

平成 28 年度 HOPE 事業研究助成金（個別研究課題）

研 究 報 告 書
(年 間)

平成 29 年 7 月 31 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 国立がん研究センター研究所

住 所 東京都中央区築地 5-1-1

研究者氏名 白石 航也



（研究課題）

EGFR 変異を伴う肺腺がんリスクに対する HLA-DPB1 アレルの違いとその機能的意義の解明

平成 28 年 8 月 5 日付助成金交付のあった標記研究課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

研究課題：

EGFR 変異を伴う肺腺がんリスクに対する *HLA-DPB1* アレルの違いとその機能的意義の解明

研究代表者：

国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野 ユニット長 白石航也

研究目的と背景：

本邦における肺がんは男女ともにがん死因上位を占める難治がんであり、罹患数は年々増加傾向にある。また複数の分子標的薬が開発されているが、多くの患者で再増悪することが知られており、進行肺がんに対する根治はきわめて難しいのが現状である。そのため、進行肺がんの5年生存率は20%以下であるのに対して、早期肺がんの5年生存率は70%以上であることから、肺がんに対する高危険度群を捕捉し、早期診断・治療を行うことができれば、肺がん死抑制のための有益な手段となりうる。近年のゲノム研究の進歩により、*EGFR* 変異を伴う肺腺がんの発症頻度は、欧米人に比べてアジア人で高いため、アジア人に特有の遺伝要因があると考えられてきた（図1）。そこで我々は *EGFR* 変異を伴う肺腺がん症例を対象に全ゲノム関連解析を実施し、*HLA-DPB1* を感受性遺伝子座として同定した（Shiraishi et al., Nat. Commun. 2016）。しかしながら、*HLA-DPB1* にはいくつかのアレルが存在し、また *EGFR* 変異型には主にエクソン19の欠失変異とエクソン21の点突然変異がよく知られているが、それそれに対する感受性の違いは明らかではない。本研究では、*EGFR* 変異型によって *HLA-DPB1* アレルの感受性に違いが認められるか、また免疫活性化能への違いの有無を明らかにすることで、*EGFR* 変異を伴う肺腺がんの発症メカニズムを明らかにし、高危険度群を捕捉するためのエビデンスとその手法の構築を目指す。

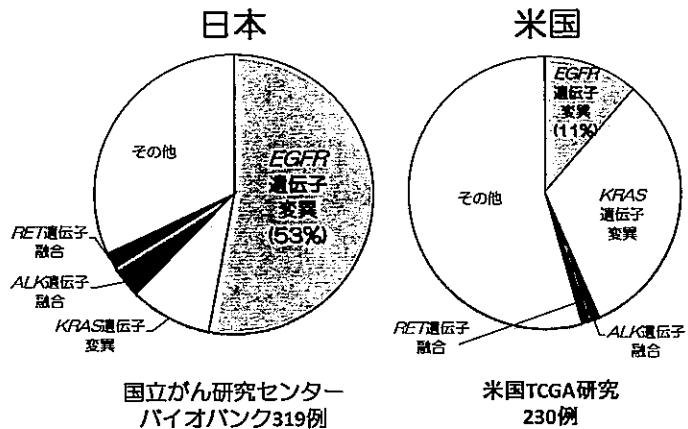


図1. 日本人と欧米人の肺腺がんに生じるがん遺伝子変異の違い
*EGFR*変異を伴う肺腺がんの発症割合は、欧米人に比べてアジア人で高い。

方法

本研究に用いた解析対象症例

検出研究に用いた症例は、1997年～2007年において国立がん研究センター病院にて、肺腺がんと病理学的に診断された症例を抽出しさらに、外科的もしくは内科的治療目的に採取された外科もしくは内科的余剰試料を用いて、*EGFR* 体細胞遺伝子変異検索を行うことができた肺腺がん症例 663 例、健常群はバイオバンクジャパンの非がん対照群 3,428 例とした（Shiraishi et al., Nat. Commun. 2016）。

