

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300346

研究課題名（和文） がん体質遺伝子診断法の確立とがんの予防、早期発見システムの開発

研究課題名（英文） Establishment of a genetic diagnosis system for cancer predisposition and its application to cancer prevention.

研究代表者

清水 憲二 (SHIMIZU KENJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・名誉教授

研究者番号：10037286

研究成果の概要（和文）：

孤発性癌の発症リスクに関与する遺伝子多型、特に1塩基多型(SNP)の重複による癌体質遺伝の解明と応用をめざした。のべ約8,000検体を解析し、53 SNPが17種の何れか1種以上の癌のリスクに関与した。関与するSNPの個人別重複を総積で評価し、多くの癌について日本人の約15%が高リスク群に、1%程が超高リスク群に属すること、肺腺癌等4種の癌では再現性が確認できたこと、リスクは男女間で異なること、癌の悪性化や肺癌の遺伝子変異に関係するSNPを同定できたこと、等が主な成果である。

研究成果の概要（英文）：

We have aimed to clarify the nature of genetic predisposition for sporadic cancers, influenced by genetic polymorphisms, such as single-nucleotide polymorphism (SNP). By analyzing about 8,000 specimens, we found 53 SNP are related with at least one of 17 major cancers in Japan. Stratification of the data of the multiplied OR of overlapping SNP for each cancer and each individual revealed that about 15% and 1% of the Japanese represent the high- and the highest risk-group for most cancers, respectively. Other major findings are, about half of the SNPs at risk were replicated between two case/control data sets on 4 kinds of cancers, Risk-SNP combinations were largely different between genders, some SNPs were identified as those closely associated with cancer-progression or occurrence of specific gene alterations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2012年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：分子腫瘍学・分子疫学

科研費の分科・細目：腫瘍学・がん疫学・予防

キーワード：癌発症危険度、癌体質遺伝、遺伝的多型、リスク遺伝子型重複、癌の早期発見、コホート研究

1. 研究開始当初の背景

我が国の死因第一位を占める悪性腫瘍については毎年約60万人が発症している。最近

の統計によると、国内の悪性腫瘍による年間死亡数は35万人といわれ、高齢化の進行に伴って今後ますます増大すると推計されて

いる。がんの一次予防は発症自体の防止で、二次予防は早期発見である。罹患リスクの評価に基づく生活習慣の改善と適確な予防措置、早期発見に直結する高リスク者、高リスク臓器に重点的な集中検査は、これら二つの予防を共に実現可能とする方法である（テーラーメイドがん検診）。更に、がんの悪性化に関する分子診断や抗がん剤に対する反応性の予測も極めて重要な領域である。

本研究代表者らは平成 21 年度までの 10 年間にわたる癌特定領域研究、「癌発症に関する遺伝的素因重複の研究」から、日本人の全癌患者の約 7 割を占める肺腺癌、肺扁平上皮癌、頭頸部癌、食道癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌の 9 種の癌について、計 1,800 検体を用いて候補遺伝子解析法で解析した結果、総計約 350 SNP 中 47 SNP が有意なリスクを示した。その結果から、日本人の約 8 割を占める低リスク群、約 2 割を占める高リスク群、約 0.5-1.5%を占める超高リスク群を診断できる方法を確立した。これまでの世界中の研究でも、個人毎に多数の遺伝素因の重複を広く解析し、がん発症リスクを総合的に評価する試みは、単一の癌種についても乳癌や前立腺癌以外には例がなかった。まして、多くの癌種について、個人別の発症リスクを総合的に解析した研究報告は全くなかった。肥満、糖尿病などの生活習慣病に関しては、日本でも遺伝子検査が広く行なわれている。

2. 研究の目的

本研究課題では 3 年以内に、がんのうちこれまで解析していなかった胆道癌、肝癌、肺小細胞癌、子宮癌、卵巣癌、尿路系腫瘍、造血器腫瘍などについても研究を進め、日本の全悪性腫瘍患者の約 90 %を占める 17 群の悪性腫瘍の発症および悪性化高リスク群の総合的がん体質遺伝診断法を確立する。これを前向き検証や再現性試験により確認し、がんの予防と早期発見に貢献しようとするものである。

