

平成29年度シニア・リサーチフェロー  
**研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 31 日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団  
理 事 長 堀 田 知 光 殿

報告者氏名： 本多 隆行



研究課題：

遺伝要因による能動・受動喫煙による体細胞変異シグネチャーの異同の解明  
(テーマ)

研究期間： 自 平成 29 年 4 月 1 日

至 平成 30 年 3 月 31 日

研究指導者： 氏名 河野 隆志



公益財団法人 がん研究振興財団

# 平成 29 年度 がん研究振興財団 リサーチフェロー 研究成果報告書

研究課題 :

## 遺伝要因による能動・受動喫煙による 体細胞変異シグネチャーの異同の解明

### (1) シニア・リサーチフェロー期間中の研究についての報告

#### 【要旨】

**背景:** 肺腺がんは喫煙との関連が弱いとされていたが、一部の研究からは肺腺がんにおいて遺伝学的要因とくに ALDH2 (アルコールデヒドロゲナーゼ 2) 遺伝子失活多型によって、その交互作用から発がんにおける喫煙のリスクが高くなる可能性が示唆されている。

**目的:** 肺腺がんにおいて ALDH2 遺伝子失活多型が喫煙と交互作用を示し、そのリスク(オッズ比)を上げるか検証する。また、肺腺がんの体細胞変異の解析から多型の影響が変異に蓄積されているのかを検証する。

**方法:** 二つの独立した NCCH1 コホート研究(肺腺がん患者 1583 例/健常者 1147 例)および NCCH2 コホート研究(肺腺がん 1035 例/健常人 2336 例)の遺伝子座決定を行い、ALDH2 多型が喫煙の Odds 比を上昇させるか関連解析を行う。また、402 例の肺腺がんの全エクソン解析(WES)を行い、各多型群に特徴的な変異パターン(変異シグネチャー)の異動を検証する。

**結果:** NCCH1 および NCCH2 コホート研究いずれも、ALDH2 遺伝子失活多型(rs671\_AA\_504Lys)は喫煙と交互作用を示し、重喫煙者(Pack year $\geq$ 45)に

において顕著に Odds 比を有意に上昇させることができた(NCCH1:Odds 比 =40 P<sub>interaction</sub>=0.038, NCCH2 : Odds 比=57 P<sub>interaction</sub>=0.23)。また、WES の結果からは ALDH2 失活多型に有意に多い変異シグネチャーを見出した。

**結論:**ALDH2 遺伝子多型は喫煙と交互作用し、そのオッズ比を上昇させる。

またその影響が腫瘍の体細胞変異の差異として可視化が可能であった。

## 〔序〕

肺腺がんの化学療法では、ドライバー遺伝子の体細胞変化を標的とした分子標的治療が有効であるが、いずれ耐性を獲得し再発するため根治は難しい。従って、早期診断・外科的根治切除のための高危険度群の捕捉が肺がん死減少のための最も有効な手段となる。喫煙は肺がん発症の原因として広く知られ、肺扁平上皮がんや肺小細胞がんの原因と考えられている。全ゲノム多型関連解析(GWAS)からは喫煙代謝経路の遺伝子多型によって発がんリスクが高まることも示されている<sup>1</sup>。一方で、肺腺がんは肺がんの約半数を占めるが、他の組織型と異なり喫煙との関連が弱く<sup>2</sup>、肺腺がんの高危険度群の把握は困難であった。

これまでの我々の検討では全ゲノム多型関連解析(GWAS)を行うことにより、肺発がんリスク因子となる遺伝子多型を複数同定し、またそれらの感受性遺伝子座は喫煙の有無に関わらず肺腺がんの発症リスクに関わる(喫煙とは交互作用が見られない)ことも同時に明らかにした<sup>3-6</sup>。一方、ALDH2(アルコールデヒドロゲナーゼ2)遺伝子には遺伝子多型(rs671; major allele GG/minor allele AA)が存在し、そのうちアジア人に特異的な失活多型(rs671\_AA\_504Lys)アレルでは、アルコール代謝能を規定する。日本人においては約5%がこの失活多型を有することが知られている。一方で、煙草中に含まれる変異原物質であるアセトアルデヒドの分解能も同時に規定する。アセトアルデヒドは頭頸部がんおよび食道がんに代表的であるが発がんリスクに大きく関与しており<sup>7</sup>、失活多型はこれらの

