

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24年6月1日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591012

研究課題名（和文） SNPに対するジーンチップによる肺癌EGFR変異遺伝子関連遺伝子の同定と解析

研究課題名（英文） Analysis and identify of gene associated with EGFR mutation by gene chip for SNPs

研究代表者

前門戸 任 (MAEMONDO MAKOTO)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号：40344676

研究成果の概要（和文）：非小細胞肺癌に対する初の分子標的治療剤として世界に先駆けて日本で承認された薬剤であるゲフィチニブは、その EGFR のチロシンキナーゼ(TK)阻害を作用機序としており、肺癌治療において重要な役割を担ってきている。このゲフィチニブの奏効例では肺癌の EGFR の TK 領域において遺伝子変異が多いことが報告され、この EGFR 遺伝子変異が治療効果予測因子として臨床の場で広く認識されるようになった。この EGFR の遺伝子変異に人種差が認められ日本人をはじめとした東アジア人にその遺伝子変異が多いことが報告された。本研究ではこの遺伝子変異人種差に影響を与える EGFR 遺伝子変異関連遺伝子があると予想し EGFR 遺伝子変異陽性患者を研究対象とし、全ゲノムレベルの SNP 解析を通してその関連遺伝子を同定することを目的とする。

方法・結果

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌 65 症例の末梢血を採取、ゲノム DNA を抽出、Affymetrix 社の SNP Array6.0 を用いて全ゲノム 90 万ヶ所の SNP の遺伝子型を決定した。これらの遺伝子型を、ホモ接合ハプロタイプ法により有意な 2 領域（染色体 1 番、染色体 7 番）が検出された。この 2 領域をさらに詳細に検討した結果、染色体 1 番の領域が KIF26B を含む領域であり、染色体 7 番の領域が DPP6 を含む領域であった。KIF26B には患者番号 1、6、26、29、34、37、45、49、50 の患者が関連しており、DPP6 には患者番号 2、9、18、20、25、28、34、43、51、56、62 が関連していた。

研究成果の概要（英文）：Lung cancer is a major cause of cancer death, and one of the most resistant cancers to treatment. Several mutations in the lung tumor were found in female, non-smoker patients with adenocarcinoma. These mutations were associated with not only oncogenicity but the target of therapy. Gefitinib is an orally administered tyrosine kinase inhibitor (TKI) of EGFR that was approved in Japan for the first time in the world. This drug has substantial role on treatment with non-small cell lung cancer patients who have characteristics that include female, never smoker, and adenocarcinoma histology. The response of treatment with gefitinib was found strongly correlated with both these patient characteristics and EGFR mutations. In addition, it was reported that there are more frequent EGFR mutations in Asian patients than in Westerners. On the hypothesis of that there are some genes associated with this ethnic difference in incidence of mutation, we conducted the study to identify these associated genes by the analysis of SNP through the whole genome with Gene chip assay.

Result: We collected blood samples from 64 patients with EGFR mutation and extracted DNA and analyzed whole genome SNP with SNP Array 6.0 which defined SNPs in more than 900,000 sites. We found two sites associated with EGFR activating mutation with this method. We

are planning to conduct re-examination with other sample set.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：非小細胞肺癌、EGFR 遺伝子変異、全ゲノム SNP 解析

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌に対する初の分子標的治療剤として世界に先駆けて日本で承認された薬剤であるゲフィチニブは、その EGFR のチロシンキナーゼ(TK)阻害を作用機序としており、肺癌治療において重要な役割を担ってきている。このゲフィチニブの奏効例では肺癌の EGFR の TK 領域において遺伝子変異が多いことが報告され、この EGFR 遺伝子変異が治療効果予測因子として臨床の場で広く認識されるようになった。この EGFR の遺伝子変異に人種差が認められ日本人をはじめとした東アジア人にその遺伝子変異が多いことが報告された。

2. 研究の目的

EGFR 遺伝子変異関連遺伝子があると予想し EGFR 遺伝子変異陽性患者を研究対象とし、全ゲノムレベルの SNP 解析を通してその関連遺伝子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌 65 症例の末梢血を採取、ゲノム DNA を抽出。Affymetrix 社の SNP Array 6.0 を用いて全ゲノム 90 万ヶ所の SNP の遺伝子型を決定した。これらの遺伝子型を、ホモ接合ハプロタイプ法 (1)、HM on HH 法 (2) を用いて解析した。

(1) Miyazawa, H., et al., Homozygosity haplotype allows a genomewide search for the autosomal segments shared among patients. *Am J Hum Genet*, 2007. 80(6): p. 1090-102.