さらに検証研究として、1997年～2014年において国立がん研究センター病院にて、肺腺がんと病理学的に診断された症例を抽出しさらに、外科的もしくは内科的治療目的に採取された外科もしくは内科的余剰試料を用いて、*EGFR* 体細胞遺伝子変異検索を行うことができた肺腺がん症例 2,414 例を研究対象とした（表1）。Luminex 法もしくは PCR-RFLP 法で *HLA-DPB1* 遺伝子型がタイピングされアレル型が分かっている 2 つの非がんボランティアを合わせた 2,183 例を健常群として本研究に用いた。

表1. 本研究に用いた症例の内訳

Subject	Case (Lung adenocarcinoma with EGFR mutation)			Control	
	All	Exon 19 deletion	Exon 21 point mutation	Okada et al., Nishida et al., 2015	2015
Total	1,207	573	634	908	1,225
Female (%)	690 (57.2)	304 (53.1)	386 (60.9)	NA	252* (36.6)
Age, yr ± SD	65.7 ± 9.7	64.3 ± 10.0	67.0 ± 9.1	NA	38.4* (19-69)

*537 of 1,225 healthy controls were de-identified without information on age and gender.

Okada et al., Nat Genet. 2015; 47(7):798-802.

Nishida et al., Tissue Antigens. 2015; 86(6):406-12.

HRM 法を用いた *EGFR* 体細胞遺伝子変異検索

外科的手術もしくは原発性肺腺がん症例であるか明らかにするため、HRM (high resolution melting) 法を用いて *EGFR* 体細胞遺伝子変異の有無の確認を行った。具体的には、気管支鏡などを用いて生検試料を採取し病理学的な診断を行った際の余剰検体より、QIAamp DNA Micro Kit もしくは DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) を用いて、DNA の抽出を行った。得られた DNA 10 ng と Light Scaner Master mix (BioFire™) を用いて、プロトコールどおりに PCR を行い専用機械にて測定し、専用のソフトウェアを用いて変異の検出・測定を行った (Nomoto et al., 2006)。

Luminex 法を用いた *HLA-DPB1* の遺伝子型の決定

EGFR 変異陽性肺腺がん症例より抽出した血液由来 DNA を 20 ng/ul に希釈し、WAKFlow HLA タイピング試薬 (湧永製薬) を用いてプロトコールに従って実験を行った。*HLA-DPB1* 遺伝子型は、WAKFlow® Typing Software を用いて判定した。

GWAS 解析に対するサンプル Quality control (QC) と HLA インピュテーションの実施

全ゲノム関連解析を行う前にサンプル並びに SNP に対する QC を実施した。まず、性別の不一致や近親者の除外、SNP のコールが悪かった症例 (99%以上の精度で遺伝子型が確定できていない症例) の除外等を行うため、EIGENSOFT を使用した。さらに各 SNP に着目し、コールが悪かった SNP を除外した。得られたデータに偏りがないかどうかを Q-Q plot で確認したところ、 $\lambda_{GC} < 1.10$ であったことから、このまま解析を続けた。

本研究に用いたインピュテーション法とは、連鎖不平衡ハプロタイプブロックにおける SNP の相関を利用して、ジェノタイピングされていない遺伝子型を推測する方法である。インピュテーションを行うために、SNP2HLA (Broad institute) を用い、合わせて Beagle (インピュテーション用) および Plink (関連解析) も使用した。また、日本人健常者レファレンスパネル (908 例の SNP chip データと HLA-A, B, C, DRB1, DPB1, DPA1 のアレル情報) のデータを使用した。本研究では、特に *HLA-DPB1* アレルに着目して解析を行った。関連解析は、ロジスティック回帰分析を用いて行った。