また、癌の種類によっては、悪性化に関与する遺伝子多型の同定、特別な状況下での発症、例えば分子標的抗癌剤イレッサに反応する EGF 受容体遺伝子変異をもつ肺癌、C 型肝炎ウイルス陽性肝炎からの肝癌発症に至るリスク、多様性と類似性を示す婦人科癌の総合的な解析、なども試みた。

3. 研究の方法

本研究課題は、これまでにほぼ達成した 9 種の癌に加えて、胆道癌、肝癌、肺小細胞癌、子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌、尿路系腫瘍、造血器腫瘍についても発症の危険度に関与する遺伝子多型の重複解析を行なう。方法は、がん患者 4,700 検体と健常人対照 3,500 検体の DNA を SnapShot 法又は Mass-Array 法によって総計 60 種の ms-SNP を解析する。解析対

象遺伝子は癌に関係する様々な遺伝子群で、多数回解析の統計学的限界を考慮して特にアミノ酸置換型のミスセンス 1 塩基多型 (ms-SNP), 約 60 SNP に焦点を絞って解析する。また、岡山地区の健常人被験者 1,600 名はがん年齢に達した継続的人間ドック受診者かフォローアップ非癌患者なので、上記の 9 種類の癌に関する追跡調査（がん早期発見診断トライアル）を今後少なくとも 5 年間継続して予測的中率を検証する。更に、癌患者検体数が 200 を超えたがん種のデータについては、独立した患者/健常人検体セットによる再現性試験を実施する。それらの結果を基に、癌種ごと、個人ごとに、尤度/層別解析による癌発症確率予測法を確立する。

4. 研究成果

(1) 概要：新しく加わった検体を総合して過去のデータを再検討した結果、総計 17 種類の癌で、累計 316 SNP が有意な結果を示し（重複を除外すると 53 SNP）、1 種の癌当たり平均 5-16 SNP が関与した（疑陽性発見確率 (FDR) = 20%）。うち少なくとも 35 SNP に関しては、多数回解析に伴う統計学的エラー (Bonferroni 水準) を超えている。癌患者検体数が 200 例を越えるものについては、対照とともに 2 群に分割して群間での再現性をテストした。これまでに、前立腺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、大腸癌などの再現性試験がほぼ終了した。特に、2 種の SNP 遺伝子型を総合して解析する方法で、統計学的信頼度が向上し、肺癌などでは高い再現性が得られた。今後、膵臓癌、胃癌、胆道癌、乳癌、食道癌などについても逐次解析する予定である。また、前立腺癌の悪性化やラテント癌に密接に関与する遺伝子多型、肺癌の分子標的薬イレッサに感受性を示す EGFR 遺伝子変異に関わる遺伝子多型、婦人科癌の家族性集積に関連する遺伝子多型なども多数明らかになった。

(2) 新規な癌種の解析結果： 婦人科癌：全症例 (7 SNP が有意)。卵巣癌 (5 SNP が有意)、子宮頸癌 (6 SNP が有意)、子宮体癌 (6 SNP が有意)。若年発症リスク (RAD17 などの DNA 修復遺伝子群 5 SNP が有意)。婦人科癌家族歴：(MAD1L1 など 4 SNP が関連)。胆道系腫瘍：(6 SNP が有意、特に WRN と SNM1B の DNA 修復遺伝子の多型が高い相関を示した)。

(3) リスクの性差： 肺腺癌、肺扁平上皮癌、大腸癌、胃癌、膵臓癌、腎細胞癌、胆道系腫瘍、等については、男女間で関与する SNP レパートリーが大きく異なっていた。このように、種々の癌の発症機構が男女間で異なっている可能性が示唆された。

(4) 累積オッズ比 (MOR) による各癌の発症絶対リスクの 5 段階評価： 日本人の全悪性腫瘍患者の約 90%をカバーする計 17 種の癌で、53 SNP の何れかが関与する有意相関が総計 316 通り明らかになり、それらの累積効果

評価により、各癌種につき5段階の区分で20〜700倍の生涯罹患率の差が見られた。例えば肺腺癌のリスクで最高リスクの分位(男13万人、女26万人)の生涯罹患率は男75%(4人中3人)、女39%(5人中2人)となる。16種類の癌の各々について、それぞれ有意であったSNP遺伝子型の重複を解析し、オッズ比の総積(MOR)から総合リスクを求めた。患者群と健常人群の層別解析により、健常人で約60-80%を占める低リスク群、10-30%の中リスク群、5-20%の高リスク群、0.5-2%の超高リスク群を診断できる系を構築できた。高リスクおよび超高リスク群は各癌種の発症確率が約80%以上の特異度と約40%程度の感度で予測可能である。