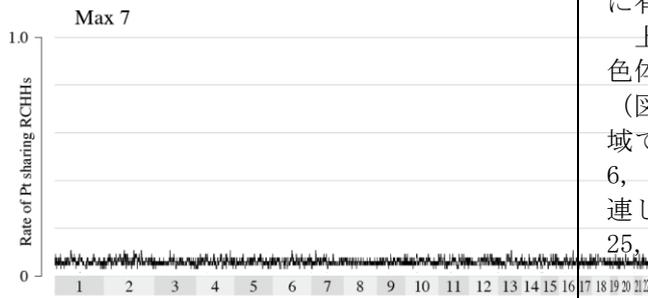
(2) Hagiwara, K., et al., Homozygosity mapping on homozygosity haplotype

analysis to detect recessive disease-causing genes from a small number of unrelated, outbred patients. *PLoS ONE*, 2011. 6(9): p. e25059.

ホモ接合ハプロタイプ法は、少数例に使用できる疾患遺伝子同定法である。患者群の中に有意に保存されている同一ハプロタイプを検出し、そのハプロタイプが共通先祖由来であることを想定して解析を行う。例えば、57 名の患者より COPD 関連遺伝子を同定した報告がある (3)。ホモ接合ハプロタイプ法では優性遺伝子、劣性遺伝子が共に同定できる。

(3) Brehm, J.M., et al., Identification of FGF7 as a novel susceptibility locus for chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 2011. 66(12): p. 1085-90.

本研究では、最初にこの手法を用いて SNP6.0 の解析結果を検討した。患者群での結果を図 1 に示す。患者群では、お互いに共通のハプロタイプを有する患者は最大 7 名であった。ホモ接合ハプロタイプ法では共通のハプロタイプを有する患者が 3 名がバックグラウンドとして設定してあるため、7 名は有意差以下であった。P 値を図 2 に示す。-log₁₀(P) 値を示したものだが、2.38 以上が通常の有意差に相当する。ホモ接合ハプロタイプ法では疾患遺伝子候補を挙げることはできなかった。

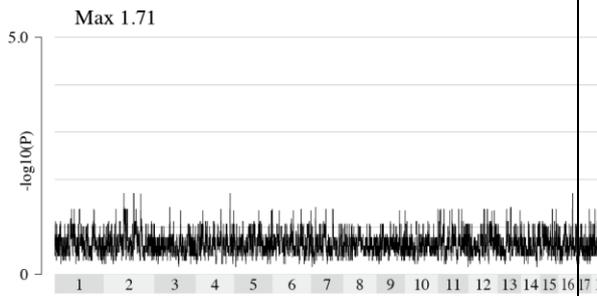
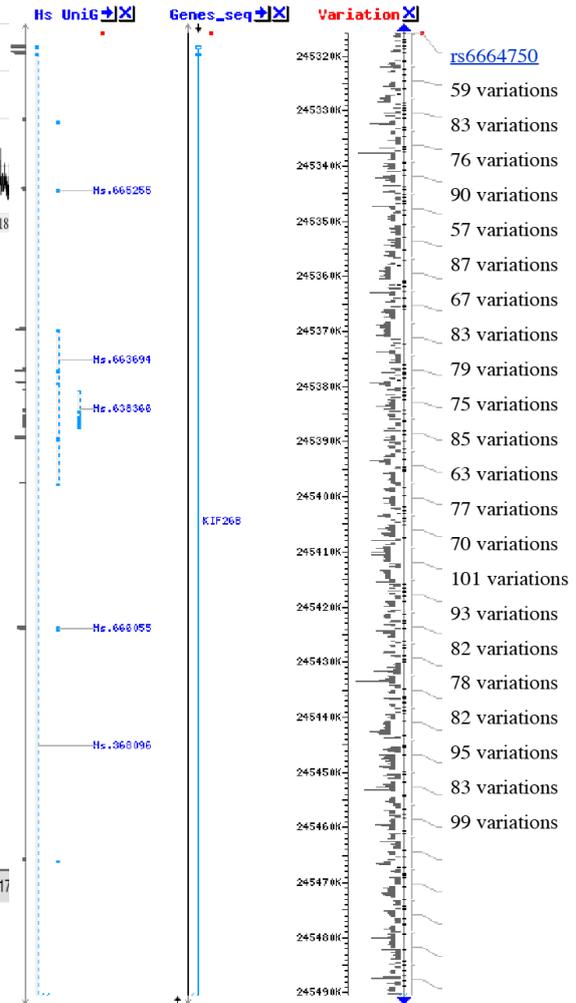