がん種におけるリスク因子と考えられている。ところで、肺腺がんにおいてもこの多型が肺腺がんの発がんにおける喫煙のリスクを大きく上昇させるアジア人特有の遺伝要因であることが示唆されている<sup>8</sup>。すなわち現時点では、肺腺がんの発がんにおける遺伝的要因は存在するが、統計学的な検出力の問題により同定できていないことを示している。

一方で、発がんにおける喫煙の関与は、肺がんゲノム DNA に蓄積する体細胞変異の塩基置換パターン（変異シグネチャー）によって可視化が可能となっている<sup>9 10</sup>。代表的なものは、煙草中のベンツピレン DNA アダクトを反映する C→A 変異シグネチャーである<sup>9</sup>。遺伝子多型によって規定される高危険度群の腫瘍組織に、特徴的な煙草中発がん物質もしくはその代謝産物による遺伝子変異を誘発した場合、特異的な変異シグネチャーが検出されると考えられる。実際に他がん腫の大規模がんゲノム解析の結果からは BRCA 遺伝子の胚細胞変異を有するサンプルからは特徴的な変異シグネチャーが抽出されている<sup>9</sup>。したがって、多型の影響による体細胞変異の影響が可視化できるようになってきている。

今回我々は、これまでの研究で交互作用を見据えた関連解析が可能にする統計学的サンプルサイズを満たす検体収集を終えたため、喫煙と交互作用する遺伝要因について関連解析を行いその同定とリスク評価を行い、さらに全エクソン解析を用いて体細胞変異に及ぼす影響を変異シグネチャーによってその発がん機構における影響を可視化するため本研究を行った。

## **[実験方法]**

### **関連解析対象患者**

二つの独立なコホートを設定した。国立がん研究センター中央病院(NCCH)で肺腺がんと診断され研究同意を得た症例および健常ボランティアからコホートを構成した。NCCH1 コホート研究(肺腺がん患者 1583 例/健常者 1147 例)および NCCH2 コホート研究(肺腺がん 1035 例/健常人 2336 例)から関連解析を行った。

### **DNA 抽出およびドライバー遺伝子スクリーニング**

ゲノム DNA は QIAamp DNA Mini kit (Qiagen K.K, Tokyo, Japan)を用いて抽出した。ドライバー遺伝子のスクリーニングは、*EGFR*, *KRAS*, *BRAF* および *HER2* のホットスポット変異については High-Resolution Melting 法 High-Resolution Melting 法で解析した。*ALK*, *RET* および *ROS1* については RT-PCR で解析を行った。

### **遺伝子型決定**

ALDH2 遺伝子多型(rs671)の情報は Illumina HumanOmni1-Quad Chip/Illumina Human OmniExpress Genotyping BeadChip/Illumina Human OmniExpress exome Genotyping BeadChip のいずれかを用いて同定した。

### **Whole-exome Sequence (WES) analysis**

WES は国立がん研究センター中央病院で 1999 年～2013 年の間に根治的手術を受けた症例の中で、研究解析の同意を得たものの残余検体から試料を抽出した 402 例を対象とした。これらの症例は一部関連解析で利用された症例と重複する。既存の WES 施行症例および WES 候補症例の ALDH2 遺伝子多型 (rs671) の情報は WES シークエンスデータあるいは Illumina HumanOmni1-Quad Chip/Illumina Human OmniExpress Genotyping BeadChip/Illumina Human OmniExpress exome Genotyping BeadChip のいずれかを用いて解析した。

腫瘍部 (T) と非腫瘍部 (N) からゲノム DNA を QIAamp DNA Mini kit (Qiagen K. K, Tokyo, Japan) を用いて抽出した。WES はゲノム DNA を 1.0–2.5 μg を使用し、T および N に対して SureSelect Human All Exon exome capture kit (version 4 or 5) (Agilent Technologies Japan, Ltd, Tokyo, Japan) でライブラリー作成を行い、Illumina HiSeq 2000 platform (Illumina, San Diego, CA, USA) でシークエンスを行った。リファレンスゲノムは Hg19 で、Burrows Wheeler Aligner package でアライメントをつけた。シークエンスカバレッジは T および N それぞれ平均 100 リードとなるようにした。Mutation calling について单塩基変異 (SNV) は Mutect<sup>11</sup>、挿入・欠失変異 (Indel) については GATK Somatic Indel Dectector (BROAD Institute, <http://www.broadinstitute.org/gatk/>) を用いて検出した。rs671 の情報については WES シークエンスデータからも haplotype caller を用いて検証し、一致を認めた。

