

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10263

研究課題名(和文) 肺扁平上皮癌における喫煙量別比較に基づいた新たなドライバー遺伝子変異の同定

研究課題名(英文) Identification of a new driver oncogene mutation based on comparison of the smoking amount in lung squamous cell carcinoma

研究代表者

岡本 龍郎 (Okamoto, Tatsuro)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：80568626

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)：非小細胞肺癌において、非・軽度喫煙患者および重度喫煙患者に発生する癌は異なる性質・遺伝子変化を持つことが最近の研究で示唆されており、その遺伝子変化の違いを指標に治療標的候補(ドライバー遺伝子)の検索・同定を行うことで、新規治療法の開発へ繋がられる可能性がある。本研究では、非/軽度喫煙者及び重度喫煙者における肺扁平上皮癌の切除検体から、次世代シーケンサーを用いたRNAシーケンスにより遺伝子発現量の変化を詳細に検討し、予後に関係する分子を探索した。がん関連遺伝子パネルを用いたエクソーム解析により、肺扁平上皮癌における遺伝子変異量(Mutation burden)の臨床的意義を検討した。

研究成果の概要(英文)：Recent studies suggest that cancers occurring in never/light smokers and cancers occurring in heavy smokers have different characteristics and genetic alterations in non-small-cell lung cancer. In this study, we investigated comprehensive gene expression by next generation RNA sequence in lung squamous cell carcinoma of never/light smokers and of heavy smokers in detail, and searched for candidate oncogene related to patients prognosis. (2) Clinical significance of mutation burden in lung squamous cell carcinoma was examined by next generation exosome sequence using cancer-related gene panel.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺扁平上皮癌 次世代シーケンス 喫煙量 遺伝子変異 非小細胞肺癌 扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

肺癌はいまだに難治性癌の一つであり、日本のみならず欧米諸国における癌死亡の第1位である。扁平上皮癌は、非扁平上皮癌の約30%を占め、肺癌において腺癌に継ぎ二番目に多い組織型である。

肺扁平上皮癌においては、いくつかの特徴的な遺伝子異常が報告されているものの[Nature. 2012; 489:519-25] [Kim HR, et al. J Clin Oncol. 2013 31:731-7]、明らかなdriver oncogeneであるは確認されておらず、分子標的薬の開発が遅れている。最近、肺扁平上皮癌手術例の解析から、非・軽喫煙者に発生する肺扁平上皮癌は重喫煙者に発生する扁平上皮癌と生物学的に異なる可能性が示された[Okamoto T, et al. Lung Cancer 2014;85:125-30]。

2. 研究の目的

現在までに報告された扁平上皮癌のドライバー遺伝子変異候補は、主に喫煙者の扁平上皮癌において探索された因子である。扁平上皮癌はその90%以上が重喫煙者に発生するが、重喫煙者の肺癌は種々の遺伝子変異が蓄積されており、腫瘍遺伝子的にheterogeneityが強いことが予想される。したがって、重喫煙者の解析のみでは重要な遺伝子変異がマスクされる可能性がある。今回、非/軽喫煙者に発生した肺扁平上皮癌の臨床検体を用いて、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、新規ドライバー遺伝子候補を検索した。

また最近の研究において、腫瘍における遺伝子変異量 (Mutation burden: MB) がPD-1/PD-L1 阻害剤の治療効果と関係する可能性が示されたが、MBの肺癌における臨床的意義は十分に明らかではない。がん関連遺伝子パネルを用いたエクソーム解析により、肺扁平上皮癌における遺伝子変異量 (Mutation burden) の臨床的意義を検討した。

3. 研究の方法

(1) 非/軽喫煙者および重喫煙者に生じた肺扁平上皮癌のRNAシーケンス解析

・対象症例：1995年4月から2013年12月までに九州大学消化器・総合外科にて標準切除が行われた肺扁平上皮癌を対象とした。この中から、臨床データが利用可能で、かつ手術標本から得られたRNAの解析が可能な症例を選択した。

・RNAのクオリティー検査およびcDNAライブラリー作成：Agilent2100バイオアナライザを用い、RIN (RNA Integrity Number) 値を調査し、RNAの質が保たれているかを解析した。TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kitを用いてRNAシーケンスライブラリーを作

