

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790340

研究課題名(和文) アジア人で多く発症するEGFR変異型肺腺がんリスクに関わる遺伝要因の解明

研究課題名(英文) Approach to identify genetic susceptibility to lung adenocarcinoma with EGFR mutation

研究代表者

白石 航也 (Shiraishi, Kouya)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：80609719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR変異を伴う腺がんの頻度は、欧米人とアジア人で大きく異なるから、EGFR変異を伴う肺腺がんに対する感受性に関わる遺伝要因は、恐らく人種や遺伝的背景によって異なると考えられる。本研究では、EGFR変異を伴う肺腺がん発症にかかわる新規感受性遺伝子を同定するために、663例のEGFR変異を伴う肺腺がん症例とバイオバンクジャパンの非がん対照群4,365例を用いて、全ゲノム関連解析を行った。その結果、既存の肺腺がん感受性遺伝子座であるTERT、TP63、BPTFとBTNL2は、EGFR変異を伴う肺腺がんの発症リスクと関連することを確認し、現在さらなる検証を進めている。

研究成果の概要(英文)：Advanced in genome research, it has become clear that the frequency of ADC with EGFR mutation was different between Asian and Caucasian. Therefore, genetic factors involved in susceptibility to ADC with EGFR mutation might be different by ethnicity or genetic background. To identify new susceptibility loci in ADC with EGFR mutation, we performed a genome-wide association study of ADC with EGFR mutation consisted of 663 cases from National cancer center hospital and 4,365 controls from Bio-bank Japan. In the GWAS, previously reported loci with ADC risk (TERT, TP63, BPTF and BTNL2) were also associated with risk for ADC with EGFR mutation. We detected EGFR mutation in DNA samples extracted from lung cancer tissues using HRMA. Further studies of putative susceptibility loci in several replication sets will need to identify new susceptibility to ADC with EGFR mutation.

研究分野：医学一般

科研費の分科・細目：人類遺伝学

キーワード：肺腺がん 遺伝子多型 全ゲノム関連解析

1. 研究開始当初の背景

肺がんはがん死因第一位を占める難治がんであり、生命を脅かす重要な因子である。近年、肺がん予防の改善・高危険度群の把握を目的として、欧米人喫煙男性を解析対象の中心としたゲノムワイド関連解析(GWAS)が行われ、アセチルコリン受容体(CHRNA)やテロメラーゼ触媒サブユニット(TERT)をコードする遺伝子の多型が肺がんリスクに関与することが明らかにされた。しかしながら、肺がん発症には人種差が存在し、遺伝要因(やおそらくそれと相互作用する環境要因)の差異により、本邦では欧米とは異なる肺がん生態系が構築されている。例えば、最も頻度の高い組織型である腺がんでは(Ⅰ)EGFR遺伝子体細胞変異を介するもの、(Ⅱ)KRAS遺伝子体細胞変異を介するもの、(Ⅲ)ALK転座等他の遺伝子異常を介するもの、という少なくとも3つの発がん経路が知られているが、本邦では(Ⅰ)の経路による発症例が半数を占めるのに対して、欧米の頻度は10%程度と大きく異なっている。また、欧米人と比し非喫煙者女性の比率が高い。よって、本邦の肺がん予防・高危険度群の把握に有用な遺伝要因を同定するためには、「EGFR遺伝子体細胞変異といった特定の因子により症例を層別化したGWAS」を行う必要がある。今までに、欧米・本邦を含め、発がん経路別の(すなわち、EGFR遺伝子変異等の情報に基づき層別化した)肺がんリスクに関するGWASの報告はない。これは、欧米では複数機関から収集される試料のメタ解析が主体であるため、均一かつ詳細な試料・診療情報の収集が困難であるためと考えられる。

所属施設で行われるGWAS(肺がんリスク)

