

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462185

研究課題名(和文) CAGE法によるRNA解析を用いた肺原発扁平上皮癌に特異的なマーカーの開発

研究課題名(英文) Novel biomarkers that assist in accurate discrimination of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung

研究代表者

高持 一矢 (Takamochi, Kazuya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30397369

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)：Cap Analysis of Gene Expression(CAGE)法を用いて、肺扁平上皮癌(SCC)22例と肺腺癌(AD)75例の間で発現の異なる遺伝子についてゲノムワイドに探索した。同定された遺伝子については、免疫染色による蛋白レベルの発現の差について検証しValidationを行った。既存の鑑別マーカー(SCC: CK5, CK6, p40, Desmoglein-3, AD: TTF-1, NapsinA)は、CAGE法でも発現レベルに有意差が確認された。これらより的確に2群を分類できる新規マーカーとして、SPATS2(SCC)、ST6GALNAC1(AD)を同定した。

研究成果の概要(英文)：Precisely diagnosing squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma (AD) is important to select the most effective treatment regimen for lung cancer, but this has been challenging in cases with poorly differentiated SCC (PDSCC) and AD without a lepidic growth component (non-lepidic AD). We approached this problem with a genome-wide technology to monitor promoter activities, Cap Analysis Gene Expression (CAGE). Based on the genome-wide profiles of 97 frozen tissues from surgically resected lung cancers, we identified two novel markers, SPATS2 for SCC and ST6GALNAC1 for AD. The expression of known molecular markers used in immunohistochemical analysis (IHC) for SCC (CK5, CK6, p40 and desmoglein-3) and AD (TTF-1 and napsin A) were different between SCC and AD. We confirmed their performance with an IHC and also confirmed the findings in another group of 74 patients.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 腺癌 扁平上皮癌 鑑別マーカー SPATS2 ST6GALNAC1

1. 研究開始当初の背景

原発性肺癌における扁平上皮癌(SCC)、腺癌(AD)の鑑別マーカーの探索

進行肺癌に対しては、プラチナ製剤(シスプラチンもしくはカルボプラチン)と新規抗癌剤の2剤併用(platinum doublet)が標準治療である。新規抗癌剤のひとつであるペメトレキセドは、SCCと非扁平上皮癌(non-SCC)で治療効果が大きく異なること(non-SCCに有効)が、複数の臨床試験のサブセット解析によって明らかになった。また血管新生阻害剤であるアバスチンは、platinum doubletに加えることで生存期間の延長が示されているが、喀血などの副作用の観点から non-SCCに限って用いられている。

これらの有用な二つの薬剤の使用にあたっては、SCC、non-SCCの鑑別を正確に行うことが重要である。しかし、進行癌では微小な生検検体から組織診断を行わなければならないため、これらを鑑別することは、とくに低分化な肺癌では非常に困難な場合が多い。

(1) 原発性肺 SCC と食道癌・頭頸部癌肺転移との鑑別マーカーの探索

原発性肺 SCC、食道癌および頭頸部癌はいずれも重喫煙者に発生し、しばしば同一の患者に同時性、異時性に認められる。原則として原発性肺 SCC に対しては、肺葉切除+リンパ節郭清が行われ、全身病である食道癌・頭頸部癌肺転移に対しては部分切除などの縮小手術が行われ、肺原発か肺転移かで手術術式が全く異なる。肺葉切除と縮小手術では残存呼吸機能に大きな差があるため、肺気腫や間質性肺炎などの合併頻度の高い重喫煙者の患者においては、治療効果のみならず、QOLの点からも正確な鑑別診断が重要になる。

しかし、組織学的には角化の程度以外に肺原発か肺転移かを明確に鑑別する方法はないため、臨床経過などから総合的に判断しているのが現状で正確な鑑別診断法はない。

2. 研究の目的

原発性肺 SCC と non-SCC の大部分を占める肺腺癌(AD)の鑑別マーカー、および原発性肺 SCC と食道癌・頭頸部癌肺転移との鑑別マーカーを見出すのが本研究の目的である。原発性肺癌、食道癌および頭頸部癌肺転移の手術による切除検体を用いて、Cap Analysis of Gene Expression(CAGE)法という理化学研究所で開発されたオリジナルの新技术で原発性肺 SCC に特異的に発現が高い遺伝子群を選別する。

3. 研究の方法

(1) CAGE 法による新規鑑別マーカーのスクリーニング

CAGE法はキャップ構造を持つRNAの5'端塩基配列を次世代シーケンサによって網羅的に読み取ることができるため、遺伝子の転写開始点をゲノムワイドに同定しその活性を定量できる。これを当科で切除した原発性肺癌97例(SCC 22例、AD 75例)の腫瘍凍結切片より抽出したRNAに適用し、両群間で発現の異なる遺伝子(新規鑑別マーカー)を探索した。

