

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04714

研究課題名(和文) Driver変異不明の肺癌を層別化する試み

研究課題名(英文) Subclassification of lung cancers without driver mutations

研究代表者

石川 雄一 (Ishikawa, Yuichi)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 病理部・部長

研究者番号：80222975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：ドライバー変異(EGFR, KRAS, ALK)のない肺の腺癌は、喫煙などの外来性発癌因子との関連がより濃厚であると推定される。本研究では、mRNAおよびmiRNA発現を網羅的に検索した。外来発がん因子として、喫煙とアスベスト曝露とに着目した。喫煙量、肺内アスベスト量とmiRNAの発現と相関を検討し、アスベスト曝露に特有のmiRNAを抽出できた。miRNA発現とRNA発現の統合的解析を試みたが、miRNAとmRNAとでクラスターが一致せず、再実験を行っている。

免疫チェックポイント阻害薬関連のバイオマーカーPD-L1発現は腺癌では予後不良因子であったが、小細胞癌では予後良好因子であった。

研究成果の概要(英文)：Lung cancers without driver mutations (EGFR, KRAS, ALK etc.) are thought to relate with exogenous carcinogens such as smoking. In this study, we focused on exposure to cigarette smoke and asbestos and comprehensively investigated mRNA and miRNA expression. By comparing cumulative smoking, asbestos burden with miRNA expression, we successfully identified specific miRNA to asbestos exposure. Although we attempted to perform integrated analysis using mRNA and miRNA expression, clusters drawn from mRNA and miRNA were not identical. Also, we examined PD-L1 expression in adenocarcinoma and small cell carcinoma and found that PD-L1 expression in small cell carcinoma was unexpectedly a marker for good prognosis.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：肺癌 ドライバー変異

1. 研究開始当初の背景

肺腺癌では、EGFR 変異、KRAS 変異、ALK 融合遺伝子、HER2 変異、MET 増幅/変異、BRAF 変異、AKT1 変異、PIK3CA 変異が指摘され、RET および ROS1 融合遺伝子が発見されている。これらは相互排他性がかなり高いことから、日本人の肺腺癌はほぼ 3/4 が driver 遺伝子変化による分類で説明されるようになった。この分類は、治療のための標的薬剤を直ちに示すので、非常に有用であり、かつ、癌細胞増殖パスウェイの主経路を示すものである。

しかしながら、EGFR 変異肺癌、KRAS 変異肺癌、ALK 融合遺伝子肺癌までは、頻度がそれぞれ大まかに 50-60%、10%、5%と、比較的高頻度であったが、それ以外は、非常に頻度が低い。

では、残りの腺癌（日本では 2-3 割、欧米ではほぼ半分）も、このように 1% 刻みで癌遺伝子変化が driver 遺伝子変化として見出されるのであろうか。おそらくそうではないであろう。というのは、これまで発見されている主たる driver 遺伝子変化は、KRAS 以外は大部分が非喫煙者ないし軽度喫煙者に発生するものである。残っている driver 変異不明の腺癌は、殆ど重喫煙者の癌である。

腺癌では一般に、喫煙との関連が強い癌は染色体不安定性（LOH 頻度）が高く、driver 遺伝子変異が見出されていない。すなわち、「driver 変異-passenger 変異」という概念で説明できない腺癌である。

扁平上皮癌、小細胞癌では、高速シークエンスを用いた研究で FGFR1 や MYC の増幅、DDR2・SLIT2・MLL 変異などの変化が見出されているが、その頻度はそれほど高くなく大半は不明なままである。癌抑制遺伝子の変化は高頻度であるものの、癌の分類や治療に結びつきにくいのが現状である。

すなわち、「oncogene 中毒を起こすような癌遺伝子を見出して分子標的薬で治療する」という戦略は、腺癌の 20-30%と、他の組織型に対してはあまり有効でない可能性がある。

2. 研究の目的

では、driver 変異不明の肺癌を層別化して、個別治療へと近づけるにはどのようにしたら良いのであろうか。我々は、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌を対象に、以下のような解析を計画した。

