

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 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 横田 淳

平成 19 (2007) 年 4 月

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、2,500例に達した。病理組織型の内訳は、腺がんが1,750例、扁平上皮がんが350例、小細胞がんが200例、その他が200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、それぞれ200例の肺腺がん症例、非がん対照のDNAからなる2セットのDNAプールを用い、アレル分布の比較を行った。その結果、症例対照間で統計学的に有意にアレル分布の異なる多型を15個に絞り込んだ。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と肺腺がん、肺腺腫リスクとの相関解析を開始した。36個のDNA修復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、各組織型の肺がんとのリスクとの相関解析を行い、MTH1、OGG1の多型と肺小細胞がん、肺腺がんとの相関を見出した。OGG1多型と肺腺がんとの相関は、6個の症例対照研究におけるメタ解析でも確認された。また、組織型間、喫煙習慣により、感受性を規定するDNA修復遺伝子群は異なることが示唆された。

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 対策情報センター	室長

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

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

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。

今年度は、昨年度より整備してきた血液試料、統計学的手段等の研究基盤をもとに相關研究を進め、幾つかの感受性遺伝子を同定した。また、組織亜型等の詳細な診療情報の収集を行い、肺がん罹患の有無だけでなく、肺腺腫や組織亜型別の相關解析を行った。新規肺発がん感受性遺伝子の同定に向け、ゲノム網羅的解析を進めた。

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、20 ml の末梢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關解析

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。2x_m Fisher 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。

また、200 例の肺腺がん症例、非がん対照に対する 100,000 個の一塩基多型に関する遺伝子型の決定は、Illumina 社 Human-1 チップを用いて行った。

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パイロシーケンス法により遺伝子型の決定を開始した。

4. DNA 修復遺伝子多型と肺発がんリスクとの相關解析

36 個の DNA 修復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、パイロシーケンス法を用いた。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。

（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、2,500 例に達した。病理組織型の内訳は、腺がんが1,750 例、扁平上皮がんが350 例、小細胞がんが200 例、その他が200 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350 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2,500 例、非がん対照1,150 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、それぞれ 200 例の肺腺がん症例、非がん対照の DNA からなる DNA プール2セットの解析を行った。その結果、両セットで再現性をもって統計学的に有意なアレル分布の違いを示した多型は15 個であった。また、また、200 例の肺腺がん症例、非がん対照に対して 100,000 個の一塩基多型に関する相関解析を開始した。

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。これらの多型について 300 例の肺腺がん手術症例、非がん対照における遺伝子型の決定を開始した。

4. DNA 修復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、各組織型の肺がんリスクとの相関解析を行った。その結果、MTH1、OGG1 の多型がそれぞれ肺小細胞がん、肺腺がんとの相関

することを見出した。OGG1 多型と肺腺がんとの相関は、本研究を含めた 6 個の症例対照研究におけるメタ解析でも確認された。また、組織型間、喫煙習慣により、感受性を規定する DNA 修復遺伝子群は異なることが示唆された。

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 15 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。今後、これらの多型周辺に存在する遺伝子の一塩基多型を解析することで、感受性遺伝子を同定して行きたい。

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、上述に示すヒト肺腺腫に相当する異型腺腫様過形成の情報を用い、肺腺腫へのリスクと相関する多型の探索を開始した。これまで、ヒト肺腺腫リスクと相関する多型を同定した報告はなく、独創性の高い結果であると考えられる。

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。症例数の拡大により、複数の多型の組み合わせによる相関の変動の解析が可能になったので、DNA 修復遺伝子をはじめとして、我々

及び他のグループの研究から同定されてくる多型群を対象として、各組織型の肺がんリスクにおける感受性遺伝子間の相互作用について検討して行く予定である。

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 2,500 例に達した。これらの検体は、均一かつ詳細な診療情報に付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 15 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、KRAS 遺伝子の多型が肺腺腫リスクと相関することを見出した。

