

## 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 5月 13日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590516

研究課題名（和文） 新規迅速遺伝子解析技術の発癌感受性遺伝子多型診断への応用

研究課題名（英文） Application of rapid gene analyzing method for susceptibility to cancer

研究代表者

清水 公裕（SHIMIZU KIMIHIRO）

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：90375535

研究成果の概要（和文）：MDM2 遺伝子は腫瘍抑制因子 p53 の負の制御因子といわれている。MDM2 のプロモーター領域に存在する一塩基多型(SNP309 T>G)について、これまで多くの癌腫においてその相関が報告されてきた。我々は Smart Amplification Process(SmartAmp)法を応用した SNP309 解析キットを作成し大規模な症例対照研究を行った。日本人においては MDM2 SNP309 は肺癌の発癌には関与しないということが分かった。しかし喫煙との相関が強いといわれる群(扁平上皮癌や KRAS G>T 変異腺癌)においては GG 群が発がんに関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：MDM2 is known as an oncoprotein that binds to p53 protein and inactivates the tumor suppressor activity of p53. Genetic polymorphisms in the MDM2 gene are suggested to be a tumor susceptibility marker and a prognostic factor for cancer. In this study, we have developed a new SNP detection method applied Smart Amplification Process (SmartAmp) method to detect the SNP c.309T>G in the MDM2 gene and conducted a large-scale case-controlled study. We found that there were no significant associations between MDM2 SNP309 genotypes and lung cancer risk. Subgroup analysis of smoking related lung cancer indicated that G/G genotype of SNP309 may be associated with lung cancer carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
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：境界医学・病態検査学

キーワード：肺癌、一塩基多型、SNP、SmartAmp 法、喫煙

## 1. 研究開始当初の背景

癌抑制遺伝子である P53 は、遺伝子を損傷か

ら守る際に極めて重要な役割を担っている。MDM2 は、この p53 の負の調節因子であ

る。その作用機序には2つの経路があり、①MDM2 蛋白が直接 p53 に結合して p53 を不活化し、②ユビキチンリガーゼとして作用することにより p53 を分解する。MDM2 蛋白の上昇は肺癌を含む多くの癌で認められており、MDM2 の活性化とそれに伴う p53 の不活化が、肺癌の発生・増殖に関与する。近年、MDM2 の第一イントロン上のプロモーター領域において、一塩基多型 (MDM2 SNP309 T>G: rs2279744; 以後 SNP309) が同定された。SNP309 が GG 型の場合、プロモーター領域において転写因子 (Sp1) との親和性が高まり、MDM2 の RNA/蛋白レベルの上昇することが報告されている。すなわち、SNP309 が GG 型の人では、MDM2 の活性化により p53 が不活化され易いということである。p53 に変異を有する Li-Fraumeni 症候群においては、SNP309 が GG 型の症例ではより早期 (9 年以上) に発癌することが報告された。これまで腎癌、肝細胞がん、食道がんにおいて GG 型は TT 型と比較して、約 1.5 倍から 2.7 倍癌に罹患しやすいと報告がある。肺がんについては、GG 型が癌にかかりやすいという報告がある一方、関与しないという報告もある。中国人を対象とする研究では、SNP309 の GG 型は TT 型に比べて肺癌に 1.8 倍 (扁平上皮癌で 2.0 倍、腺癌で 1.9 倍) 罹り易く、喫煙者のみで比較すると、GG 型では TT 型に比べ 7.5 倍も高率に肺癌に罹り易いと報告した。韓国人を対象とする報告でも肺腺癌の発症と SNP309 との関連が報告されている。また、SNP309 の G アレル出現頻度は、アフリカ系アメリカ人 (9.1%)、白人 (37.6%)、アジア人 (53.5%) と人種間格差があることがわかっている。ヨーロッパやアメリカからの報告では肺癌の発症と SNP309 との相関がないとする報告が多い一方で、中国や韓国では相関が報告されているので、アジア人である日本人において MDM2

SNP309 と肺癌発症との相関が有るか否かはとても興味深い課題である。

Smart Amplification Process (SmartAmp 法) は、近年、理化学研究所において開発された遺伝子増幅技術である。毛髪・爪 1 滴の血液を用いて、検体採取後 40 分程度で一塩基多系の遺伝子型を迅速・簡便に検出可能である。本法の特徴は以下のとおりである。①60℃等温の条件下で反応が進行する。②新規の鎖置換型 DNA 合成酵素 (Aac DNA polymerase) を用いる。③非対称的なプライマーセットを用いる。④ミスマッチ結合タンパク (MutS) の存在下で増幅反応を行うため特異性が高い。⑤国産技術である。よって SmartAmp 法は、増幅の基礎研究ツールとして PCR にとって代わるのではなく、その簡便性、迅速性を生かして日々の臨床検査ツールとして有効活用されることが期待されている。従来、一塩基多型の検出には、PCR-RFLP 法が用いられることが多い。この手法は、DNA の抽出、目的領域の核酸増幅、制限酵素処理、電気泳動と多くのステップを要し、血液から一塩基多型の解析までには約 1 日を要する。SmartAmp 法は、1 滴の血液から DNA の抽出無しに、40 分ほどで SNP の解析ができるので、本法を応用すれば、外来診療の場面において検査当日に遺伝子の解析結果を踏まえた診療を行うことが出来る。また、多くの検体を扱う大規模な試験にも非常に適している。

