

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：87502
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2021～2023
課題番号：21K08896
研究課題名(和文) ドライバー遺伝子変異肺癌における免疫微小環境の経時的变化を利用した治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategies utilizing changes in the immune microenvironment in driver mutation positive lung cancer.

研究代表者
岡本 龍郎 (Tatsuro, Okamoto)

独立行政法人国立病院機構別府医療センター(臨床研究部)・臨床研究部・臨床研究部長

研究者番号：80568626
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異肺癌において、高分解能CT画像および病理学的情報を参考にした非浸潤癌・浸潤癌の選別と行い、NGS解析による遺伝子発現・遺伝子変化の網羅的解析を行うことで、腫瘍微小環境の高悪性化に関与する分子変化を探索した。トランスクリプトーム解析において、両群間で統計学的有意にmRNA発現の差があった53遺伝子を検出した。Collagen XI alpha 1遺伝子が進行期群において最も発現が上昇していた。エクソーム解析において、総variant数、indelおよびSNV変異数は進行期群で多い傾向にあった。両群間における総variant数の差は変異全体の3.2%に相当した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
今回の研究において、EGFR変異肺癌の高悪性化には、癌関連遺伝子のダイナミックな発現変化および共存遺伝子変異の増加が関与していることが明らかとなった。Collagen XI alpha 1 (COL11A1) 発現亢進がEGFR変異肺癌における腫瘍微小環境の高悪性化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In lung cancer with EGFR gene mutations, noninvasive and invasive cancers were selected based on high-resolution CT images and pathological information, and clinically significant molecular abnormalities were explored by comprehensive analysis of gene expression and gene changes using NGS analysis. 1) In transcriptome analysis, there were 53 genes whose mRNA expression differed significantly between the two groups. 2) The total number of variants in the exome analysis tended to be higher in the advanced stage group than in the early stage group. The difference in the total number of variants between the two groups was 3.2% of all mutations. The number of indel and SNV mutations also tended to be higher in the advanced stage group.

研究分野：General Thoracic Surgery

キーワード：lung cancer EGFR mutation malignant phenotype

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

EGFR/ALK 遺伝子変異などドライバー遺伝子変異に増殖を依存する肺癌においては、免疫チェックポイント (ICI) 治療の効果が乏しい。その主な理由に、免疫逃避に有利な腫瘍内微小環境 (tumor microenvironment: TME) を持つことが示されている。その反面、分子標的治療への耐性獲得後には ICI 治療への感受性が高まる可能性も示されている。また一方で、KRAS 遺伝子変異肺癌においては、ICI 治療の有効性が示されている。現在のところ、これらの機序の詳細は十分に明らかになっていない。本研究では、ドライバー遺伝子変異の代表格である EGFR 遺伝子変異に注目した。ごく早期の EGFR 変異肺癌は、他の肺癌に比較して再発が少ない一方で、浸潤・転移を示す II/III 期になると、他の肺癌に比べて再発が多く予後不良となる。すなわち、EGFR 変異肺癌は発癌初期では低悪性 (非浸潤性) であるが、癌の進化的発育過程において劇的に高悪性 (浸潤・転移性) へ転化することが示唆される。したがって、この高悪性化に關与する TME 変化を引き起こす分子を同定することにより、新たな治療開発に繋げることができる可能性がある。

2. 研究の目的

今回の研究では、高分解能 CT 画像および病理学的情報を参考にした非浸潤癌・浸潤癌の選別と行い、NGS 解析による遺伝子発現・遺伝子変化の網羅的解析を行うことで、TME の高悪性化に關与する分子変化を探索する。

3. 研究の方法

1) 症例選択

2007~22 年に肺切除が行われ腫瘍の凍結組織が保存された、*GFR* exon 19 欠失変異を有する肺癌症例のうち、高分解能 CT 画像および臨床病理所見から、早期群、進行期群をそれぞれ下記のごとく選択した。

a) 早期群 (cT1mi~T1a, C/T 比 0.6 かつ pTis~T1bN0 : 早期群) : 12 例

b) 浸潤群 (C/T 比>0.6 かつ pN1/2 陽性 : 進行期群) : 28 例

2) トランスクリプトーム解析

切除肺癌組織から切り出して凍結保存しておいた標本から RNA を抽出し、品質検定後にシーケンスライブラリー作成 (SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA) を行い、NovaSeq6000 によるシーケンス解析を行った。シーケンス解析で得られたリード配列をリファレンスゲノム配列にマッピングし、遺伝子単位および転写産物単位の発現量を算出した。Ensemble データベース (<https://www.ensembl.org/biomart/martview>) を用いてアノテーションを行い、発現解析を行った。