4. DNA 修復遺伝子 MTH1、OGG1 の多型は、肺小細胞がん、腺がんリスクを規定する。また、組織間で、感受性を規定する DNA 修復遺伝子群は異なることが示唆された。

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. Kohno T, Sakiyama T, Kunitoh H, Goto K, Nishiwaki Y, Saito D, Hirose H, Eguchi T, Yanagitani N, Saito R, Sasaki-Matsumura R, Mimaki S, Toyama K, Yamamoto S, Kuchiba A, Tomotaka S, Ohta T, Ohki M, Yokota J. Association of Polymorphisms in the MTH1 gene with small cell lung carcinoma risk. *Carcinogenesis*, 27:2448-2454, 2006.
2. Kohno T, Kunitoh H, Toyama K, Yamamoto S, Kuchiba A, Saito D, Yanagitani N, Ishihara S, Saito R, and Yokota J. Association of the OGG1-Ser326Cys polymorphism with lung adenocarcinoma risk. *Cancer Science*, 97:724-728, 2006.
3. Katsura Y, Sasaki S, Sato M, Yamaoka K, Suzukawa K, Nagasawa T, Yokota J, Kohno T. Involvement of Ku80 in microhomology-mediated end joining for DNA double-strand breaks *in vivo*. *DNA Repair*. 2006, in press.
4. 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.
5. Kohno T, Yokota J. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions causing inactivation of the *p16* tumor suppressor gene in human cancer: Deduction from structural analysis of breakpoints for deletions. *DNA Repair*. 5:1273-1281, 2006.
6. 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*, 118:2498-2504, 2006.
7. Raimondi S, Paracchini V, Autrup H, Barros-Dios J, Benhamou S, Boffetta P, Cote M, Dialyna Ia, Dolzan V, Filiberti R, Garte S, Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Imyanitov E, Kalina I, Kang D, Kiyohara C, Kohno T. Kremers P, Lan Q, London S, Povey A, Rannug A, Reszka E, Risch A, Romkes M, Schneider J, Seow A, Shields P, Sobti R, Sorensen M, Spinola M, Spitz M, Strange R, Stucker I, Sugimura H, To-Figueras J, Tokudome S, Yang P, Yuan JM, Warholm M, Taioli E. Meta- and Pooled Analysis of GSTT1 and Lung Cancer: A HuGE-GSEC Review. *Am J Epidemiol.* 164:1027-1042, 2006.
8. Liu Y, Yoshimura K, Hanaoka T, Ohnamni S, Ohnami S, Kohno T. Yoshida T, Sakamoto H. Sobue, 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. 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.
10. 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: 6108-6118, 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
<u>Kohno T</u> , <u>Sakiyama T</u> , <u>Kunitoh H</u> , <u>Goto K</u> , <u>Nishiwaki Y</u> , <u>Saito D</u> , <u>Hirose H</u> , <u>Eguchi T</u> , <u>Yanagitani N</u> , <u>Saito R</u> , <u>Sasaki-Matsumura R</u> , <u>Mimaki S</u> , <u>Toyama K</u> , <u>Yamamoto S</u> , <u>Kuchiba A</u> , <u>Tomotaka S</u> , <u>Ohta T</u> , <u>Ohki M</u> , <u>Yokota J</u> .	Association of Polymorphisms in the MTH1 gene with small cell lung carcinoma risk.	Carcinogenesis	27	2448-2454	2006
<u>Kohno T</u> , <u>Kunitoh H</u> , <u>Toyama K</u> , <u>Yamamoto S</u> , <u>Kuchiba A</u> , <u>Saito D</u> , <u>Yanagitani N</u> , <u>Ishihara S</u> , <u>Saito R</u> , and <u>Yokota J</u> .	Association of the OGG1-Ser326Cys polymorphism with lung adenocarcinoma risk.	Cancer Science	97	724-728	2006
<u>Raimondi S</u> , <u>Paracchini V</u> , <u>Autrup H</u> , <u>Barros-Dios J</u> , <u>Benhamou S</u> , <u>Boffetta P</u> , <u>Cote M</u> , <u>Dialyna Ia</u> , <u>Dolzan V</u> , <u>Filiberti R</u> , <u>Garte S</u> , <u>Hirvonen A</u> , <u>Husgafvel-Pursiainen K</u> , <u>Imyanitov E</u> , <u>Kalina I</u> , <u>Kang D</u> , <u>Kiyohara C</u> , <u>Kohno T</u> , <u>Kremers P</u> , <u>Lan Q</u> , <u>London S</u> , <u>Povey A</u> , <u>Rannug A</u> , <u>Reszka E</u> , <u>Risch A</u> , <u>Romkes M</u> , <u>Schneider J</u> , <u>Seow A</u> , <u>Shields P</u> , <u>Sobti R</u> , <u>Sorensen M</u> , <u>Spinola M</u> , <u>Spitz M</u> , <u>Strange R</u> , <u>Stucker I</u> , <u>Sugimura H</u> , <u>To-Figueras J</u> , <u>Tokudome S</u> , <u>Yang P</u> , <u>Yuan JM</u> , <u>Warholm M</u> , <u>Taioli E</u> .	Meta- and Pooled Analysis of GSTT1 and Lung Cancer: A HuGE-GSEC Review.	Am J Epidemiol.	164	1027-1042	2006
<u>Katsura Y</u> , <u>Sasaki S</u> , <u>Sato M</u> , <u>Yamaoka K</u> , <u>Suzukawa K</u> , <u>Nagasawa T</u> , <u>Yokota J</u> , <u>Kohno T</u> .	Involvement of Ku80 in microhomology-mediated end joining for DNA double-strand breaks <i>in vivo</i> .	DNA repair	In press		

<u>Kohno T</u> , <u>Yokota J</u> .	Molecular processes of chromosome 9p21 deletions causing inactivation of the <i>p16</i> tumor suppressor gene in human cancer: Deduction from structural analysis of breakpoints for deletions.	DNA Repair	5	1273-1281	2006
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
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
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
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
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