

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670609

研究課題名(和文)ミトコンドリア多形解析に基づいた肺腺癌ドライバー変異体系化と発癌時遺伝子変異予測

研究課題名(英文)Mitochondrian haplotypes and EGFR mutations in Japanese lung cancer patients

研究代表者

佐藤 雅美 (Sato, Masami)

鹿児島大学・医学部・教授

研究者番号：30250830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子異常が確認された21例の肺癌切除例においてミトコンドリアDNAハプロタイプを決定した。EGFR遺伝子異常はEx19 del10例、L858R9例、その他2例でこれらは日本人肺癌例における既知のEGFR遺伝子変異頻度と同等だった。一方ミトコンドリアDNAハプロタイプはD4 7例、B4 2例、M7a 3例、G 2例、A 1例、F 1例、D5 1例、N9a 1例、M7b 1例、B5 1例、M9 1例であった。

EGFR遺伝子異常とミトコンドリアDNAハプロタイプとの相関を検討したが特定の遺伝子変異が集中するハプロタイプは確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：We examined mitochondrial haplotypes and EGFR mutations in 21 Japanese lung cancer patients. EGFR mutation were observed as follows, EX19 del in 10, L858R in 9 and others in two. In these 21 cases with EGFR mutations, mitochondrial haplotypes were as follows, D4 in 7, B4 in 2, M7a in 3, G in 2, A in 1, F in 1, D5 in 1, N9a in 1, M7b in 1, B5 in 1, and M9 in 1.

In conclusion, there is no relationship between mitochondrial haplotype and EGFR mutation. However, the number of examined cases was small. Thus future examination will be necessary to obtain final conclusions.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 遺伝子異常 EGFR ミトコンドリア ハプロタイプ

1. 研究開始当初の背景

EGFR 遺伝子変異は肺腺癌の発がん遺伝子として極めて重要で、その阻害剤による治療効果により、生存期間の延長が得られている。しかしながら、遺伝子変異の存在しない場合や耐性型の遺伝子変異の場合には、EGFR-TKI の投与は効果が全く期待できず、むしろその使用期間内に病勢の進行を来しかねない。従って、現在の肺癌治療方針の決定のためには、その遺伝子変異の有無、遺伝子変異のタイプを特定することは必須となった。

一方で、EGFR 遺伝子変異は極東の非喫煙者腺癌の約半数から 7 割程度に見られる。しかしながら、欧米などでは極めて稀で、肺癌の他の発がん遺伝子とは異なった地理的分布形態となっている。肺癌は、感染症に由来する疾患でないことは明らかであり、この特異な分布形式は、人類がアフリカで誕生し、その移動過程で獲得、あるいは喪失した何等かの遺伝子の変化によると考えるのが妥当である。同様の事例は、アフリカから移動中の人類の一集団でアルコール代謝に関する遺伝子の変化が中央アジアで発生し、その末裔である現在の日本人や極東アジアのモンゴリアンが著しくアルコール代謝に弱いということにも見て取ることが可能である。

一方で、すべての非喫煙日本人肺腺癌が EGFR 遺伝子異常を有しているわけではない。EGFR 遺伝子異常に関与するある特定の遺伝子変化を有している集団が存在するはずであるが、それを特定するのは、極めて困難であることは容易に推定できる。その一方で、ミトコンドリアの多形分析によれば、日本人は 17 の集団に分類することができ、太古におけるおおまかな移動経路なども推定されている。もし、太古の日本人の祖先の移動中に、このような遺伝子変化を来したのであれば、EGFR 遺伝子変異は特定のミトコンドリア多形集団にのみ観察されることとなるはずである。

EGFR 遺伝子異常に直結する遺伝子変化を直接捉えることができなくても、ミトコンドリアのハプロタイプ別に何等かの相関が存在することを示すことができれば、日本人、非喫煙者、肺腺癌における EGFR 遺伝子異常の有無やそのパターンをミトコンドリアのハプロタイプから推定することが可能となる。

