

700500134 A

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「肺がん感受性を規定する遺伝子に関する研究」

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 横田 淳

平成18(2006)年4月

# 目次

## I. 総括研究報告 -----1

肺がん感受性を規定する遺伝子に関する研究

横田 淳

## II. 分担研究報告

本研究は、主任研究者の統括のもと、以下に記すような役割分担をもって、ひとつの研究が遂行されるものであり、研究経費は主任研究者に一括計上されている。よって、総括研究報告をもって本研究の報告とし、分担研究報告書は提出しないものとさせて頂く。

本研究における役割分担

横田 淳：研究の統括

河野 隆志：遺伝子多型、遺伝子機能の解析

坂本 裕美：遺伝子多型の解析

猪子 英俊：遺伝子多型（マイクロサテライト多型）の解析

國頭 英夫：検体の収集、診療情報の解析

鈴木 健司：診療情報の解析

山本 精一郎：統計解析

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----6

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

肺がん感受性を規定する遺伝子に関する研究

主任研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部・部長

研究要旨

肺がん感受性を規定する遺伝子同定のための症例対照研究に必要な血液試料・診療情報の収集を行った。その結果、肺がん症例は、2,000 例に達した。病理組織型の内訳は、腺がんが 1,400 例、扁平上皮がんが 300 例、小細胞がんが 150 例、その他が 150 例であった。約 100-kb 間隔で散在する 27,000 箇所のマイクロサテライト多型に関して、200 例の肺腺がん症例、非がん対照の DNA からなる DNA プールを用い、アレール分布の比較を行った。その結果、2 群間で統計学的に有意にアレール分布の異なる多型 100 個を同定した。マウス肺腺腫感受性遺伝子に対応するヒト遺伝子 LRMP、LAS1、KRAS2 に存在する遺伝子多型を 10 個同定した。これらの多型間の連鎖不平衡を調査し、ハプロタイプの推定を行った。36 個の DNA 修復酵素遺伝子に存在するアミノ酸置換を伴う多型 50 個について、肺がんリスクとの相関解析を行った。その結果、塩基除去修復遺伝子である MTH1 の多型と肺小細胞がんリスクとの相関を見出した。また、MTH1 遺伝子の多型は、特に軽度喫煙者の肺小細胞がんのリスクを上昇させることを見出した。一方、OGG1 遺伝子の多型は、肺腺がんのリスクと相関すること、また、その相関は喫煙による影響は少ないことを見出した。細胞の DNA 切断修復活性を測定するためのプラスミドベクターを構築した。

分担研究者

横田 淳	国立がんセンター研究所	部長
河野 隆志	国立がんセンター研究所	室長
坂本 裕美	国立がんセンター研究所	室長
猪子 英俊	東海大学医学部	教授
國頭 英夫	国立がんセンター中央病院	医長
鈴木 健司	国立がんセンター中央病院	医員
山本精一郎	国立がんセンターがん 予防・検診研究センター	室長

A. 研究目的

肺がんは死亡率の最も高い難治がんであり、効果的な予防法の開発が強く望まれている。本研究の目的は、肺がん感受性を規定する遺伝要因を解明し、肺がん予防実現に向けた分子情報を得ることである。肺がんは、本邦のがん死要因の一位であり、代表的な難治がんである。近年肺がん治療に有効な分子標的治療薬が開発されているものの、その奏功性は特定の肺がんに限られていることも

明らかにされ、肺がん死亡を著しく減少させるには至っていない。従って、肺がん死亡率の減少には、効果的な肺がん罹患への予防法を開発する必要がある。申請者らの研究を含め、これまでの研究により、肺がんの家族集積は極めて稀であることが明らかにされている。よって、遺伝子の変異を惹起する環境要因と環境要因の影響を左右する遺伝要因（遺伝子多型）が、体内・細胞内の発がん物質蓄積量の個体差をもたらし、肺がん感受性に関与することが示唆されてきた。そして、これまでは主に、環境要因としてはタバコの煙に含まれる発がん物質に関して、また、遺伝要因としてはその代謝酵素遺伝子群の解析が行われてきた。しかし、これらの遺伝子群の関与はいまだ確定的なものではない。また、喫煙との関連の弱い肺腺がんが、本邦や欧米の最も頻度の高い組織型の肺がんであることを考えると、煙草以外の因子による肺発がんの分子基盤を解明することが将来の肺がん予防に必須である。本研究では、詳細かつ正確な診療情報を持つ肺がん症例 1,500 以上

