

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：3 2 6 1 2

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：2 0 K 1 5 7 7 1

研究課題名（和文）肺多形癌のゲノム・エピゲノム解析による新規治療開発を目指した研究

研究課題名（英文）Genomic and epigenomic analysis of lung pleomorphic carcinoma for the development of new treatments

研究代表者

中込 貴博（NAKAGOMI, Takahiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：4 0 8 6 8 3 0 3

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：肺多形癌手術検体を顕微鏡的に正常肺組織、上皮成分、肉腫様成分に区分けし、網羅的なDNAメチル化解析を行い、肺多形癌の発癌・形態分化にDNAメチル化による遺伝子発現の変化が関与していることが示唆された。また、肺多形癌の発癌に関与するDNAメチル化部位が有意に影響する細胞内シグナル伝達経路を同定。また、発癌に関与するDNAメチル化が起きている遺伝子領域のうち、肉腫様成分の分化に関与し、リンパ節転移・リンパ管侵襲と相関関係にある5遺伝子、再発・生存と相関関係にある3遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には肉腫様組織への形態変化という悪性進展を示唆する病理学的腫瘍内不均一性にDNAメチル化の関与を科学的に示したことにより、高悪性度腫瘍に対するエピゲノム異常を標的とした新規治療開発への基礎的知見を示したと言える。

社会的意義としても昨今保険診療にがんゲノムプロファイリングが使用可能となり、今後の個別化がん医療の推進が進めばゲノム異常だけでなくこのようなエピゲノム異常も治療に直結する臨床情報になり得る可能性を提起したと言えるだろう。

研究成果の概要（英文）：Surgical specimens of lung pleomorphic carcinoma were microscopically divided into normal lung tissue, epithelial-like component, and sarcoma-like component, and subjected to comprehensive DNA methylation analysis. Comparative analysis of DNA methylation rates in each region suggested that changes in gene expression due to DNA methylation are involved in carcinogenesis and morphological differentiation of lung pleomorphic carcinoma. We identified several intracellular signaling pathways significantly affected by DNA methylation sites involved in carcinogenesis, including the FGF signaling pathway, the TGF-beta family, and WNT/Beta-catenin signaling. In addition, we identified five genes (THSD1, ZFYVE21, CDT1, LYPD1, BGLAP) correlated with lymph node metastasis and lymphatic invasion, and three genes (LOC101927151, NRN1L, PLCXD3) correlated with recurrence and survival from the DNA methylation regions involved in carcinogenesis and differentiation to sarcoma-like components.

研究分野：医学（ゲノム生物学関連）、肺がんゲノム・エピゲノム異常

キーワード：肺多形癌 肉腫様癌 エピゲノム DNAメチル化異常 腫瘍内不均一性

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 肺多形癌は腫瘍内に肉腫様成分を有する組織型で予後は悪い。その形態の変化は腫瘍の悪性進展を示唆する。
- (2) 肉腫様の形態変化において特定のゲノム異常の関与は発見されていないため、エピゲノム異常が関与する可能性が考えられるが、エピゲノムの関与を立証した報告はない。

## 2. 研究の目的

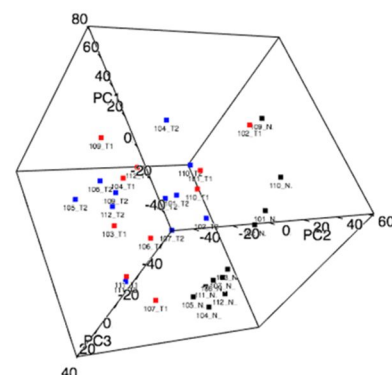
腫瘍内の肉腫様の形態変化に関与するゲノム・エピゲノム異常を解析し、肺多形癌の悪性進展の分子機構を理解すること。

## 3. 研究の方法

2014.4~2020.3 当院で手術を行い、肉腫様成分を有する肺癌と病理学的に診断された症例 11 例を対象とした。手術検体の FFPE 標本から組織ダイセクション法を用いて、正常肺組織、上皮様成分、肉腫様成分を正確に分取、QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用い DNA 抽出を行った。抽出 DNA は EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Irvine, CA)を用いてバイサルファイト処理を行った後に Infinium Methylation EPIC BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) array を用いて 862927 CpG サイトのメチル化状態を解析した。症例間の解析のための条件検討を行い、最終的に 775033 CpG サイトを解析対象とした。合計 11 症例、32 サンプルにおける 775033 か所のメチル化率 ( 値 ) について統計ソフト R を用いて臨床的因子との相関を検討した。また、MetaCore pathway analysis (<http://www.genego.com>, by GeneGo)を用いて、発癌・形態分化に関与する分子経路解析を行った。