(5) 肝癌発症リスク：肝癌についてはHCV感染による肝炎・肝硬変患者と肝細胞癌(HCC)患者計468名の検体を質量分析法によって解析し、信頼性の高いリスク関連SNPを6種特定できたが、うち2種は日本人についての既報の完全な再現で、4種は新規発見であった。これらの6SNP遺伝子型の重複による累積効果は、肝炎・肝硬変患者の繊維化の程度に応じたHCC発症危険度として明確な5段階予測ができた。また、HCC患者のラジオ波治療後の再発率と明らかに相関した。

(6) 病態関連SNPの特定

①前立腺癌患者のPSA値、進行度、ラテント癌、悪性度などを解析した結果、各病理学的特徴に関連したSNPを各数種類特定できた。特に、悪性度に関与するあるSNPの p 値はBonferroni水準を遥かにクリアしており、大きく期待される。

②肺腺癌のEGFR遺伝子変異に関与するSNP
岡山大学病院の肺癌患者の多くはEGFR遺伝子変異のスクリーニングを受けており、これまでに300例以上の検体の集積がある。EGFR遺伝子変異を有する患者は女性、非喫煙者、腺癌が多く、扁平上皮癌では少ない。この変異に関係するSNPを男女別に解析した結果、女性ではアルコール代謝に関わる遺伝子、男性ではDNA修復に関わる遺伝子のSNPが統計学的有意を示した。この予想外の結果は、肺腺癌の発症に関わる特定の遺伝子変異が性差の影響を受け、体内の酸化ストレスや細胞の修復能と関連することを示している。

(7) 再現性試験

①前立腺癌：中国、シンガポール在住の中国人前立腺癌患者では調べた21SNPのうち5SNPが日本人の結果と一致した。

②肺腺癌：岡山地区の肺腺癌(325例)では独立の健常人/患者の2セット(各約900例)で7種のリスクSNPが完全な再現性を示した。また、有意に関連する16種のSNPを2種ずつ組み合わせた複合遺伝子型解析(120通り)では、60通りが2つの集団で再現され、うち33通りの複合遺伝子型のオッズ比が厳しい

統計学的水準(Bonferroni水準)をクリアし、高い信頼性で再現された。

③肺扁平上皮癌：全国から集積した236例の肺扁平上皮癌患者検体を総数、男女比、年齢構成を同じくする2群に分け、それぞれ独立の743名の健常人集団2群と組み合わせたA、B、2組のペアで比較したところ、Aでは9種、Bでは12種のSNPが有意となり、うち4種が完全に再現された(RAD18, ALDH2, WRN, IRF3)。肺腺癌と同様に、16SNPの2つずつの組み合わせ(120通り)による複合遺伝子型解析を行なったところ、22通りの複合遺伝子型のオッズ比が高い信頼性で再現された。

④大腸癌：同様に、大腸癌患者検体(386例)を2群に分けて解析した結果、5SNPが完全に再現された(ALDH2, PTPRJex6, MMP9, IRF3, BARD1)。

(8) 健常人コホートによる癌早期発見プロジェクト：平成21年度から、岡山地区の主に人間ドックを毎年受診する方々から、約1,600名の協力者を得て、遺伝子解析とその結果の開示によるフォローアップを開始した。1,600名のうち、約250名が生涯のうちで特定の癌に罹患する確率が20%を越えると予測された。これまでの3年間でのべ32名が新しく何らかの悪性腫瘍に罹患しており、今後長期的にフォローアップを徹底して、本研究による癌罹患率予測の的中率を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計15件)

1. Tomoda T, Nouse K, Sakai A, Ouchida M, Shimizu K, et al: Genetic risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus: A case-control study. J Gastroenterol. Hepatol. 2012, 27(4), 797-804. 査読有
2. Oka H, Ouchida M, Kondo T, Shimizu K, et al. Different responses to 5-fluorouracil in mutagenicity and gene expression between two human lymphoblastoid cell lines with or without TP53 mutation. Acta Med Okayama. 2012, 66(2): 119-129. 査読有
3. Ouchida M, Kanzaki H, Ito S, et al. Novel direct targets of miR-19a identified in breast cancer cells by a quantitative proteomic approach. PLoS One. 2012, 7(8):e44095. 査読有
4. Maruo T, Ichikawa T, Kanzaki H, et al. Proteomics-based analysis of