を用い、高い統計学的検出力のもとに種々の遺伝子多型に関する症例対照研究を行うことで、肺発がん感受性遺伝子群を同定する。

研究計画初年度にあたる今年度は、肺がん感受性を規定する遺伝子同定のための症例対照研究の体制、基盤作りを主目標として、研究を進めた。その結果、来年度以降の研究に有用な血液試料及び、それに附随する喫煙歴、病理組織型等の診療情報が収集され、現在も継続している。また、肺がんリスクと遺伝子型の相関、喫煙との相互作用の検討を開始した。それに加え、肺非小細胞がんリスクと相関を示す DNA 切断修復遺伝子群が司る細胞内 DNA 切断修復活性を測定するための実験系の構築に着手した。以下に本年度の研究方法与成果を列記する。

## B. 研究方法

### 1. 症例対照研究のための血液試料の収集

国立がんセンター中央病院の入院、及び、外来患者より、書面同意のもと、20ml の採血血液の採取を行った。また、年齢、性別、喫煙歴及び、患者の家族、両親等近親者のがん既往歴等の情報を採取した。手術摘出標本及び、細胞診標本から得られた腫瘍細胞の病理学的所見の情報を得た。血液試料、診療情報を国立がんセンター個人識別情報管理室において連結可能匿名化した後、遺伝子解析に用いた。

### 2. 肺腺がん感受性遺伝子同定に向けた全ゲノム相関解析

それぞれ 200 例の肺腺がん症例、非がん対照の DNA を等量ずつ混合した DNA プールを作製した。DNA プールに対し、約 100-kb 間隔でヒトゲノムに分布する 27,000 個のマイクロサテライト多型を含む DNA 断片を蛍光標識プライマーにて PCR 増幅し、オートシーケンサーにて泳動した。各多型アレルに対応するピークの高さより、各プール中の多型アレルの本数を推定し、肺腺がん症例群、非がん対照群でのアレル分布を比較した。2xm カイ 2 乗検定で統計学的に有意差の見られたマイクロサテライト多型に対して、別の 200 例の肺腺がん症例、非がん対照の DNA からなる DNA プールの解析を同様の方法で行った。

### 3. マウス肺腺腫感受性遺伝子群 (Pas1 候補遺伝子群) に対応するヒト遺伝子の解析

肺がん患者、非がん対照それぞれ 24 人の DNA に関して、LRMP、LAS1、KRAS2 遺伝子の各エクソンを PCR 増幅し、PCR 産物の塩基配列を決定することによって遺伝子多型を同定した。アミノ酸置換を伴う多型、日本人におけるマイナーアレル頻度が 10%

以上と推定される多型をあわせて 10 個同定した。これらの多型について非がん対照 250 人の遺伝子型をパイロシーケンシング法により決定し、EM アルゴリズムを用いて、ハプロタイプの推定を行った。

### 4. DNA 修復酵素遺伝子多型と肺発がんリスクとの相関解析

36 個の DNA 修復酵素遺伝子に存在するアミノ酸置換を伴う多型 50 個について、肺小細胞がん 211 例の遺伝子型を決定した。遺伝子型の決定には、パイロシーケンシング法を用いた。ロジスティック回帰分析により、各遺伝子型保持者のオッズ比を算出した。

### 5. DNA 切断修復活性の測定系の構築

pMY189 プラスミド、pmaxGFP プラスミドに、400-bp 及び、10-bp のタンデムリピート配列を挿入することにより、pREC、pREC1、pREC2 プラスミドを作成した。制限酵素処理により、タンデムリピート間でプラスミド DNA を切断した後、培養ほ乳類細胞に導入した。11~16 時間後、環状化されたプラスミドを回収し、切断点結合部の構造を解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究の実施に当たっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、書面での同意のもと試料提供を受け、試料を匿名化することで、試料提供者のプライバシーの保護を行った。また、本研究は国立がんセンター遺伝子解析研究倫理審査委員会において審査を受け、総長の承認を得て実施した。

