

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：85408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10807

研究課題名(和文) 口腔粘膜遺伝子異常の網羅的解析による肺がん発生高リスク群検出モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of a model for risk stratification of lung cancer development by comprehensive analysis of oral mucosal gene abnormalities

研究代表者

原田 洋明 (Harada, Hiroaki)

独立行政法人国立病院機構東広島医療センター(臨床研究部)・診療部呼吸器外科・呼吸器外科医師

研究者番号：90573816

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)：肺癌組織と同じく気道の組織であるが容易に採取可能な口腔粘膜を用いて遺伝子異常の網羅的解析を行い、肺がん発生高リスク群を低リスクで効率的に選定するバイオマーカーの確立を目指した。がん発生の主たるメカニズムであるエピジェネティクス異常について統合的に解析したところ、遺伝子異常の組み合わせが肺がん発生リスクを層別化する分子生物学的マーカーになりうる可能性について展望を開くことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺がんの死亡率低下をもたらすが被曝リスクやコスト面、さらには偽陽性率の高さで問題を残すCT検診において、対象者とすべき肺がん発生高リスク群の選定が現在大きな課題である。

肺組織の採取に比べ口腔粘膜の採取は極めて容易で危険性も少ないため、口腔粘膜の解析による肺がん発生高リスク群の選出についてその可能性を示すことができた本研究は、今後社会全体として低リスク低コストである効率的な肺がん検診システムの構築に繋がる学術的・社会的な意義を有するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish a biomarker that efficiently selects a high-risk group of lung cancer at low risk by comprehensive analysis of genetic abnormalities using the easily collectable oral mucosa, which is the airway tissue same as lung cancer tissue. An integrated analysis of epigenetics abnormalities, the main mechanism of cancer development, revealed the possibility that a combination of epigenetic alteration profile could be a promising molecular biological marker for lung cancer risk stratification.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：エピジェネティクス 肺癌 分子マーカー 遺伝子異常 口腔粘膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺がんは早期発見が困難であり、発見時には多くの患者が既に有効な治療法の少ない状況にある。肺がんCT検診が死亡率の低下に寄与すると報告されたが、重度喫煙者に限った検討にもかかわらず、コホート内での肺がん発生確率は決して高くなかった。一方肺がんCT検診はコストや被ばく量の問題もあり、その有用性やプロトコル確立には議論の余地を残す。

(2) 効率的に肺がん発生の高リスク群を選定しうる分子生物学的マーカーを同定することができれば、CTやPET検診などと連動し、高リスク群に対する密な検診プログラムの確立に繋がり、社会全体として低コストでの早期肺がん患者発見に大きく寄与すると期待される。

(3) 肺がん発生の主因である喫煙・大気汚染などの環境要因は、肺組織のみならず口腔内も含めた気道全域に直接影響を及ぼし、さらには間接的に循環血液にも影響を及ぼしうると考えられるが、肺がん組織以外の気道上皮や血液における遺伝子異常について、肺がんとの関係性は十分に解明されていない。

(3) DNAメチル化で代表されるエピジェネティクス異常は、ジェネティックな異常である突然変異、染色体欠失とあわせて発がんの主たるメカニズムとして知られている。エピジェネティクス異常は環境要因による影響を強く受けるとされており、肺がん発生の最大原因である喫煙をはじめとする環境要因が、肺がん組織のみならず気道(肺組織および口腔粘膜)上皮や循環血液に与える遺伝子異常について解析することは、肺がん発生高リスク群や生物学的悪性度の指標となりうる分子生物学的マーカーの同定に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 肺がん組織だけでなく容易に採取可能な口腔粘膜や血液を用いて、がん発生の主たるメカニズムであるエピジェネティクス異常の解析を行い、肺がん発生高リスク群を効率的に選定しうる分子生物学的マーカーの確立を目指す。

(2) 肺がんの発生と関連する環境要因として酸化ストレスを測定し、肺がん組織および口腔粘膜、血液における遺伝子発現異常のプロファイリングと環境要因との関連性について解明する。

3. 研究の方法

肺がん摘出標本に加え、容易に採取可能な口腔粘膜および血液を用い、DNAメチル化異常と臨床的パラメーターさらには生体内酸化ストレス度(d-ROMテストを使用)との関連について詳細に評価した。

