

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25871068

研究課題名(和文)大規模ゲノム配列解析による肺腺がんの亜型分類

研究課題名(英文)Lung adenocarcinoma classification by big data analysis

研究代表者

藤原 大(Fujiwara, Takeshi)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がんゲノム研究部・研究員

研究者番号：00552712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺がんのトランスクリプトームデータを公共データベースより取得し、既報の遺伝子セットでサブタイプ分類を実施した。特にがんゲノムアトラスより548症例の肺腺がんのデータを取得し、トランスクリプトームでのサブタイプ分類を実施後、サブタイプごとのゲノム異常を解析した。既報と類似した発現パターンのサブタイプが同定され、特徴的な変異をもつ遺伝子が得られた。また、サブタイプと関連するマイクロRNA予測を実施した。自施設の肺腺がん24症例のマイクロアレイ実験を行い、マイクロRNAの網羅的発現解析の結果、サブタイプ特異的なマイクロRNAを同定・検証した。

研究成果の概要(英文)：Seven additional independent web-based datasets of lung adenocarcinoma were examined. The expression level of the ASCL1 geneset was used to define the neuroendocrine character based on the method we previously reported. Subtyping was performed by consensus clustering with nonnegative matrix factorization. Correlation of overall survival was analyzed with the Kaplan-Meier method. The neuroendocrine subtype was identified from each of seven independent cohorts. Among them, three datasets showed statistically significant association with patient survival ($p < 0.05$). Somatic mutations identified in the neuroendocrine subtype with the TCGA data were common ones such as TP53, STK11 and KRAS. Transcriptomic profiling partially reproduced the neuroendocrine subtype in lung adenocarcinoma samples derived from the independent datasets.

研究分野：ゲノムインフォマティクス

キーワード：肺がん ゲノム解析 遺伝子病理診断学

1. 研究開始当初の背景

肺がんは、世界で年間 130 万人が死亡するがん (World Health Organization 2012) であり早急な対策が求められている。肺がんは多様な組織病理像を示し、腺がん・扁平上皮がんなどに分類される。一方で遺伝子発現プロファイルによる分類が近年検討されてきており、申請者らは 2012 年に、肺腺がんの遺伝子発現プロファイルから ASCL1 共発現遺伝子セットと新規クラスタリング手法を用いて神経内分泌特性をもつ予後不良のサブタイプである NE サブタイプ、および扁平上皮がん様の SQ サブタイプ、肺胞様の AL サブタイプを発見している (発表論文 Fujiwara, Lung Cancer 2012)。また、既にスーパーコンピュータ上での次世代シーケンサーの情報処理解析手法を構築している。申請者は、2009 年より次世代シーケンサーのデータ解析に従事しており、肺がんについても、細胞株についてキナーゼ約 600 遺伝子の全エクソン解析を進めている。しかしながら、その肺腺がんサブタイプの頑健性、およびサブタイプとゲノム異常、マイクロ RNA との関係は明らかにされていない。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では、研究期間内に以下のことを明らかにすることを目的とした。

- (1) サブタイプの頑健性を検証するために、他国データセットでサブタイプを同定する。
- (2) サブタイプのゲノム異常を同定する。
- (3) ゲノム異常情報を解析することで分子経路を同定し、要因を明らかにする。
- (4) サブタイプに関連するマイクロ RNA を独自開発したバイオインフォマティクス手法を用いて予測する。
- (5) サブタイプにおけるマイクロ RNA 発現を、臨床検体を用いて計測し、予測されたマイクロ RNA の発現を検証する。

3. 研究の方法

(1) 肺がん大規模配列情報の収集と整理

まず、統合的な解析を可能にするために、肺がんのゲノム・トランスクリプトームデータを次世代シーケンサーのデータベースにより取得した。既に 10 報ほどのデータが報告されていた。そのうち、予後データが得られた 7 つのデータセットを対象とした。特に、がんゲノムアトラスでは肺がん・肺扁平上皮がんについて 500 例近いゲノム・トランスクリプトームデータを公開しており利用した。配列解析は大規模になるため、高性能サーバを活用した。

(2) 肺がんサブタイプの検証

まず、他国の肺腺がんにおいても、同様の分類が可能かどうか検証するために、2012 年に発表されたスウェーデン人の肺腺がん 106 例の遺伝子発現プロファイルを始めとして、7 つのデータセットに対して、申請者の手法

でサブタイプ分類を実施した。

(3) サブタイプと関連する分子経路の同定

トランスクリプトームデータから各サブタイプを既報と同手法にて構築した後に、神経内分泌遺伝子の発現を指標にサブタイプに関連する分子経路の同定を実施した。また、TCGA のデータセットに対しては、サブタイプごとに特徴的なゲノム異常を同定した。

(4) サブタイプに関連するマイクロ RNA の検証

各サブタイプに関連するマイクロ RNA の予測を行い、マイクロ RNA マイクロアレイでの検証を行った。既報論文の臨床サンプルから各 8 検体 (計 24 検体) のパラフィン包埋材料にて計測を実施し、解析を行った。

4. 研究成果

公共データベースより 7 つのデータセットを作成し、トランスクリプトームデータから各サブタイプを既報と同手法にて構築した。生存解析を Kaplan-Meier 法にて実施した結果、米国と日本のデータセットで予後不良のサブタイプが同定できた。