EGFR 遺伝子異常は、癌組織、癌細胞を解析することが必要である。しかしながら、ミトコンドリアのハプロタイプは、血液から解析可能で、癌組織の部位により侵襲的検査が必要な場合においても、これを回避することが可能となる可能性がある。したがって、本研究は本邦肺癌例の EGFR-TKI 治療薬選択において、大きな光明となりうる可能性がある。

2. 研究の目的

本邦の非喫煙者肺癌例におけるミトコンドリアハプロタイプによる多形と

EGFR 遺伝子異常の有無、およびその遺伝子変異タイプの相関の有無を明らかにする。

2. 研究の方法

過去の研究結果から本研究で対象とする日本人のミトコンドリアハプロタイプを主要 18 グループとした (Tanaka et al. 2004, 篠田謙一 日本人になった祖先たち 2007)。

そのタイプは、以下の如くである。D4, B4, M7a, G, A, F, D5, N9a, M7b, B5, M9, M8a, N9b, M10, Z, M7c, C, Y (日本人の割合が高い順)

具体的には以下の手順によるが、その概要は、組織および培養細胞から DNA を採取し、最初に、ミトコンドリア環状 DNA の D-loop 内の超可変領域 I (HV1) の一部をシーケンスする。各グループの SNP をチェックすることで、シーケンスで判別できるハプログループ (13 グループ) B4, M7a, A, F, N9a, M7b, B5, M9, M10, Z, M7c, C, Y

について判別する。次にシーケンスで判別できないグループをマルチプレックス PCR でチェックする。マルチプレックス PCR で判別できるハプロタイプは 5 グループ D4, G, D5, M8a, N9b である。これらはハプロタイプと臨床で判明していた EGFR 遺伝子変異型との相関を検討する。以下の手順で検討を行った。

3-2: 組織採取および細胞培養 3-3. ミトコンドリア DNA 抽出 3-4. ミトコンドリア DNA の D-loop 内の超可変領域 I の PCR 反応 3-5. ミトコンドリア DNA の D-loop 内の超可変領域 I のシーケンス反応 3-6. ミトコンドリア DNA の D-loop 内の超可変領域 I のシーケンス 3-7. ミトコンドリア DNA ハプロタイプ D4, G, D5, M8a, N9b 決定のためのマルチプレックス PCR

4. 研究成果

研究結果の概要: 現時点で、EGFR 遺伝子変異の頻度は、ミトコンドリア DNA ハプロタイプ別に明らかな差異は認められなかった。しかしながら、鹿児島大学の共通実験施設の移転工事やシーケンサーの故障修理などのために、十分な検討症例数に到達したとは言えず、その結果に関しては、慎重に解釈する必要があると考えられた。

研究結果:

臨床症例の解析に先立ち、培養細胞株を用いて、本研究の遂行が可能であることを確認した。

EGFR 遺伝子異常が確認された 21 例の肺癌切除例において、ミトコンドリア DNA ハプロタイプを決定した。

観察された EGFR 遺伝子異常は、Ex19 del 15 例、L858R 5 例、その他 1 例であった。これらは日本人肺癌例における既知の EGFR 遺伝子変異の頻度とほぼ、同等であった。

一方、21例におけるミトコンドリア DNA ハプロタイプは、D4 7例、B4 2例、M7a 3例、G 2例、A 1例、F 1例、D5 1例、N9a 1例、M7b 1例、B5 1例、M9 1例であった。

さらに、EGFR 遺伝子異常すなわち、頻度の多い Ex19 del、L858R その他と、ミトコンドリア DNA ハプロタイプとの相関を検討したが、特定の遺伝子変異が集中するハプロタイプは確認できなかった。

この結果からは、現時点で、EGFR 遺伝子変異の頻度は、ミトコンドリア DNA ハプロタイプ別に明らかな差異は認められなかった。

本研究に関する考察：

本研究では、EGFR 遺伝子変異の頻度に関してミトコンドリア DNA ハプロタイプ別の相関を検討することを目的としたが、明らかな関連を示すことはできなかった。本研究では、EGFR 遺伝子異常を示した症例におけるミトコンドリア DNA ハプロタイプとの相関は検討したが、ミトコンドリア DNA ハプロタイプ別の EGFR 遺伝子変異の頻度やそのタイプまでは検討していない。従って、EGFR 遺伝子変異症例におけるミトコンドリア DNA ハプロタイプ別の偏りを示すには至らなかったが、ミトコンドリア DNA ハプロタイプ別の EGFR 遺伝子変異の頻度を算出したわけではない。今後、母集団をミトコンドリア DNA ハプロタイプ別として検討することで、関連性が示唆される余地を残していると考えられた。