成し、RNAシーケンスを施行した。

・遺伝子発現解析：非・軽喫煙者 (Pack Year 30) 重喫煙者 (Pack Year > 30) 毎にTCGAのデータベースを併用して遺伝子発現量、pathway等の相違について検討した。

(2) 肺扁平上皮癌における遺伝子変異量と臨床背景との関係

・対象症例：2009～2015年に九州大学消化器・総合外科および新潟大学呼吸循環外科学にて切除が行われた肺扁平上皮癌67例を対象とした。

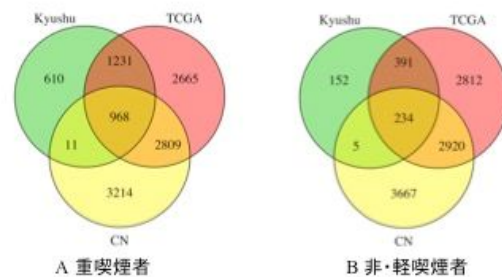
・FFPE切片よりDNAを抽出、415遺伝子を網羅したがん関連遺伝子パネルを用いエクソーム解析を施行した。1 Mbpあたりのnonsynonymous mutationの数をMBと定義し、MB ≥ 18 (中央値) を高MB群、MB < 18を低MB群とした。腫瘍PD-L1蛋白発現をSP142抗体を用いて検討し、全癌細胞における陽性細胞の割合 ≥ 5%を発現陽性とした。

4. 研究成果

1) 肺扁平上皮癌のRNAシーケンス解析

23症例46検体で癌部・正常部共にRIN値が7.0以上に保たれており、RNAシーケンスのライブラリー作成を行った。続いてHi-Seq2100にてRNAシーケンスを施行し解析を行った。非・軽喫煙者と重喫煙者それぞれにおいて、TCGAのデータベースと共通して、癌部で正常部に比べ有意に上昇しており、かつ遺伝子コピー数と発現量が有意に相関している候補遺伝子をWiIcoxon検定 (FDR補正、B-H法、 $q < 0.05$) にて同定した (重喫煙者：968遺伝子、非・軽喫煙者：234遺伝子：図1)。

図1. TCGA data baseを併用した重喫煙者、非・軽喫煙者におけるcandidate oncogeneの同定



続いて同定した遺伝子にてpathway解析を施行したところ、両群間で同定した遺伝子の発癌に関わるpathwayは類似していた(図2)。

次にheat mapを作成したところ、それぞれ類似したsubgroupに分類された(図3)。以上より、今回の検討では、扁平上皮肺癌において非/軽喫煙者と重喫煙者の間に、遺伝子発現パターンに大きな相違がないことが示唆された。

図2. 重喫煙者、非・軽喫煙者におけるcandidate oncogeneの pathway解析

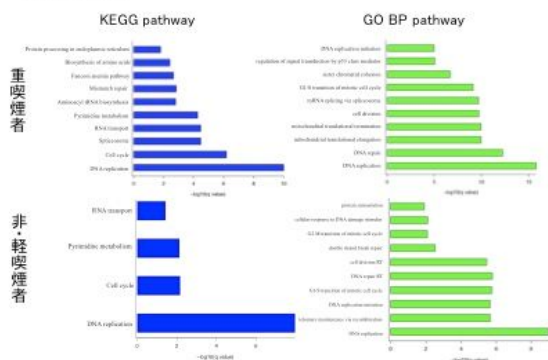
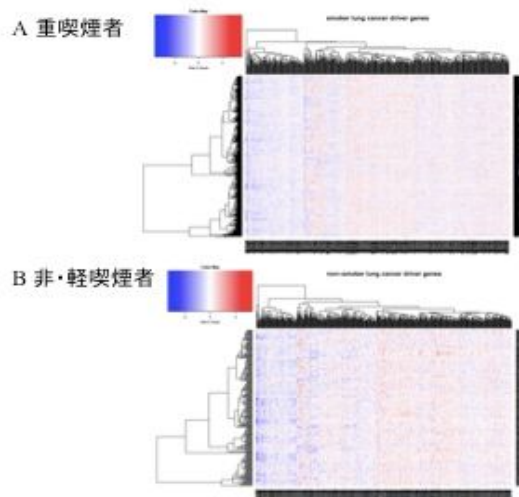
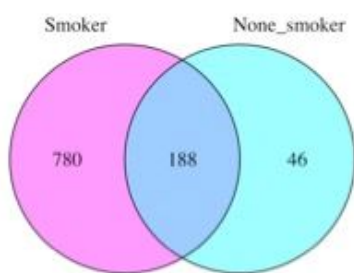


