

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10279

研究課題名(和文) 胸腺癌における発癌原因候補遺伝子の機能解析及び個別化治療法の確立

研究課題名(英文) Functional analysis of candidate genes for oncogenesis in thymic carcinoma and establishment of individualized therapy

研究代表者

奥田 勝裕 (Okuda, Katsuhiko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50529170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサー解析にて同定した25の胸腺癌における発癌原因遺伝子変異候補につき、機能解析研究を進めた。有力な発癌原因候補遺伝子のKIT遺伝子変異につき機能解析を行ったが、KIT遺伝子の変異だけでは発癌性がない可能性を示唆した。また、5つのTyrosine kinase domain変異につき胸腺癌および肺癌手術症例について解析したが、1例も変異を認めなかった。胸腺癌におけるPD-L1タンパク発現の陽性率は比較的高く、免疫チェックポイント阻害剤が胸腺癌に対する有効な治療法になり得ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We carried out functional analysis on 25 candidate genes of oncogenic driver mutation by using next generation sequencer. Functional analysis was performed on KIT gene mutation, which is a potential candidate gene of oncogenic driver mutation, but it suggested that just only the KIT gene mutation may not have carcinogenicity. In addition, five tyrosine kinase domain mutations were analyzed for surgical cases of thymic carcinoma and lung cancer, but no mutation was observed.

We revealed that the positive cases of PD-L1 protein expression in thymic carcinoma is relatively high and immune checkpoint inhibitors can be an effective treatment for thymic carcinoma.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：ウイルスベクター Gateway system KIT Tyrosine kinase domain gene mutation PD-L1

1. 研究開始当初の背景

(1) 胸腺癌に対する治療は、手術完全切除以外有効な治療法が確立されていない。抗癌剤治療に関しては、肺癌や胸腺腫の治療薬・プロトコールを踏襲しており、胸腺癌に特化した効果的な治療薬・プロトコールが確立していないのが現状である。我々は、胸腺癌手術検体を用いた次世代シーケンサーによる遺伝子多型解析にて、正常胸腺組織にはない25の癌関連遺伝子変異を腫瘍組織のみに同定した。この内5つは腫瘍増殖・発癌に強く関与が疑われるチロシンキナーゼ領域の変異であり、治療標的遺伝子となる可能性が高いものであった。

(2) 胸腺癌について、分子生物学的な解析による発症メカニズムの解明や、個別化治療につながる遺伝子変異・遺伝子増殖・遺伝子機能解析を行うことは非常に重要である。

(3) 遺伝子機能解析によって得られる結果は、肺癌症例などで進んでいる副作用の少ない効果的な個別化治療法を胸腺癌症例に対して確立する上で、非常に大きな意味を持つ。

2. 研究の目的

(1) 我々が、胸腺癌手術検体を用いた次世代シーケンサーによる遺伝子多型解析にて明らかにした25の癌関連遺伝子変異につき機能解析を行っていく。

(2) 関連遺伝子につき、その機能解析、発現解析を行っていく。これらの遺伝子変異の機能解析及び関連遺伝子の機能解析を行うことで、胸腺癌の分子生物学的特性が解明され、実地臨床における個別化治療法の確立に繋げていく。

(3) 胸腺癌に特異的な発癌原因遺伝子及び関連遺伝子の機能解析を行うことで、抗癌剤治療薬の治療効果予測なども検討が行えると考えている。

3. 研究の方法

(1) チロシンキナーゼ領域の発癌原因候補遺伝子の5つ(KIT, DDR2, PDGFRA, ROS1, IGF1R)を含めた25の発癌候補遺伝子の全長cDNAを作成後、遺伝子変異を加えた全長cDNAを作成する。

(2) cDNAを効率的にウイルスベクターに組み込めるGateway Systemを用い、遺伝子変異導入cDNAをウイルスベクターに導入後、Ba/F3細胞に形質導入し、発癌・増殖関連遺伝子が評価を行う。ウイルスベクターを作成する上では、10kbを越えるPCR産物でも組み込めるよう、適宜工夫を加えていく。ウイルスベクターとしてはレトロウイルスベクターを使用する予定ではあるが、細胞への形質導入がうまくいかない場合には、レンチウイ