1. ゲノム不安定性：特に chromothripsis に着目

2. メチル化異常：グローバルメチル化、内在性レトロトランスポゾン、癌抑制遺伝子

3. 非コード RNA：miRNA（腫瘍中、血中エクソソーム内）、長鎖非コード RNA

4. 増殖分化パスウェイ解析：RTK 下流因子では AKT 経路、ERK 経路、STAT 経路因子の発現を、さらに Hedgehog (HH)、Notch、Wnt 経路を、特に小細胞癌における HH 経路

を調べる。

5. 転写因子解析：山中因子の発現や、特に小細胞癌における MYC 系因子について本研究では、driver 変異が見つからない肺癌を上記の手段によって層別化する試みを行う。

3. 研究の方法

[1] 対象例の選定：

(1) 腺癌：ドライバー変異陰性の 33 例を主たる対象とする。更に、シークエンスにて BRAF、PIK3CA、HER2 の変異を、FISH で MET の増幅について、それぞれ検索する。

(2) 小細胞癌：新鮮凍結組織のある 28 例を対象とする。

(3) 扁平上皮癌：EGFR・KRAS・DDR2 の変異、ALK 融合遺伝子、FGFR1 増幅のないもの 40 例を対象とする。

以上の対象例（約 100 例）について、組織型、病理病期、再発の有無・再発形式・死因などの予後情報、喫煙歴、アスベスト曝露歴（曝露歴のあるものについては肺内アスベスト量）、腫瘍歴、家族歴などを、対象症例ファイルとしてまとめる。免疫染色での検索を効率化するため、tissue array を作製する。

[2] ゲノム不安定性の解析

腺癌 33 例の全ゲノムにおけるアレル量データを詳細に解析する。小細胞癌について、driver 遺伝子変化のないものを CGH アレイによるアレル量解析を行う。扁平上皮癌についても、driver 遺伝子変化のないものを CGH アレイによるアレル量解析を行う。

いずれの組織型でも、chromothripsis 特有のアレル量の oscillation がないか慎重に検討する。

[3] メチル化異常

腺癌 33 例、扁平上皮癌約 40 例、小細胞癌 28 例については、ゲノムワイドメチル化解析を Illumina 社の Infinium Human Methylation 27 BeadChip を用いて行う。

次に、内在性レトロエレメントについては、LINE-1 のプロモータ部位のメチル化を検索する。さらに、主たる癌抑制遺伝子（CDKN2A、PTEN など）のメチル化の程度も調べる。

[4] 非コード RNA の検索

CGH アレイ解析を実施した腺癌の全例（n=130）について、miRNA 発現アレイを用いて miRNA 発現を網羅的に解析する。さらに Agilent 社の SurePrint G3 Human Gene Expression 60K v2 Microarray を用いて、長鎖非コード RNA（と mRNA）発現解析を行う。

[5] 増殖分化パスウェイ解析

我々のこれまでの研究では、(i) EGFR 変異、MET 増幅のある腺癌でも、その下流シグナルの活性化は一定ではない、(ii) EGFR 変異肺癌でも AKT が活性化しているもの、ERK 経路

が活性化しているもの、両方が活性化しているものなどがある。(iii) ALK 肺癌では、STAT 経路が活性化している細胞株があるが、臨床例ではむしろそれは少ない、などを解明してきた。このように、RTK 下流因子の活性化により、種々の癌を層別化できる可能性がある。本研究で対象とする 100 例について、ERK, AKT, STAT3 蛋白発現を免疫染色により検討し、他の因子との相関を検討する。

[6] 転写因子の病理学的解析

本研究では、腫瘍細胞の stemness の度合いを見つめるという観点から、細胞初期化因子(山中因子)をはじめ、種々の幹細胞マーカー、胚細胞マーカーの発現を調べる。

4. 研究成果

[1] 対象

肺癌：これまで 130 例の肺腺癌を CGH アレイ解析し、33 例の EML4-ALK 肺癌、2 例の KIF5B-ALK 肺癌、55 例の EGFR 変異肺癌、7 例の KRAS 変異肺癌において、詳細な allele 量変化を記録した。更に、シーケンシングにて BRAF, PIK3CA, HER2 の変異を、FISH で MET の増幅例を同定した。現在、喫煙との相関を検討中である。

