

令和元年6月25日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09561

研究課題名(和文)4遺伝子シグネチャーによる 期肺腺癌再発予測システムの構築

研究課題名(英文)4 gene signature will predict the recurrence for stage I lung carcinomas.

研究代表者

野呂 林太郎 (Noro, Rintaro)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50366738

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)： 期肺癌の術後化学療法が必要な予後不良患者と不必要な予後良好患者を選択する必要がある。現在までに様々な再発予測マーカーが報告されているが、どれも地域や患者背景の異なるバリテーション検体では再現性がとれず、コンセンサスが得られる予測マーカーの開発が困難である。本研究の目的は、既知の予測マーカーを組み合わせて、新しい普遍的な再発予測マーカーを構築することである。現在までに報告されている4遺伝子シグネチャー、病理学的脈管侵襲、HOXA9メチル化、ACTN4遺伝子増幅を組み合わせて、再発予測診断法を構築している。FFPE切片からの個々の解析では再発予測に関わることが示され、現在統合解析を施行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌 期、特にIA期であっても術後化学療法が必要な予後不良群や不必要な予後良好群が存在し、正確に予測できる再発予測マーカーの同定が必要である。よって新しい再発予測マーカーを構築する。この診断システムにより、術後化学療法を行う必要がある再発高リスク群患者の予後の向上や、不必要な化学療法を行わないことにより、再発低リスク患者のQOLの向上も図ることができる。

研究成果の概要(英文)：Surgery with curative intent is the standard treatment for stage I lung adenocarcinoma. However, disease recurrence occurs in a third of patients, and additional adjuvant chemotherapy will be needed for lung carcinomas with high risk for recurrence. There are no validated molecular methods that prospectively identify patients with surgically resected lung carcinoma with early stage at high risk for recurrence. We established the diagnostic system for analyzing 4 gene signature including DLD1, XPO1, BRCA1 and HIF1A, HOXA9 methylation, pathological finding with vascular invasion, ACTN4 activity. We are analyzing how these modality would be able to predict the recurrence with more precision. These system would prove the prognosis for lung carcinomas with early stage.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：再発予測

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦で死亡率トップの予後不良な癌である。近年の画像診断の進歩により、根治可能な早期肺癌の検出が可能になり手術療法への期待は高まっている。しかしながら 期であっても根治手術後 30%が再発する。よって術後化学療法の必要性が問われている。 期特に IA 期の術後化学療法が必要な予後不良患者と不必要な予後良好患者を選択する必要がある。現在までに様々な再発予測マーカーが報告されているが、どれも地域や患者背景の異なるバリデーション検体では再現性がとれず、コンセンサスが得られる予測マーカーの開発が困難である。本研究の目的は、既知の予測マーカーを組み合わせ、新しい普遍的な再発予測マーカーを構築することである。

## 2. 研究の目的

肺癌 期、特に IA 期であっても術後化学療法が必要な予後不良群や不必要な予後良好群が存在し、正確に予測できる再発予測マーカーの同定が必要である。よって新しい再発予測マーカーを構築する。

## 3. 研究の方法

既に肺腺癌の一期再発予測マーカーとして報告された 4 遺伝子シグネチャーは BRCA1、XP01、DLD1、HIF1A 遺伝子からなりこれらは、機能が異なるがん関連遺伝子である。これらの 4 遺伝子シグネチャー診断システムによる高危険群は、再発予測可能であり術後御化学療法のメリットを予測できるのか?他の modality 例えば HOXA9 遺伝子メチレーションや病理学的因子(血管侵襲、リンパ管侵襲)、ACTN4 遺伝子増幅など既に報告されている再発予測マーカーと相乗して、術後化学療法のメリットを予測できるかを検討する。

同様に肺扁平上皮癌でも新しい再発予測バイオマーカーを構築できる可能性があり、付随的な研究として以前の留学先である LHC/NCI/NIH(Harris 博士)との共同研究で研究している。

現在までは新鮮凍結標本からなる RNA で解析していたが、臨床における実用化のためには、固定パラフィン包埋検体から施設の異なる新たなコホートにおける再現性を示す必要がある。

