

令和 元年 5 月 31 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05167

研究課題名(和文) 肺癌におけるtwo compartment modelの検証及び発展

研究課題名(英文) Two compartment model for lung cancer

研究代表者

谷田部 恭 (YATABE, Yasushi)

愛知県がんセンター(研究所)・個別化医療TR分野・分野長

研究者番号：90280809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでわれわれは肺癌の発生機序について、発生母地の生物学的違いに基づくtwo compartment modelを提唱してきた。本研究では、これまでの我々の解析で明らかにしてきたがん化機序とそのモデルとの関係を検証するため、#1.mutation loads/burden, #2. Unique translocations, #3. Cis-type amplification, #4. Stepwise progression modelについて検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌の個性に基づく治療の細分化が進んでいるが、本研究はそれらを包括的に説明する生物学的意義を明らかにする試みである。そのため、その結果に基づいて肺癌治療の生物学的意味付けが可能となり、その特性による新たな治療戦略を考える礎となる。

研究成果の概要(英文)：We have proposed the novel theme of the two compartment-model of lung cancer development according to the cellular origin. In this study, we tried to validate the theme with the following key issues. #1.mutation loads/burden, #2. Unique translocations, #3. Cis-type amplification, #4. Stepwise progression model.

研究分野：分子病理学

キーワード：腫瘍病理学 肺癌 分子生物学 腺癌 バイオマーカー

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

1. 研究開始当初の背景

われわれの検討では、TRU 型腺癌においては非喫煙者に生じることが多いのに対し、喫煙の影響は扁平上皮癌、小細胞癌に加えて non-TRU 型腺癌で顕著であることがわかった。喫煙流に含まれる粒子の大きさに応じて解剖学的到達部位規定されることなどが原因と考えられる。また、気管上皮には線毛があるなど、解剖学的部位に規定される細胞組織構成は、沈着した発がん物質のクリアランスに関係することで発がん機序に大きく影響する。これらの考察から、肺における解剖学的部位による発がん機序の違いは、末梢肺組織 (TRU) および中枢気道組織の 2 つに大別できることを提唱した (Two compartment model)。このモデルは他の研究者にも受け入れられるとともに、代表的な肺発がん組織モデルとして 2015 WHO 分類においても紹介されている。

2. 研究の目的

この発がんモデルは肺癌における多くの現象を説明できることから、本研究ではこのモデルをさらに発展させるとともに、新しく得られた知見について検証することを目的とし以下の 4 つの点に焦点を当てて検討を進めていく。

(1) Mutation loads/burden: 腫瘍の組織型に応じて、それぞれの腫瘍における遺伝子変異 (mutation loads/burden) が異なることが知られている。その loads/burden は腫瘍化メカニズムと密接に関連しており、それらを検討することによりメカニズムの異なる腫瘍タイプを決定する。

(2) Unique translocations: 腫瘍化をドライブする ALK, RET, ROS1 などの融合遺伝子の形成の他に、その形成の意義が不明なユニークな遺伝子転座がそれぞれの腫瘍に 5 ~ 10 程度存在することが知られている。このユニークな遺伝子転座の形成について、腫瘍横断的に検討することで腫瘍化メカニズムおよびその遺伝子転座の意義を検討するとともに、two compartment model との関連を考察する。

(3) Cis-type alteration mechanism: EGFR, KRAS などの変異を有する腫瘍では、その変異に加えて遺伝子増幅が加わることがあり、それが腫瘍の進展に寄与することを示した。その増幅の際は cis 型に変異が加わるが、そのメカニズムは解明されていない。そこで、そのメカニズムおよび腫瘍における変異+増幅の肺癌分類における意義について検討を加える。

(4) Stepwise progression model: 腫瘍内で遺伝子異常が不均等に分布されていることが網羅的遺伝子解析の結果で示されているが、われわれはその多様性がそれぞれの腫瘍の進展に大きく関与していることを示してきた。その進展モデルについてより詳細な検討を試みるとともに、臨床上の大きな問題である分子標的薬耐性や、我々のこれまでの研究で明らかとなりつつある転写産物ががん化促進モデルと progression model, 腫瘍内遺伝子多様性について解析する。

3. 研究の方法

上記の背景をもとに、本研究では次の 4 つの基本計画に基づき、モデルの検証およびより深い理解につなげるべく検討した。

(1) Mutation loads/burden の検索:

既存のデータからは、小細胞癌、扁平上皮癌では高い mutation burden を有していると考えられ、two compartment model は EGFR, ALK に代表されるドライバー変異にドライブされたより単純型 (mutation burden の低い) 発がんメカニズムによる TRU 型肺癌と、多数の

遺伝子異常の蓄積（遺伝子異常を促す異常）にドライブされた複雑型発がんメカニズムに集約できることが推定される。免疫チェックポイント阻害剤の多くが、がん抗原となる可能性のある種々のタンパク異常発現に対して免疫学的回避が行われ、腫瘍化に重要な役割を果たしていると考えられることから、複雑型発がんメカニズムを取る扁平上皮癌、一部の腺癌で効果が期待できるとの仮説をたてた。そこで、免疫チェックポイント阻害剤治療薬で治療された症例でゲノム変異総数を算出するとともに、MSI 状態を検討した。これらのデータをもとに単純型/複雑型発がんメカニズムを判別できる数個の遺伝子マーカーの抽出を試みた。

(2)Unique translocations:

計画#1 で述べた多くの mutation を引き起こすメカニズムと転座メカニズムは異なる機序を基にして起こることが知られており、固有の融合遺伝子の頻度や融合パターンによる two compartment model の違いの検討を試みた。特に ALK、ROS1、RET いずれの融合遺伝子も共通した融合遺伝子パートナー（KIF5B, CD74 など）を有することが知られ、これらパートナー遺伝子の網羅的な融合遺伝子解析により、肺癌における fragile sites を同定することが可能であり、それらの遺伝子に対するターゲットシーケンスを行うことで新たな融合遺伝子を見出すことを試みた。

(3)Cis-type alteration mechanism:

EGFR, KRAS などの変異を有する腫瘍では、その変異に加えて遺伝子増幅が加わることがある。腫瘍細胞ではこのような変異アリルに更なる何らかの変化（付加の変異）が加わる現象が認められるが、SNP s をコントロールとし、cis 型と trans 型変異の頻度を算出し、その生物学的意義を検討するとともに、two compartment model に当てはめ考察を行った。

(4)Stepwise progression model:

正常上皮が過形成、前癌病変、上皮内癌を経て浸潤癌になるという stepwise progression model が癌の進展過程として広く受け入れられているが、われわれの検討から肺腺癌では EGFR, KRAS 変異ではその腫瘍の進展過程に大きな違いがあることを見出した。そこで、この検討について上皮内腺癌からの進展についても検討を行った。

4 . 研究成果

(1)Mutation loads/burden の検索:

PD-L1 治療薬で治療された症例を用い次世代シーケンサーでの網羅的遺伝子変異検索をスタートし、mutation burden の基礎となる遺伝子変異情報を蓄積した。TMB の算定方法については、現在 CAP/AMP によるコンセンサスガイドラインの作成が進みつつあり、それと整合性をもって検討するため、ガイドラインの制定に積極的に関与するとともに、その完成をまって国際的に容認された内容とすべく、解析を行っている。また、マイクロサテライトマーカーを用いた解析については、ペムプロリズマブの認可に合わせて承認された QMVR 法を用いたマイクロサテライト不安定性を検討したが、検討の過程で免疫染色で示されるミスマッチ修復遺伝子蛋白の発現との乖離が見出され、その原因について探究を進めた。その結果、現在の QMVR 法での MSI-high 陽性とするクライテリアにおいては、比較的移動度に乏しい変異を示す場合に十分に検索ができないことがわかり、それらを十分にカバー可能な評価基準を再構築した。その結果については論文としてまとめ、投稿中である。

(2)Unique translocations:

EGFR, ALK, ROS1, BRAF, KRAS, HER2 などのドライバー遺伝子変異を持たない肺腺癌 20 例について、CD74 や KIF5B などの共通した融合パートナーをターゲットにした RNA seq を行った。また、同様に ALK, ROS1 について同様のドライバー変異陰性の腺癌について、ALK および ROS1 をターゲットにした RNA seq を行った。その結果、未知の反復する融合遺伝子は見出されなかったが、既知のドライバー遺伝子との新たな融合パートナー遺伝子を見出し、現在論文を作成している。

(3) Cis-type alteration mechanism :

これまでの Amplicon sequence にて遺伝子多型部位とドライバー変異とが同時に見える部位を複数抽出し、cis-type に変異が加わっていることを確認するとともに、その遺伝子コピー数変化については、EGFR 以外には増幅している遺伝子は少なく、あったとしても数コピーの増加にとどまった(図1)。その生物学的意義について現在も検討を進めている。