なお、本研究において鹿児島県の肺癌症例におけるミトコンドリア DNA ハプロタイプ別の頻度を日本全体のそれと比較すると、M7a が多い傾向がみられた。沖縄県においては M7a の頻度が高いことが知られており、地理的要因を反映した結果と思われる。

本研究では、さまざまな事情（鹿児島大学の共通実験施設の移転工事やシーケンサーの故障修理など）のため、統計学的に有意な結論を得るにたる検討数までには至らなかった。今後、補完的に検討を進め、新たな知見が得られた場合には機会をとらえて報告する。

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. Watanabe Y, Ogura C, Hatanaka K, Okada Y, Watanabe T, Oishi H, Matsuda Y, Notsuda H, Harada A, Aoki M, Nagata T, Kariatsumari K, Nakamura Y, Sato M. MicroRNA Analysis in a Mouse Heterotopic Tracheal Model (in press) (査読有)

2. Watanabe Y, Aoki M, Suzuki S, Umehara T,

Harada A, Wakida K, Nagata T, Kariatsumari K, Nakamura Y, Sato M. Lung abscess mimicking lung cancer developed around staples in a patient with permanent tracheostoma Gen Thorac Cardiovasc Surg 63,632-635,2015 201510.1007/s11748-014-0392-z (査読有)

3. Watanabe Y, Sato M, Nakamura Y, Hoshikawa Y, Harada A, Nagata T, Yotsumoto G, Imoto Y, Okada Y. Right Lower Lobe Autotransplantation for Locally Advanced Central Lung Cancer. Ann Thorac Surg 2015 99(1)323-326,2015 (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.gov/pubmed/25555957>
10.1016/j.athoracsur.2014.02.065

4. Endo C, Nakashima R, Taguchi A, Yahata K, Kawahara E, Shimagaki N, Kamio J, Saito Y, Ikeda N, Sato M. Inter-Rater Agreement of Sputum Cytology for Lung Cancer Screening in Japan Diagnostic Cytopathology 43(7)545-550, 2015 201510.1002/dc.23253 (査読有)

5. Wakida K, Yotsumoto G, Yokomakura N, Sato M. Bilobectomy with superior pulmonary vein reconstruction with a greater saphenous vein autograft to avoid pneumonectomy The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 149(1) 392-394,2015.1 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2014.10.039>

10.1016/j.jtcvs.2014.10.039 (査読有)

6. Watanabe Y, Harada A, Aoki M, Kamimura G, Wakida K, Nagata T, Yokomakura N, Kariatsumari K, Nakamura Y, Sato M. Pulmonary Metastascctoy 31 years after Surgery for Renal Cell Carcinoma, The Annals of Thoracic Surgery 99, 2195-2197, 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2014.07.077>

[10.1016/j.athoracsur.2014.07.077](http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2014.07.077) (査読)

有)

7. Kato H, Kurosawa K, Inoue Y, Tanuma N, Momoi Y, Hayashi K, Ogoh H, Nomura M, Sakayori M, Kakugawa Y, Yamashita Y, Miura K, Maemondo M, Katakura R, Ito S, Sato M, Chiba N, Watanabe T, ShimaH. Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced carcinogenesis Cancer letters 365,223-228, 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.05.022> (査読有)

2015.05.02210.1016/j.canlet.2015.05.022 (査読有)

8. Watanabe Y, Shibuya J, Handa M, Watanabe T, Notsuda H, Saito R, Hatanaka K, Okada Y, Sato M. Unilateral Absence of the Right Pulmonary Artery Accompanied by Right Lung Cancer Ann Thorac Surg 100, 1113, 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsue.2015.05.106> 10.1016/j.athoracsue (査読有)

10.1016/j.athoracsue (査読有)