(2) 免疫染色(IHC)による新規鑑別マーカー候補の Validation

CAGE法で同定された新規鑑別マーカーと既存の鑑別マーカー(SCC: CK5, CK6, p40, Desmoglein-3, AD: TTF-1, napsin A)について、別コホートの肺癌74例(SCC 29例、AD 45例)を対象にIHCを施行し、CAGE法で得られた結果について Validation を行った。

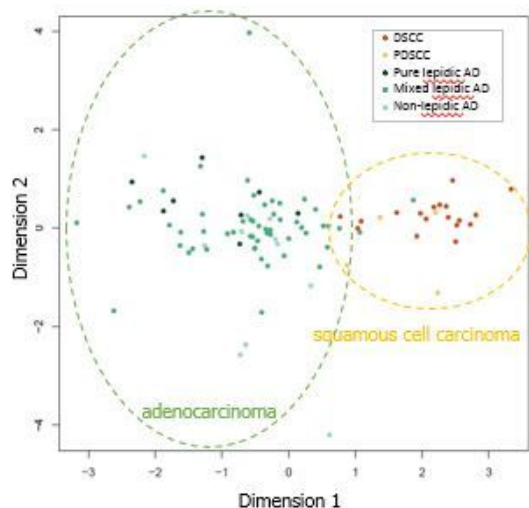
4. 研究成果

(1) SCC と AD では転写開始点の発現が認められる遺伝子群のプロファイルに差が認められた (Fig.1A)。SCC と AD の中でも、形態学的(組織学的)に鑑別が困難な場合の多い低分化 SCC(PDSCC)と癌細胞が肺胞上皮置換性に増殖する成分(lepidic growth component)

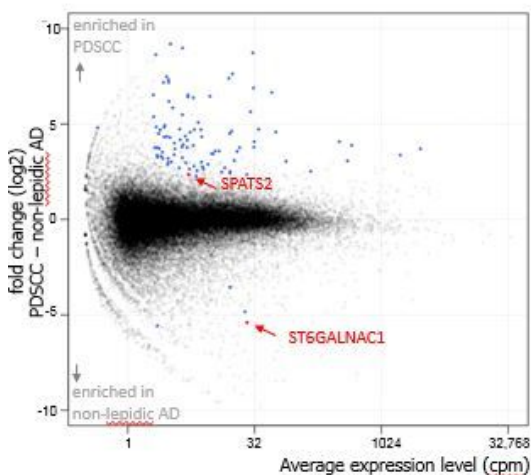
を伴わない AD (non-lepidic AD)の間で転写開始点の発現レベルに有意差の認められる遺伝子群の中から、鑑別マーカーの候補として、SPATS2(PDSCC に高発現)とST6GALNAC1(non-lepidic AD に高発現)を見出した (Fig.1B)。

Fig. 1

(A) An MDS plot



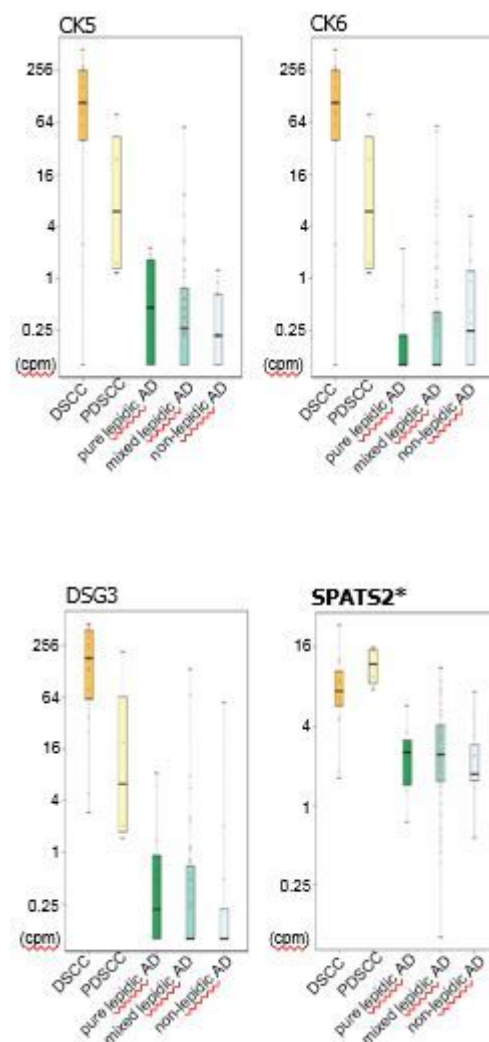
(B) An MA-plot of the differential analysis