研究データを2次利用する形で、EGFR変異腺がんリスクに関する関連解析を進め、EGFR変異肺腺がんに対する感受性遺伝子を同定し、それらの因子を組み合わせることで、アジア人特異的な肺腺がんに対する高危険度群補足のための基盤的情報を提供する。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの先行研究でほとんど解析されてこなかった宿主の遺伝要因(遺伝子多型)とがん細胞の特性(EGFR体細胞変異)との関連について、解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)肺腺がん組織由来DNA試料を用いたHRMAによるEGFR変異解析

検出研究の感度を高めるために既にIllumina Omini1チップで約70万SNPsの遺伝子型を決定した症例のうち、バイオプシーや手術検体などの組織診断用の余剰検体などからのDNA抽出を約500例行い、HRMAを用いてEGFR変異の検索を行った。その結果、181例のEGFR変異陽性肺腺がんを同定した。これらの症例を検出研究に追加し、最終的にEGFR変異を伴う肺腺がん701例とバイオバンクジャパンの非がん対照群4,776例を用いて、再度全ゲノム関連解析を行った。

次に検証研究用の症例数を確保するために、国立がん研究センター中央病院にて本研究に同意していただいた肺腺がん患者さんでかつ、当院で手術を受け手術標本約750例よりDNA抽出を行い、HRMAを用いてEGFR変異の検索を行った。その結果、約4割の380例のEGFR変異陽性肺腺がん症例を同定した。

(2)正常肺組織からのRNA抽出並びにcDNA

合成

EGFR 変異陽性肺癌に対する感受性遺伝子を同定した場合、その遺伝子の機能的意義（たとえば遺伝子発現動態など）の解明を行う必要がある。そこで、凍正常肺組織ならびにがん組織から 230 例分の RNA 抽出を完了し、cDNA を作成した。これにより、TaqMan gene expression assay による責任遺伝子の発現解析を行うことが可能となり、今後同定できると考えられる責任遺伝子の発現量と多型との関連について検討を行う予定である。

(3) 検証研究に用いる症例数確保に向けた取り組み

本研究を通して、約 1000 例の EGFR 変異陽性肺癌の同定に成功した。しかしながら、遺伝子多型研究において、真の感受性遺伝子を同定するためには、さらなる症例数が必要である。そこで、2011 年 5 月より開始された国立がん研究センター中央病院で実施されている新包括同意検体を用いることができるように、ゲノム指針に則った研究計画書を作成し、本センターの研究倫理審査委員会にて新たな研究計画書を提出し、承認された「2013-060：肺がんの予防・治療に資する遺伝要因の同定を目指す研究 研究代表者：河野隆志」。しかしながら、本研究計画書の承認が得られたのが最終年度の 9 月であったため、十分な試料を収集するには至らなかった。今後は検出力がある程度見込める症例数の確保を目指す。本年度においては、研究開始前試料である 356 例の肺がん及び正常組織から DNA を抽出した。今後は肺がん組織由来の DNA を用いて、HRMA 法を用いて EGFR 変異検索を行う予定である。

(4) EGFR 変異陽性肺癌に対する全ゲノム関連解析

今まで未検討であった EGFR 変異陽性肺癌がん症例を加えて、再度全ゲノム関連解析を行った。最終的に EGFR 変異を伴う肺がん

701 例とバイオバンクジャパンの非がん対照群 4,776 例を用いて、全ゲノム関連解析を行った。(図 1)。

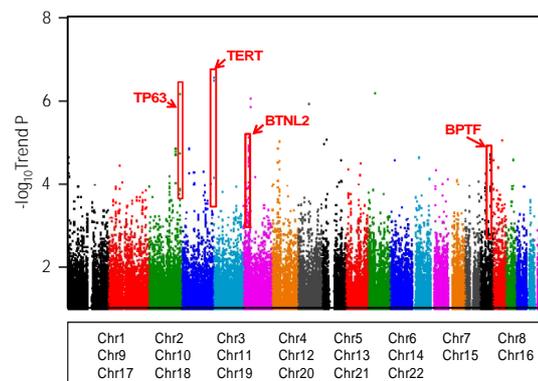


図1.EGFR変異陽性肺癌に対する全ゲノム関連解析の結果。図の縦軸はEGFR変異陽性発症リスクとの関連の強さを示し、横軸は染色体の位置を示す。4つの感受性遺伝子座は、Shiraishi et al., 2012 Nat Genetで同定された感受性遺伝子座を示す。