9. Wakida K, Watanabe Y, Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Hiraki T, Kamimura G, Nagata T, Nakamura Y, Sato M. Lymphangioliomyomatosis in a Male. Ann Thorac Surg 100,1105-1107,2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2014.11.069> 10.1016/j.athoracsur (査読有)

10. 佐藤 雅美, 柴 光年, 齋藤 泰紀, 佐藤 之俊, 渋谷 潔, 土田 敬明, 中山 富雄, 宝来 威, 池田 徳彦, 河原 栄, 三浦 弘之, 中嶋 隆太郎, 田口 明美, 矢羽田 一信, 島垣 二佳子, 神尾 淳子, 長尾 緑, 三宅 真司, 下川 幸弘, 田中 良太, 遠藤 千頭肺がん検診における喀痰細胞診の診断

一致性と標準化. 肺癌 55 (6) 859-865,2015.10 (査読有)

11. Umehara T, Aoki M, Harada A, Watanabe Y, Sato M. A Case of Nontuberculous Mycobacteria Highly Suspected as Lung Cancer Invading the Aortic Arch. J Thorac Oncol 10(7) 1118-1119,2015 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26134231> 10.1097/JTO.0000000000000413. (査読有)

12. 横枕 直哉, 西島 浩雄, 柳 正和, 脇田 和博, 原田 亜矢, 佐藤 雅美. 約5年間の経過観察中に増大傾向を認めた炎症性多発するガラス結節の1切除例. 日本呼吸器外科学会 29 (7) 890-895,2015 (査読有)

13. 梅原 正, 永田俊行, 中村好宏, 鈴木聡一, 横枕直哉, 佐藤雅美. 妊娠36週で自然気胸を起こしドレナージ後に再膨張性肺水腫をきたした1例 日本呼吸器外科学会誌 28 (2) 149-152 : 2014 (査読有)

14. 中村好宏, 佐藤雅美. いますぐ役立つ診断・治療デバイス - 気管支鏡 - 胸部外科 37 (8) 702-709,2014 (査読有)

15. 小林 健, 木部佳記, 樋浦 徹, 田中洋史, 西井研治, 小林弘明, 鐘撞一郎, 原田亜矢, 永田俊行, 中村好宏, 佐藤雅美, 中山博史, 阿久津敏恵, 桜田晃, 竹田芳弘, 佐川元保. 低線量CT肺がん検診における被曝線量と許容画質の検討 CT検診学会誌 21 (2) 68-73,2014 (査読有)

〔学会発表〕(計68件)一部省略

1. 中村好宏, 狩集弘太, 大塚綱志, 永田俊行, 原田亜矢, 鈴木聡一, 佐藤雅美. 左上葉切除術における前方アプローチによる気管分岐下リンパ節郭清 第32回日本呼吸器外科学会総会、かがわ国際会議場(香川県高松市) 2015.5.14

2. 中村好宏, 原田亜矢, 狩集弘太, 大塚綱志, 永田俊行, 青木雅也, 鈴木聡一, 佐藤雅美. 持続陰圧吸引療法(NPWT)を用いた膿胸開窓後の閉鎖術 第32回日本呼吸器外科学会総会、かがわ国際会議場(香川県高松市) 2015.5.14

3. 狩集弘太, 大塚綱志, 中村好宏, 永田俊

行, 青木雅也, 原田亜矢 佐藤雅美. 当科における抗血栓薬服用者に対する周術期管理の現状と問題点 第32回日本呼吸器外科学会総会、かがわ国際会議場(香川県高松市) 2015.5.14

4. 徳永拓也, 中村好宏, 原田亜矢, 青木雅也, 永田俊行, 大塚綱志, 狩集弘太, 佐藤雅美. 血管塞栓術用コイルの気管支内逸脱に対する1手術例 第32回日本呼吸器外科学会総会、かがわ国際会議場(香川県高松市) 2015.5.14

5. Watanabe Y, Nagata T, Aoki M, Harada A, Suzuki S, Umehara T, Kamimura G, Wakida K, Otsuka T, Yokomakura N, Kariatsumari K, Nakamura Y, Sato M. Lymphogenic skip metastases and adjacent segmental metastases may occur in limited resection for subpleural lung cancer. The 18th WCBIP 2014/04/14, Kyoto, Japan