に有意であった。

上記の2領域をさらに詳細に検討した。染色体1番の領域は KIF26B を含む領域であり (図5), 染色体7番の領域は DPP6 を含む領域であった (図6)。KIF26B には患者番号 1, 6, 26, 29, 34, 37, 45, 49, 50 の患者が関連しており, DPP6 には患者番号 2, 9, 18, 20, 25, 28, 34, 43, 51, 56, 62 が関連していた。

図5

Region Displayed: 245,316K-245,491K bp



次に, HM on HH 法にて解析を行った。HM on HH 法は劣性遺伝子を高感度に検出する方法である。高いレベルで検出されれば, より多くの患者が検出領域のハプロタイプをホモ接合で共有していることが分かる。その結果を図3, 4に示す。

図3

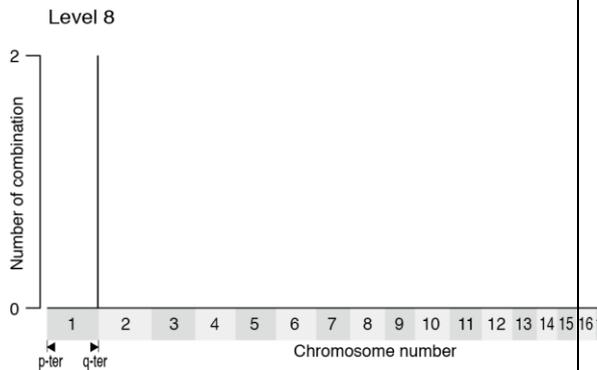
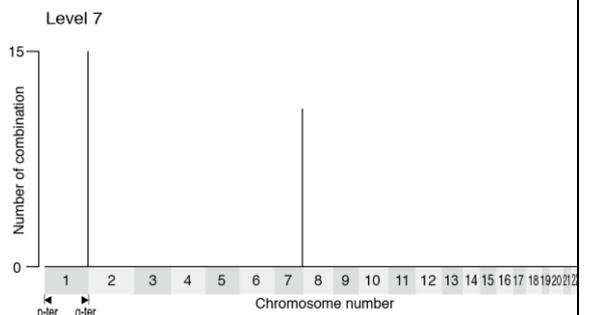
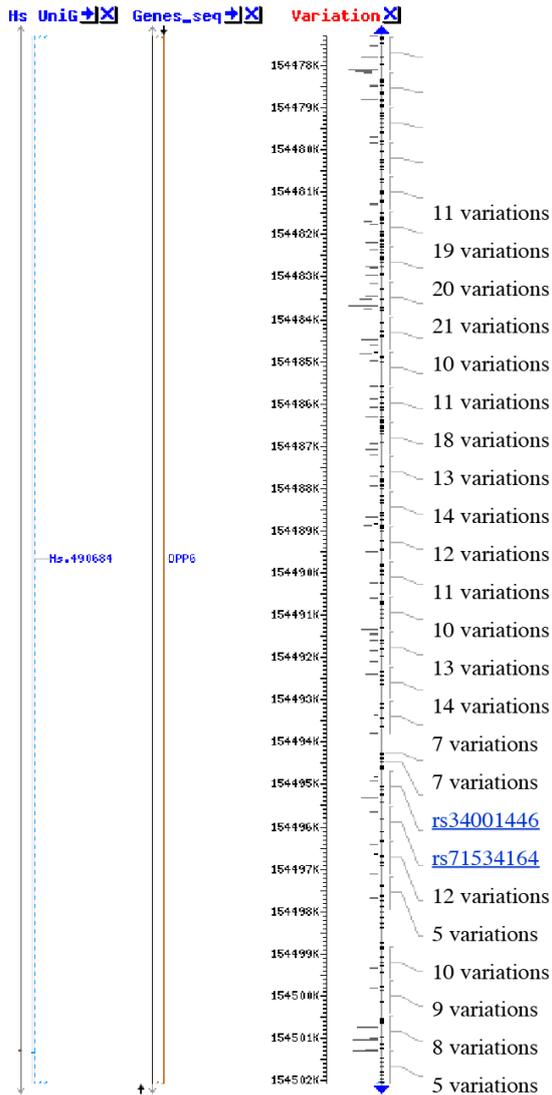