3) エキソーム解析

標本から、DNA を抽出し、品質検定後に Twist Comprehensive Exome Panel を用いたライブラリー作成を行い、NovaSeq6000 によるシーケンス解析を行った。得られた検体のリード配列をゲノム配列にマッピング後、変異塩基候補を検出し SnpEff、SIFT、dbNSFP を用いてアノテーションを行った。

4) 発現量変動遺伝子の抽出

100 万マッピングフラグメントあたりのフラグメント数 (Transcripts per million : TPM) を用

いて、正規化処理およびフィルタリングを行い、倍率変化を算出した。早期群と進行期群の mRNA 発現量比較 (t 検定) を行い、発現が有意に変動した遺伝子を抽出し、高悪性化に關与する候補遺伝子を探索した。

5) Gene Ontology 解析

両群間で統計学的有意に mRNA 発現の差があった遺伝子を DAVID (<https://David.ncifcrf.gov/>) 上の Web ツールにて解析を行った。

6) 変異遺伝子解析

エクソーム解析にてコールされた総 varian 数および missense、indel と判定された変異数を各群で比較した。さらに、TP53 遺伝子変異と各群の遺伝子変異の関係を検討した。

4. 研究成果

1) 患者臨床背景

年齢は早期群 / 進行期群がそれぞれ平均値 72.4 / 65.3 歳であり、進行期群が高齢の傾向があった。進行期群に喫煙歴のある患者が多かった (表 1)。

表1. 全症例の臨床背景 (n=40)

因子	分類	早期癌(n=12)	浸潤癌(n=28)	P value
年齢	平均値 (範囲)	72.4 (SE 2.97)	65.3 (SE 2.00)	0.058
性別	男 女	4 8	15 13	0.24
喫煙歴	Never Current/Ex	10 2	14 14	0.049
cT	T1mi	8	0	<0.01
	T1a	4	1	
	T1b	0	9	
	T1c	0	3	
	T2	0	13	
pT	T3	0	2	<0.01
	T1is	2	0	
	T1mi	2	0	
	T1a	4	0	
	T1b	3	4	
pN	T1c	1	5	<0.01
	T2	0	14	
	T3	0	5	
	N0	12	0	
	N1	0	15	
	N2	0	11	

2) mRNA 発現差のあった遺伝子

最終的に RNA-Seq 解析が行われたのは早期群 12 例、進行期群 26 例であった。53 の遺伝子において、統計学的有意に両群間の mRNA 発現差が認められた (図 1 上段)。31 遺伝子において進行期群での発現量が低く、一方 22 遺伝子で進行期群での発現量が高かった。Collagen XI alpha 1 遺伝子 (*COL11A1*) が進行期群において最も発現が上昇していた (9.4 倍, $p < 0.0001$)

3) 変動遺伝子の Ontology 解析

46 遺伝子が抽出され、細胞代謝 / 組織発達 / 遺伝子発現制御 / 細胞周期 / 細胞外マトリックスに関連した遺伝子群に、それぞれ 43% / 35% / 35% / 13% / 11% が分類された (図 1 下段)。

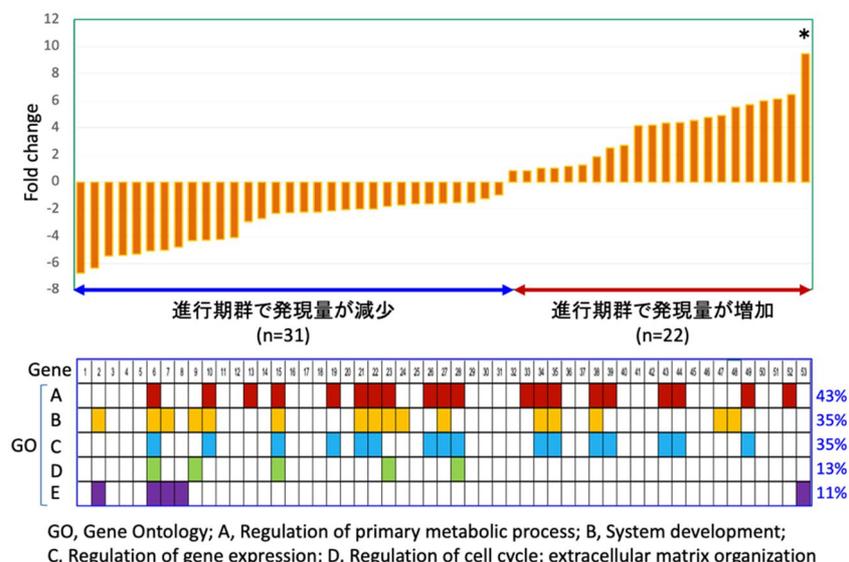


図1 . 両群間でmRNA発現量に有意な差があった遺伝子の発現差

4) EGFR exon 19 del 変異を有する進行期肺癌切除例における COL11A1 発現の意義

上記の解析に用いた進行期群 26 例において、COL11A1 mRNA の発現量 < 1 TPM (Transcripts Per Million) を COL11A1 mRNA 低値群、 1 TPM を COL11A1 mRNA 高値群として、COL11A1 発現差と術後無再発生存期間との関係を検討した。2 群間の臨床背景に有意さはなかった(表 2)。COL11A1 発現高値群 (n=16) の無再発生存中央値は 26.8 ヶ月であったのに対して、<1 TPM 群 (n=10) は未到達であり、COL11A1 高発現群が術後再発において予後不良の傾向があった(HR 1.83, p=0.31)。

