

200707008B

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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～19年度 総合研究報告書

主任研究者 横田 淳

平成20 (2008) 年 4 月

目 次

| | | |
|----------------------|-------|---|
| I. 総合研究報告 | | |
| 肺がん感受性を規定する遺伝子に関する研究 | ----- | 1 |
| 横田 淳 | | |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 6 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 9 |

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合研究報告書

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。研究終了時点で、肺がん症例は2,500例に達し、対照群は2,000例に達した。肺がん症例の中には、最も高頻度でありながら喫煙との関連が弱く効果的な予防法のない腺がん1,300例、喫煙との関連し、最も悪性度が高い小細胞がん300例等、代表的な組織型のがんを含めた。肺がんリスクとPOLI、OGG1、TP53、LIG4、REV1、MTH1遺伝子の多型が相関することを見出した。また、これらの多型の相関には組織型による特異性が存在し、また、喫煙によって相関が変動することを見出した。KRASがん遺伝子の多型が、腺がんの前がん病変と考えられている異型腺腫様過形成（Atypical adenomatous hyperplasia）発生のリスクと相関することを見出した。全ゲノムに亘って約130-kb間隔で位置する23,000マイクロサテライト多型を用いた肺腺がんリスクに関するゲノム網羅的な相関解析を行い、7箇所の新規感受性遺伝子座を同定した。本研究で得られた情報・研究資源は今後の個別化肺がん予防の実現に向けた更なる研究に有用である。

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 |

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子を解明し、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はいるものの、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2,000例以上を用い、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。

主に、平成17-18年度は血液試料、統計学的手段等の研究基盤の整備を行い、平成18-19年度は相関研究を中心として研究を進め、感受性遺伝子を同定することを課題とした。

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の抹消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. DNA修復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、パイロシーケンス法を用いて遺伝子型を決定した。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。

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、KRAS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を決定した。

4. 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2セットずつ作製した。DNAプールに対し、約130-kb間隔でヒトゲノムに分布する23,000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。これら2セットのDNAプールの解析において、2x_m Fisher検定で再現性を持って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、DNAプール構成例を含む症例、対照各576例について個別タイピングし、アレル分布に有意差の見られるマイクロサテライト多型座を同定した。

(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。肺がん症例の中には、最も高頻度でありながら喫煙との関連が弱く効果的な予防法のない腺がん1,300例、喫煙と関連し、最も悪性度が高い小細胞がん300例等、代表的な組織型のがんを含めた。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2,000例に達した。症例・対照共に、年齢、性別、喫煙歴及び、肺腺腫 (異型腺腫様過形成: Atypical adenomatous hyperplasia) 併発等の情報を、血液試料とともに連結可能匿名化した。

2. 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)

DNA修復遺伝子に存在するアミノ酸置換を伴う50個の遺伝子多型に関する相関解析を行い、腺がんリスクとPOLI、OGG1、扁平上皮がんリスクとTP53、LIG4、REV1、小細胞がんリスクとMTH1遺伝子の多型が相関することを見出した。MTH1遺伝子の多型は、特に軽喫煙者において肺小細胞がんのリスクを上昇させることを示した。一方、OGG1多型等、他の多型は、喫煙との有意な相互作用を示さなかった。

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 (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、KRASに存在する遺伝子多型を10個同定した。KRASがん遺伝子の多型が、腺がんの前がん病変と考えられている腺腫病変 (異型腺腫様過形成) 発生のリスクと相関することを見出した。また、リスクとの相関を示した多型は、肺組織内でのKRAS遺伝子のmRNA発現量とも相関したことから、KRAS遺伝子群の多型がKRAS遺伝子の発現量に影響を与えると考えられた。

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)

全ゲノムに亘って約130-kb間隔で位置する23,000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ール分布の違いを示した多型は15個であった。DNAプール構成例を含む症例、対照各600例について個別タイピングした結果、アレール分布に有意差の見られるマイクロサテライト多型7個を同定した。

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を遂行できたと考える。また、手術症例については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情報が付随しており、肺がんのみならず肺腺腫感受性遺伝子の探索を同時に行うことが可能であった。また、非喫煙症例が全体の40%を占めており、喫煙に影響されない遺伝要因の同定が可能であった。収集された試料は本研究のみならず、今後の肺がんの遺伝要因探求のための有用な研究資源となると考える。

4. DNA修復遺伝子に関しては、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、世界に先駆けて相関の結果を得ることができた。特に、これらの多型の相関には組織型による特異性が存在し、また、喫煙によって相関が変動することを見出せたことは、きわめて先進的、かつ、有意義であると考えられる。

3. KRAS遺伝子多型と肺腺腫リスクとの相関に関しては、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、世界に先駆けた結果であると考えられる。また、この結果は、ヒトとマウスで共通の遺伝子が肺腺腫リスクを規定することを示すものである。

4. 全ゲノム相関解析で同定された7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と考えられる。今後、これらの多型座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。

E. 結論

本研究期間内で、感受性遺伝子同定のための症例対照研究に十分な数の試料が収集され、また、各代表的な組織型の肺がんへの感受性を規定する遺伝子群が同定された。また、一部の遺伝子では、喫煙による相関の変動が見出された。よって、本研究で肺がんの遺伝要因に関する基盤的な分子情報及び、肺がん予防実現へ向けた更なる研究のための研究資源が得られたため、計画通り、研究が進行したと判断する。

