

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861246

研究課題名(和文) 胸腺悪性腫瘍における次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子変異解析

研究課題名(英文) Genetic profiling of thymic carcinoma using targeted next-generation sequencing

研究代表者

設楽 将之(Shitara, Masayuki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：60595643

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)：胸腺扁平上皮癌12例に対して、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスによって、癌関連409遺伝子の網羅的解析を行った。Ingenuity Variant Analysis、SHIFT、PolyPhen-2、PROVEANによってフィルタリングを行い、胸腺癌10例から24遺伝子、25変異が候補遺伝子変異として決定された。明らかな胸腺癌に共通する遺伝子変異は認めなかったが、個々の症例においてKIT、DDR2、PDGFRA、ROS1、IGF1Rなどのチロシンキナーゼ遺伝子に変異を認めた。

研究成果の概要(英文)：Thymic carcinoma is a rare mediastinal neoplasm and little is known about its tumorigenesis. There is no effective treatment except for complete resection, and the prognosis of advanced cases is poor. To identify the mutations associated with tumorigenesis, we analyzed genetic profile of thymic carcinoma using targeted Next-Generation Sequencing. We sequenced about 409 cancer related genes in 12 thymic squamous cell carcinoma tissues including 10 tumor / normal tissue pairs using Ion AmpliSeq Cancer Panel and Ion PGM Sequencer. We filtered the mutations with Ingenuity Variant Analysis, SIFT, PolyPhen-2, and PROVEAN. Twenty five candidate mutations in 24 genes were identified, including six tyrosine kinase genes (KIT, DDR2, PDGFRA, ROS1, IGF1R). There was no recurrent mutation among the samples studied. The mutation status of thymic squamous cell carcinoma is highly heterogeneous.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：胸腺癌 縦隔腫瘍 遺伝子変異 次世代シーケンス ターゲットシーケンス

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性腫瘍に対する研究は、近年の医学研究の中心であり、その発展はめざましい。胸部外科領域では特に肺癌において多くの研究が行われ、次第にその分子生物学的メカニズムが解明されつつある。その結果、EGFR 遺伝子をターゲットにしたイレッサ、ALK 遺伝子をターゲットにしたクリゾチニブなどの分子標的薬が実用化され、優れた臨床成績を上げている。

(2) 一方、胸腺癌、胸腺腫をはじめとする胸腺上皮悪性腫瘍については、KIT 遺伝子についての報告が散見される程度で、分子生物学的な発症機構がほとんど解明されていない。そのため、手術以外の有効な治療がなく、転移陽性例や術後再発例の治療は難しく予後は不良である。我々は胸腺悪性腫瘍については、EGFR の遺伝子変異、Kras の遺伝子変異ならびに遺伝子増幅についての検討を行ったが、胸腺腫 99 例では EGFR の遺伝子変異はなく、胸腺腫、胸腺癌の Kras では 125 例中、遺伝子変異、遺伝子増幅を認めたのはわずかに 1 例ずつであり、胸腺悪性腫瘍の発症メカニズムや治療の開発に有用なデータは得られなかった

(3) 分子生物学的機構の解明にはシーケンサーによるゲノムの解析が重要な役割を果たしてきた。一方、シーケンスは非常にコストが高く、多症例のシーケンスを行える施設は限られていた。また、遺伝子変異については主にシーケンスもしくは PCR によって検出されてきたが、多数の遺伝子変異の検索には

非常な時間とコストが必要であった。

(4) しかし、近年、次世代シーケンサーが開発され、これまでよりも安価に全ゲノムシーケンス、ターゲットシーケンスが可能となった。これにより、多数の遺伝子変異を一度に解析することが可能となり、胸腺悪性腫瘍の発症メカニズムに關与する遺伝子の解明が急速に進んでいくものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスによって、胸腺癌の遺伝子変異を網羅的に解析し、病態に關与する遺伝子群の同定を行う。

3. 研究の方法

(1) 1992 年から 2013 年までに名古屋市立大学病院で手術を施行された胸腺扁平上皮癌 12 例を対象とした。LifeTechnology 社の次世代シーケンサー (Ion PGM system) Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel によって癌関連 409 遺伝子に対してターゲットシーケンスを行い、遺伝子変異の網羅的解析を行った。