固定パラフィン包埋 (FFPE : formalin-fixed paraffin embedded) は、手術等で摘出された組織を保存するための最も一般的な方法であり、多くの病院や研究機関では、病理診断等を行った後の FFPE が大量に保存されている。これらの FFPE 組織は、患者の治療成績・予後等臨床情報が明らかであることから、バイオマーカー検索や創薬ターゲット探索のために非常に有効であると考えられている。よって認容性の高いバイオマーカーを構築するためには、FFPE 標本より採取した RNA を利用する必要がある。それらをリアルタイム PCR によって発現解析を行う。よって最終的には 1)FFPE からの RNA 抽出 4 遺伝子発現解析の確立 2)HOXA9 遺伝子メチレーション解析 3) 病理学的脈管侵襲(BVI)の検討 4) ACTN4 遺伝子増幅解析 5)4 遺伝子シグネチャーにおける臨床検体解析 6)複数の modality を交えた再発予測統合解析 7)肺扁平上皮癌の再発予測マーカーの解析を行う。

## 4. 研究成果

### 1)テストサンプルにおける FFPE と新鮮凍結標本からの RNA 抽出および発現解析法の確立

30 例のテストサンプルを用いて 4 遺伝子の凍結切片からの RNA と、FFPE からの RNA を採取しリアルタイム PCR を行い、4 遺伝子の ct value を比較したところ  $P=0.04$   $r=0.85$  の一致率であり劣悪な質の FFPE サンプルからも良質な RNA 発現解析が可能であることが示された。

### 2)新規早期肺腺癌バイオマーカー HOXA9 メチル化解析

この結果からまず早期肺がんの再発予測マーカーである HOXA9 を用いたメチル化および発現解析を FFPE から抽出した DNA RNA を用いて行った。同様にメチル化解析においても FFPE と新鮮凍結標本の結果は同様であった。(図 1) 期肺腺癌においては、HOXA9 のメチル化は予後に関わることが示された。

### 3) 再発予後に関わる病理学的脈管侵襲(BVI)の評価

病理学的脈管侵襲(BVI)の評価も行い、予後因子であることを確認し、これらの組み合わせでは高リスク群は予後に関わることが示された。

### 4) 肺腺癌再発予後に関わる ACTN4 遺伝子増幅解析

また以前早期肺がんの再発予測マーカーである ACTN4 遺伝子にも注目し(Noro R et al. Ann oncol, 2013)、現在一期肺腺がんの本研究に用いているサンプルで遺伝子発現解析、FISH による遺伝子コピー解析を行っている。

### 5) 肺腺癌再発予後に関わる 4 遺伝子シグネチャーの解析

術後化学療法 100 例、術後経過観察群 100 例の FFPE から RNA を採取しリアルタイム PCR を用いて 4 遺伝子発現解析を行った。その結果は臨床情報と照合し現在解析中であるが、暫定的な解析では高リスク群では術後化学療法群 vs 経過観察群で 5 年再発期間は前者で延長の傾向にあった。また一方で低リスク群では 5 年再発期間はほぼ同等であった。本シグネチャー高リスク群の術後化学療法の必要性を予測することができた。Validation サンプルでの解析を施行中である。

### 6) 肺腺癌再発予測に関わる多因子による統合解析

HOXA9, 4 遺伝子シグネチャー, 病理学的脈管侵襲, ACTN4 遺伝子増幅を解析結果を踏まえ複数も modality を用いた万能な一期肺腺癌の術後化学療法の必要性を判断する再発予測マーカーを構築している。

### 7) 肺扁平上皮癌における再発予後に関わる因子の抽出

一方で肺扁平上皮癌は、既に公表されているマイクロアレイを用いた統合解析では4遺伝子シグネチャーでは予後予測は難しく、LHC/NCI/NIHのHarris博士と共同で早期肺扁平上皮癌特異的な独立した2コホートの早期扁平上皮癌のRNAサンプルを用いてトランスクリプトーム解析を行い、2遺伝子シグネチャーを構築し、複数のコホートや公表されているマイクロアレイデータでも確認できている。2遺伝子は上記のACTN4遺伝子 DUSP6遺伝子である。これらも4遺伝子同様、IPA pathway 解析でもがんの進行転移に対して異なった機能を有していることを確認している。(図2)ACTN4 遺伝子は腺癌でも有望な再発予測遺伝子であり期待される。