小細胞癌：28 例の新鮮凍結組織を用いてゲノムワイドメチル化解析を行い、小細胞癌の中にも予後良好な一群があり、メチル化の状態が異なることを見出した。1/3 の症例に、driver 遺伝子変化(EGFR, KRAS, FGFR2, MLL などの変化)を見出した。喫煙との相関は、はっきりしなかった。非喫煙者に発生した小細胞癌のゲノム上の特徴も、これまでのところ、有意な結果は得られていない。

扁平上皮癌：5 生率の判明している 2008 年以前の手術例 50 例を調べ、EGFR・KRAS・DDR2 の変異、ALK 融合遺伝子、FGFR1 増幅のないものを 35 例同定した。

対象症例の、免疫染色によるタンパク発現解析のため、組織マイクロアレイを作製した。

[2] ゲノム不安定性の解析

肺癌 33 例のアレル量変化と喫煙量との相関を確認した。マイクロサテライト不安定な症例は、染色体不安定なものよりも、喫煙との相関が少なかった。

小細胞癌、扁平上皮癌についても、driver 遺伝子変化のないものを CGH アレイによるアレル量データを取得した。

[3] メチル化異常

肺癌、扁平上皮癌、小細胞癌の計約 100 例について、ゲノムワイドメチル化解析を行ない、メチル化データを取得した。

内在性レトロエレメントについては、良好な結果が得られなかった。

主たる癌抑制遺伝子(CDKN2A, PTEN など)のメチル化解析は、実施中である。

[4] 非コード RNA の検索

肺癌 150 例について、miRNA, mRNA, 長鎖非コード RNA のデータを取得した。miRNA と mRNA の統合解析を実施したところ、クラスターが一致せず、意味のある結果が得られなかった。また、mRNA によるクラスターも、これまでの結果と一致しなかった。実験がうまく行かなかった理由を分析し、現在、再度、発現解析実験を行い、データを入手中である。

[5] 増殖分化パスウェイ解析

我々のこれまでの研究では、EGFR 変異、MET 増幅のある肺癌でも、その下流シグナルの活性化は一定ではない。EGFR 変異肺癌でも AKT が活性化しているもの、ERK 経路が活性化しているもの、両方が活性化しているものなどがある(Hiramatsu et al. Lung Cancer 2010)。ALK 肺癌では、STAT 経路が活性化している細胞株があるが、臨床例ではむしろそれは少なかった。本研究で対象とする 100 例について、RTK 下流のシグナル因子発現による分類ができる可能性が得られた(詳細は、論文で発表する予定)。また、ドライバー変異のある癌でも、例えば、EGFR 肺癌では種々のパスウェイ活性があることが判ってきた。現在、整理中である。

[6] 転写因子の病理学的解析

転写因子の解析は、小細胞癌において集中的に行った。特に神経内分泌性の発現を司り、ASCL1 の上流に位置する INSM1 に着目した。INSM1 は、神経内分泌マーカーとしては最も高感度であった。また、肺癌や扁平上皮癌での発現が低く、特異性も高かった。小細胞癌の診断は神経内分泌性を証明しなくてもできることになっているが、神経内分泌マーカー陰性の小細胞癌でも、高率に INSM1 が陽性であった。

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 77 件)

2018

Noma, D., Inamura, K., Matsuura, Y., Hirata, Y., Nakajima, T., Yamazaki, H., Hirai, Y., Ichinose, J., Nakao, M., Ninomiya, H., Mun, M., Nakagawa, K., Masuda, M., Ishikawa, Y., Okumura, S. Prognostic effect of lymphovascular invasion on TNM staging in stage I non-small-cell lung cancer. Clin. Lung Cancer, 2018; 19 (1): e109-e122,