ルスベクターの使用も考慮する。

(3) 2にて生存・増殖に関与を認めたと変異遺伝子導入細胞に抗癌剤を使用し、各遺伝子変異導入細胞に効果的な治療薬を明らかにし、個別化治療に応用できるか評価する。

(4) 生存・増殖に関与を認めたと変異遺伝子導入細胞については、癌関連遺伝子発現等についても解析を行う。具体的には、JAK-STAT・RAS-RAF-MEK-MAPK及びERK・PI3K-AKT・BIM・EGFR等の腫瘍増殖関連遺伝子アポトーシス関連遺伝子のタンパク発現について免疫染色及びウエスタンブロットにて解析を行う。

(5) 25の発癌原因遺伝子に関し、遺伝子増幅・タンパク発現・関連遺伝子機能解析を行う。関連遺伝子についても遺伝子増幅及びタンパク発現について解析を行い、効果的な治療法を探し出す。当院で治療を行った胸腺癌手術・生検組織検体のパラフィン切片よりDNAを抽出し、各発癌原因候補遺伝子のCopy number(遺伝子増幅の有無を確認)につき、リアルタイムPCRにて解析する。また、パラフィン切片より組織スライドを作成し、適切な抗体を用いた免疫染色を行い、各タンパク発現に関して解析を行う。

(6) 同じ扁平上皮癌である肺扁平上皮癌症例に関しても、遺伝子変異の有無及び遺伝子増幅・タンパク発現につき、当院の過去の肺癌手術切除検体を用いて解析を行う。これらの症例においては、生存・再発の有無・抗癌剤の効果等を含めた臨床病理学的背景がはっきりわかっている。詳細な検討により、当該遺伝子変異の有無と臨床病理学的因子との相互関係について検討が可能である。

(7) 既に樹立されている肺癌細胞株において、上記遺伝子変異等が認められれば、細胞株を用いて機能解析、腫瘍細胞の増殖抑制などに関して細胞実験を行っていく。

4. 研究成果

(1) 我々が次世代シーケンサー解析にて同定した25の胸腺癌における発癌原因遺伝子変異候補につき、各遺伝子・各遺伝子変異の機能解析研究を進めた。当初の予定通り、25の癌関連遺伝子変異の内、腫瘍増殖・発癌に強く関与していることが疑われたチロシンキナーゼ領域の5つの変異について検討を始めた。

(2) 本研究の要となる各遺伝子の機能解析を行うためのウイルスベクターを作成した。ウイルスベクター作成には、Gateway Systemを用いた。10Kbを越える候補遺伝子の全長PCRを組み込むウイルスベクターの作成に手間取ってしまった。

(3) 我々が最も注目していた KIT 遺伝子の全長 PCR を作成し、wild type と Site-Direct Mutagenesis キットを用いて遺伝子変異を組み込んだ全長 KIT 遺伝子をウイルスベクターに組み込み、Ba/F3 細胞にトランスフェクションし、機能解析を進めていった。KIT 遺伝子変異を組み込んだ Ba/F3 細胞に関しては、IL3 Free の環境では細胞が育たず・増殖もしなかった。KIT 遺伝子が発癌原因遺伝子ではないのか、実験系がうまくいっていないのか検証を進めているところであり、他の遺伝子変異解析に関しては中断を余儀なくされている。

(4) Tyrosine kinase domain に変異を認めた 5 つの Tyrosine kinase domain の遺伝子変異につき、当院で手術切除を行った胸腺癌 20 症例及び肺癌 20 症例のパラフィン切片から genomic DNA を抽出し、各遺伝子変異を検索したが、遺伝子変異を認めた症例は 1 例もなかった。通常の PCR にて検討を行ったため、次世代シーケンサーもしくは Digital PCR を用いたより詳細な検討により、微細な変異を拾い上げる可能性もあるため、今後の検討が必要と考えている。