## C. 研究結果

### 1. 症例対照研究のための血液試料の収集 (國頭 鈴木)

国立がんセンター中央病院の肺がん症例の収集を行った。その結果、肺がん症例は、本研究開始以前に収集したものを合わせ、2,000 例に達した。病理組織型の内訳は、腺がんが 1,400 例、扁平上皮がんが 300 例、小細胞がんが 150 例、その他が 150 例であった。また、非がん対照群の収集を合わせて行い、現在までの収集数は 300 例に達した。症例・対照共に、年齢、性別、喫煙歴及び、患者の近親者のがん既往歴等の情報を、血液試料とともに連結可能匿名化した。これまでに収集した慶応大学の健常人ボランティア 800 人をあわせると、肺がん症例は、2,000 例、非がん対照 1,100 例となった。

### 2. 肺腺がん感受性遺伝子同定に向けた全ゲノム相関解析 (横田、河野、猪子、坂本)

約 100-kb 間隔で散在する 27,000 箇所のマイクロサテライト多型に関して、200 例の肺腺がん症例、非がん対照の DNA からなる DNA プールの genotyping を行った。その結果、統計学的に有意なアレル分布の違いを示した多型は 2,106 個であった。このうち、138 個がさらなる別の DNA プールの解析において、統計学的に有意なアレル分布の違いを示した。

### 3. マウス肺腺腫感受性遺伝子群 (Pas1 候補遺伝子群) に対応するヒト遺伝子の解析 (横田、河野)

マウス Pas1 候補遺伝子に対応するヒト遺伝子 LRMP、LAS1、KRAS2 に存在する遺伝子多型を 10 個同定した。これらの多型のうち 2 つはアミノ酸置換を伴うものであり、ひとつは 3'-非翻訳領域の塩基置換であった。10 多型間の連鎖不平衡を調査し、ハプロタイプの推定を行った。10 多型のうち、LAS1、KRAS2 遺伝子に亘る 60-kb の領域に散在する 5 多型が、強い連鎖不平衡の関係にあること (連鎖不平衡係数 $>0.9$ )、日本人の染色体の 90% が、5 多型に関して 3 つのハプロタイプで説明されることを見出した。

### 4. DNA 修復酵素遺伝子多型と肺発がんリスクとの相関解析 (横田、河野、山本)

36 個の DNA 修復酵素遺伝子に存在するアミノ酸置換を伴う多型 50 個について、肺がんリスクとの相関解析を行った。その結果、塩基除去修復遺伝子である MTH1 の多型と肺小細胞がんリスクとの相関を見出した (マイナーアレル保持者の非保持者に対する調整オッズ比 $=1.6$ 、P 値 $=0.004$ )。また、MTH1 遺伝子の多型は、特に軽度喫煙者の肺小細胞がんのリスクを上昇させることを見出した。一方、OGG1 遺伝子の多型は、肺腺がんのリスクと相関すること (マイナーアレルのホモ接合体のメジャーアレルのホモ接合体に対する調整オッズ比 $=1.5$ 、P 値 $=0.04$ )、また、その相関は喫煙による影響は少ないことを見出した。また、p53 遺伝子の多型は、肺小細胞がん、非小細胞がん双方のリスクに相関することが示唆された。

### 5. DNA 切断修復活性の測定系の構築 (河野、横田)

非小細胞がんリスクとの関与が示唆される DNA 切断修復活性の測定系の構築を開始した。具体的には、修復活性の検出に加え、DNA 切断断端の塩基相同性の利用等、修復経路を推定できるプラスミド pREC、pREC1、pREC2 を構築した。これらのプラスミドを線状化し、培

養ほ乳類細胞に導入すると、細胞内の DNA 切断修復活性によって環状化されること、また、その際、相同塩基を介して、あるいは介さずに修復されることが示された。

### D. 考察

1. 本研究で収集された検体は、均一、かつ、詳細、正確な診療情報が付随しているため、適切に組織型等の因子と遺伝子多型との相互作用の解析が行えると考えられる。また、肺腺がんの前がん病変と考えられる異型腺腫様過形成の多発症例 39 例、50 才未満での発症例 150 例等、強い遺伝的素因の関与が疑われる症例が含まれており、感受性遺伝子の探索に適していると考えられる。また、非喫煙症例が全体の 40% を占めており、喫煙以外の環境因子と相互作用する遺伝的要因を同定できる可能性が高い。

2. 全ゲノム相関解析で同定された 138 個のマイクロサテライト多型周辺には、これまでに肺がんリスクとの相関が報告された遺伝子は存在していない。よって、新規肺腺がん感受性遺伝子が存在する可能性が高い。200 例の肺腺がん症例、非がん対照群のからなる 3rd セットの相関解析を進め、再現性良く相関を示す多型座を同定することが必要である。