#### まとめ

術後化学療法の必要な再発予測診断法の確立を行っており、個々の因子は予測可能と思われた。これらの再発予測バイオマーカーの統合解析を行っているがさらに validation セットでの解析を行うため、米国との共同研究を予定している。

図1 凍結標本と FFPE からの DNA を用いたメチル化解析

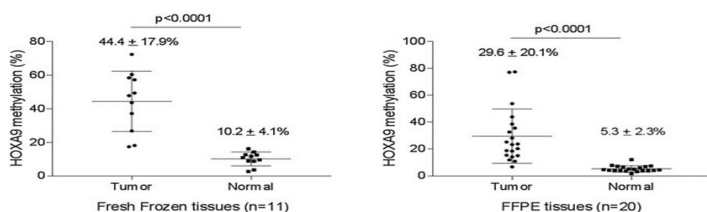
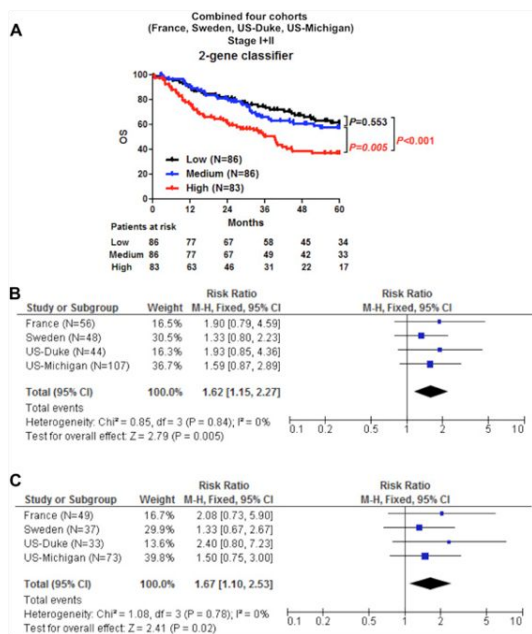


図2 肺扁平上皮癌における再発予測マーカー



## 5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) HOXA9 methylation and blood vessel invasion in FFPE tissues for prognostic stratification of stage I lung adenocarcinoma patients. Lissa D, Ishigame T, Noro R, Tucker MJ, Bliskovsky V, Shema S, Beck JA, Bowman ED, Harris CC, Robles AI. Lung Cancer. 2018 Aug;122:151-159. doi: 10.1016/j.lungcan.2018.05.021. Epub 2018 May 22.
- 2) A Two-Gene Prognostic Classifier for Early-Stage Lung Squamous Cell Carcinoma in Multiple Large-Scale and Geographically Diverse Cohorts. Noro R, Ishigame T, Walsh N, Shiraishi K, Robles AI, Ryan BM, Schetter AJ, Bowman ED, Welsh JA, Seike M, Gemma A, Skaug V, Mollerup S, Haugen A, Yokota J, Kohno T, Harris CC. J Thorac Oncol. 2017 Jan;12(1):65-76. doi: 10.1016/j.jtho.2016.08.141. Epub 2016 Sep 6.

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) I 期肺腺癌再発予測システムの構築 術後化学療法と ACTN4 遺伝子増幅  
Author: 野呂 林太郎, 本田 一文, 三浦 奈美, 白石 英晶, 藤原 豊, 大江 裕一郎, 石井 源一郎, 蔦 幸治, 浅村 尚生, 山田 哲司, 清家 正博, 久保田 馨, 弦間 昭彦 日本癌治療学会学術集会 55 回 (2017.10)
- 2) 非小細胞肺がんの分子腫瘍マーカー  
野呂 林太郎, 山田 哲司  
日本分子腫瘍マーカー研究会 2017.03
- 3) 一 期肺腺癌再発予測システムの構築 術後化学療法と ACTN4 遺伝子増幅  
野呂 林太郎, 本田 一文, 三浦 奈美, 白石 英晶, 藤原 豊, 石井 源一郎, 蔦 幸治, 清家 正博, 久保田 馨, 大江 裕一郎, 浅村 尚生, 山田 哲司, 弦間 昭彦  
日本肺癌学会総会 2016.11

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔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：清家正博

ローマ字氏名： **Masahiro Seike**

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：**30366687**

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：**Harris Curtis** 博士

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