Takamatsu, M., Sato, Y., Muto, M., Nagano, H., Ninomiya, H., Sakakibara, R., Baba, S., Sakata, S., Takeuchi K, Okumura, S., Ishikawa, Y. Hyalinizing clear cell carcinoma of the bronchial glands: presentation of three cases and pathological comparisons with salivary gland counterparts and bronchial

mucoepidermoid carcinomas. *Mod Pathol*, 2018

Kasajima A, Ishikawa Y, Iwata A, Steiger K, Oka N, Ishida H, Sakurada A, Suzuki H, Kameya T, Konukiewitz B, Kloppel G, Okada Y, Sasano H, Weichert W. Inflammation and PD-L1 expression in pulmonary neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2018; 25: 339–350

石川雄一. 神経内分泌腫瘍の性質をめぐるトピック - マーカーから用語まで. 特集「神経内分泌腫瘍 (NET) の病理学～治療と診断の新局面～」病理と臨床, 2018; 36(5): 415-419.

2017

Satoh, Y., Ishikawa, Y. Multiple primary pulmonary meningiomas: 20-year follow-up findings for a first reported case confirming a benign biological nature. *Int. J. Surg. Case Rep.*, 2017; 31: 58-60.

Hassan, W. A., Takebayashi, S. I., Abdalla, M. O. A., Fujino, K., Kudoh, S., Motooka, Y., Sato, Y., Naito, Y., Higaki, K., Wakimoto, J., Okada, S., Nakao, M., Ishikawa, Y., Ito, T. Correlation between histone acetylation and expression of Notch1 in human lung carcinoma and its possible role in combined small-cell lung carcinoma. *Lab. Invest.*, 2017; 97 (8): 913-921.

Nakao, M., Matsuura, Y., Uehara, H., Mun, M., Nakagawa, K., Nishio, M., Ishikawa, Y., Okumura, S. Development of indication criteria for preoperative examination in lung cancer. *Asian Cardiovasc. Thorac. Ann.*, 2017; 25 (4): 281-286.

Saiki, M., Ohyanagi, F., Ariyasu, R., Koyama, J., Sonoda, T., Nishikawa, S., Kitazono, S., Yanagitani, N., Horiike, A., Ninomiya, H., Ishikawa, Y., Nishio, M. Dramatic response to alectinib in inflammatory myofibroblastic tumor with anaplastic lymphoma kinase fusion gene. *Jpn. J. Clin. Oncol*, 2017; 47 (12): 1189-1192.

Sakakibara R, Inamura K, Tambo Y, Ninomiya H, Kitazono S, Yanagitani N, Horiike A, Ohyanagi F, Matsuura Y, Nakao M, Mun M, Okumura S, Inase N, Nishio M, Motoi N, Ishikawa Y. EBUS-TBNA as a promising method for the evaluation of tumor PD-L1 expression in lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2017 Sep;18(5):527-534.e1. doi: 10.1016/j.clcc.2016.12.002. Epub 2016 Dec 22.

Takamatsu M, Sato Y, Muto M, Nagano H, Ninomiya H, Sakakibara R, Baba S, Sakata S, Takeuchi K, Okumura S, Ishikawa Y. Hyalinizing clear cell carcinoma of the bronchial glands: presentation of three cases and pathological comparisons with salivary gland counterparts and bronchial mucoepidermoid carcinomas. *Mod Pathol*

2018 Feb 12. doi: 10.1038/s41379-018-0025-7. [Epub ahead of print]

Inamura K, Yokouchi Y, Kobayashi M, Ninomiya H, Sakakibara R, Nishio M, Okumura S, Ishikawa Y. Relationship of tumor PD-L1 (CD274) expression with lower mortality in lung high-grade neuroendocrine tumor. *Cancer Med* 2017 Oct;6(10):2347-2356. doi: 10.1002/cam4.1172. Epub 2017 Sep 18.

Inamura K, Kobayashi M, Nagano H, Sugiura Y, Ogawa M, Masuda H, Yonese J, Ishikawa Y. A novel fusion of HNRNPA1-ALK in inflammatory myofibroblastic tumor of urinary bladder. *Hum Pathol*, 2017 Nov;69:96-100. doi: 10.1016/j.humpath.2017.04.022. Epub 2017 May 10.