図4



HM on HH 法のバックグラウンドは level 4 であり, 上記の解析で検出された2領域は共

図 6



両遺伝子の詳細を図 7, 8 に示す。

図 7

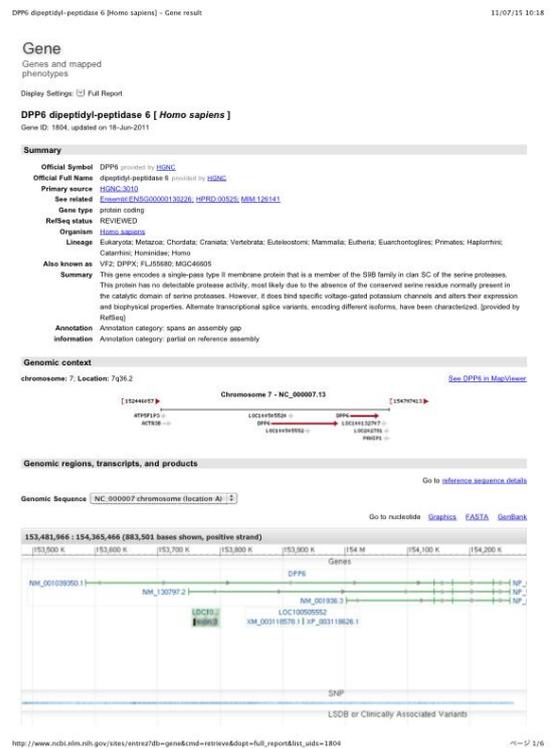


図 8



DPP6 は膵臓癌の全ゲノム関連解析で、膵臓癌との関連が指摘されている遺伝子である (4).

(4) Low, S.K., et al., Genome-wide association study of pancreatic cancer in Japanese population. PLoS One, 2010. 5(7): e11824.

本研究で検出された KIF26B および DPP6 が、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌症例を再度収集して検索した場合に再び検出されるか否か、再現実験を行っている。もし、再現実験においても検出されれば、両遺伝子が EGFR 遺伝子変異と関連している可能性が高くなる。その場合、両遺伝子のどのような変化が EGFR 遺伝子変異の引き金になっているのか、患者での両遺伝子の詳細な解析が必要になる。

まとめ

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌症例を用いて、SNP6.0 を用いて全ゲノム SNP 遺伝子型の検討を行った。劣性遺伝子を高感度に検出できる HM on HH 法で、KIF26B および DPP6 を含む領域で、ハプロタイプを共有する遺伝子断片が患者間で保存されていることを見出した。両遺伝子の多型、変異が EGFR 遺伝子変異のリスクを高めている可能性、EGFR 遺伝子変異の原因となっている可能性がある。今後再現実験を行い、両遺伝子が再度検出されることを確認した上で、患者における詳細な遺伝子配列検索、遺伝子機能解析を行う必要がある。

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 2 件)

- ① Satoh H, Inoue A, Kobayashi K, Maemondo M, et al
Low-dose gefitinib treatment for patients with advanced non-small cell lung cancer harboring sensitive epidermal growth factor receptor mutations
J Thorac Oncol.
8:160-168 2011
- ② 前門戸 任
EGFR 遺伝子変異による個別化医療に向けた治療戦略
分子呼吸器病
3/1 号:45-47 2011

[学会発表] (計 3 件)

- ① Makoto Maemondo
Gefitinib for the lung tumors with mutated EGFR
KASLC (招待講演)
2011 November 18
Seoul Korea
- ② Makoto Maemondo
Gefitinib for the lung tumors with mutated EGFR
European Respiratory Society (招待講演)
2011 September 27
Amsterdam Netherland
- ③ A. Inoue, K. Kobayashi,
M. Maemondo et al.
Final overall survival results of NEJ002, a phase III trial comparing gefitinib to carboplatin (CBDCA) Plus paclitaxel (TXL) as the first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with EGFR mutations.
ASCO Annual Meeting
2011 June 6
Chicago

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前門戸 任 (MAEMONDO MAKOTO)
地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・特任研究員
研究者番号: 40344676

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

萩原 弘一 (HAGIWARA KOUICHI)
埼玉県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00240705