その結果、今までの研究において肺がんリスクと関連が認められていた TERT, TP63, BPTF, BTNL2 遺伝子の多型の他に、さらに複数の EGFR 変異を伴う肺がん感受性遺伝子の同定に至った(表 1)。

表1.肺がん感受性遺伝子多型とEGFR変異陽性肺癌がんリスクとの関連

遺伝子	dbSNP	リスクアレル頻度		オッズ比	P値
		症例	対照		
TERT	rs2736100	0.468	0.391	1.37	2.5E-07
TP63	rs10937405	0.269	0.323	1.28	2.3E-04
BPTF	rs7216064	0.241	0.294	1.35	2.1E-05
BTNL2	rs3817963	0.388	0.327	1.30	2.3E-05

次年度以降は、上位 100SNPs について Invader もしくは TaqMan assay による遺伝子型の決定を行う予定である。

本研究期間内に肺がんの感受性遺伝子の同定には至らなかったが、追加の症例数の確保や多施設との共同研究を積極的に行うことで、アジア人に多い EGFR 変異陽性肺癌がんの感受性の同定を進め、最終的にはアジア人を対象とする高危険度群の同定、リスクモデリングの構築を目指す。

4. 研究成果

全ゲノム関連解析の結果、今までの研究において肺がんリスクと関連が認められていた TERT, TP63, BPTF, BTNL2 遺伝子の多型

のほかに、さらに複数の EGFR 変異を伴う肺腺がん感受性に関わる候補となる遺伝子座の同定に至った。

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. Suzuki T, Shibata T, Takaya K, **Shiraishi K**, Kohno T, Kunitoh H, Tsuta K, Furuta K, Goto K, Hosoda F *et al.*: Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Molecular and cellular biology* 2013, 33(12):2402-2412. (査読あり) DoI: 10.1128/MCB.00065-13
2. **Shiraishi K**, Kunitoh H, Daigo Y, Takahashi A, Goto K, Sakamoto H, Ohnami S, Shimada Y, Ashikawa K, Saito A *et al.*: A genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for lung adenocarcinoma in the Japanese population. *Nature genetics* 2012, 44(8):900-903. (査読あり) DoI: 10.1038/ng.2353.

[学会発表] (計 3 件)

Shiraishi K, Kunitoh H, Daigo Y, Takahashi A, Goto K, Sakamoto H, Ohnami S, Shimada Y, Ashikawa K, Saito A, Watanabe S, Tsuta K, Kamatani N, Yoshida T, Nakamura Y, Yokota J, Kubo M, Kohno T. Genetic factors related with lung adenocarcinoma. 日本癌学会 2013 横浜

Shiraishi K, Kunitoh H, Daigo Y,

Takahashi A, Goto K, Sakamoto H, Ohnami S, Shimada Y, Ashikawa K, Saito A, Watanabe S, Tsuta K, Kamatani N, Yoshida T, Nakamura Y, Yokota J, Kubo M, Kohno T. A genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for lung adenocarcinoma in the Japanese population. An AACR Special Conference on Post-GWAS horizons in molecular epidemiology 2012 Hollywood, FL, USA
Shiraishi K, Kunitoh H, Daigo Y, Goto K, Sakamoto H, Yoshida T, Nakamura Y, Yokota J, Kohno T. A genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for lung adenocarcinoma in the Japanese population. 日本癌学会 2012 札幌

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

独立行政法人国立がん研究センター研究所
ゲノム生物学研究分野ホームページ

http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/genome_biology/

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

白石 航也 (SHIRAISHI Kouya)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号 : 80609719

(2) 研究分担者・連携研究者 : なし