

令和元年6月24日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0197

研究課題名(和文) 前がん病変から早期肺がんを鑑別する多面的情報統合に基づく予測モデルの構築

研究課題名(英文) Difference in mutation distribution between adenocarcinoma in situ and early lung adenocarcinoma

研究代表者

白石 航也 (Shiraishi, Kouya)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：80609719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：同時多発を来した女性非喫煙者肺腺がん症例由来の非浸潤性肺腺がんと浸潤性肺腺がんに対する外科的試料10例(浸潤がんと非浸潤がん、合わせて20サンプル)を用いて50遺伝子のホットスポット変異検索を行った。その結果、10症例の内3症例の浸潤性肺腺がんにおいて、アジア人で高頻度に検出されるEGFR変異型を検出し、またTP53体細胞変異も同時に検出した。一方で、EGFR変異を初めとするドライバー変異は非浸潤性肺腺がんでも認められたものの、TP53体細胞変異は認めなかった。本研究で得られた結果は、既に報告されている欧米の結果や今までの散発症例で報告されていた遺伝子変異パターンの結果と類似していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、今まで行われてこなかった同時多発を来した症例由来の非浸潤性肺腺がんと浸潤性肺腺がんに対するゲノム解析を行うことで、がんの進展過程に関わる遺伝子異常の同定やメカニズムの解明、さらには新しい治療標的の探索を試みた。本研究により、既報で報告があったようにTP53遺伝子異常ががんの進展において重要な役割を果たしている可能性が示された。しかし本研究では、解析対象数が少ないために、再現性のある遺伝子異常や新規治療標的因子の同定には至らなかった。今後は症例数を増やして解析することで、本結果が再現されるか検証する予定である。

研究成果の概要(英文)：We performed the targeted sequencing of 10 pair samples, including non-invasive (adenocarcinoma in situ) and invasive lung adenocarcinoma tissue from never-smoking female, using the Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2. As results of sequencing, in three of ten patients, EGFR and TP53 mutations were detected in both adenocarcinoma in situ and invasive lung adenocarcinoma, however, driver mutations including EGFR mutations were only detected in adenocarcinoma in situ. These results were similar to previous reported of lung cancer in Caucasian.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：非浸潤性肺腺がん 浸潤性肺腺がん 遺伝子異常

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

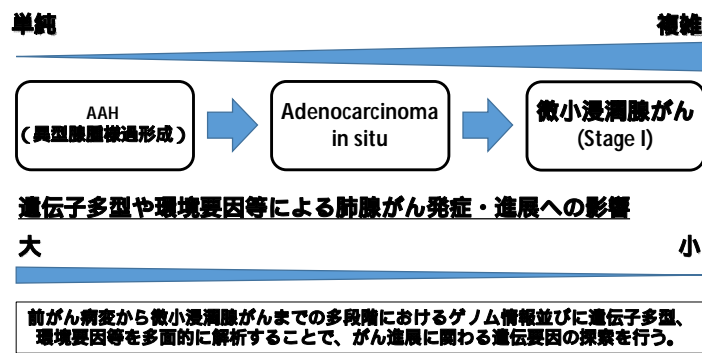
1. 研究開始当初の背景

進行性肺がんの多くは、分子標的薬等の恩恵により一時的に病勢をコントロールすることができるが、殆どの場合再増悪することから、肺がんは難治性がんの一つである。従って、早期発見・早期治療を行うことで、がん死の抑制に寄与できると考えられる。近年は高解像度 CT などにより、超早期の肺がんまで検出することができるようになったが、一方で前がん病変に対しても手術を施行される場合があり、オーバーダイアグノーシス(過剰な診断)が問題になっている。

研究代表者は日本人集団を対象とした SNP を用いた全ゲノム関連解析 (GWAS) を行い、複数の肺がん感受性遺伝子座 (*TERT* (5p15.33)、*TP63* (3q28)、*ROS1-DCBLD1*(6q22.1)、*BTNL2* (HLA-class II, 6p21.3)、*VTI1A* (10q25.2)、*BPTF* (17q24.2)) を同定した (Shiraishi et al., Nat Genet 2012., Lan et al., Nat Genet 2012, Shiraishi et al., Nat Commun 2016)。さらにこれらの肺がん感受性遺伝子座はより早期の段階、すなわち前がん病変のリスクにも関わると考え、国立がん研究センターがん予防・検診研究センターで肺がん CT 検診を受けた 10,469 名のうち、肺に AAH(異型腺腫様過形成)と思われる擦りガラス様陰影が検出された症例群 506 名と検出されなかった対照群 1,107 名を対象に、上記の肺がん感受性遺伝子座が、AAH の発症リスクと関連するかどうか検討したところ、*TERT* 遺伝子多型と *TP63* 遺伝子多型が AAH 発症リスクと関連することを明らかにしている。