結果

HLA-imputation 法を用いた *HLA-DPB1* アレルと *EGFR* 変異陽性肺腺がんリスクとの関連

EGFR 変異陽性肺腺がん症例 663 例とバイオバンクジャパンの非がん対照群 3,428 例を用いた HLA-imputation 法により、*HLA-DPB1* アレルの有無と *EGFR* 変異陽性肺腺がんリスクとの関連を検討した。以前の GWAS 解析により、*EGFR* 変異陽性肺腺がんリストと最も関連が認められた *HLA-DPB1* 遺伝子領域近傍に位置する rs2179920 を同定している。その多型と強い連鎖不平衡に位置する 57 番目のアミノ酸変化を伴う多型 (E/D) があり、このアミノ酸多型が発症原因多型と考えられている (Shiraishi et al., Nat. Commun. 2016)。その結果、リスクに関わる D (アスパラギン酸) 多型をもつ *HLA-DPB1* *03:01 と *09:01 が発症リスクに働き、リスク低減に関わる E (グルタミン酸) 多型をもつ *HLA-DPB1* *02:01 と *04:01 は発症のリスク低減に働く結果が得られた。

表2. HLA-imputation法を用いたHLA-DPB1アレルとEGFR変異陽性肺腺がんリスクとの関連（検出研究）

4-digit HLA alleles (HLA-DPB1)	Japanese			Amino acid position in HLA-DPB1					Minor allele frequency			
	Japanese reference panel (N=908) ¹	HLA Laboratory (N=2,966) ²	JPDSC (N=2,823) ³	8	9	11	57	76	Case (663)	Control (3,379)	P value	OR
*02:01	0.226	0.241	0.233	L	F	G	E	M	0.185	0.228	4.2.E-03	0.80
*02:02	0.042	0.034	0.039	L	F	G	E	M	0.031	0.039	1.2.E-01	0.76
*03:01	0.034	0.040	0.048	V	Y	L	D	V	0.065	0.047	1.6.E-02	1.38
*04:01	0.046	0.051	0.059	L	F	G	E	M	0.038	0.049	2.0.E-02	0.70
*04:02	0.093	0.098	0.097	L	F	G	E	M	0.100	0.098	8.5.E-01	0.98
*05:01	0.389	0.384	0.377	L	F	G	E	M	0.403	0.389	1.2.E-01	1.11
*06:01	0.004	0.006	0.006	V	Y	L	D	M	0.011	0.007	1.1.E-01	1.72
*09:01	0.126	0.099	0.100	V	H	L	D	V	0.129	0.101	1.5.E-02	1.27
*13:01	0.016	0.020	0.017	V	Y	L	E	I	0.014	0.017	3.6.E-01	0.79
*14:01	0.013	0.015	0.014	V	H	L	D	V	0.013	0.015	3.6.E-01	0.78

¹Okada et al., Nat. Genet. 47, 798–802 (2015), ²http://hla.or.jp/med/frequency_search/en/haplo/, ³Kamitsuji et al., J Hum Genet. 60, 319–326 (2015)

Luminex法を用いて遺伝子型を決定したHLA-DPB1アレルとEGFR変異陽性肺腺がんリスクとの関連

EGFR変異陽性肺腺がん症例1,207例とLuminex法もしくはPCR-RFLP法でHLA-DPB1遺伝子型がタイプングされアレル型が分かっている2つの非がんボランティアを合わせた2,133例を用いて、HLA-DPB1アレルの有無とEGFR変異陽性肺腺がんリスクとの関連を検討した（表2）。その結果、リスクに関わるD（アスパラギン酸）多型をもつHLA-DPB1 *03:01が発症リスクに働き、リスク低減に関わるE（グルタミン酸）多型をもつHLA-DPB1 *02:01と*13:01は発症のリスク低減に働く結果が得られた。したがって検証研究と検出研究において、HLA-DPB1 *03:01が発症リスクに働き、HLA-DPB1 *02:01は発症のリスク低減に働く結果が得られた。