- invasion-related proteins in malignant gliomas. *Neuropathology*. 2012 Nov 1(ePub)、査読有
5. Itani S, Kunisada T, Morimoto, Y, et al. MicroRNA-21 correlates with tumorigenesis in malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) via programmed cell death protein 4 (PDCD4). *J Cancer Res Clin Oncol.*, 2012, 138(9): 1501-1509. 査読有
 6. Tanaka M, Nakamura K, Ouchida M, Shimizu K, et al.: Elevated oxidative stress is associated with ventricular fibrillation episodes in patients with Brugada-type electrocardiogram without SCN5A mutation. *Cardiovasc Pathol*. 2011, Jan-Feb;20(1):e37-42. 査読有
 7. Kanzaki H, Ito S, Hanafusa H, Jitsumori Y, Tamaru S, Shimizu K, Ouchida M. : Identification of direct targets for the miR-17-92 cluster by proteomic analysis. *Proteomics*, 2011, 11, 3531-3539. 査読有
 8. Sonoyama T, Sakai A, Mita Y, Ouchida M, Shimizu K. et al.: TP53 codon 72 polymorphism is associated with pancreatic cancer risk in males, smokers and drinkers. *Mol. Med. Report*, 2011, 4(3):489-495. 査読有
 9. Rai K, Takigawa N, Ito S, Shimizu K, Tanimoto M, Kiura K: Liposomal Delivery of MicroRNA-7-Expressing Plasmid Overcomes Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitor-Resistance in Lung Cancer Cells, *Mol Cancer Ther.* 2011, 10(9):1720-1727. 査読有
 10. Wang L, Kaku H, Nasu Y, Shimizu K, Kumon H, Na Y, et al.: Single Nucleotide Polymorphism *WRN* Leu1074Phe Is Associated with Prostate Cancer Susceptibility in Chinese Subjects. *Acta Medica Okayama*, 2011, 65 (5): 315-323. 査読有
 11. Ali MA, Gunduz M, Gunduz E, Shimizu K, Nagatsuka H. et al.: Expression and Mutation Analysis of Her2 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Invest.* 2010, 28 (5), 495-500. 査読有
 12. Mita Y, Yasuda Y, Sakai A, Yamamoto H, Toyooka S, Ouchida M and Shimizu K. : Missense polymorphisms of *PTPRJ* and *PTPNI3* genes affect susceptibility to a variety of human cancers. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010, 136, 249-259. 査読有
 13. Sato H, Oka T, Shinnou Y, Kondo T, et al.: Multi-step aberrant CpG island hyper-methylation is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Pathol.* 2010, 176(1):402-415. 査読有
 14. Katase N, Gunduz M, Shimizu K, Nagatsuka H. et al.: Frequent allelic loss of Dkk-1 locus (10q11.2) is related with low distant metastasis and better prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Invest.* 2010, Jan;28(1):103-110. 査読有
 15. Cengiz B, Gunduz E, Gunduz M, Shimizu K, Nagatsuka H. et al.: Tumor-specific mutation and downregulation of ING5 detected in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2010, Nov. 1;127(9):2088-2094. 査読有
- [学会発表] (計 17 件)
1. 大内田守、神崎浩孝、伊藤佐智夫、花房裕子、実盛好美、田丸聖治、清水憲二、乳癌におけるmiR-17-92 clusterの新規標的タンパク質の検討。第 35 回日本分子生物学会 平成 24 年 12 月 11-14 日 福岡
 2. 清水憲二。癌体質遺伝の解析に基づく癌予防と早期発見：婦人科癌を中心に 第 53 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 特別講演(2012 年 11 月 23 日、岡山)
 3. 清水憲二、肺がん及びその他の主要ながんの発症リスクと遺伝子多型並びに喫煙との関連、第 27 回助成研究発表会(公財 喫煙科学研究財団)(2012 年 7 月 18 日、東京)
 4. Ito S, Hanafusa H, Ouchida M, Shimizu K. Identifications of direct target of MicroRNA-29a in Esophageal squamous cell carcinoma. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13-16 日、パシフィコ横浜
 5. Yamamoto K, Ouchida M, Ito S, Hanafusa H, Shimizu K. Identification and functional analysis of miR-19a target genes in lung cancer. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13-16 日、パシフィコ横浜
 6. Ouchida M, Hanafusa H, Ito S, Yamamoto K, Tamaru S, Shimizu K. Proteomic analysis of target genes of miR-17-92 cluster in lung cancer. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13-16 日、パシフィコ横浜
 7. 小阪茜友、三田雄一郎、神崎浩孝、堺明子、大内田守、清水憲二、豊岡伸二、三

