

令和元年6月10日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10017

研究課題名(和文)放射線治療後再発した肺癌組織は、治療前と分子生物学的プロファイルがどう異なるか

研究課題名(英文) Genomic alterations of non-small-cell lung cancer following radiotherapy

研究代表者

藤田 史郎 (FUJITA, Shiro)

愛知県がんセンター(研究所)・がん病態生理学分野・研究員

研究者番号：60612140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺癌の治療として、根治的放射線療法や化学放射線療法が施行されることがあるが、これら治療により癌細胞の遺伝子へ新たに変異が加わる可能性がある。そこで今回我々は、放射線照射を含む治療後に再発してきた非小細胞肺癌組織の遺伝子解析を行い、治療前と比較することで新たな変異のパターンを検討した。結果として、ドライバー遺伝子変異も含め治療後は新たに変異が生じ、特に単塩基置換(23.8%)よりも塩基欠失(76.2%)が多く出現した。これらから、放射線治療後に再発してきた癌組織の遺伝子変異パターンは、治療前と異なるため、再発組織を採取の上遺伝子を再解析することが望ましいと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非小細胞肺癌の診療においては日常的に、遺伝子変異の情報を得た上で適切な治療法が選択されているが、いつの時点で採取された癌組織を用いて遺伝子解析を行うべきかについては、これまで統一した見解がなかった。今回の研究にて、治療目的で照射された放射線が癌細胞の遺伝子に無視できない変化を与えていることが判明した。今後、特に放射線を含む治療後の患者の診療に際しては、放射線治療後に改めて採取されたがん組織の遺伝子情報を参考にすることが望ましいと考えられる。これは一般診療の質の向上にも繋がる重要な発見といえる。

研究成果の概要(英文)：Definite radiotherapy and/or chemoradiotherapy (RT/CRT) is often conducted for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). However, there is a potential concern regarding the mutagenic effects on tumor cells derived from the therapies, and genomic information regarding cancer cells that survived definitive RT/CRT is lacking. To evaluate the mutagenic effect of RT/CRT, we compared genomic signatures of recurrent NSCLC tissue with those of pretreatment. Some mutations remained in the post-therapy state, and others, including driver mutations, either newly occurred or disappeared during the course of disease. Compared with single nucleotide substitution (23.8%), substantial number of deletions (76.2%) was observed in specimens obtained after definite RT/CRT. RT/CRT effects on tumor cells have a wide spectrum, and re-sequencing of a recurrent lesion is always recommended to discuss the best course of therapy for recurrent NSCLC after RT/CRT.

研究分野：がんゲノム解析

キーワード：次世代シーケンサー 非小細胞肺癌 放射線治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌の概略

肺癌は、本邦では癌死の原因として最も多く、2012年には本邦で71518名が亡くなっている。肺癌は、組織型から腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌の4種に分類される。生物学的悪性度が大きく異なる小細胞肺癌を除いた3種は、時に区別が困難であることなどから、これらを非小細胞肺癌と一括して呼称する。非小細胞肺癌の進展度はステージ分類で群分けされ、最も早期のI期から、最も進行したIV期まで分かれる。おおむねI期からIII期の状態では手術療法が検討されるものの、高齢者の増加に伴い、肺癌の平均発症年齢は70歳近くまで上昇しており、合併する併存症などから手術不能と判断される事例も増えている。

(2) 非小細胞肺癌治療における、完治を目指した放射線治療

このような手術不能例で、特にステージI期の非小細胞肺癌症例に対しては、多門照射により局所の放射線治療効果を高めた定位放射線療法が2000年以降行われており、手術療法に匹敵する治癒率とされている。また、ステージII期やIII期にある非小細胞肺癌で手術不能とされた症例では、局所への放射線療法に加え抗がん剤を併用する治療が推奨される。それでも非小細胞肺癌は生物学的悪性度が高い疾患であり、最も早期であるステージI期を定位放射線療法にて治療を施行したとしても、20%の症例で5年以内に再発を認め、ステージII期やIII期で化学放射線療法がなされた症例では、およそ60-80%の患者が再発を経験する。