3. マウス肺腺腫感受性遺伝子群に対応するヒト LRMP、LAS1、KRAS2 遺伝子に関しては、データベースに存在しない多型を独自に同定している。また、上述のごとく本研究で収集された検体には、ヒト肺腺腫に相当する異型腺腫様過形成の情報が附随していることから、ヒトにおける肺腺がんだけでなく、肺腺腫へのリスクを検討することも可能である。今年度の研究で同定した多型、ハプロタイプと、肺腺がん、肺腺腫リスクとの相関を明らかにしたい。

4. DNA 修復遺伝子に関しても、データベースに存在しない多くの多型を申請者らは独自に同定している。よって、世界に先駆けて相関の結果を得ている状況にある。今後、DNA 損傷の発生率を規定する薬物代謝酵素遺伝子の多型等を含め、複数の多型の組み合わせに基づく相関の変動を明らかにすることで、DNA 修復遺伝子多型群の肺発がん感受性における役割を明らかにできると考える。

5. DNA 切断修復は、肺がんを含めた複数のがん種の発生リスクへの関与が示唆されるものの、活性に個人差が存在するのか、存在するならば、

DNA 切断修復遺伝子の多型によって規定されているか否かは明らかではない。本研究で構築したプラスミドを用いることにより、ほ乳類細胞における DNA 切断修復活性の検出、修復経路の同定を可能にしてゆきたい。今後、本測定系を確立し、DNA 切断修復活性の個人差と肺がんリスクと関わりについて、検討していく予定である。

#### E. 結論

本研究で得られた結論は以下のごとくであり、概ね当初の計画通り、研究が進行している。

1. 症例対照研究のための血液試料の収集を行い、肺がん症例は約 2,000 例に達した。これらの検体には、均一、かつ詳細な診療情報が附随していることから、肺がんリスクに関する相関解析に有用である。
2. 全ゲノム約 100-kb 間隔に位置する遺伝子多型に対する相関解析を行い、肺腺がんリスクと相関を示す多型 138 個を同定した。これらの多型周辺に、新規肺腺がん感受性遺伝子が存在する可能性がある。
3. マウス肺腺腫感受性遺伝子群 (Pas1 候補遺伝子群) に対応するヒト遺伝子の多型を同定し、ハプロタイプを推定した。今後、これらの多型、ハプロタイプと、肺がん、肺腺腫リスクとの相関解析を行う必要がある。
4. DNA 修復酵素遺伝子 MTH1、OGG1 の多型は、肺小細胞がん、腺がんリスクを規定している可能性がある。
5. 本研究で構築されたプラスミドベクターを用いることで、細胞の DNA 切断修復活性を評価できる可能性がある。

本研究のさらなる進展は、肺発がん感受性遺伝子群の同定のみならず、それらの肺発がん感受性における意義の解明につながると考えられる。

#### F. 健康危険情報

全ての実験の研究内容は、組換え DNA 安全委員会に計画書を提出し、適切な計画が基準に従った施設において行われていることが承認されている。また、本研究は遺伝子倫理審査委員会の承認のもと、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従って遂行されている。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sakiyama T, Kohno T, Mimaki S, Ohta T, Yanagitani N, Sobue T, Kunitoh H, Saito R, Shimizu K, Hiramata C, Kimura J, Maeno G, Hirose H, Eguchi T, Saito D, Ohki M, Yokota J. Association of amino acid substitution polymorphisms in DNA repair genes, TP53, POLI, REV1 and LIG4, with lung cancer risk. *Int J Cancer*, 114: 730-737, 2005.
2. Sasaki S, Sato M, Katsura Y, Kurimasa A, Chen DJ, Takeda S, Kuwano H, Yokota J, Kohno T. Rapid assessment of two major repair activities against DNA double-strand breaks in vertebrate cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 339:583-590, 2006.
3. Sato M, Sasaki H, Kazui T, Yokota J, Kohno T. Probing the chromosome 9p21 region susceptible to DNA double-strand breaks in human cells in vivo by restriction enzyme transfer. *Oncogene*, 24: 6108-18, 2005.
4. Matsumoto S, Iwakawa R, Kohno T, Suzuki K, Matsuno Y, Yamamoto S, Noguchi M, Shimizu E, Yokota J. Frequent EGFR mutations in non-invasive bronchioloalveolar carcinoma. *Int J Cancer*, 118: 2498-504, 2006.
5. Matsumoto S, Takahashi K, Iwakawa R, Matsuno Y, Nakanishi Y, Kohno T, Shimizu E, Yokota J. Frequent EGFR mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma. *Int J Cancer*, in press.
6. Sato M, Takahashi K, Nagayama K, Arai Y, Ito N, Okada M, Minna JD, Yokota J, Kohno T. Identification of chromosome arm 9p as the most frequent target of homozygous deletions in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 44: 405-414, 2005.
7. Takahashi K, Kohno T, Ajima R, Sasaki H, Minna JD, Fujiwara T, Tanaka N, Yokota J. Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer. *Int J Oncol*, 28: 321-328, 2006.
8. Liu Y, Yoshimura K, Hanaoka T, Ohnamni S, Ohnami S, Kohno T, Yoshida T, Sakamoto

