	全体 (n=379)	≤39 歳 (n=278)	左側結腸 /直腸 (n=271)	アレル 頻度	全体 頻度
<i>LIMK2</i>	chr22	31276790	-	C	p. G574Rfs*12	5	4	3	0. 0035	1. 87*
<i>SLC25A13</i>	chr7	96189372	CATA	-	p. M285Pfs*2	4	3	1	0. 0028	1. 9*
<i>MYH8</i>	chr17	10406923	C	-	p. C675Vfs*22	3	2	2	0. 0024	1. 65*
<i>ZSWIM7</i>	chr17	15981114	AT	-	p. C78Ffs*21	3	1	3	0. 00013	31. 4*
<i>NSMCE2</i>	chr8	125182232	C	T	p. Q132*	3	2	2	0. 0012	3. 3*
<i>XPA</i>	chr9	97687762	C	G	p. X130_Splice (c. 390-1G>C)	3	1	2	0. 002	2. 02*
<i>RECQL</i>	chr12	21499569	A	G	p. Met1?	3	3	3	0. 0022	1. 79*
									2. 44*	2. 51*

^{*}各群で n = 3 かつ、非がんコントロールオッズ比 1.5 倍以上[†]AYA 大腸がん症例の各群における対照群（ナショナルバイオバンクネットワーク、n = 7898）に対するオッズ比

図 1



[引用文献]

1. Sung JJ, Chiu H-M, Jung K-W, et al. Increasing trend in young-onset colorectal cancer in Asia: more cancers in men and more rectal cancers. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG.* 2019;114(2):322-9.
2. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, et al. Prevalence and spectrum of germline cancer susceptibility gene mutations among patients with early-onset colorectal cancer. *JAMA oncology.* 2017;3(4):464-71.
3. Ahnen DJ, Wade SW, Jones WF, et al., editors. *The increasing incidence of young-onset colorectal cancer: a call to action.* Mayo Clinic Proceedings; 2014: Elsevier.
4. Liu X, Takata S, Ashikawa K, et al. Prevalence and spectrum of pathogenic germline variants in Japanese Patients with early-onset colorectal, breast, and prostate cancer. *JCO Precision Oncology.* 2020;4:183-91.
5. Rotunno M, Barajas R, Clyne M, et al. A systematic literature review of whole exome and genome sequencing population studies of genetic susceptibility to cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers.* 2020;29(8):1519-34.
6. Stoffel EM, Koeppe E, Everett J, et al. Germline genetic features of young individuals with colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2018;154(4):897-905. e1.
7. Valle L, de Voer RM, Goldberg Y, et al. Update on genetic predisposition to colorectal cancer and polyposis. *Molecular aspects of medicine.* 2019;69:10-26.
8. Mao R, Krautscheid P, Graham RP, et al. Genetic testing for inherited colorectal cancer and polyposis, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine.* 2021;23(10):1807-17.
9. AmpliSeq for Illumina Inherited Cancer Research Panel. [02/05/2022]; Available from: <https://www.illumina.com/products/by-brand/ampliseq/community-panels/inherited-cancer.html>.
10. Huang K-I, Mashl RJ, Wu Y, et al. Pathogenic germline variants in 10,389 adult cancers. *Cell.* 2018;173(2):355-70. e14.
11. Rahman N. Realizing the promise of cancer predisposition genes. *Nature.* 2014;505(7483):302-8.

12. Knijnenburg TA, Wang L, Zimmermann MT, et al. Genomic and molecular landscape of DNA damage repair deficiency across The Cancer Genome Atlas. *Cell reports*. 2018;23(1):239–54. e6.
13. Tomita N, Ishida H, Tanakaya K, et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2020 for the clinical practice of hereditary colorectal cancer. *International Journal of Clinical Oncology*. 2021;26(8):1353–419.
14. Fujita M, Liu X, Iwasaki Y, et al. Population-based screening for hereditary colorectal cancer variants in Japan. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2020.
15. Panda S, Banerjee N, Chatterjee S. Solute carrier proteins and c-Myc: a strong connection in cancer progression. *Drug Discovery Today*. 2020;25(5):891–900.
16. Lourenço FC, Munro J, Brown J, et al. Reduced LIMK2 expression in colorectal cancer reflects its role in limiting stem cell proliferation. *Gut*. 2014;63(3):480–93.
17. Chubb D, Broderick P, Dobbins SE, et al. Rare disruptive mutations and their contribution to the heritable risk of colorectal cancer. *Nature communications*. 2016;7(1):1–7.
18. Cybulski C, Carrot-Zhang J, Klužniak W, et al. Germline RECQL mutations are associated with breast cancer susceptibility. *Nature genetics*. 2015;47(6):643–6.
19. Debnath S, Sharma S. RECQL helicase in genomic stability and cancer. *Genes*. 2020;11(6):622.