## 変異シグネチャー解析

肺腺がんゲノムの変異シグネチャー解析を、各サンプルの 6 種類の塩基置換パターン (C>A, C>G, C>T, T>A, T>C, T>G) に加えて、その前後の 5' と 3' の塩基パターンを考慮した計 96 パターンに分類した。その変異パターンは Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures>) に登録がある 30 種類の変異シグネチャーの中から、肺がんあるいは喫煙との関連が報告されている COSMIC 変異シグネチャー 1, 2, 4, 5, 6, 13, 15, 16, 17 (ref) を参照として、得られた解析データとこれら COSMIC 変異シグネチャーとの類似性がカルバックライブラリ距離を最小となるように分解した<sup>12</sup>。

## 統計学的解析

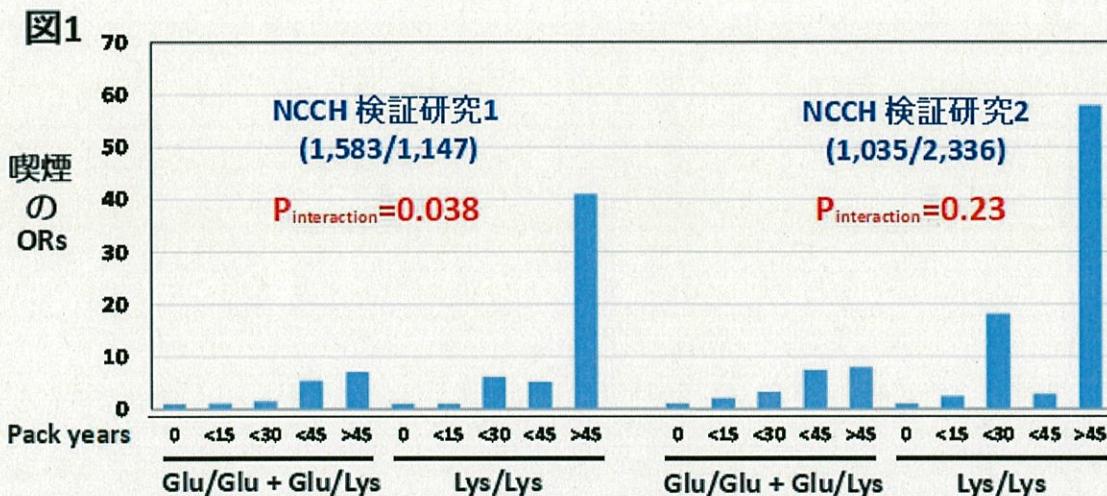
関連解析はロジスティック回帰検定を用いて行った。説明変数の群間差は Student T 検定、Mann-Whitney U 検定、Kruskal-Wallis 検定、ピアソンカイ二乗検定、Fisher の正確検定を適切に用いた。グラフは Mean ± SEM で表記した。統計的処理は JMP 8.0 software (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan) あるいは GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software) を用いて行い、p 値 < 0.05 を有意とした。

## [結果]

ALDH2 遺伝子失活多型(rs671\_AA\_504Lys) は交互作用により、肺腺がん発

がんにおける喫煙のリスクがあがる。

2つのコホート(NCCH1/2)において、肺腺がんの発がんにおける ALDH2 遺伝子失活多型と喫煙の交互作用を検証した。NCCH1 コホート研究および NCCH2 コホート研究において、喫煙歴を調整したロジスティック回帰検定を行い、喫煙の Odds 比を算出した。二つのコホートいずれにおいても、ALDH2 遺伝子失活多型(rs671\_504Lys)のを有する症例は、特に重喫煙者群(Pack year $\geq$ 45)では顕著に喫煙の Odds 比が上昇することが明らかになった(図 1, NCCH1:Odds 比=40 P<sub>interaction</sub>=0.038, NCCH2 : Odds 比=57 P<sub>interaction</sub>=0.23)。また、アセトアルデヒド代謝経路におけるその他の遺伝