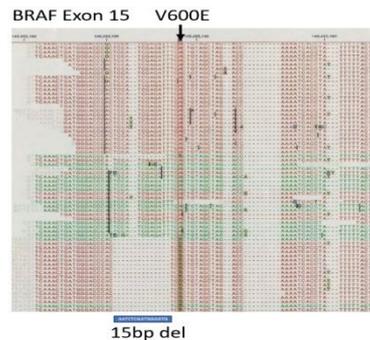


図1 . 低分化腺癌での BRAF 変異。Cis-type に変異と deletion がともに観察されるが、Wild-type との比率はほぼ 1:1 であり、明瞭なコピー数変化は確認できなかった。

(4) Stepwise progression model :

これまでの検討で、前癌病変から早期肺癌までについて考察したが、対象を上皮内腺癌からの進展についても検討を行うため、1 cm 以下の浸潤径をもつ極早期肺腺癌について検討した。これまでの研究の結果で遺伝子変異状態が判明している 1,125 例より極早期肺腺癌である 125 例について、遺伝子変異状態を全体のコホートと比較した(表1)。その結果、遺伝子異常に大きな隔たりは認められなかった。また、ALK, ROS1 陽性肺腺癌では充実性増殖を主体とする腫瘍が多いことが知られているが、超早期腺癌においても肺胞置換型増殖を主体とする肺腺癌が存在することが判明した。これらの結果からは超早期肺癌からの進展には stepwise

progression model に矛盾しないと考えられた。この結果については論文投稿中である。更に共同研究として行った早期病変についての発表も加わり、さらなる概念の発展を検討したい。

Tumor type	Genotype					
	Wild type	EGFR	KRAS	ALK	BRAF	ROS
Early invasive ADC (n=240)	125 (52.5%)	93 (38.8%)	17 (7.1%)	3 (1.3%)	1 (0.4%)	1 (0.4%)
Entire cohort (n=1,125)	535 (47.5%)	408 (36.3%)	100 (8.9%)	26 (2.3%)	13 (1.2%)	3 (0.3%)

Early invasive ADC and Entire Cohort, chi-square test, p=0.574

表 1 超早期腺癌と全体コホートにおける遺伝子変異頻度の比較。統計学的に有意差は認められなかった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)(すべて査読あり)

1. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, ..., Yatabe Y, Hirsch FR. Pd-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol.* 13:1302-11, 2018
2. Lindeman NI, Cagle PT, ..., Yatabe Y. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment with Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol.* 13:323-58, 2018

3. Yamamoto H, Yatabe Y, Toyooka S. Inherited Lung Cancer Syndromes Targeting Never Smokers. *Transl Lung Cancer Res.* 7:498-504, 2018.
4. Nicholson AG, Torkko K, Viola P, ..., Yatabe Y, ..., Franklin WA. Interobserver Variation among Pathologists and Refinement of Criteria in Distinguishing Separate Primary Tumors from Intrapulmonary Metastases in Lung. *J Thorac Oncol.* 13:205-17, 2018.
5. Masago K, Fujita S, Yatabe Y. Targeting Minimal Residual Disease after Surgery with Molecular Targeted Therapy: The Real Path to a Cure? *J Thorac Dis.* 10:S1982-S5, 2018.
6. Masago K, Fujita S, Hata A, Okuda C, Yoshizumi Y, Kaji R, Katakami N, Hirata Y, Yatabe Y. Validation of the Digital Pcr System in Tyrosine Kinase Inhibitor-Resistant Egfr Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *Pathol Int.* 68:167-73, 2018.
7. Dejima H, Nakanishi H, Kuroda H, Yoshimura M, Sakakura N, Ueda N, Ohta Y, Tanaka R, Mori S, Yoshida T, Hida T, Sawabata N, Yatabe Y, Sakao Y. Detection of Abundant Megakaryocytes in Pulmonary Artery Blood in Lung Cancer Patients Using a Microfluidic Platform. *Lung Cancer.* 125:128-35, 2018.
8. Thunnissen E, Borczuk AC, ..., Yatabe Y, Noguchi M. The Use of Immunohistochemistry Improves the Diagnosis of Small Cell Lung Cancer and Its Differential Diagnosis. An International Reproducibility Study in a Demanding Set of Cases. *J Thorac Oncol.* 12:334-46, 2017.
9. Hijioka S, Hosoda W, Matsuo K, ..., Yatabe Y, Mizuno N. Rb Loss and Kras Mutation Are Predictors of the Response to Platinum-Based Chemotherapy in Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm with Grade 3: A Japanese Multicenter Pancreatic Nen-G3 Study. *Clin Cancer Res.* 23:4625-32, 2017.
10. Yoshida T, Oya Y, Tanaka K, Shimizu J, Horio Y, Kuroda H, Sakao Y, Hida T, Yatabe Y. Differential Crizotinib Response Duration among Alk Fusion Variants in Alk-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 34:3383-9, 2016.
11. Travis WD, Asamura H, Bankier AA, Beasley MB, ..., Yatabe Y, International Association for the Study of Lung Cancer S, Prognostic Factors C, Advisory Board M. The Iaslc Lung Cancer Staging Project: Proposals for Coding T Categories for Subsolid Nodules and Assessment of Tumor Size in Part-Solid Tumors in the Forthcoming Eighth Edition of the Tnm Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 11:1204-23, 2016.
12. Tan DS, Yom SS, Tsao MS, Pass HI, Kelly K, Peled N, Yung RC, Wistuba, II, Yatabe Y, Unger M, Mack PC, Wynes MW, Mitsudomi T, Weder W, Yankelevitz D, Herbst RS, Gandara DR, Carbone DP, Bunn PA, Jr., Mok TS, Hirsch FR. The International Association for the Study of Lung Cancer Consensus Statement on Optimizing Management of Egfr Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: Status in 2016. *J Thorac Oncol.* 11:946-63, 2016.