(5) 25 の遺伝子において、免疫機構に影響を及ぼすと思われる遺伝子を認めたため、胸腺癌における PD-L1 タンパク発現についての検討を行った。昨今様々な癌腫において免疫チェックポイント阻害剤の効果予測因子ともいわれている PDL-1 タンパク発現についての研究が行われている。一方では、希少癌である胸腺癌における PDL-1 タンパク発現についての検討はほとんど行われていなかった。4 種類の PD-L1 抗体を用いて免疫染色の検討を行った。図 1 は胸腺癌腫瘍細胞での PD-L1 タンパク発現、図 2 は胸腺癌周囲免疫細胞での PD-L1 タンパク発現に関して、検討した胸腺癌 53 症例各々の PD-L1 タンパク発現をグラフにしている。結果としては、腫瘍細胞での評価の方が腫瘍周囲の免疫細胞での評価よりも信頼性があり、各 4 種類の PDL-1 タンパク発現を確認する抗体による免疫染色の一致率が高かった。53 例中 25 例 (47.1%) の症例で PD-L1 タンパク発現陽性であった。上記の解析結果より、胸腺癌における PD-L1 蛋白発現の陽性率は比較的高く、免疫チェックポイント阻害剤が胸腺癌に対する有効な治療法になり得ることを明らかにした。

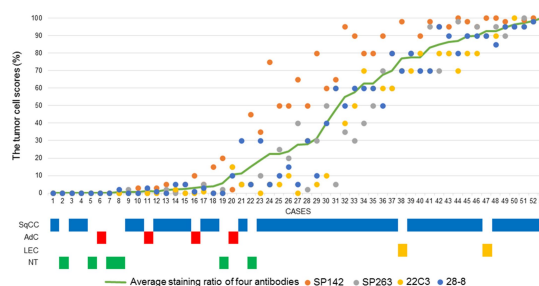
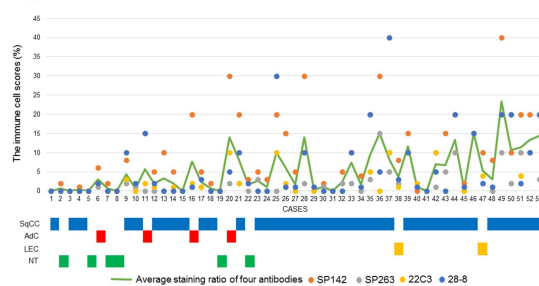


図 1. 胸腺癌腫瘍細胞での PD-L1 タンパク発現



Abbreviation: SqCC, squamous cell carcinoma; AdC, adenocarcinoma; LEC, lymphoepithelioma-like carcinoma; NT, neuroendocrine tumor

図 2. 胸腺癌周囲免疫細胞での PD-L1 タンパク発現

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 2 件)

Sakane T, Murase T, Okuda K, Takino H, Masaki A, Oda R, Watanabe T, Kawano O, Handeda H, Moriyama S, Saito Y, Yamada T, Nakanishi R, Inagaki H. A comparative study of PD-L1 immunohistochemical assays with four reliable antibodies in thymic carcinoma. *Oncotarget*. 9; 6993-7009: 2018. 査読有.

Okuda K, Suzuki A, Tatematsu T, Haneda H, Moriyama S, Yano M, Nakanishi R. Expression of excision repair cross-complementation group 1 and class -tubulin in thymic carcinoma. *Oncol Lett*. 13; 3144-3150: 2017. 査読有.

〔学会発表〕(計 3 件)

坂根理司、奥田勝裕、渡邊拓弥、小田梨紗、横田圭右、羽田裕司、森山悟、中西良一 .
第 118 回日本外科学会定期学術集会 . 2018 .
4.7 東京

Sakane T, Moriyama S, Haneda H, Okuda K, Kawano O, Watanabe T, Oda R, Nakanishi R. Treatment Outcomes of Primary Malignant Germ Cell Tumors of the Mediastinum. 18th World Conference on Lung Cancer. 2017.10.17 Yokohama

坂根理司、鈴木あゆみ、小田梨紗、川野理、奥田勝裕、羽田裕司、森山悟、中西良一 .
胸腺癌における癌精巢抗原の発現 . 第 34 回日本呼吸器外科学会総会 . 2017.5.18 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

奥田 勝裕 (OKUDA KATSUHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50529170

(2)研究分担者

森山 悟 (MORIYAMA SATORU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50551264

(3)研究分担者

矢野智紀 (YANO MOTOKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40315883