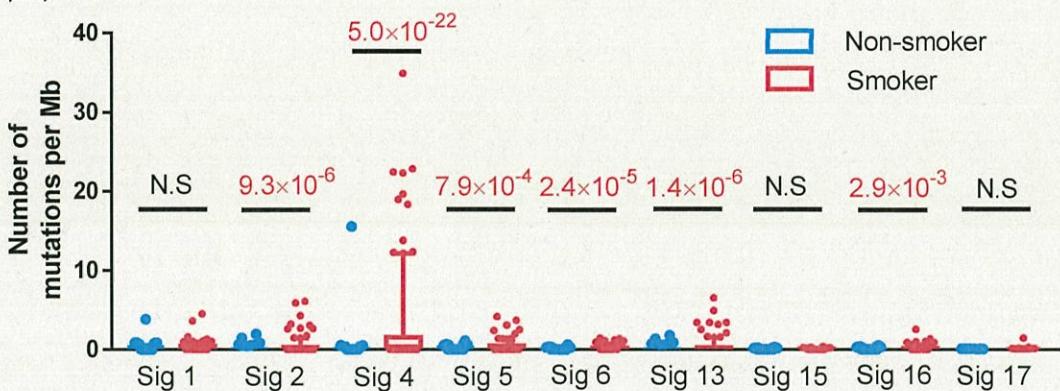


子多型(ADH1B 遺伝子多型[rs1229984]、および ADH1C 遺伝子の二つの多型[rs698 and rs1693482])では喫煙との交互作用は認めなかった(data not shown)。以上の結果は、ALDH2 遺伝子失活多型が喫煙と交互作用を示して発がんにおける喫煙のリスクを高めることが示された。すなわち、肺腺がんにおいても喫煙の影響を受ける遺伝的要因の存在が確認された。

## 本邦肺腺がんの WES から抽出した変異シグネチャーと喫煙との関連

一部のサンプルは関連解析と重複して、計 402 例の肺腺がん腫瘍部および非腫瘍部に対して WES を施行、体細胞変異について探索した。得られた変異データを COSMIC 変異シグネチャー 1, 2, 4, 5, 6, 13, 15, 16, 17 によって分解した。各変異シグネチャーと喫煙の関連を調べるため、喫煙者と非喫煙者について各変異シグネチャーの異同を検討したところ、先行研究同様に COSMIC 変異シグネチャー 2, 4, 5, 6, 13, 16 が喫煙者に有意に多く喫煙に関連した変異シグネチャーであることが確認された(図 2)。

図 2



ALDH2 遺伝子失活多型は、特徴的な体細胞変異シグネチャーを示す。

更に、WES 施行症例を ALDH2 遺伝子多型(rs671\_AA n=63/AG n=149/GG n=190)ごとに 3 群に分けて検討した。SNV 中央値はそれぞれ 1.11/Mb, 1.18/Mb, 0.97/Mb であった(Kruskal-Wallis 検定, p=0.764)。Indel 中央値は 0.078/Mb, 0.10Mb, 0.11Mb で(Kruskal-Wallis 検定, p=0.0135)、遺伝子型

が Major homo (rs671\_GG) に Indel が多い傾向であった。3 群間において臨床的特徴(年齢・性別・喫煙歴・ドライバー遺伝子の分布)には差を認めなかった(表 1)。また、The Cancer Genome Atlas (TCGA) による大規模ゲノム解析で報告された肺腺がんにおける高頻度遺伝子(ref) の分布についても各群で差を認めなかつた(図 3)。

先の結果から明らかとなつた喫煙関連の変異シグネチャー(COSMIC 変異シグネチャー 2, 4, 5, 6, 13, 16)について多型毎に大小を比較したところ、COSMIC 変異シグネチャー 16 由来の推定変異数は喫煙量依存性に増加し、AA/AG/GG の多型によって有意な差を認めた(図 4)。従つて、COSMIC 変異シグネチャー 16 は ALDH2 多型によって分解能が規定される変異原、例えばアセトアルデヒド、の影響を示していると考えられる。

表1

	Polymorphism at rs 671			p-value <sup>1</sup>
	AA	AG	GG	
Cases, number	63	149	190	0.8670
Age, y				
Median	61	62	61	
Range	37-84	23-84	20-83	
Sex, number (%)				0.7125
Male	35 (55.6)	85 (57.0)	100 (52.6)	
Female	28 (44.4)	64 (43.0)	90 (47.4)	
Smoking (pack-year), number (%)				0.6777
P.Y=0	24 (38.1)	66 (44.3)	85 (44.7)	
0<P.Y<45	27 (42.9)	49 (32.9)	66 (34.7)	
45≤P.Y	12 (19.0)	34 (22.8)	37 (19.5)	
Unknown	0	0	2 (1.1)	
Driver oncogene aberration number (%)				0.3004
EGFR mutation	30	65	82	
KRAS mutation	9	12	20	
BRAF mutation	1	2	0	
HER2 mutation	3	1	2	
ALK fusion	0	4	12	
RET fusion	0	6	7	
ROS1 fusion	0	4	6	
Pan-negative	20	55	61	

<sup>1</sup>P-value was derived by Kruskal Wallis test or Pearson's chi-square test, as appropriate.