〔学会発表〕(計9件)

1. 肺がんバイオマーカー検査の UP-to-date、第 59 回日本細胞学会総会春期大会 (教育講演)、2018.6.3、札幌・谷田部 恭。
2. 新たな時代のコンパニオン診断 アカデミーの立場から、第 107 回日本病理学会総会 (シンポジウム)、2018.6.22、札幌・谷田部 恭。
3. PD-L1 検査の変遷、第 107 回日本病理学会総会 (ワークショップ)、2018.6.22、札幌・谷田部 恭。
4. 肺癌の病理とバイオマーカー、第 33 回日本肺癌学会ワークショップ (特別講演)、2018.7.14、東京・谷田部 恭。

5. 2015 WHO 分類と診断に必要な免疫染色、第 59 回日本肺癌学会（シンポジウム）、2018.11.29、東京．谷田部 恭．
6. 肺癌治療のパラダイムシフト -PD-L1 22C3 検査の実際について、第 106 回日本病理学会総会（ワークショップ）、2017.4.27、東京．谷田部 恭．
7. 明日から出来る！！ PD-L1 検査 22C3 ハンズオンセミナー ～顕微鏡を備えて～について、第 106 回日本病理学会総会（ワークショップ）、2017.4.28、東京．谷田部 恭．
8. 肺癌診療における NGS を含めた診断ワークフローについて、第 106 回日本病理学会総会（コンパニオンミーティングワークショップ）、2017.4.28、東京．谷田部 恭．
9. 非小細胞肺癌治療戦略における PD-L1 検査の現状とその運用について、第 106 回日本病理学会総会（ワークショップ）、2017.4.29、東京．谷田部 恭．

〔図書〕(計 3 件)

1. ロビンス基礎病理学 原書 10 版，2018（分担執筆）谷田部 恭．(P535-588)
2. 呼吸器疾患 診断アプローチ 肺癌．1.3 原発性肺癌における遺伝子異常．中山書店，2018（分担執筆）谷田部 恭．(p13-17)
3. 『肺癌診療 Q&A』第 2 版．8. ALK 遺伝子変異検査法とそれぞれの長所短所を教えてください．11 免疫チェックポイント阻害治療における関連免疫染色について教えてください．中外医学社，2017（分担執筆）谷田部 恭．(p35-37, p50-78)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：坂尾 幸則

ローマ字氏名：(SAKAO, Yukinori)

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8 桁）：00274605

研究分担者氏名：樋田 豊明

ローマ字氏名：(HIDA, Toyoaki)

所属研究機関名：愛知県がんセンター(研究所)

部局名：分子腫瘍学分野

職名：研究員

研究者番号（8 桁）：80250249

(2)研究協力者 なし

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。