4. 研究成果

(1) 肺がん摘出標本を用いた解析

肺がん切除時にリンパ節転移を伴わず完全切除が行われた症例の手術時検体を用いて MyoD family inhibitor (*MDFI*)のメチル化異常について解析した。*MDFI*メチル化異常の有無で分けた2群の Recurrence-free survival curve (Figure 1) を下に示すが、統計学的有意差を認め、さらに多変量解析でも *MDFI* のメチル化異常が再発と関連する独立した因子であることを発見した。この成果について論文を作成し海外ジャーナルに投稿したが現在までのところ accept には至っていない。

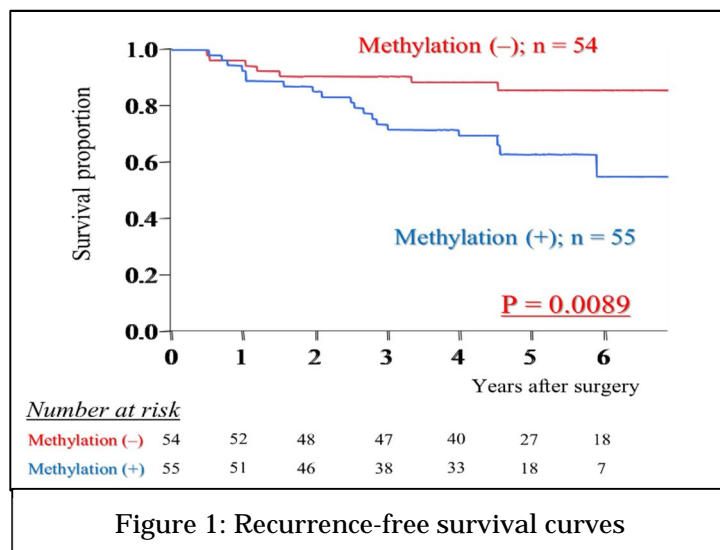


Figure 1: Recurrence-free survival curves

これまでに予後関連因子として発表してきた *DLX4*, *PCDH10* に加えて *MDFI* のメチル化プロファイルを統合解析した結果、DNA メチル化異常を生じている遺伝子種類の数によって予後が層別化された (Figure 2)。本解析結果について 2017 年の World Congress of Surgery にて発表し、Best Poster Prize に選出され表彰された。

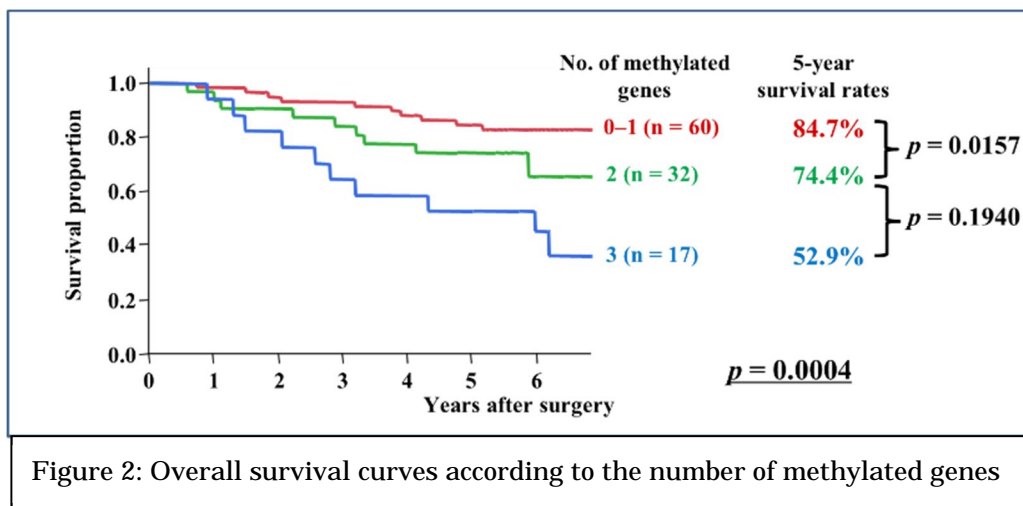


Figure 2: Overall survival curves according to the number of methylated genes

(2) 口腔粘膜を用いた解析

Preliminary data として口腔粘膜における DNA メチル化異常プロファイルについて、*HOXD11* と *PCDHGB6* が肺癌患者において多く検出されることを 2017 年度の日本胸部外科学会総会で発表した。それまでの Pilot study において肺癌患者との関連性が指摘できていた *GDNF*、*RARB*、*ProK* を含めた 5 遺伝子による多数例での統合解析を行ったところ、3 遺伝子 (*GDNF*、*RARB*、*HOXD11*) が、肺癌患者において高率にメチル化異常が口腔粘膜で発生しており、肺癌高リスク群の同定につながる分子マーカーとしての可能性が示された (Figure 3)。本研究成果を 2018 年度 Asia Pacific Society of Respiriology にて口演発表、および 2019 年度の呼吸器外科学会総会で発表した。