### Significantly Mutated Genes      Driver genes

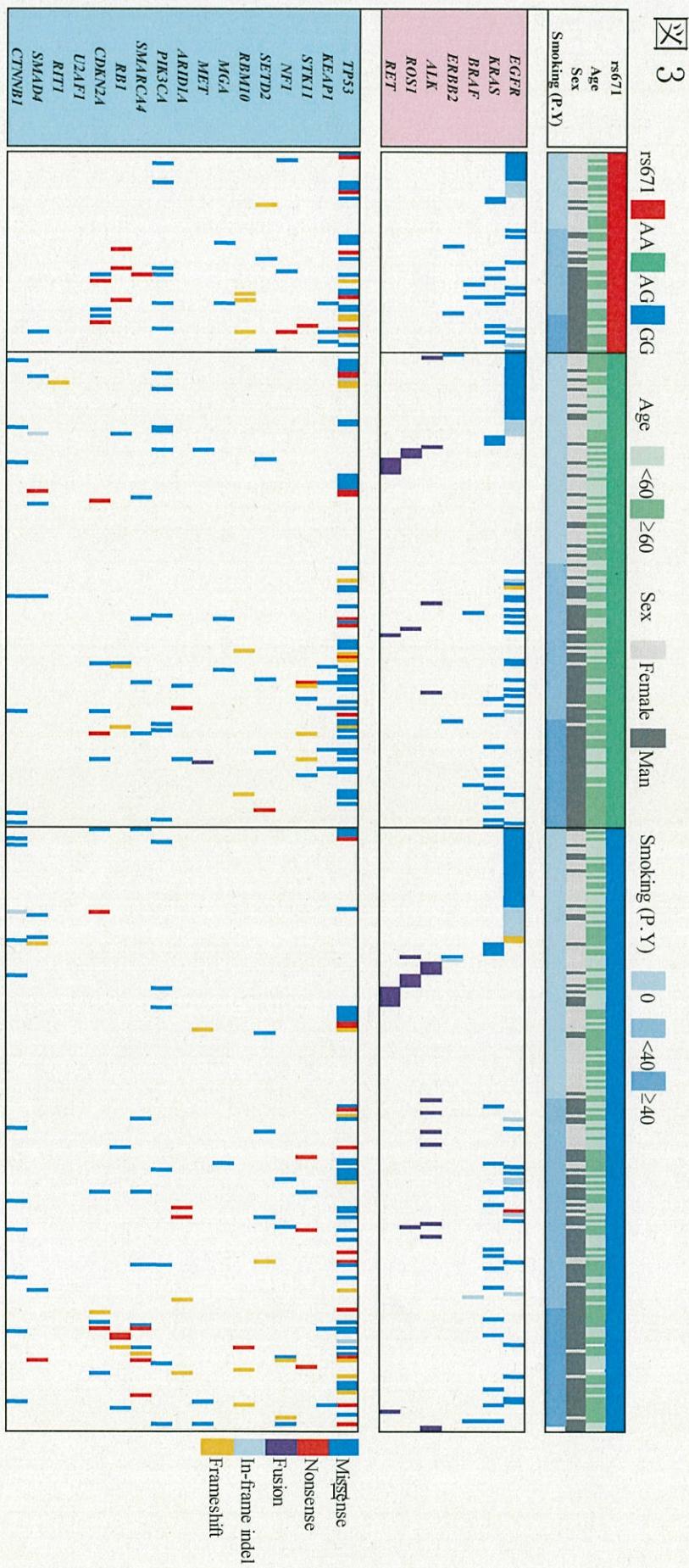
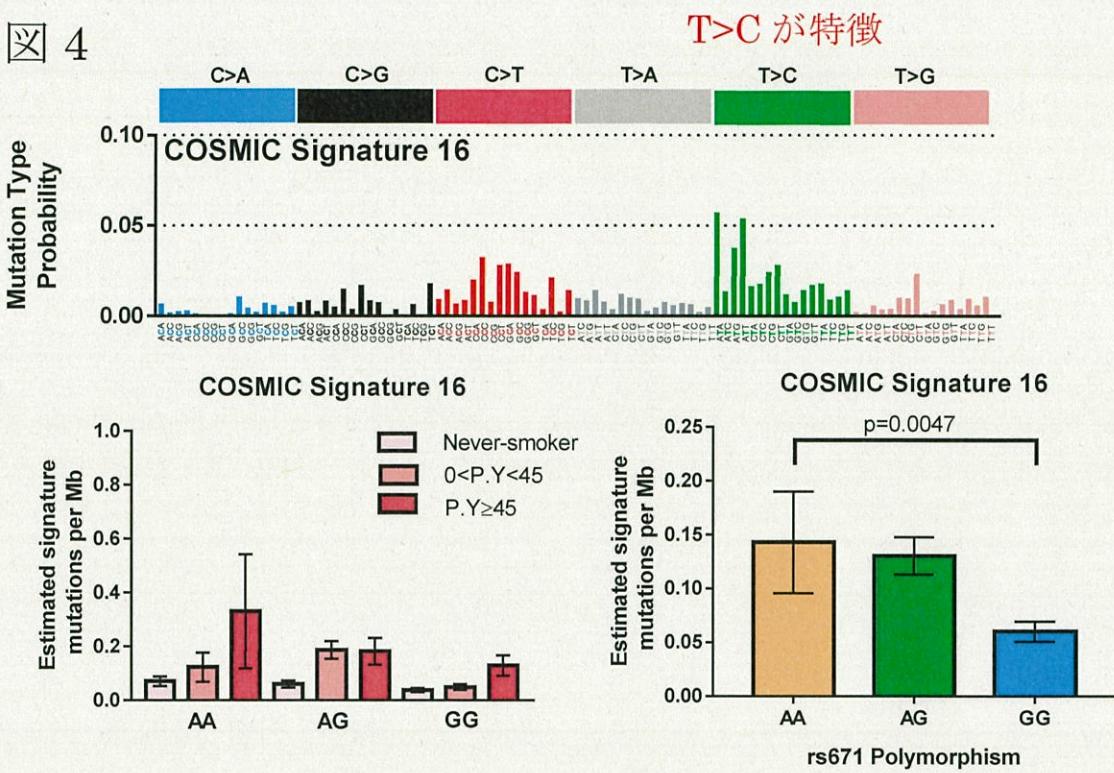