## 2. 研究の目的

日本人において、肺癌と SNP309 との相関を明らかにするために、大規模な症例対照研究を行う。その準備段階として、SmartAmp 法を応用した SNP309 検出キット

を作成することにより、多数の検体を簡便・迅速に解析可能とすることを目的とした。もし、日本人においても SNP309 が喫煙による肺癌の発癌感受性遺伝子であるということが証明され、SNP309 を外来で簡易的に判定することが出来たなら、禁煙外来における禁煙指導において有益な指標と成り得る。喫煙により比較的若年で発癌する人と、重喫煙によっても高齢まで発癌しない人がいることは日常よく経験されることである。喫煙者にとっては、自分が肺癌に罹りやすい GG 型であると分かれば、禁煙に対する強い動機付けとなる。禁煙外来で SNP309 を簡易的に解析することが出来れば、日本人の約 3 割に見られる GG 型の症例に対して、喫煙により肺癌に成りやすい体質であることを示すことができ、これにより、禁煙外来における禁煙成功率（約 20%前後）をより高めることができる可能性が高い。

### 3. 研究の方法

(1) MDM2 SNP309 検出用 SmartAmp キットの開発  
理化学研究所との共同研究により SmartAmp 法応用した MDM2 SNP309 検出キットを作成し、従来法と比較を行う。

(2) 症例対照研究の対象  
大規模な症例対照研究を行うため、理化学研究所と神奈川県立がんセンターとの共同研究を行った。当科と神奈川県立がんセンターでの肺癌手術症例合計 849 例と癌の既往がない正常健康人（682 例）を対象とした。

(3) SNP/遺伝子変異解析  
MDM2 の遺伝子多型は末梢血抽出 DNA を鋳型として SmartAmp 法を用いて解析した。当科で

の肺腺癌症例については腫瘍凍結組織抽出 DNA を用いて、EGFR 変異は PNA-LNA PCR Clamp 法、KRAS 変異は PNA-Enriched sequencing 法で解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) Duplex SmartAmp 法：MDM2 SNP309 検出キットの作成

本キットでは 2 つの異なる吸光度を有する新規蛍光ハイブリダイゼーションプライマー（エキシトンプライマー）を含む、合計 7 種類のプライマー設計し、MDM2 SNP309 検出キットを作成した。従来、野生型・変異型は 2 つのチューブでの解析が必要であったが、本キットではひとつのチューブ内で解析が可能となり、解析用資材の節約・作業効率の向上に繋がった。このキットは、1 滴の血液を簡単な前処理を行うだけで鋳型として利用可能で、検体採取から 40 分以内と簡便かつ迅速な SNP の解析が可能であった。（図 1）キットの正確性を確認する為、従来法（PCR-RFLP 法）による 98 例の解析結果と比較し、全例での一致を確認した。末梢血抽出 DNA を鋳型とした解析では 48 検体を 60 分で解析可能であり 288 検体の解析を、一日の作業で行うことができた。また、従来 SmartAmp 法に用いていたミスマッチ結合タンパク（TaqMutS）はタンパク質である故、不安定であった。本キットでは TaqMutS を用いずに検出が可能となり、保存・管理・解析手技が容易となったため、より臨床に即したものとなった。

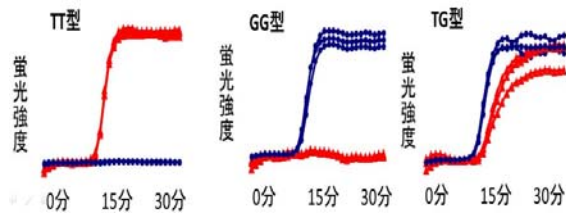


図1 SmartAmp法による各遺伝子型の解析

(2) 肺癌群と正常健常人群との比較

肺癌群と正常健常人群の年齢はそれぞれ 64.5±9.6 歳 / 64.0±12.7 歳、男性比は 51.9 % / 45.7 % と肺癌群のほうが高齢、男性が多いという特徴があった。肺癌群の組織型は腺癌 612 例、扁平上皮癌 159 例、小細胞癌 27 例、その他 51 例であった。肺癌群と対照群の間で、各遺伝子型を性別・腫瘍組織型毎に年齢・性別を調整した、調整済みオッズ比を算出し、比較を行った。本研究では、肺癌群と対照群との間に有意な差を認めず、日本人においては MDM2 SNP309 は肺癌の発癌には関与しないということが分かった (TT+TG 群 対 GG 群 : 調整済みオッズ比 0.97, 95%信頼区間 0.78-1.22)。