本研究で肺がんリスクとの相関が明らかにされた遺伝子群には、これまで、がん感受性遺伝子として同定されていない新規遺伝子群が多く

含まれている。よって、同研究分野の知見を大きく拡大させるものである。また、ゲノム網羅的な相関解析で見出された新規肺がん感受性遺伝子座、遺伝要因が未知であった肺腺腫・小細胞がんへの感受性を規定する遺伝子を同定できたことは、世界に先駆けた成果であり、その国際的な評価も高い。今後、本研究で得られた情報、研究資源を基盤とし、研究をさらに進めることで、個人の肺がんリスクprofilingやそれに基づいた個別化予防が実現できると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kohno T, Kunitoh H, Suzuki K, Yamamoto S, Kuchiba A, Matsuno Y, Yanagitani N, Yokota J. Association of KRAS polymorphisms with risk for lung adenocarcinoma accompanied by atypical adenomatous hyperplasias. *Carcinogenesis*, 2008, in press.
2. Maekawa T, Shinagawa T, Sano Y, Sakuma T, Nomura S, Nagasaki K, Miki Y, Saito-Ohara F, Inazawa J, Kohno T, Yokota J, Ishii S. Reduced levels of ATF-2 predispose mice to mammary tumors. *Mol Cell Biol*, 27:1730-1744, 2007.
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 (Amst)*. 6(5):639-648, 2007.
4. 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.
5. Kohno T, Kunitoh H, Toyama K, Yamamoto S, Kuchiba A, Saito D, Yanagitani N, Ishihara S, Saito R, Yokota J. Association of the OGG1-Ser326Cys polymorphism with lung adenocarcinoma risk. *Cancer Science*, 97:724-728, 2006.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
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.

11. Aoki M, Yamamoto K, Noshiro H, Sakai K, Yokota J, Kohno T, Tokino T, Ishida S, Ohyama S, Ninomiya I, Uesaka K, Kitajima M, Shimada S, Matsuno S, Yano M, Hiratsuka M, Sugimura H, Itoh F, Minamoto T, Maehara Y, Takenoshita S, Aikou T, Katai H, Yoshimura K, Takahashi T, Akagi K, Sairenji M, Yamamura Y, Sasazuki T. A full genome scan for gastric cancer. J Med Genet 42: 83-87, 2005.

12. Sato Y, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I, Sakamoto H, Yoshida T, Yoshimura K. The confidence interval of allelic odds ratios under the Hardy-Weinberg disequilibrium. J Hum Genet. 51(9):772-780, 2006.

13. Liu Y, Yoshimura K, Hanaoka T, Ohnami 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(2):62-68, 2005.

G. 知的財産権の出願・登録情報

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>Kunitoh H</u> , <u>Suzuki K</u> , <u>Yamamoto S</u> , Kuchiba A, Matsuno Y, Yanagitani N, <u>Yokota J</u> . | Association of KRAS polymorphisms with risk for lung adenocarcinoma accompanied by atypical adenomatous hyperplasias. | Carcinogenesis | | | 2008 In press |
| Maekawa T, Shinagawa T, Sano Y, Sakuma T, Nomura S, Nagasaki K, Miki Y, Saito-Ohara F, Inazawa J, <u>Kohno T</u> , <u>Yokota J</u> , Ishii S. | Reduced levels of ATF-2 predispose mice to mammary tumors. | Mol Cell Biol | 27 | 1730- 1744 | 2007 |
| Katsura Y, Sasaki S, Sato M, Yamaoka K, Suzukawa K, Nagasawa T, <u>Yokota J</u> , <u>Kohno T</u> . | Involvement of Ku80 in microhomology-mediated end joining for DNA double-strand breaks in vivo. | DNA Repair (Amst) | 6 | 639-648 | 2007 |
| <u>Kohno T</u> , Sakiyama T, <u>Kunitoh H</u> , Goto K, Nishiwaki Y, Saito D, Hirose H, Eguchi T, Yanagitani N, Saito R, Sasaki-Matsumura R, Mimaki S, Toyama K, <u>Yamamoto S</u> , Kuchiba A, Tomotaka S, Ohta T, Ohki M, <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> , Toyama K, <u>Yamamoto S</u> , Kuchiba A, Saito D, Yanagitani N, Ishihara S, Saito R, and <u>Yokota J</u> . | Association of the OGG1- Ser326Cys polymorphism with lung adenocarcinoma risk. | Cancer Science | 97 | 724-728 | 2006 |

| | | | | | |
|--|---|----------------------------|-----|-----------|------|
| 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, <u>Kohno T</u> , 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 |
| 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 |
| <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 |
| Sakiyama T, <u>Kohno T</u> , Mimaki S, Ohta T, Yanagitani N, Sobue T, <u>Kunitoh H</u> , Saito R, Shimizu K, Hiramata 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 |
| Aoki M, Yamamoto K, Noshiro H, Sakai K, <u>Yokota J</u> , <u>Kohno T</u> , Tokino T, Ishida S, Ohyama S, Ninomiya I, Uesaka K, Kitajima M, Shimada S, Matsuno S, Yano M, Hiratsuka M, Sugimura H, Itoh F, Minamoto T, Maehara Y, Takenoshita S, Aikou T, Katai H, Yoshimura K, Takahashi T, Akagi K, Sairenji M, Yamamura Y, Sasazuki T. | A full genome scan for gastric cancer. | J Med Genet | 42 | 83-87 | 2005 |
| Sato Y, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I, <u>Sakamoto H</u> , Yoshida T, Yoshimura K. | The confidence interval of allelic odds ratios under the Hardy-Weinberg disequilibrium. | J Hum Genet | 51: | 772-780 | 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 |