- 好新一郎：肺腺癌のEGFR mutationに関する遺伝子多型 がん予防大会 2011 京都、2011年6月20-21日。京都府立医科大学
8. 保田雪子、三田雄一郎、神崎浩孝、堺明子、大内田守、清水憲二、猶本良夫ほか。食道癌におけるEX01及びIRF3遺伝子多型と発癌リスクの解析 がん予防大会 2011 京都、2011年6月20-21日。京都府立医科大学
 9. Ito S, Hanafusa H, Ouchida M, Shimizu K. Identification of true targets of MicroRNA-183 in lung cancer cells using labeled ds-miRNA in vitro pull-down assay; BMB2010 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月7-10日 神戸
 10. Ouchida M, Kanzaki H, Ito S, Yamamoto K, Tamaru S, Shimizu K. Identification of target genes of miR-17-92 cluster by proteomic analysis; BMB2010 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月7-10日 神戸
 11. Kenji Shimizu; Comprehensive SNP Analyses on Genetic Predisposition for Incidence of 14 Major Cancers in Japan. 第4回日中泌尿器科会議 特別講演 中国西安市 2010年10月14-17日
 12. 伊藤 佐智夫、大内田 守、清水 憲二；肺癌における標識MicroRNA-183を用いた標的遺伝子の同定；平成22年9月22-24日、第69回日本癌学会学術総会 大阪
 13. 大内田 守、神崎 浩孝、伊藤 佐智夫、清水 憲二；癌細胞におけるmiR-17-92 cluster の新規標的タンパク質のプロテオーム解析；平成22年9月22-24日、第69回日本癌学会総会 大阪
 14. 頼 冠名、瀧川 奈義夫、伊藤 佐智夫、木浦 勝行、清水 憲二、谷本 光音；micro RNA 7 発現プラスミドによるEGFR依存性腫瘍におけるin vivoでの著明な抗腫瘍効果；平成22年9月22-24日、第69回日本癌学会学術総会 大阪
 15. 園山 隆之、堺 明子、三田 雄一郎、保田 雪子、河本 博文、八木 孝仁、吉岡 正雄、三村 哲重、大内田 守、山本和秀、清水 憲二；DNA修復・複製遺伝子多型と膀胱発症リスク；平成22年9月22-24日、第69回日本癌学会学術総会 大阪
 16. 清水 憲二、堺 明子、三田 雄一郎、園山 隆之、伊藤 充矢、賀来 春紀、山本 寛斎、豊岡 伸一、松原 長秀、松岡 順治、山本 和秀、公文 裕巳；癌発症リスク多型遺伝子レパートリーの性および年齢区分による差異；平成22年9月22-24日、第69回日本癌学会学術総会 大阪
 17. Kanzaki H, Ouchida M, Ito S, Shimizu K. et al. Identification of novel direct targets of miR-19a in MCF-7 breast cancer cells. AACR 101st Annual Meeting 2010. Walter E. Washington Convention Center. Washington, DC. USA. 2010, April 17-21.
- [その他]
ホームページ等
岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・
分子遺伝学分野
<http://genet1.med.okayama-u.ac.jp/>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
清水 憲二 (SHIMIZU KENJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
名誉教授
研究者番号：10037286
 - (2) 研究分担者
品川 克至 (SHINAGAWA KATUJI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：00273988

豊岡 伸一 (TOYOOKA SHINICHI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：30397880
 - (3) 連携研究者
大内田 守 (OUCHIDA MAMORU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：80213635

堺 明子 (SAKAI AKIKO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：60205698

伊藤 佐智夫 (ITO SACHIO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：30335624