(3) 放射線治療による抗腫瘍効果

放射線療法により細胞死は惹起されるが、これは主にDNA傷害によって誘導される。放射線によって生体内に生じた電離が直接、あるいはラジカル形成を通じて間接的にDNAの切断などの損傷を引き起こす。ここで、DNA修復機構に問題のない正常細胞では損傷を自己修復できるが、このような修復能力の低い腫瘍細胞ではDNAに生じた異常を修復できず、結果として細胞死に至る。放射線療法後、特に局所に再発した病巣は前述の放射線治療の影響により、DNA損傷を受けた腫瘍細胞が再増殖をきたしていることから、もともとの腫瘍細胞の特性とは異なっている可能性がある。

(4) 肺癌の分子生物学的プロファイルと、放射線療法がもたらす影響

近年、非小細胞肺癌の分子生物学的プロファイルの解析がすすみ、単一の変異により細胞の腫瘍化を誘導し得るdriver mutationと呼ばれる変異がいくつか同定され、その変異シグナルをブロックすることで良好な抗腫瘍効果が得られることがわかった。活性化型上皮増殖因子受容体(epidermal growth factor receptor: EGFR)遺伝子変異を有する症例へのEGFRチロシキナーゼ阻害薬、あるいは受容体型チロシキナーゼanaplastic lymphoma kinase (ALK) 遺伝子の再構成を認める症例へのALK活性阻害薬がその例である。放射線治療後再発をきたした腫瘍では、放射線の影響によりこのようなdriver mutation以外の増殖経路に変異が入り活性化する可能性がある。すると、放射線療法前に採取された検体で同定されたdriver mutationのはたらしを抑えたとしても、抗腫瘍効果が得られないこととなる。

2. 研究の目的

背景にある通り、放射線治療により腫瘍細胞が受ける影響を包括的に評価することは、その後の治療戦略にも結び付くことから極めて重要である。次世代シーケンサーでは、数十から数百bpの配列を数万から数億の単位で大量に並列に解析し、結果をde novoに、もしくは既知の配列を参考にしながら配列決定を行う。この方法により、一度に大量の遺伝子配列が可能となり、腫瘍細胞の遺伝子変化の包括的解析には非常に適している。今回、放射線照射前の腫瘍組織と放射線照射後再発時の腫瘍組織とを、driver mutationを含めた代表的な癌遺伝子・癌抑制遺伝子につき配列を比較し、放射線治療が腫瘍組織に与える変化を検索することとした。

3. 研究の方法

当初は、研究期間は3年を予定していた。申請時在籍していた先端医療センターにて定位放射線療法を施行し、のちに再発をきたした症例群と、化学療法と放射線療法を併用した加療にて一旦奏効したのち、再発をきたした症例群の2群において、それぞれ解析する検体を選定したのち、治療前に採取した検体と治療後再発をきたした際採取した検体の二つについて腫瘍DNAやRNAの抽出、ならびに次世代シーケンサーを用いた解析を行った。

4. 研究成果

研究期間は2015年4月から3年を予定していたが、もともとの所属組織である先端医療センターの閉鎖などから研究が遅れ4年を要した。症例群としては2群で合計14症例の検体を解析したが、特に治療前に採取した検体からの、一定の品質のDNAやRNAの抽出が困難を極めた。DNAもRNAも高度に断片化しており、何度か抽出法を変更したものの、治療前の検

体・治療後の検体各々、十分な収量の DNA を得られ、かつ遺伝子配列情報を得られたのは 3 例のみであった。RNA については、検体そのものの質が良くないためライブラリーを作成しシークエンスしたが、解析に十分耐えられる情報は得られなかった。なお、この過程で今回使用している次世代シークエンサーの Ion Proton System に固有の読み取り間違いに遭遇し対応を要したことから、これらの読み取り間違いが発生する背景などを調査し論文発表した(後述)。