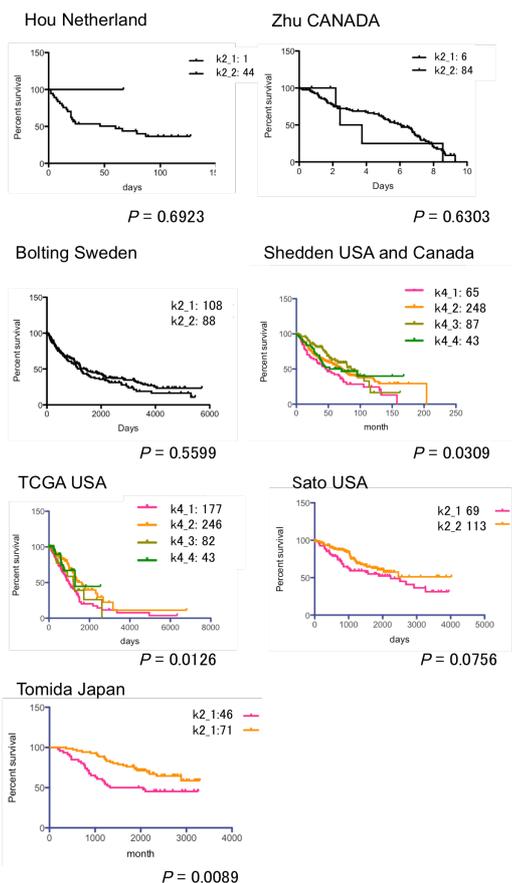


図 1. 肺腺がんのトランスクリプトームデータによるサブタイプの生存解析

次に、特徴的なゲノム異常をデータベース上から抽出した。がんゲノムアトラスより 548 症例の肺腺がんのデータを取得し、トランスクリプトームでのサブタイプ分類を実施後、異常のある遺伝子をサブタイプごとに集約

し、統計解析を実施したところ、サブタイプ特異的遺伝子が得られた。既報と類似した特徴的な変異をもつ遺伝子が得られた。

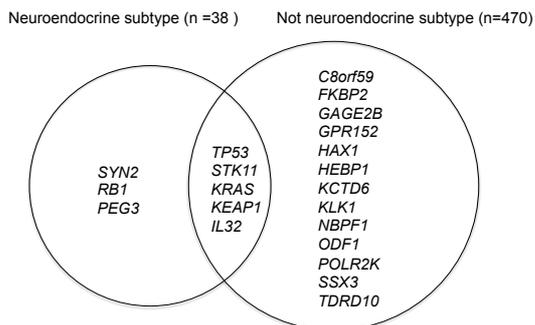


図 2. 神経内分泌サブタイプに頻出する遺伝子変異(TCGA データセット)

最後に、臨床検体 24 サンプルのマイクロ RNA 発現プロファイルを取得した。トランスクリプトームデータからサブタイプと関連するマイクロ RNA 予測を実施し、自施設の肺腺がん 24 症例のマイクロアレイ実験を行い、マイクロ RNA の網羅的発現解析の結果、サブタイプ特異的なマイクロ RNA を同定・検証した。遺伝子発現プロファイルと異なる特徴をもつサブタイプが得られた。

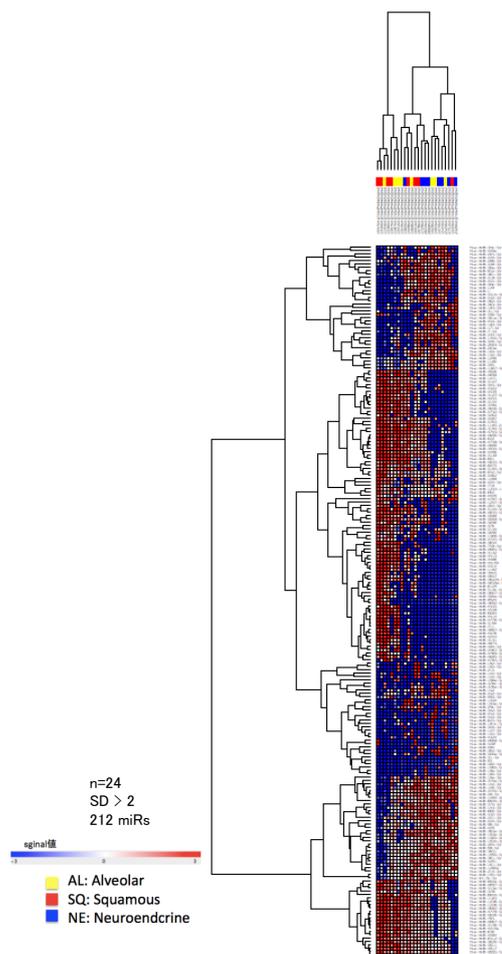


図 3. 肺腺がん 24 症例のマイクロ RNA 発現プロファイル

今後、自施設のシーケンス情報を取得することで、日本人の肺腺がんの神経内分泌特性と遺伝子変異との解明が期待される。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

①藤原大「腫瘍中の体細胞突然変異と低頻度 1 塩基多型との判別変数評価」第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 4 日パシフィコ横浜 (神奈川県)

②Takeshi Fujiwara “The Development of Pipeline to Discriminate Somatic Mutation from Rare SNP” 第 3 回生命情報学医薬連合大会 2014 年 10 月 2・3 日 仙台国際センター (宮城)

③Takeshi Fujiwara “Lung adenocarcinoma with neuroendocrine feature revealed by transcriptome profiling.” 第 16 回世界肺癌会議 2015 年 9 月 9 日 デンバー (米国)

④Takeshi Fujiwara “Prediction Somatic mutations from rare SNPs” 生命医薬情報学連合大会 2015 年大会 京都大学 宇治キャンパス (京都) 2015 年 10 月 2 日

⑤藤原大「神経内分泌性肺腺がんのトランスクリプトーム解析」第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 8 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 大 (Takeshi Fujiwara)
公益財団法人がん研究会 がんゲノム研究
部 特任研究員
研究者番号：00552712

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

石川 雄一 (Yuichi Ishikawa)
公益財団法人がん研究会・がん研究所 病
理部 部長