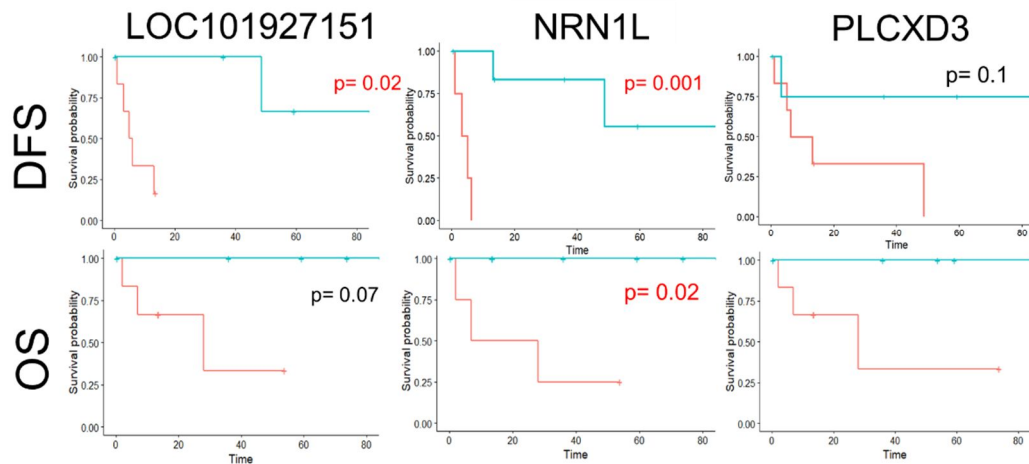
## 4. 研究成果

- (1) メチル化の発癌への関与の立証：がん組織 (T) 合計 21 検体 ( T1:Epithelial 成分 10 検体, T2:Sarcomatoid 成分 11 検体 ) と正常肺組織 N:11 検体に対して、足切り後全 775033 プローブを用いた主成分分析を行った。主成分 1/主成分 2/主成分 3 の 3 次元的検討において、N は 1 か所にクラスターを形成するが、T は分散して分布しており、その現象から、正常肺組織から Sarcomatoid component を含む carcinoma の発生に DNA のメチル化が関与していることが示唆された ( 図 1 ) 。



( 図 1 ) 3 次元的主成分分析

- (2) 発がんに関与するメチル化箇所の絞り込み：正常肺組織 (N) と Sarcomatoid 成分 (T2) との間のメチル化率を Welch の T 検定 ( $FDR < 0.05$ ,  $|\Delta\beta| \geq 0.1$ ) を用いて、発がんに関与している可能性がある 2734 遺伝子を同定した。
- (3) 肉腫様形態変化に関与するメチル化箇所の絞り込み：(2) で同定した 2734 遺伝子のうち、T1 vs T2 の直接比較 (Welch の T 検定,  $p < 0.05$ ) で有意差があり、転写制御に重要な TSS 近傍の CpG アイランド・ショア・シェルフに一致している 146 遺伝子を同定した。
- (4) (2) で同定された 2734 遺伝子を対象に関与する細胞内分子経路解析を MetaCore pathway analysis (<http://www.genego.com>, by GeneGo)を用いて行った。関与する上位経路の中に肺多形癌の発癌分子メカニズムとして説明可能な経路として FGF signaling pathway, TGF-beta family, WNT/Beta-catenin signaling が含まれていることを確認した。
- (5) 臨床予後因子と相関する遺伝子の同定：(3) で同定した 146 遺伝子におけるメチル化と臨床予後因子との相関を統計解析 (Welch の T 検定, ピアソンの積率相関係数分析)を行った。そのうち、リンパ節転移・リンパ管侵襲と相関関係にある遺伝子として 5 遺伝子 (THSD1, ZFYVE21, CDT1, LYPD1, BGLAP) を、再発・生存と相関関係にある遺伝子として 3 遺伝子 (LOC101927151, NRN1L, PLCXD3) を同定した。各々の遺伝子におけるメチル化率を、全症例における平均 値をカットオフに高メチル化群、低メチル化群に分けて生存分析を行った結果を示す ( 図 2 ) 。



( 図 2 ) 再発・生存と相関する 3 遺伝子のメチル化率による予後比較

- ( 6 ) 補足事項：当初の研究立案時点では同検体を用いたゲノム解析を計画し，エピゲノム異常との相関関係を検討する予定であったが，研究期間中のコロナ感染蔓延による研究室の設備投資の遅延，および解析費用の不足といった要因により断念した。
- ( 7 ) 考察：当研究の結果は肺多形癌の腫瘍内不均一性に DNA メチル化異常が深く関与していることを示唆する結果である。これまで肺多形癌をはじめとする病理学的腫瘍内不均一性が臨床的悪性転化を示唆する場合もゲノム異常においては明確な差異が説明不能であったが，このような現象の病態理解を進めていく上ではエピゲノム異常を当研究のようなアプローチで検証し，ゲノム異常と合わせて考察しなければならない。当研究の価値は肺多形癌の腫瘍発生，肉腫様形態変化に DNA メチル化異常の関与を示した点にあるが，Limitation として症例数の少なさ，ゲノム異常との相関の検討がされていない点にあり，より深い考察を加えていくには追加検討により情報の集積が望まれる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|---------------------------------|---|----|
| 研究協力者 | 菱田 智之<br><br>(Hishida Tomoyuki) | 慶応義塾大学・医学部 外科学（呼吸器）・准教授<br><br>(32612)  |    |
| 研究協力者 | 金井 弥栄<br><br>(Kanai Yae)        | 慶応義塾大学・医学部 病理学（病因病理学）・教授<br><br>(32612) |    |

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|