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	p Value
Overall analysis	30.0%	93.4%	54.5%	83.5%	<0.0001
Subgroup analysis					
Current or former smokers	25.0%	89.5%	46.2%	70.8%	0.0814
Never smokers	41.7%	95.8%	44.4%	92.9%	<0.0001
Age ≥ 50 years	30.0%	85.7%	42.9%	65.4%	0.0537

PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value

Figure 3: Diagnostic values obtained by combined analyses

(3) 環境要因 (酸化ストレス) とエピジェネティクス異常の関連

環境因子である酸化ストレスが肺癌の予後と関連するとの報告があり、肺切除時にリンパ節転移を認めなかった症例において、酸化マーカーである d-ROM の程度で肺切除後の予後を比較したところ統計学的な有意差が確認された。

酸化ストレスと DNA メチル化異常との関連性について、肺切除時にリンパ節転移を認めなかった非小細胞肺癌において術前に採取した血液を用いて 12 遺伝子のメチル化異常を解析した。これまでに早期肺癌の予後との関連について報告していた *PCDH10* のみが酸化ストレスとメチル化異常に関連性が示され (Figure 4) その結果を 2017 年の Asia Pacific Society of Respiriology で発表し、APSR assembly Best Abstract Award Lung Cancer に選出された

次に肺腺がんに限定して同じく 12 遺伝子について評価した。*SIM-1* のメチル化異常が酸化ス

トレス度との関連性を認め (Figure 5) その結果について 2018 年の Asia Pacific Society of Respirology で発表した。

Symbol	Methylation status	d-ROM: High N = 34	d-ROM: Low N = 31	p Value
<i>MDFI</i>	Yes/no	0/34	0/31	N/A
<i>KLK10</i>	Yes/no	11/23	14/17	0.2891
<i>HOXD11</i>	Yes/no	21/13	14/17	0.1799
<i>SIM-1</i>	Yes/no	10/24	14/17	0.1888
<i>miRNA-137</i>	Yes/no	27/7	24/7	0.8453
<i>HS3ST2</i>	Yes/no	31/3	26/5	0.3705
<i>PCDH10*</i>	Yes/no	23/11	13/18	0.0373
<i>GDNF</i>	Yes/no	25/9	20/11	0.4316
<i>DCC</i>	Yes/no	19/15	13/18	0.2613
<i>TIMP3</i>	Yes/no	2/32	0/31	0.1702
<i>RARB</i>	Yes/no	10/24	14/17	0.1888
<i>Rec8p</i>	Yes/no	34/0	31/0	N/A

Figure 4: DNA methylation profiles by the d-ROM levels in node-negative non-small cell lung cancer

Symbol	Methylation status	d-ROM High N = 23	d-ROM Low N = 27	p Value
<i>MDFI</i>	Yes/no	0/23	0/27	N/A
<i>KLK10</i>	Yes/no	8/15	12/15	0.4870
<i>HOXD11</i>	Yes/no	15/8	12/15	0.1419
<i>SIM-1</i>	Yes/no	4/19	13/14	0.0221
<i>miRNA-137</i>	Yes/no	19/4	21/6	0.6704
<i>HS3ST2</i>	Yes/no	20/3	23/4	0.8572
<i>PCDH10</i>	Yes/no	16/7	12/15	0.0745
<i>GDNF</i>	Yes/no	15/8	17/10	0.8685
<i>DCC</i>	Yes/no	14/9	9/18	0.0515
<i>TIMP3</i>	Yes/no	0/23	0/27	N/A
<i>RARB</i>	Yes/no	8/15	12/15	0.4870
<i>Rec8p</i>	Yes/no	23/0	27/0	N/A

Figure 5: DNA methylation profiles by the d-ROM levels in node-negative lung adenocarcinoma

(4) 解剖検体を用いた解析

これまでの研究を通して、肺がん組織と口腔粘膜もしくは血液が同じような遺伝子異常という影響を受けているのかという疑問が生じた。この Heterogeneity について評価することの重要性を感じ、解剖検体を用いて原発病巣と転移病巣における異質性につて遺伝子メチル化異常のプロファイル解析した。無治療の剖検例から採取されたサンプルを用いて 9 遺伝子のメチル化異常プロファイルについて原発巣と転移巣 (9 か所) の評価を行ったところ、Heterogeneity が確認された (Figure 6)。この 1 例報告を 2019 Asia Pacific Society of Respirology で発表し、その後に組織型などを踏まえた 5 例についての *p16* のメチル化異常に限った解析ではあるが、2019 年日本肺癌学会総会で発表した。