図 4



### [考察]

これまでの疫学的報告では喫煙との関連が弱いとされていた肺腺がんであるが、今回の研究で我々は、①ALDH2 遺伝子多型は肺腺がん発がんにおいて喫煙のオッズ比をあげる遺伝的要因であることが証明され、②ALDH2 遺伝子多型によってがん細胞中の体細胞変異パターンにも COSMIC 変異シグネチャー-16 という特徴的パターンが有意に多くその痕跡を残していること、が明らかになった。特に ALDH2 遺伝子失活多型はアジア人に特徴的な遺伝子多型であることから、今回の研究結果は本邦肺腺がんに対して、欧米とは異なるアプローチも必要となるという予防医学上の基礎的エビデンスを提供しうるものである。

アセトアルデヒドは疫学的研究から頭頸部がん・食道がんを中心として発がんリスクに大きく関していることが知られている<sup>7</sup>。アセトアルデヒドの代謝産物である N2-ethylidene-deoxyguanosine はや 1, N2-propano-2'-deoxyguanosine はゲノム DNA に作用して変異原として作用していることが考えられている<sup>13</sup>。実際に起こるゲノム DNA 上の異常としては、ヒトリンパ球を用いた HPRT reporter assay からは G>A 次いで A>T が高頻度に起こるとの報告がある<sup>14</sup>。肺腺がんは末梢に肺胞上皮を発生母地とするため、煙草中に含まれるアセトアルデヒドが肺胞上皮に上記のような変異原に暴露させることで発がんに至ると考えられる。

