

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592096

研究課題名(和文)多発肺腺癌の発生に関わる遺伝的背景の基礎的研究

研究課題名(英文)Genetic backgrounds associated with multicentric development of lung adenocarcinoma

研究代表者

池田 公英 (IKEDA, KOEI)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20448525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：今回検討したEGFR遺伝子多型およびCYP1A1、CYP1B1、CYP2A13のSNP、CYP19A1 rs10064、rs2470152、TTTA repeat多型と多発肺腺癌発生との間には有意な相関は認めなかった。については関連性は証明できなかったが、rs3764221のAアレルが有意に多発肺腺癌のリスク因子となった。(P=0.001)正常肺から抽出したDNAにおいてゲノム全体の低メチル化の指標となるLINE-1遺伝子のメチル化をPyrosequencing法を用いて定量したが、多発肺腺癌の発生とは有意な相関を示さなかった。しかし腫瘍部分の低メチル化が肺腺癌の予後に関連することを示した。

研究成果の概要(英文)：A minor allele of SNP rs3764221, which is located in the CYP19A1 gene, was significantly associated with multiple adenocarcinomas risk. Other analyzed polymorphisms and LINE-1 methylation level of normal lung tissue were not significantly associated with the risk of multiple adenocarcinomas.

Conclusions: A minor allele of SNP rs3764221, which is located in the CYP19A1 gene, was significantly associated with multiple adenocarcinomas risk. Other polymorphisms and LINE-1 methylation levels of background lung were not significantly associated with the risk of multiple adenocarcinomas.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：多発肺腺癌 メチル化 アロマトラーゼ エストロゲン CYP19A1

1. 研究開始当初の背景

・多発肺腺癌症例の増加：研究の学術的背景
高分解能 CT(HRCT) の普及により、肺野に複数個所のスリガラス様陰影 (GGO) を認める肺腺癌症例が増加してきている。病理組織学的には肺胞壁置換性の増殖を示す肺癌が多く、背景肺に肺腺癌の前癌病変である Atypical adenomatous hyperplasia (AAH) を伴うことが多い。これらの症例は非小細胞肺癌全体と比較して、非喫煙者、女性に多く、高率に EGFR 遺伝子変異を伴うことが知られている。

・肺腺癌における EGFR 遺伝子変異：上皮成長因子受容体 (EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor) 遺伝子が肺癌において突然変異を起こしていることが報告され、これが EGFR 特異的なチロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィニチブの効果と関連することが報告されている。この遺伝子変異は女性、非喫煙者、腺癌、東洋人に多いということが知られており、また、肺胞上皮置換性増殖を示す肺腺癌の組織型に密接に関連することがわかっている。また、EGFR 変異が肺腺癌の発生、成立に関わることが証明されてきており、特に非喫煙者の腺癌の発生には重要な役割を果たしているものと考えられている。

・EGFR 遺伝子の polymorphism と肺腺癌の発生: EGFR 遺伝子は 7 番染色体の短腕にコードされている。そのプロモーター領域の SNP と、intron 1 の CA リピートの回数が EGFR の転写活性に関与し、肺腺癌の発生リスク、EGFR 変異の発生に関連性を持つことが報告されている。(Zhang W et al. Mol Carcinog 2007) また、これらの polymorphism の頻度には人種間で差があることも報告されている。(Lee SJ et al. Cancer Genet Cytogenet 2007) 肺癌細胞においては短い CA repeat のアレルがより増幅されやすく、EGFR 遺伝子の allelic imbalance を引き起こすことで、EGFR 変異

が起こりやすくなるとされる。(Nomura M et al. Plos Med 2007)

・癌組織における低メチル化：癌組織においてはゲノム全体が低メチル化していることが知られている。この低メチル化は癌組織だけでなく、背景となる正常組織においてすでに起こっていることが大腸癌や尿路上皮癌で証明されており、これが癌遺伝子の活性化をひきおこし、発癌に関与すると考えられている。LINE-1 と呼ばれるゲノム中に 60 万コピー以上存在している遺伝子配列において、4 カ所の CpGsite におけるメチル化の定量を行うことで、ゲノム全体のメチル化の程度を推測することができるが、LINE-1 遺伝子の低メチル化が、遺伝子不安定性、各種癌の発生に関連し、また予後に影響を与えることが報告されている。(Cordaux R, Batzer MA: Nat Rev Genet, 2009)。

2. 研究の目的

1) EGFR 遺伝子の polymorphism の多発肺腺癌ならびに肺癌発生との関連性の検討：入院患者から抽出した血液から gDNA を抽出し、EGFR promoter 領域の -216G/T および -191C/A の polymorphism を判定し、intron1 の CA repeat の数も計数する。この DATA を多発肺腺癌患者 VS 単発肺癌患者、さらには肺癌患者 VS 非肺癌患者、で比較し、肺腺癌の発生、多発との関連性を検討する。また、予後を含めた臨床病理学的因子との関連性を検討、肺腺癌における遺伝子変異として EGFR 変異、k-ras 変異、EML4-ALK 融合遺伝子との関連性も検討する。