本研究では、肺がんの中で最も発症頻度が高い肺腺がんに着目し、前がん病変(AAH: 異型腺腫様過形成)から Adenocarcinoma *in situ*、微小浸潤肺腺がんまでの経時的に観察されるがんの進展過程における遺伝的要因並びに環境要因との関連を明らかにするため、同時多発もしくは異時性の肺腺がん症例に対して、ゲノム解析を行った。

図1. 肺腺がん進展に伴うゲノム異常、遺伝的要因や生活習慣との関連



2. 研究の目的

本研究では、肺がんの中で最も発症頻度が高い肺腺がんに着目し、前がん病変(AAH: 異型腺腫様過形成)から Adenocarcinoma *in situ*、微小浸潤肺腺がんまでの経時的に観察されるがんの進展過程における遺伝的要因並びに環境要因との関連を明らかにすることを目的とする。具体的には、

1. 異時性もしくは同時多発した肺腺がん症例に着目し、同一症例における前がん病変 (AAH もしくは Adenocarcinoma *in situ*) と微小浸潤肺腺がんにおけるがんゲノム異常の差異を明らかにする。
2. TCGA に登録されている mucinous bronchioloalveolar carcinoma (BAC) の内、mucinous Adenocarcinoma *in situ* (AIS), mucinous Minimal invasive adenocarcinoma (MIA) を示す nonmucinous type10 例との比較を行う。

3. 研究の方法

アジア人肺腺がん症例の約 40% が非喫煙者女性で占められるため、本研究では特に女性非喫煙者肺腺がん症例に着目した。次に 2011 年～2017 年国立がん研究センター中央病院にて肺腺がんと診断された女性非喫煙者 463 名より、外科的手術を受けた症例でかつ同研究所バイオバンクにて凍結組織検体が保存されている 227 症例を抽出した。その中から、30 サンプル (浸潤性肺がん、Adenocarcinoma *in situ*、非がん肺組織が同時に揃った 10 症例) を選択し、それぞれ Qiagen 社 AllPrep DNA/RNA Mini Kit を用いて DNA/RNA を抽出した。またこれらの症例に対する診察情報なども合わせて収集を行った。年齢、受動喫煙歴に大きな差は認めなかった (表 1)。症例数も少ないこともあり、特徴的な環境要因との関連は認められなかった。

表1. 本研究に用いた症例と受動喫煙との関連

受動喫煙歴	全例 (n=463)				凍結組織検体 (n=227)				異時性・同時多発症例 (n=10)			
	10歳代	%	30歳代	%	10歳代	%	30歳代	%	10歳代	%	30歳代	%
毎日	137	29.6	192	41.5	66	29.1	95	41.9	5	50	3	30
週1-4日	32	6.9	62	13.4	16	7.0	31	13.7	0	0	0	0
月1-3日	34	7.3	28	6.0	16	7.0	14	6.2	1	10	0	0
ほとんどなし	260	56.2	181	39.1	129	56.8	87	38.3	4	40	7	70
年齢 (± SD)	67.6 ± 10.4				67.6 ± 10.4				70.1 ± 9.37			

次にがん組織検体を用いて主要なドライバーとなる遺伝子変異を同定するため、まずは 50 遺伝子のホットスポット変異を検出できる Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 を実施した。ライブラリー作成は、キットに添付されているプロトコールに従い行い、全例のシーケンスを Ion Proton システムを用いて行った。平均 depth 量が 1000 以上でかつシーケンスクオリティスコアである Q20 (1% で誤りが認められる確率) が全リードの 90% 以上を示した症例を Quality Control をパスした症例とし、全例その基準をクリアした。次に 20 サンプルで認められた遺伝子変異の意義付けを行う前に、まず遺伝子多型ではないことを確認するため、東北メディカルバンクに登録されている 3,552 例の健常群において、1% 以上で認められたバリエーションを除外した。さらに ClinVar で pathogenic もしくは likely pathogenic mutation として登録されているか、また OncoKB で oncogenic mutation と登録されている遺伝子変異群のみを抽出し、これらを病的意義のある変異とした。

10 症例の内 3 症例の浸潤性肺がんにおいて、アジア人で高頻度に検出される EGFR 変異型を検出し、また TP53 体細胞変異も同時に検出した。一方で、EGFR 変異を初めとするドライバー変異は adenocarcinoma *in situ* でも認められたものの、TP53 体細胞変異は認めなかった。EGFR 変異はアジア人肺腺がんが多いことから、この結果はアジア人肺腺がん症例と類似する結果となった。また本研究で得られた結果は、既に報告されている欧米の結果や今までの散発症例で報告されていた結果と類似していた。