		<i>p16</i>	<i>MDFI</i>	<i>CDH1</i>	<i>TERC</i>	<i>PCDH10</i>	<i>HOXD11</i>	<i>MLH1</i>	<i>RARB</i>	<i>TIMP3</i>
①	Rt. upper lobe of lung (primary lesion)	+	+	+	-	+	+	-	+	-
②	Rt. parietal pleura	+	+	+	-	+	-	-	+	-
③	Lt. lobe of liver	-	+	+	-	+	+	-	+	-
④	Rt. lobe of liver	-	+	+	-	+	+	-	+	-
⑤	Rt. lobe of liver	-	+	-	-	+	-	-	-	-
⑥	Lt. lower lobe of lung	+	+	+	-	+	+	-	-	-
⑦	Lt. upper lobe of lung	-	+	+	-	+	-	-	+	-
⑧	Lt. visceral pleura of lung	-	+	-	-	+	+	-	-	-
⑨	Rt. upper lobe of lung	-	+	+	-	+	+	-	-	-
⑩	Rt. lower lobe of lung	-	+	+	-	+	+	-	+	-

Figure 6: DNA methylation profiles of 9 genes in the primary and metastatic lesions

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroaki Harada, et al	4. 巻 27(2)
2. 論文標題 Lung cancer risk stratification using methylation profile in the oral epithelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asian Cardiovascular & Thoracic Annals	6. 最初と最後の頁 87-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0218492318813443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 原田洋明 他
2. 発表標題 肺癌無治療例における剖検検体を用いた病巣別p16エピジェネティクス異常プロファイルの検討
3. 学会等名 第60回 日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Harada, et al.
2. 発表標題 Assessment of inter-tumor heterogeneity among primary and metastatic lesions in a patient with untreated lung cancer by DNA methylation profiling: an autopsy case
3. 学会等名 24th Asia Pacific Society of Respirology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田洋明、他
2. 発表標題 口腔粘膜遺伝子エピジェネティクス異常解析による肺癌発生リスク層別化の試み
3. 学会等名 第36回 日本呼吸器外科学会 学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Narumi Yashiki, Hiroaki Harada, et al
2. 発表標題 Clinical relevance between preoperative serum oxidative stress level and aberrant DNA methylation of peripheral whole blood in patients with curatively resected Stage I lung adenocarcinoma; A pilot analysis.
3. 学会等名 23rd Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Harada, et al.
2. 発表標題 Clinical implication of DNA methylation analysis in the oral epithelium for lung cancer risk stratification
3. 学会等名 23rd Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Harada, et al.
2. 発表標題 Preoperative serum oxidative stress levels are associated with aberrant PCDH10 methylation in serum and poor clinical outcomes in curatively resected node-negative non-small cell lung cancer
3. 学会等名 Asia Pacific Society of Respiriology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroaki Harada, et al.
2. 発表標題 Combined Analysis of Epigenetic Inactivation of MDF1, DLX4, and PCDH10 in Stage I Non-Small Cell Lung Cancer for the Assessment of Prognostic Impact
3. 学会等名 World Congress of Surgery (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原田洋明 他
2. 発表標題 口腔粘膜遺伝子エピジェネティクス異常を用いた肺癌発生リスク評価の試み
3. 学会等名 日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	村上 功 (Murakami Isao)		
連携研究者	岡田 守人 (Okada Moihito) (70446045)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授 (15401)	
連携研究者	松田 守弘 (Matsuda Morihiro) (00362591)	独立行政法人国立病院機構（呉医療センター臨床研究部）・ その他部局等・その他（移行） (85402)	
連携研究者	鬼武 美幸 (Onitake Yoshiyuki) (10448269)	独立行政法人国立病院機構（呉医療センター臨床研究部）・ その他部局等・その他（移行） (85402)	
連携研究者	三村 剛史 (Mimura Takeshi) (50467776)	独立行政法人国立病院機構（呉医療センター臨床研究部）・ その他部局等・その他（移行） (85402)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	山下 芳典 (Yamashita Yoshinori) (50210430)	独立行政法人国立病院機構（呉医療センター臨床研究部）・ その他部局等・その他（移行） (85402)	