図3: 重喫煙者、非・軽喫煙者におけるheat map



さらに、非・軽喫煙者群と重喫煙者群間に共通する candidate oncogenes 188 種類を同定した (図4)。

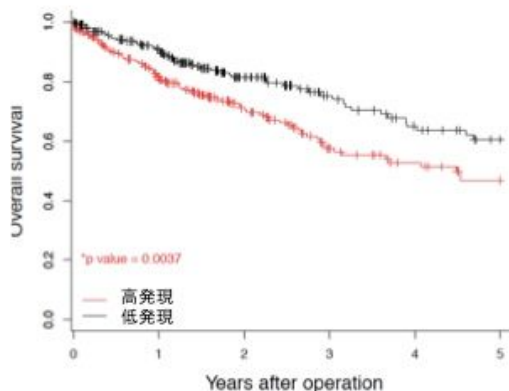
図4. 重喫煙者、非・軽喫煙者に共通する candidate oncogeneの同定



同遺伝子 188 種類のうち、TCGA data baseにて遺伝子高発現が全生存期間 (OS)・無再発期間 (RFS)とも予後不良と関係しているもの (median OS/RFS, $p < 0.05$) を同定した (図5)。

(2) 肺扁平上皮癌における癌関連遺伝子パネルを用いたエクソーム解析

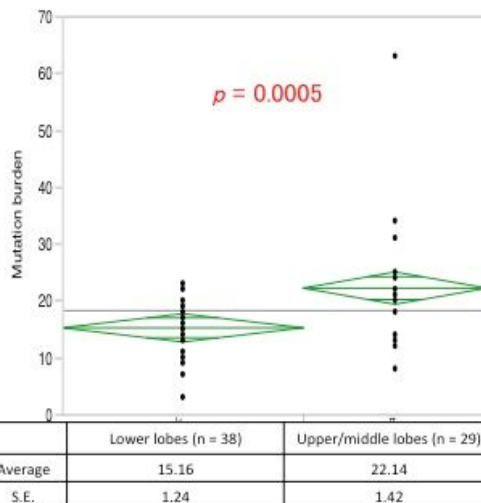
図5. 重喫煙者、非・軽喫煙者共通の予後不良と関連するcandidate oncogene同定



肺扁平上皮癌における (全例喫煙者の解析) 主な遺伝子変異は TP53 (76.1%)、cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (CDKN2B; 35.8%)、CDKN2A (31.3%)、phosphatase and tensin homolog (30.0%)、sex-determining region Y-box 2 (SOX2; 28.3%)であった。P53は点変異、CDKN2A/2B, PTEN, RB1, FBXW7, APCは欠失、SOX2, TNK2は増幅が主な変異形式であった。高MB群は、低MB群に比べ、分化度の低い癌が多く ($p=0.0446$)、腫瘍の存在肺葉が上・中葉に多かった ($p=0.0019$ 、表1)。

因子	カテゴリー	p値
年齢	< 75歳 / ≥ 75歳	0.7296
性別	男 / 女	1.000
喫煙	≤ 40 / > 40PY	0.8460
病理病期	I / II-III	0.0540
分化度	Grade 1 / 2-3	0.0446
肺葉	上・中葉 / 下葉	0.0019
腫瘍位置	中枢 / 末梢	0.7516
PD-L1 発現	陰性 / 陽性	0.5178