表3. HLA-imputation法を用いたHLA-DPB1アレルとEGFR変異陽性肺腺がんリスクとの関連（検証研究）

4-digit HLA alleles (HLA-DPB1)	Japanese			Amino acid position in HLA-DPB1					Minor allele frequency			
	Japanese reference panel (N=908) ¹	HLA Laboratory (N=2,966) ²	JPDS (N=2,823) ³	8	9	11	57	76	Case (2,414)	Control (2,133)	P value	OR
*02:01	0.226	0.241	0.233	L	F	G	E	M	0.215	0.236	0.047	0.89
*02:02	0.042	0.034	0.039	L	F	G	E	M	0.031	0.038	9.9.E-02	0.79
*03:01	0.034	0.040	0.048	V	Y	L	D	V	0.056	0.040	1.7.E-03	1.45
*04:01	0.046	0.051	0.059	L	F	G	E	M	0.042	0.052	8.4.E-02	0.81
*04:02	0.093	0.098	0.097	L	F	G	E	M	0.098	0.091	3.9.E-01	1.08
*05:01	0.389	0.384	0.377	L	F	G	E	M	0.394	0.386	5.0.E-01	1.04
*06:01	0.004	0.006	0.006	V	Y	L	D	M	0.007	0.005	2.1.E-01	1.51
*09:01	0.126	0.099	0.100	V	H	L	D	V	0.120	0.110	2.0.E-01	1.11
*13:01	0.016	0.020	0.017	V	Y	L	E	I	0.009	0.016	1.3.E-02	0.54
*14:01	0.013	0.015	0.014	V	H	L	D	V	0.011	0.015	1.3.E-01	0.70

¹Okada et al., Nat. Genet. 47, 798–802 (2015), ²http://hla.or.jp/med/frequency_search/en/haplo/, ³Kamitsuji et al., J Hum Genet. 60, 319–326 (2015)

HLA-DPB1アレルとEGFR変異陽性型別での肺腺がんリスクとの関連

EGFR変異陽性肺腺がんには主にエクソン19に位置する欠失変異型の体細胞変異とエクソン21の点突然変異型が知られている。そこでEGFR体細胞遺伝子変異型別で検討したところ、変異別に関わらずHLA-DPB1 *03:01が発症リスクに働く結果が得られた。他のアレルについては統計学的に有意な差は得られなかった。一部のアレルについては、エクソン21の点変異でより強く関連を示すアレルが認められたが、症例数も少くさらなる検証が必要である。

表4. HLA-DPB1 アレルとEGFR 変異陽性変異別型での肺腺がんリスクとの関連

(1)Exon 21 point mutation types (L858R)

4-digit HLA alleles	Amino acid position in HLA-DPB1					Minor allele frequency		P value	OR
	8	9	11	57	76	Case	Control		
*02:01	L	F	G	E	M	0.216	0.236	0.14	0.89
*02:02	L	F	G	E	M	0.030	0.038	1.6.E-01	0.77
*03:01	V	Y	L	D	V	0.056	0.040	1.2.E-02	1.44
*04:01	L	F	G	E	M	0.033	0.052	6.0.E-03	0.63
*04:02	L	F	G	E	M	0.095	0.091	7.3.E-01	1.04
*05:01	L	F	G	E	M	0.420	0.386	3.2.E-02	1.15
*06:01	V	Y	L	D	M	0.006	0.005	4.8.E-01	1.35
*09:01	V	H	L	D	V	0.117	0.110	4.9.E-01	1.07
*13:01	V	Y	L	E	I	0.006	0.016	9.7.E-03	0.39
*14:01	V	H	L	D	V	0.007	0.015	2.7.E-02	0.46

(2)Exon 19 deletion types

4-digit HLA alleles	Amino acid position in HLA-DPB1					Minor allele frequency		P value	OR
	8	9	11	57	76	Case	Control		
*02:01	L	F	G	E	M	0.213	0.236	0.10	0.88
*02:02	L	F	G	E	M	0.031	0.038	2.6.E-01	0.81
*03:01	V	Y	L	D	V	0.057	0.040	1.2.E-02	1.46
*04:01	L	F	G	E	M	0.052	0.052	9.4.E-01	1.01
*04:02	L	F	G	E	M	0.101	0.091	3.1.E-01	1.12
*05:01	L	F	G	E	M	0.366	0.386	2.6.E-01	0.92
*06:01	V	Y	L	D	M	0.008	0.005	1.9.E-01	1.68
*09:01	V	H	L	D	V	0.124	0.110	1.8.E-01	1.15
*13:01	V	Y	L	E	I	0.011	0.016	2.6.E-01	0.71
*14:01	V	H	L	D	V	0.015	0.015	9.2.E-01	0.97