(2) LINE-1 のメチル化定量より推定されるゲノム全体のメチル化の多発肺腺癌および肺癌発生との関連性の検討：当科で切除された肺癌とそれ以外の疾患において腫瘍部、非腫瘍部における gDNA のメチル化の程度を知るため、pyrosequence 法を用いて LINE-1

遺伝子のメチル化を定量し、肺癌組織と正常部肺との比較を行うとともに、多発肺腺癌患者 VS 単発肺癌患者、肺癌患者 VS 非肺癌患者などの比較をおこない、予後を含めた臨床病理学的因子との関連性を調査し、肺腺癌の多発、肺癌の発生への影響を検討する。

3. 研究の方法

患者サンプルからの核酸の抽出：遺伝子解析の同意を得た当科入院患者の血液サンプルを入院時に採取。QIAMP DNA BLOOD mini Kit を用いて gDNA を抽出する。当科での肺癌手術切除標本は腫瘍部と非腫瘍部肺を凍結保存し、Tissue Lyser II でホモジナイズする。PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen)で gDNA を、FastPure RNA Kit (Takara)にて RNA を抽出する。抽出した RNA から速やかに Super Script First Strand System にて cDNA を作製し保存する。

EGFR 遺伝子の polymorphism の解析：EGFR 遺伝子の promoter 領域および CA repeat が存在する intron 1 の配列から作成した primer を作成し、Ampli Taq Gold を用いて目的の部分を PCR で増幅し、増幅産物を QIA quick PCR purification Kit で精製。BigDye terminator v3.1 を用いてシークエンス反応を行う。シークエンス解析は総合研究施設のキャピラリーシークエンサーを用いて行う。

Pyrosequencing 法を用いた LINE-1 遺伝子メチル化の定量：腫瘍部および非腫瘍部の摘出凍結標本から抽出した gDNA を利用し、LINE-1 遺伝子のメチル化の頻度を Pyrosequencing technology を用いて定量する(Weisenberger DJ, Campan M ら, Nucleic Acids Res 2005)。LINE-1 遺伝子の増幅と続けて行う Pyrosequencing 反応は PyroMark kit (Qiagen)を用いて行い、Pyrosequencing Vacuum Prep Tool (Qiagen)を用いて精製する。当院遺伝子研究施設に設置済みの PSQ HS 96 System (Qiagen) を用いて LINE-1 の 4 か

所の CpG site につきメチル化の定量を行う。腫瘍部および非腫瘍部における LINE-1 遺伝子のメチル化の DATA と臨床病理学因子、予後との関連性を統計学的に検証する。

4. 研究成果

EGFR 遺伝子多型と多発肺腺癌発生との関連性を検討したが、プロモーター領域の SNP (-216GT)とイントロン 1 の CA リピート数多型のいずれも有意な相関を示さなかった。

タバコ関連の代謝酵素の SNP (CYP1A1 rs1048943, rs4646903, CYP1B1 rs1056836, CYP2A13 rs1709084) のいずれも多発肺腺癌発生との間には有意な相関は示さなかった。

エストロゲン関連の多型に関しては CYP19A1 rs10064, rs2470152, TTTA repeat 多型については多発肺腺癌の発生との関連性は証明できなかった。唯一 CYP19A1 rs3764221 の A アレルが有意に多発肺腺癌のリスク因子となった。(adjusted OR (95% CI) = 4.38 (2.00-11.70), P=0.001)

この内容を論文投稿した。

正常肺から抽出した DNA においてゲノム全体の低メチル化の指標となる LINE-1 遺伝子のメチル化を Pyrosequencing 法を用いて定量したが、多発肺腺癌の発生とは有意な相関を示さなかった。

しかし腫瘍部分の低メチル化が肺腺癌の予後に関連することを示し、論文に投稿した。

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 2 件)

1. Ikeda K, Shiraishi K, Eguchi A, et al. Association of a Genetic Variant of CYP19A1 with Multicentric Development of Lung Adenocarcinomas. Ann Surg Oncol. (査読あり)2014 ;21(3):939-45. doi: 10.1245/s10434-013-3362-2.

2. Ikeda K, Shiraishi K, Eguchi A, et al.

Long interspersed nucleotide element 1 hypomethylation is associated with poor prognosis of lung adenocarcinoma. Ann Thorac Surg. (査読あり) 2013; 96(5):1790-4. doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.06.035.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 池田公英、白石健治、多発肺腺癌の遺伝的背景の検討、第 113 回日本外科学会総会(2013 年 4 月 11 日福岡)

2. 池田公英、白石健治、非小細胞肺癌における LINE-1 の DNA メチル化異常と臨床病理学的特徴、生命予後との関連性、第 30 回日本呼吸器外科学会総会(2013 年 5 月 9 日名古屋)

3. 池田公英、大隅祥暢、肺腺癌の発生と CYP19A1 遺伝子多型の関連性、第 54 回日本肺癌学会総会(2013 年 11 月 21 日東京)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

池田 公英 (IKEDA KOEI)

熊本大学医学部附属病院・助教

研究者番号：20448525

(2)研究分担者

鈴木 実 (SUZUKI MAKOTO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：80312940

白石 健治 (SHIRAIISHI KENJI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：70363538