当科の肺癌症例においては、喫煙歴の有無に拘わらず、SNP309 と発癌との相関は認めなかった。肺腺癌 308 例では EGFR 変異:171 例、KRAS 変異:44 例であった。(表 1) 喫煙との相関が強いといわれている KRAS (G>T) 変異腺癌 21 例においては (TT+TG 群 対 GG 群 : オッズ比 2.42, 95%信頼区間 1.01-5.82) であった。KRAS 変異を有する肺腺癌、特に G⇒T トランスバージョン 変異 (図 2) は、喫煙との相関が強いとされており、この群で GG 群が有意に多かったことは、MDM2 SNP309 が喫煙を介した発がんに関与している可能性が示唆された。

組織型	肺癌の遺伝子変異	KRAS変異の詳細
計 469例	腺癌 308例	EGFR変異有 146例
	扁平上皮癌 119例	KRAS変異有 44例
	小細胞癌 15例	その他 128例
	その他 27例	
		KRAS変異の詳細
		G⇒T 21例
		G⇒C 6例
		G⇒A 17例

表 1 当科の肺癌症例の内訳

③ 累積喫煙量と SNP309 の相関

肺扁平上皮癌は喫煙との相関が非常に強い癌であるといわれている。肺扁平上皮癌において腫瘍が発見されるまでの累積喫煙量 (1 日の箱数×喫煙年数) の平均値が TT+TG 群 63.5, GG 群 52.1 と GG 群において有意に少ない (p=0.03) という結果であった。このことは、GG 群では少ない累積喫煙量で肺癌が生じやすいことを示唆している。

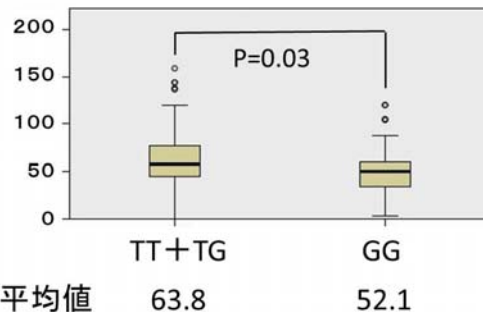


図 2 扁平上皮癌における累積喫煙量の比較

(3) まとめ

本研究で開発し、報告した Duplex SmartAmp 法は、他の一塩基多型の検出にも応用可能であり、本法を実地臨床に導入することは、個別化医療の改良の早期実現・がん治療の発展に有用と考えられる。症例対照研究では、これまでアジア人において MDM2 SNP309 と肺癌との相関が報告されてきたが、日本人において、相関がないというこ

とが明らかになった。しかし、喫煙との相関が強い特定のグループにおいては、MDM2 SNP309 が発がんに関与している可能性があるという2つのことを示すことができた。

## 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1件)

Yasuaki Enokida, Kimihiro Shimizu, Jun Atsumi, Alexander Lezhava, Yuki Tanaka, Yasumasa Kimura, Takahiro Soma, Takeshi Hanami, Yuki Kawai, Kengo Usui, Yasuko Okano, Seiichi Kakegawa, Hiroomi Ogawa, Yohei Miyamae, Yohei Miyagi, Haruhiko Nakayama, Toshihisa Ishikawa, Yoshihide Hayashizaki, Izumi Takeyoshi, Rapid Detection of SNP (c.309T>G) in the MDM2 Gene by the Duplex SmartAmp Method, PLOS ONE, 査読：有, 2013 (April), 8(4):e60151, doi: 10.1371/journal.pone.0060151

[学会発表] (計5件)

① 渥実 潤、清水 公裕ら、肺扁平上皮癌における MDM2 遺伝子多型と喫煙との関連、第53回日本肺癌学会総会、2012.11.9、岡山

② 榎田 泰明、清水 公裕ら、Smart amplification process (SmartAmp) 法を応用した超高速 MDM2 遺伝子多型診断キットの開発、第112回日本外科学会定期学術集会、2012.4.14、幕張

③ 渥実 潤、清水 公裕ら、女性肺腺癌における MDM2 遺伝子多型と予後との関連についての検討、第112回日本外科学会定期学術集

会、2012.4.13、幕張

④ 懸川 誠一、清水 公裕ら肺腺癌における MDM2 遺伝子多型と喫煙、EGFR 遺伝子変異との関連についての検討、第52回日本肺癌学会総会、2011.11.3 大阪

⑤ Jun Atsumi, Kimihiro Shimizu, MDM2 SNP 309 is associated with cigarette smoking quantity in EGFR wild-type adenocarcinoma of the lung. the 14th World Conference on Lung Cancer, 2011.7.7, Amsterdam, Netherlands

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

清水 公裕 (SHIMIZU KIMIHIRO)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：90375535

### (2)研究分担者

アレキサンダー レジャバ  
(ALEXANDER LEZHAVA)

独立行政法人理化学研究所・上級研究員

研究者番号：40443048

臼井 健吾 (USUI KENZGO)

独立行政法人理化学研究所・研究員

研究者番号：10525372

砂長 則明 (SUNAGA NORIAKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70400778

田中 和美 (TANAKA KAZUMI)

群馬大学・医学部・医員

研究者番号：30526843