図6. 癌の存在部位による遺伝子変異量の相違



喫煙量で MB 値に差を認めなかったが、上・中葉肺癌は、下葉肺癌に比べ、MB 値が有意に高かった(平均値 22.1 vs. 15.2, $p=0.0005$ 、図 6)、PD-L1 蛋白陽性が多い傾向にあった($p=0.0573$)。存在肺葉でがん関連遺伝子異常の数に差はなかった。染色体 3q に位置する SOX2 および TNK2 の増幅をもつ腫瘍は、増幅のない腫瘍に比べ MB が有意に高かった(平均値 22.5 vs. 16.4, $p=0.0065$; 26.0 vs. 16.8, $p=0.0010$)。

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 3 件)

Okamoto T, Takada K, Sato S, Toyokawa G, Tagawa T, Shoji F, Nakaniishi R, Oki E, Koike T, Nagahashi M, Ichikawa H, Shimada Y, Watanaabe S, Kikuchi T, Akazawa K, Lyle S, Okuda S, Sugio K, Wakai T, Tsuchida M, Maehara Y: Clinical and Genetic Implications of Mutation Burden in Squamous Cell Carcinoma of the Lung. Ann Surg Oncol 査読有 2018. 25:1564-1571

Haratake N, Toyokawa G, Takada K, Kozuma Y, Matsubara T, Takamori S, Akamine T, Katsura M, Shoji F, Okamoto T, Oda Y, Maehara Y: Programmed Death-Ligand 1 Expression and EGFR Mutations in Multifocal Lung Cancer. Ann Thorac Surg 査読有 2018. 105:448-454.

Takamori S, Toyokawa G, Okamoto T, Shimokawa M, Kinoshita F, Kozuma Y, Matsubara T, Haratake N, Akamine T, Takada K, Katsura M, Hirai F, Shoji F, Tagawa T, Oda Y, Honda H, Maehara Y: Clinical Impact and Risk Factors for Skeletal Muscle Loss After Complete Resection of Early Non-small Cell Lung Cancer. Ann Surg Oncol 査読有 2018. 25:1229-1236.

[学会発表](計 4 件)

岡本 龍郎、島松 晋一郎、高田 和樹、桂 正和、原武 直紀、赤嶺 貴紀、高森 信吉、鈴木 雄三、藤下 卓才、豊川 剛二、庄司 文裕、前原 喜彦：肺癌進展におけるリンパ節転移の腫瘍生物学的役割とリンパ節郭清の意義：第 33 回日本呼吸器外科学会総会(2016 年)

岡本 龍郎、庄司 文裕、豊川 剛二、上妻 由佳、松原 太一、原武 直紀、赤嶺 貴紀、高森 信吉、高田 和樹、桂 正和、前原 喜彦：非小細胞肺癌 N1 症例における腫瘍発生部位の重要性：第 69 回日

本胸部外科学会総会(2016 年)

岡本 龍郎、高田 和樹、佐藤 征二郎、松原 太一、上妻 由佳、原武 直紀、高森 信吉、赤嶺 貴紀、桂 正和、豊川 剛二、庄司 文裕、土田 正則、前原 喜彦：喫煙量が肺扁平上皮癌の腫瘍生物学に及ぼす影響：第 117 回日本外科学会定期学術集会(2017 年)

岡本 龍郎、高田 和樹、庄司 文裕、豊川 剛二、沖 英次、永橋 昌幸、杉尾 賢二、若井 俊文、前原 喜彦：肺扁平上皮癌に認められる遺伝子異常と遺伝子変異量の臨床的特徴：第 76 回日本癌学会学術集会(2017 年)

[図書](計 0 件)

なし

[産業財産権]

なし

出願状況(計 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 龍郎 (OKAMOTO, Tatsuro)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号：80568626

(2)研究分担者

諸富 洋介 (MORODOMI, Yosuke)
九州大学・医学研究院・助教
平成 27 年 12 月 15 日まで分担者
研究者番号：60645365

田川 哲三 (TAGAWA, Tetsuzo)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：90419557

杉尾 賢二 (SUGIO, Kenji)
大分大学・医学部・教授
平成 29 年 7 月 19 日より分担者
研究者番号：70235927

小副川 敦 (OSOEGAWA, Atsushi)
大分大学・医学部・助教
平成 29 年 7 月 19 日より分担者
研究者番号：90432939

(3)連携研究者

()

(4)研究協力者

()