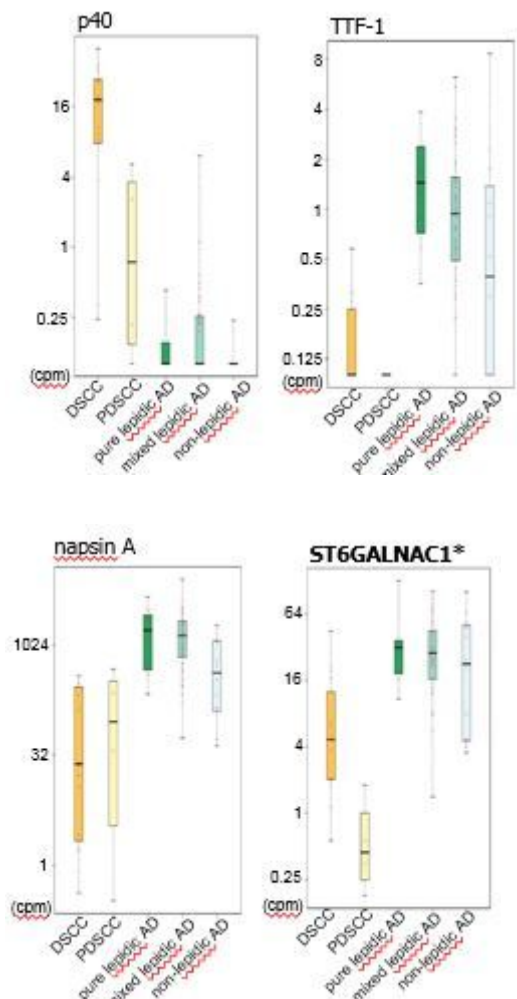
(2) SCC を分化度によって分化型 SCC (DSCC) と PDSCC, AD を lepidic component の割合によって pure lepidic AD, mixed lepidic AD, non-lepidic AD に分けて、CAGE 法で同定された新規鑑別マーカー (SCC: SPATS2, AD: ST6GALNAC1) と既存の鑑別マーカー (SCC: CK5,

CK6, p40, Desmoglein-3, AD: TTF-1, napsin A) の発現レベルを比較した (Fig.2)。SPATS2 は既存の SCC マーカーより、PDSCC において発現レベルが高かった。ST6GALNAC1 は PDSCC ではほとんど発現が認められなかった。TTF-1 も PDSCC では発現が認められないが、non-lepidic AD において発現が認められない場合があった。Napsin A は PDSCC において発現の認められる場合があった。したがって SPATS2 も ST6GALNAC1 も既存のマーカーと異なる発現パターンを示すため、既存のマーカーを補填するマーカーとしての可能性が示された。

Fig. 2

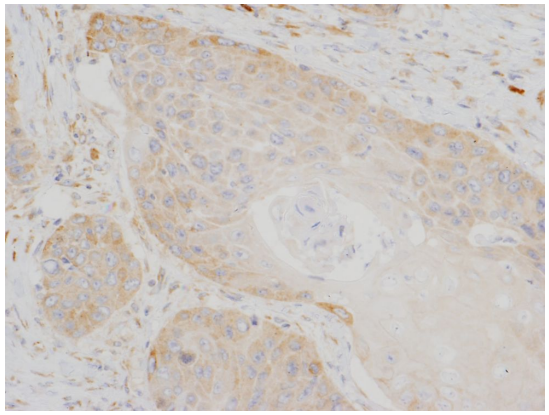


CK5, CK6, p40, Desmoglein-3, AD: TTF-1, napsin A) の発現レベルを比較した (Fig.2)。



(3) IHC による Validation においても、既存のマーカーと同様に、SPAS2 は SCC (Fig.3A)、ST6GALNAC1 は AD (Fig.3B) において陽性所見を示した (Fig.4)。とくに Fig.4 の矢印で示した症例は、SPAS2 のみで強陽性を示した。