TCGA に登録されている mucinous bronchioloalveolar carcinoma (BAC) の内、mucinous Adenocarcinoma *in situ* (AIS), mucinous Minimal invasive adenocarcinoma (MIA) を示す nonmucinous type10 例との比較を行った。その結果、TP53 体細胞変異は 10 例中 7 例で認められ、KRAS 体細胞変異は 5 例で、EGFR 変異は 1 例で認められた。この結果は、欧米人肺腺がんも多く認められる KRAS 体細胞変異を検出し、欧米人肺腺がん症例と類似する結果となった。

今回同時もしくは異時性多発肺腺がん症例 3 症例に対して、浸潤性肺腺がん、Adenocarcinoma *in situ* 非がん組織検体に対して、Agilent SureSelect V5 を用いて解析を行った。ライブラリーの作成などについては、添付のプロトコールに従い作成し、HiSeq2500 を用いてシーケンスを行った。得られた Fastq ファイルを用いて、GATK3.7 の Best practice に従い、vcf ファイルを作成した。3 症例と少ない症例数のため、Recurrent に認められる変異はほとんど検出できなかったが、ドライバー変異である EGFR 変異、KRAS 変異や TP53 変異は Cancer panel の結果と同様に検出することができ、全エクソンシーケンスはうまく行ったことを確認した。今後は、多数検体を用いた次世代シーケンス解析を実施し、腫瘍内の異種混在の程度などを検討していく予定である。

4 . 研究成果

本研究において、国立がん研究センター中央病院にて女性非喫煙者肺腺がんと診断された 463 名を抽出した。その中で当研究所のバイオバンクにて凍結組織検体が保管されていた 227 症例を抽出したが、抽出によるバイアスがないことを確認した。さらに異時性・同時多発性肺腺がんと診断された女性非喫煙者 10 症例に着目して、Cancer panel によるホットスポット変異解析を行ったところ、10 例中 3 例に EGFR 変異を認め、浸潤性肺腺がん症例においてはさらに TP53 遺伝子変異を検出した。一方 Adenocarcinoma *in situ* では TP53 の遺伝子異常を認めなかった。この結果は、浸潤性肺腺がんでは認められている変異パターンと同様の結果となった。また TCGA database より、Adenocarcinoma *in situ* と思われる BAC に着目して解析を行ったところ、TP53 遺伝子異常並びに KRAS 遺伝子異常を検出し、欧米人肺腺がんでは認められる遺伝子異常と同じパターンを示した。今後は同様の症例に対して、さらに全エクソンシーケンスを実施し、腫瘍内の異種混在の程度などを検討していく予定である。また本研究で得られた遺伝子変異情報や診療情報については、他研究にも二次利用した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Uchida S, Tsuta K, Kusumoto M, Shiraishi K, Kohno T, Watanabe SI. Radiopathologic correlation of collision lung cancer with ground-glass opacity. Asian Cardiovasc Thorac Ann. 2019; 27(1):45-48.
2. Li Z, Maeda D, Yoshida M, Umakoshi M, Nanjo H, Shiraishi K, Saito M, Kohno T, Konno H, Saito H, Minamiya Y, Goto A. The intratumoral distribution influences the prognostic impact of CD68- and CD204-positive macrophages in non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2018; 123:127-135.
3. Honda T, Sakashita H, Masai K, Totsuka H, Motoi N, Kobayashi M, Akashi T, Mimaki S, Tsuchihara K, Chiku S, Shiraishi K, Shimada Y, Otsuka A, Kanai Y, Okubo K, Watanabe S, Tsuta K, Inase N, Kohno T. Deleterious Pulmonary Surfactant System Gene Mutations in Lung Adenocarcinomas Associated With Usual Interstitial Pneumonia. 2018; JCO Precision Oncology
4. Goto A, Tanaka M, Yoshida M, Umakoshi M, Nanjo H, Shiraishi K, Saito M, Kohno T,

- Kuriyama S, Konno H, Imai K, Saito H, Minamiya Y, Maeda D. The low expression of miR-451 predicts a worse prognosis in non-small cell lung cancer cases. PLoS One. 2017; 12(7):e0181270.
5. Masai K, Tsuta K, Motoi N, Shiraishi K, Furuta K, Suzuki S, Asakura K, Nakagawa K, Sakurai H, Watanabe SI, Hiraoka N, Asamura H. Clinicopathological, Immunohistochemical, and Genetic Features of Primary Lung Adenocarcinoma Occurring in the Setting of Usual Interstitial Pneumonia Pattern. J Thorac Oncol. 2016; 11(12):2141-2149.
6. Saito M, Shiraishi K, Kunitoh H, Takenoshita S, Yokota J, Kohno T. Gene aberrations for precision medicine against lung adenocarcinoma. Cancer Sci. 2016; 107(6):713-20.

〔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〕

ホームページ等
該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者
該当なし

(2)研究協力者
該当なし

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。