結論と考察

本研究を通して、HLA-DPB1 *0301 の有無が EGFR 変異陽性肺腺がんの発症リスクに関わることを明らかにした。また、今回用いた健常群は、公開されているデータを用いたため、年齢や性別などの調整がなされていない。今後は、Luminex で HLA 型を決定されている JPDSC (日本 PGx データサイエンスコンソーシアム)で収集された対照群 2,823 例などを用いて再度関連が認められるか検討する。今回関連が再現された HLA-DPB1 *03:01 アレルは EGFR 変異型によらず関連を示した。HLA-class II は、HLA-class I に比べて認識するペプチドは 12-20mer と大きく、また特異性も低いことから、EGFR 変異を含む抗原ペプチドを認識しての免疫応答ではなく、EGFR 変異陽性肺腺がんに特異的に産出されるペプチドを認識している可能性も考えられる。今後は、RNA-seq などを用いて EGFR 変異陽性肺腺がんで特異的に発現している遺伝子に着目し、アレル毎での遺伝子発現量との相関を検討し、抗原ペプチドの同定などを引き続き行う予定である。

謝辞

本研究の遂行に当たり、貴重な研究助成を賜りました公益財団法人がん振興財団に深く御礼申し上げます。今後、最適ながん治療や予防法を提供すべく、一層研究に取り組んで行きたいと思います。

参考文献

1. Shiraishi K, Okada Y, Takahashi A, Kamatani Y, Momozawa Y, Ashikawa K, Kunitoh H, Matsumoto S, Takano A, Shimizu K, Goto A, Tsuta K, Watanabe S, Ohe Y, Watanabe Y, Goto Y, Nokihara H, Furuta K, Yoshida A, Goto K, Hishida T, Tsuboi M, Tsuchihara K, Miyagi Y, Nakayama H, Yokose T, Tanaka K, Nagashima T, Oh taki Y, Maeda D, Imai K, Minamiya Y, Sakamoto H, Saito A, Shimada Y, Sunami K, Saito M, Inazawa J, Nakamura Y, Yoshida T, Yokota J, Matsuda F, Matsuo K, Daigo Y, Kubo M, Kohno T. Association of variations in HLA class II and other loci with susceptibility to EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *Nat Commun.* 2016; 7:1 2451.
2. Okada Y, Momozawa Y, Ashikawa K, Kanai M, Matsuda K, Kamatani Y, Takahashi A, Kubo M. Construction of a population-specific HLA imputation reference panel and its application to Graves' disease risk in Japanese. *Nat Genet.* 2015; 47(7):798-802.
3. Nishida N, Ohashi J, Sugiyama M, Tsuchiura T, Yamamoto K, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsuhashi H, Koike K, Yokosuka O, Tanaka E, Taketomi A, Kurosaki M, Izumi N, Sakamoto N, Eguchi Y, Sasazuki T, Tokunaga K, Mizokami M. Effects of HLA-DPB1 genotypes on chronic hepatitis B infection in Japanese individuals. *Tissue Antigens.* 2015; 86(6):406-12.
4. Nomoto K, Tsuta K, Takano T, Fukui T, Fukui T, Yokozawa K, Sakamoto H, Yoshi da T, Maeshima AM, Shibata T, Furuta K, Ohe Y, Matsuno Y. Detection of EGFR mutations in archived cytologic specimens of non-small cell lung cancer using high resolution melting analysis. *Am J Clin Pathol.* 2006; 126(4):608-15.
5. 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. *Nat Genet.* 2012; 44(8):900-3.