本来の目的である、放射線治療前と治療後での遺伝子情報の変化の検出については、治療前と治療後再発時の双方につき、DNA 配列を次世代シークエンサーで十分に解析できた 3 例(合計 7 検体)について解析結果を論文化し、オープンアクセスのかたちで発表した(論文)。内容としては、放射線治療を含む治療後のがん組織では、もともとの治療前と比べ塩基欠失変異が多くみられ、治療後に新たに出現した変異のうちの 76.2%を占めていた。一塩基置換変異については塩基欠失の 1/3 ほどの数であった。このような欠失変異はエクソン部分に生じると高い確率でフレームシフトを惹起し遺伝子産物の機能を大きく損ねることが多い。よって、放射線治療後のがん組織では、治療前よりも遺伝子変異が機能にも影響を強く与えるかたちで蓄積されていることが示唆された。また、放射線治療前はわずか組織全体のうち 1.7%ほどのアレル頻度でしかみられなかった KRAS G12C のドライバー遺伝子変異が、治療後の検体では 49.5%に上昇しており、KRAS 変異のアレル頻度が変化するという最近の報告を裏付ける結果も得られた。

はじめの段落で述べた Ion Proton System に固有の読み取り間違いについてであるが、もともと同 system では例えば TTTTT...といった同じ塩基が続くホモポリマーと呼ばれる領域での配列読み取り間違いが多く、逆に TAGC を TCGC と間違えるような一塩基置換タイプの読み取り間違いは少ないとされていた。今回我々は、検出された一塩基置換タイプの変化を他の遺伝子配列読み取り法(サンガー法)で確認し、その過程で一塩基置換タイプの読み取り間違いが 10%弱ほどの頻度で生じうることを発見した。これらは近接するホモポリマー領域の読み取り間違いに付随して生じていた。従って、一塩基置換タイプの変化が Ion Proton System で検出されていても、他の遺伝子解析方法で確認するべきと結論した(論文)。

また、この読み取り間違いの存在が判明したことが、研究協力者である真砂博士の研究の一助となった。博士の研究は、肺腺癌の一部でみられる EGFR 活性化型変異とその治療に関連する内容である。EGFR 遺伝子の活性化型変異を有する肺腺癌に対して、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬がよく奏効することは既に知られており、また半数強の症例で EGFR のコドン 790 のスレオニンがメチオニンに変化する機序により、EGFR 阻害薬が無効となることも知られている。今回、この 790 の変異の検出にデジタル PCR 技術が有用であることを真砂博士が示したが、この変異の確認の際に次世代シークエンサーが用いられ、読み取り間違いの処理に前項の Ion Proton System で遭遇した読み取り間違いへの対応の経験が生かされた(論文)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

藤田史郎、真砂勝泰、谷田部恭、Biopsy of palliative lesions following radiotherapy、BJR Open、査読有、Vol.1、No.1、2019、20180025 (オンラインジャーナル)

DOI: 10.1259/bjro.20180025

藤田史郎、真砂勝泰、谷田部恭、Validation of the digital PCR system in tyrosine kinase inhibitor-resistant EGFR mutant non-small-cell lung cancer、Pathology International、査読有、Vol.68、No.3、2018、167-173

DOI: 10.1111/pin.12630

藤田史郎、真砂勝泰、平田結喜緒、Single nucleotide variant sequencing errors in whole exome sequencing using the Ion Proton System、Biomedical Reports、査読有、Vol.7、No.1、2017、17-20

DOI: 10.3892/br.2017.911

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

(特記すべき事項なし。)

6 . 研究組織

(1)研究分担者
(該当なし)

(2)研究協力者
研究協力者氏名：真砂 勝泰
ローマ字氏名：(MASAGO, Katsuhiro)

研究協力者氏名：平田 結喜緒
ローマ字氏名：(HIRATA, Yukio)

研究協力者氏名：谷田部 恭
ローマ字氏名：(YATABE, Yasushi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。