Fig.3
(A) SPAS2 positive for SCC



(B) ST6GALNAC1 positive for AD

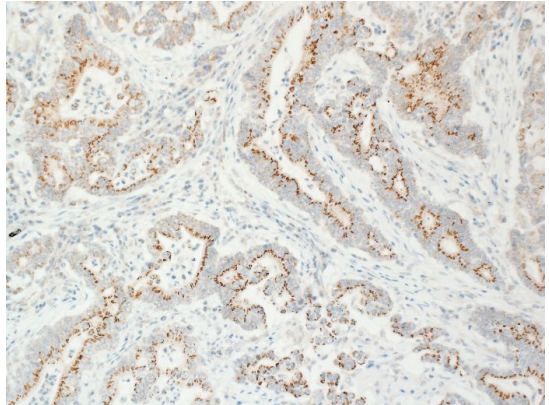
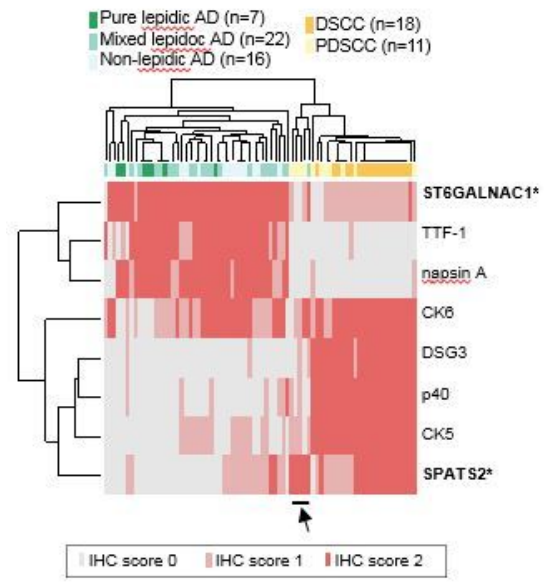


Fig. 4



(4) 新規鑑別マーカー (SCC: SPAS2, AD: ST6GALNAC1) と既存の鑑別マーカー (SCC: CK5, CK6, p40, Desmoglein-3, AD: TTF-1, napsin A) の SCC と AD の IHC の結果を Table 1 に示す。それぞれのマーカーの sensitivity, specificity, accuracy は、SPAS2: 69%, 93%, 84%, CK5: 86%, 100%, 95%, CK6: 79%, 56%, 65%, p40: 86%, 98%, 93%, Desmoglein-3: 83%, 100%, 93%, ST6GALNAC1: 96%, 97%, 96%, TTF-1: 73%, 100%, 84%, napsin A: 78%, 100%, 87% であった。

Table 1

	(Marker status) (subtype)	(+)		(-)	
		AD	SCC	AD	SCC
AD markers	ST6GALNAC1*	43	1	2	28
	TTF-1	33	0	12	29
	napsin A	35	0	10	29
SCC markers	SPATS2*	20	3	9	42
	CK5	25	0	4	45
	DSG3	24	0	5	45
	p40	25	1	4	44
	CK6	23	20	6	25

(5) 新規マーカー、既存マーカーの中で、最も accuracy が高い SCC マーカー 1 つ、AD マーカー 1 つの組み合わせは、CK5 と ST6GALNAC1 で、Accuracy は 91%であった。この組み合わせを用いた場合でも、7 4 例中 7 例 (9.5%) は鑑別不能な症例が残ったが、TTF-1 もしくは SPATS2 を 3 つ目の鑑別マーカーとして用いることで全例の鑑別が可能になった。

(6) まとめ

SCC と AD の新規鑑別マーカーとして、SPATS2 と ST&GALNAC1 を同定した。形態学的に鑑別がしばしば困難な PDSCC や non-lepidic AD の鑑別にも有用で、既存のマーカーと併用することで、すべての症例の鑑別が可能になる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2 件)

(1) Takamochi K, Omiya H, Yamanaka Y, Itoh M, Kawaji H, Oh S, Hayashizaki Y, Suzuki K: New Biomarkers for Differentiating between Primary Lung Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma Identified by Cap Analysis of Gene Expression (CAGE)

method

Presented at ESMO 2014 Congress- Madrid, Spain, September 26-30, 2014

(2) 高持一矢、大宮寛子、山中康成、伊藤昌可、川路英哉、林崎良英、鈴木健司: CAGE 法による肺原発扁平上皮癌と腺癌の新規鑑別マーカーの同定

第 55 回 日本肺癌学会総会、京都、2014 年 11 月 14 - 16 日

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 肺扁平上皮癌と肺腺癌の鑑別評価方法

発明者: 高持一矢、鈴木健司、齋藤剛、原貴恵子、三谷恵子、茂榎薫、林崎良英、伊藤昌可、川路英哉、大宮寛子、山中義成

権利者: 学校法人順天堂、国立研究開発法人理化学研究所

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/057176

出願年月日: 2015 年 3 月 11 日

国内外の別: 国際出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高持一矢 (TAKAMOCHI, Kazuya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 30397369

(2) 研究分担者

鈴木健司 (SUZUKI, Kenji)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 3262060120

向後泰司 (KOUGO, Yasushi)

独立行政法人理化学研究所・オミックス基盤研究領域・研究員

研究者番号: 8240199924

河合純 (KAWAI, Jun)

独立行政法人理化学研究所・オミックス基盤研究領域・研究員

研究者番号: 8240199924

王志明 (Oh, Shiaki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 3262060127