しかし依然として、実際の生体内でのゲノミクス的あるいは分子生物学的な機序については未解明な部分も多い。COSMIC 変異シグネチャー<sup>16</sup> は当初本邦肝臓がんの大規模ゲノム解析から同定されたものであり、<sup>9</sup> 中国の食道がんゲノム解析からも同様に抽出されて ALDH2 遺伝子失活多型との関連が示唆されており<sup>15</sup>、アセトアルデヒドによるゲノム異常の痕跡である可能性が高い。しかし、先行研究から得られている知見と異なる部分も存在し、この変異シグネチャーは T[A]>C[G] を高頻度に認めるものであるが、基礎的先行研究とは異なっている。また、アセトアルデヒドは DNA 二重鎖切断を起こすことが知られているが、そのがんゲノム DNA への痕跡は本研究では検討しておらず今後の課題と考えられる。

## 参考文献

1. Shiraishi K, Honda T: An Overview of Genetic Polymorphism and Lung Cancer Risk. *Advances in Cancer Prevention* 01, 2016
2. Subramanian J, Govindan R: Molecular genetics of lung cancer in people who have never smoked. *Lancet Oncol* 9:676-82, 2008
3. Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, et al: Contribution of nicotine acetylcholine receptor polymorphisms to lung cancer risk in a smoking-independent manner in the Japanese. *Carcinogenesis* 30:65-70, 2009
4. Kohno T, Kunitoh H, Shimada Y, et al: Individuals susceptible to lung adenocarcinoma defined by combined HLA-DQA1 and TERT genotypes. *Carcinogenesis* 31:834-41, 2010
5. Shiraishi K, Kunitoh H, Daigo Y, et al: A genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for lung adenocarcinoma in the Japanese population. *Nat Genet* 44:900-3, 2012
6. Shiraishi K, Okada Y, Takahashi A, et al: Association of variations in HLA class II and other loci with susceptibility to EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *Nat Commun* 7:12451, 2016
7. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, et al: Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer* 112:580-93, 2015
8. Park JY, Matsuo K, Suzuki T, et al: Impact of smoking on lung cancer risk is stronger in those with the homozygous aldehyde dehydrogenase 2 null allele in a Japanese population. *Carcinogenesis* 31:660-5, 2010
9. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al: Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500:415-21, 2013
10. Alexandrov LB, Ju YS, Haase K, et al: Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science* 354:618-622, 2016
11. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, et al: Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol* 31:213-9, 2013
12. Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al: Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 23:703-713, 2017
13. Brooks PJ, Theruvathu JA: DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol* 35:187-93, 2005
14. Noori P, Hou SM: Mutational spectrum induced by acetaldehyde in the HPRT gene of human T lymphocytes resembles that in the p53 gene of esophageal cancers. *Carcinogenesis* 22:1825-30, 2001
15. Chang J, Tan W, Ling Z, et al: Genomic analysis of oesophageal squamous-cell carcinoma identifies alcohol drinking-related mutation signature and genomic alterations. *Nat Commun* 8:15290, 2017

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいとかんがえているか

呼吸器内科医として7年間の臨床経験の後に研究生活を開始した。臨床医時代に感じた未解決問題や疑問点を解決するようなテーマ選択をモットーとして研究を開始した。肺がんの予後改善のためには、高危険度群の早くが極めて重要であるが、これまでの疫学的研究では肺腺がんにおけるそれらは明らかできていなかった。我々の研究は、肺腺がん発がんにおける喫煙の影響について、その遺伝学的側面からの多様性を明らかにした。本研究から喫煙の影響を受けやすい“喫煙弱者”を特定することができたため、禁煙運動を支持するエビデンスの構築に貢献できる可能性が高いと考える。

最近の報告で造血幹細胞のモデルケースでは、アルデヒドによるDNA損傷の機序として、アルデヒドによるDNA二重鎖切断後の修復エラーが原因である可能性が示唆された。ALDH2 遺伝子失活多型の患者ではアセトアルデヒドが体内で退社されないためゲノム DNA 上の二重鎖切断が多く観察される可能性がある。本研究を発展させる形で二重鎖切断の痕跡を探し、実際の生体内におけるアルデヒドの変異原としての機序の解明のため、更なる研究を現在進めている。

今後も肺発がんのメカニズムの解明と、それに基づく臨床上に有益なエビデンスの構築をライフワークとして研究活動に従事したいと考えて

いる。今回のリサーチフェロ一期間に学んだがんゲノム解析を中心とした技術・知識を活かし、更なる進歩ができるように努力していきたい。