5) エクソーム解析の結果

コールされた全 variant のうち、silent/missense/nonsense/indel/splicing 変異の割合はそれぞれ 6.3%/5.9%/0.1%/11.3%/1.0%であった。総 variant 数は進行期群で早期群に比べ多い傾向にあった(194,655 vs. 188,660, p=0.069)。両群間における総 variant 数の差は変異全体の 3.2%に相当した。indel および SNV 変異数もそれぞれ進行期群で多い傾向にあった(p=0.078, p=0.068)。

両群間で p53 変異陽性の割合に差は無かった(33% vs. 40% p=0.82)。また p53 変異の有無で variant 数に差を認めなかった(p=0.20)

表2. 変異形式の比較

種類	早期癌 (n=12)		浸潤癌 (n=28)		P value
	N (mean)	%	N (mean)	%	
Silent	12053	6.4	12098	6.2	0.23
Missense	11272	6.0	11348	5.8	0.067
Nonsense	100.6	0.1	100.9	0.1	0.91
Indel	21239	11.3	22138	11.4	0.078
Splicing	1876	1.0	1889	1.0	0.198
Others	142118	75.3	147078	75.6	0.074
Total variant	188660	-	194655	-	0.069

Total variantの变化割合 = $5995 / 188660 \times 100 = 3.2\%$

今回の研究において、EGFR 変異肺癌の高悪性化には、癌関連遺伝子のダイナミックな発現変化および共存遺伝子変異の増加が関与していることが明らかとなった。Collagen XI alpha 1 (COL11A1) は fibrillar collagen (繊維製コラーゲン) の一つであり、卵巣癌、乳癌、甲状腺癌、膵癌、非小細胞肺癌、膀胱癌などの癌で発現亢進していることが報告されている。Collagen XI alpha 1 (COL11A1) 発現亢進が EGFR 変異肺癌における TME の高悪性化に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takamori S, Seto T, Yamaguchi M, Kinoshita F, Fujishita T, Ito K, Toyozawa R, Shoji F, Okamoto T	4. 巻 12
2. 論文標題 Case report: Success of tepotinib therapy in overcoming resistance to osimertinib in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma with a potential acquired MET exon 14 skipping mutation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Oncol	6. 最初と最後の頁 965741
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2022.965741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto T, Takenaka T, Yamazaki K, Hamatake M, Miura N, Takenoyama M, Kometani T, Ueda U, Kouso H, Yano T.	4. 巻 43
2. 論文標題 Prognostic Impact of Central Nervous System Recurrence After Surgery in Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-positive Non-small-cell Lung Cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 3543-3551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.16532	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 -
1. 著者名 Takenaka T, Yano T, Yamazaki K, Okamoto T, Hamatake M, Takamori S, Kohno M, Miura N, Shimokawa M, Yoshizumi T	4. 巻 14
2. 論文標題 Is radical local therapy effective in postoperative recurrent EGFR-mutated non-small cell lung cancer?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Thorac Cancer	6. 最初と最後の頁 1660-1667
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1759-7714.14911	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 -
1. 著者名 Okamoto T, Miyawaki M, Toyokawa G, Karashima T, Abe M, Takumi Y, Hashimoto T, Osoegawa A, Tagawa T, Takeuchi H, Shimokawa M, Sugio K	4. 巻 34
2. 論文標題 Clinical significance of part-solid lung cancer in the eighth edition TNM staging system.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Interact Cardiovasc Thorac Surg	6. 最初と最後の頁 219-226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/icvts/ivab255	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本龍郎、山口正史、田口健一、武田洋子、福山誠一、矢野篤次郎
2. 発表標題 EGFR変異肺腺癌の高悪性化に関する遺伝子の探索
3. 学会等名 第124回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岡本龍郎、山口正史、田口健一、武田洋子、福山誠一、矢野篤次郎
2. 発表標題 EGFR変異肺腺癌の悪性化に伴う癌ゲノムの変化と共存遺伝子変異
3. 学会等名 第41回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2024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
研究分担者	高森 信吉 (Takamori Shinkichi) (20839542)	独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他部局等・呼吸器腫瘍科医師 (87102)	
研究分担者	田口 健一 (Taguchi Kenichi) (40325527)	独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他部局等・病理診断科部長、臨床検査科部長、腫瘍病理学研究室長 (87102)	

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
---------	---------