H, Sobue T, Tsugane S. Association of habitual smoking and drinking with single nucleotide polymorphism (SNP) in 40 candidate genes: data from random population-based Japanese samples. J Hum Genet, 50:62-68, 2005.

9. Takano T, Ohe Y, Sakamoto H, Tsuta K, Matsuno Y, Tateishi U, Yamamoto S, Nokihara H, Yamamoto N, Sekine I, Kunitoh H, Shibata T, Sakiyama T, Yoshida

T, Tamura T. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol, 23:2829-2837, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録情報

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし。

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakiyama T, <u>Kohno T</u> , Mimaki S, Ohta T, Yanagitani N, Sobue T, <u>Kunitoh H</u> , Saito R, Shimizu K, Hirama C, Kimura J, Maeno G, Hirose H, Eguchi T, Saito D, Ohki M, <u>Yokota J</u> .	Association of amino acid substitution polymorphisms in DNA repair genes, TP53, POLI, REV1 and LIG4, with lung cancer risk.	Int J Cancer	114	730-737	2005
Sasaki S, Sato M, Katsura Y, Kurimasa A, Chen DJ, Takeda S, Kuwano H, <u>Yokota J</u> , <u>Kohno T</u> .	Rapid assessment of two major repair activities against DNA double- strand breaks in vertebrate cells.	Biochem Biophys Res Commun	339	583-590	2006
Sato M, Sasaki H, Kazui T, <u>Yokota J</u> , <u>Kohno T</u> .	Probing the chromosome 9p21 region susceptible to DNA double-strand breaks in human cells in vivo by restriction enzyme transfer.	Oncogene	24	6108-618	2005
Matsumoto S, Iwakawa R, <u>Kohno T</u> , Suzuki K, Matsuno Y, Yamamoto S, Noguchi M, Shimizu E, <u>Yokota J</u> .	Frequent EGFR mutations in non- invasive bronchioloalveolar carcinoma.	Int J Cancer	118:	2498- 2504.	2006
Matsumoto S, Takahashi K, Iwakawa R, Matsuno Y, Nakanishi Y, <u>Kohno T</u> , Shimizu E, <u>Yokota J</u> .	Frequent EGFR mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma.	Int J Cancer	in press	in press	2006
Sato M, Takahashi K, Nagayama K, Arai Y, Ito N, Okada M, Minna JD, <u>Yokota J</u> , <u>Kohno T</u> .	Identification of chromosome arm 9p as the most frequent target of homozygous deletions in lung cancer.	Genes, Chromosomes Cancer	44	405-414	2005
Takahashi K, <u>Kohno T</u> , Ajima R, Sasaki H, Minna JD, Fujiwara T, Tanaka N, <u>Yokota J</u> .	Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer.	Int J Oncol	28	321-328	2006



Liu Y, Yoshimura K, Hanaoka T, Ohnamni S, Ohnami S, <u>Kohno T</u> , Yoshida T, <u>Sakamoto H</u> , Sobue T, Tsugane S.	Association of habitual smoking and drinking with single nucleotide polymorphism (SNP) in 40 candidate genes: data from random population-based Japanese samples.	J Hum Genet	50	62-68	2005
Takano T, Ohe Y, <u>Sakamoto H</u> , Tsuta K, Matsuno Y, Tateishi U, <u>Yamamoto S</u> , Nokihara H, Yamamoto N, Sekine I, <u>Kunitoh H</u> , Shibata T, Sakiyama T, Yoshida T, Tamura T.	Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer.	J Clin Oncol	23	2829-2837	2005