(2) また、癌組織に特異的な変異を同定するために、対応する正常組織 10 例に対してもシーケンスを施行した。

(3) 検出された変異については、QIAGEN 社の Ingenuity Variant Analysis を用いて重要な遺伝子変異のフィルタリングした後、正常組

織のシーケンス結果と比較した。

(4) さらに SHIFT において Tolerated であるもの、PolyPhen-2 において Benign であるもの、PROVEAN において Neutral であるものは除外した。これらによって病態に關与する可能性のある候補遺伝子変異を同定した。

4 . 研究成果

(1) 1 症例あたり平均 4,881,951 塩基のシーケンスを行い、average base coverage depth は 311、20× coverage は 96.6%、100× coverage は 86.3%であった。

(2) 1 例あたり平均で 294 遺伝子から 1039 の variants が検出された。Ingenuity Variant Analysis、正常組織のシーケンス結果、SHIFT、PolyPhen-2、PROVEAN によってフィルタリングを行い、胸腺癌 10 例から 24 遺伝子中、25 の遺伝子変異が候補遺伝子変異として挙がってきた。これらは COSMIC と SNP Pubmed において Polymorphism ではないことを確認した。

(3) 解析を行った 12 例に共通した遺伝子変異はなかったが、個々の症例において *KIT*、*DDR2*、*PDGFRA*、*ROS1*、*IGF1R* などのチロシンキナーゼ遺伝子に変異を認めた。

(4) *KIT* については exon 11 の 3 塩基欠失変異(c.1667_1669delTTG)を認め、サンガーシーケンスでも同変異を確認した。*HRAS* については D119H の変異を認めた。NF1 に関しては、1 例は L1068W、1 例は E2612*の変異を認めた。

(5) *KIT* の exon 11 欠失変異は、GIST と胸腺癌において発癌原因遺伝子であることが報告されており、分子標的薬である Imatinib の感受性との関連も報告されている。また、肺扁平上皮癌において分子標的薬のターゲットの 1 つとされている *DDR2* の splice site loss、頭頸部の扁平上皮癌で報告されている *HRAS* といった遺伝子変異も同定した。複数の症例に共通する発癌候補遺伝子の変異は認めなかったことから、胸腺扁平上皮癌は heterogeneous な腫瘍であることが示唆された。

(6) 本研究では、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスによって、胸腺扁平上皮癌について癌関連 409 遺伝子を調べ、*KIT*、*DDR2*、*HRAS* などの発癌に重要な役割を果たす遺伝子変異の同定に成功した。今後胸腺癌に対して分子標的治療の効果が期待できる可能性があることを示唆した。

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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Masayuki Shitara, Katsuhiko Okuda, Ayumi Suzuki, Tsutomu Tatematsu, Yu Hikosaka, Satoru Moriyama, Hidefumi Sasaki, Yoshitaka Fujii, Motoki Yano, Genetic Profiling of Thymic Carcinoma Using Targeted Next-Generation Sequencing, Lung Cancer, 86 巻, 2014, 174-179, 査読有、

doi: 10.1016/j.lungcan.2014.08.020.

〔学会発表〕(計 2 件)

設楽将之、矢野智紀、鈴木あゆみ、立松 勉、
奥田勝裕、彦坂 雄、佐々木秀文、藤井義
敬、胸腺癌に対する次世代シーケンサーを
用いた網羅的遺伝子変異解析、第 66 回日
本胸部外科学会定期学術集会 2012 年 10
月 17 日-20 日、福岡国際会議場(福岡県福
岡市)

Masayuki Shitara, Katsuhiro Okuda,
Ayumi Suzuki, Tsutomu Tatematsu, Yu
Hikosaka, Satoru Moriyama, Hidefumi
Sasaki, Motoki Yano,
Genetic Profiling of Thymic Carcinoma
Using Targeted Next-Generation
Sequencing, 5th International Thymic
Malignancy Interest Group Annual
Meeting. 2012.9.5-6, Antwerp (Belgium)

〔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

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

設楽 将之 (SHITARA MASAYUKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・

研究員

研究者番号 : 60595643

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

奥田 勝裕 (OKUDA KATSUHIRO)