6. Harada A, Nakamura Y, Umehara T, Suzuki S, Kamimura G, Wakida K, Watanabe Y, Aoki M, Nagata T, Otsuka T, Yokomakura N, Kariatsumari K, Sakasegawa K, Yanagi M, Sato M. Pleural lymph flows by the ICG fluorescence method with near-infrared camera(A hundred cases experience), 18th WCBIP, 2014/04/14, Kyoto, Japan

7. Aoki M, Otsuka T, Wakida K, Umehara T, Harada A, Kamimura G, Watanabe Y, Nagata T, Yokomakura N, Kariatsumari K, Sakasegawa K, Nakamura Y, Sato M. A tumor excision case of Castleman disease in pulmonary hilum, 18th WCBIP, 2014/04/14, Kyoto, Japan

8. Watanabe Y, Nagata T, Aoki M, Harada A, Suzuki S, Umehara T, Kamimura G, Wakida K, Otsuka T, Yokomakura N, Kariatsumari K, Nakamura Y, Sato M. Lymphogenic skip metastases and adjacent segmental metastases may occur in limited resection

for subpleural lung cancer, 18th WCBIP, 2014/04/14, Kyoto, Japan

9. Nakamura Y, Kariatsumari K, Yokomakura N, Otsuka T, Nagata T, Aoki M, Watanabe Y, Wakida K, Harada A, Umehara T, Suzuki S, Sato M. Novel bronchial occlusion method using an Endobronchial Watanabe Spigot for empyema with bronchopleural fistula, 18th WCBIP, 2014/04/14, Kyoto, Japan

10. Otsuka T, Yanagi M, Yokomakura N, Aoki M, Harada A, Wakita K, Nagata T, Sakasegawa K, Nakamura Y, Suzuki S, Umehara T, Kamimura G, Maeda K, Watanabe Y, Kariatsumari K, Sato M. Ultrasonic balloon measurement and suitable stenting for airway stenosis, 18th WCBIP 2014/04/14, Kyoto, Japan

11. Nagata T, Nakamura Y, Yamamoto H, Sato M. A fenestrated stent graft for surgical resection of lung cancer invading the aortic arch, 18th WCBIP 2014/04/15, Kyoto, Japan

〔図書〕(計3件)

1. 佐藤雅美, 青木雅也、呼吸器疾患の検査、P34~38、呼吸器外科テキスト~外科専門医・呼吸器外科専門医をめざす人のために~:日本呼吸器外科学会呼吸器外科専門医合同委員会編、南江堂:2016.4.30

2. 佐藤雅美、中村好宏、狩集弘太、永田俊行、青木雅也、渡辺有為:地域医療に尽くす鹿児島大学病院の最新手術、P77~84、デザイン:南方新社,朝日印刷:2015.4.1

3. 佐藤雅美、第 章胸腔ドレナージ P40~44、気管支鏡下手術 P45~51、手術法5-2 P73~82、第 章腫瘍性疾患 P123~156:ポケット呼吸器外科ハンドブック:南江堂:2015.3.31

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者：佐藤雅美 (SATO, Masami)

鹿児島大学医歯学域医学系（教授）

研究者番号：30250830

(2)研究分担者 - 1：中村好宏 (NAKAMURA Yoshihiro)

鹿児島大学医歯学域医学部・歯学部附属
病院（講師）

研究者番号：60381159

研究分担者 - 2：狩集弘太 (KARIATSUMARI Kohta)

鹿児島大学医歯学域医学部・歯学部附属
病院（助教）

研究者番号：20648050

研究分担者 - 3：大塚綱志 (Ohtsuka Tsunayuki)

鹿児島大学医歯学域医学部・歯学部附属
病院（助教）

研究者番号：40464466

研究分担者 - 4：青木雅也 (AOKI Masaya)

鹿児島大学医歯学域医学系（助教）

研究者番号：50624996

研究分担者 - 5：永田俊行 (NAGATA Toshiyuki)

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院（医
員）

研究者番号：70611763