Yoshimoto T, Motoi N, Yamamoto N, Nagano H, Ushijima M, Matsuura M, Okumura S, Yamaguchi T, Fukayama M, Ishikawa Y. Pulmonary carcinoids and low-grade gastrointestinal neuroendocrine tumors show common microRNA expression profiles, different from adenocarcinomas and small cell carcinomas. *Neuroendocrinology* 2018;106(1):47-57. doi: 10.1159/000461582. Epub 2017 Feb 17.

Inamura K, Yokouchi Y, Kobayashi M, Ninomiya H, Sakakibara R, Subat S, Nagano H, Nomura K, Okumura S, Shibutani T, Ishikawa Y. Association of tumor TROP2 expression with prognosis varies among lung cancer subtypes. *Oncotarget*. 2017 Apr 25;8(17):28725-28735. doi: 10.18632/oncotarget.15647.

Thunnissen E, Borczuk AC, Flieder DB, Witte B, Beasley MB, Chung JH, Dacic S, Lantuejoul S, Russell PA, den Bakker M, Botling J, Brambilla E, de Cuba E, Geisinger KR, Hiroshima K, Marchevsky AM, Minami Y, Moreira A, Nicholson AG, Yoshida A, Tsao MS, Warth A, Duhig E, Chen G, Matsuno Y, Travis WD, Butnor K, Cooper W, Mino-Kenudson M, Motoi N, Poleri C, Pelosi G, Kerr K, Aisner SC, Ishikawa Y, Buettner RH, Keino N, Yatabe Y, Noguchi M. The use of immunohistochemistry improves the diagnosis of small cell lung cancer and its differential diagnosis. An international reproducibility study in a demanding set of cases. *J Thorac Oncol*. 2017 Feb;12(2): 334-346. doi: 10.1016/j.jtho.2016.12.004. Epub 2016 Dec 18.

Mori S, Motoi N, Ninomiya H, Matsuura Y, Nakao M, Mun M-y, Ikumura S, Nishio M, Morikawa T, Ishikawa Y. High expression of programmed cell death 1 ligand 1 in lung adenocarcinoma is a poor prognostic factor particularly in smokers and wild-type epidermal growth-factor receptor cases. *Pathol*

Int. 2017 Jan;67(1):37-44. doi: 10.1111/pin.12489. Epub 2016 Dec 15.

Inamura K, Yokouchi Y, Kobayashi M, Sakakibara R, Ninomiya H, Subat S, Nagano H, Nomura K, Okumura S, Tomoko Shibutani T, Ishikawa Y. Tumor B7-H3 (CD276) expression and smoking history in relation to lung adenocarcinoma prognosis. *Lung Cancer*. 2017 Jan;103:44-51. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.11.013.

石川雄一. 新分類で細気管支肺胞上皮癌および肺炎様の腺癌は、どのように分類されますか？肺癌診療 Q&A (弦間昭彦編著), 東京, 中外医学社: pp.5-7, 2017

石川雄一. 肺がん: 肺がんの分類と病理診断 ALK 肺がん・PD-L1 陽性肺がんを例にして. *アニムス*, 2017; 22 (3): 21-24.

中島康裕, 小松有, 瀧玲子, 櫻井うらら, 石川雄一, 小島勝雄. 脳転移巣の出現から7年後に顕在化した潜在性肺癌の1例. *肺癌* 2017; 57: 838-42.

2016

Horiike A, Takeuchi K, Uenami T, Kawano Y, Tanimoto A, Kaburaki K, Tambo Y, Kudo K, Yanagitani N, Ohyanagi F, Motoi N, Ishikawa Y, Horai T, Nishio M. Sorafenib treatment for patients with RET fusion-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2016; 93:43-6. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.12.011. Epub 2015 Dec 30. PMID: 26898613

Saito Y, Nagae G, Motoi N, Miyauchi E, Ninomiya H, Uehara H, Mun M-y, Okumura S, Ohyanagi F, Nishio M, Satoh Y, Aburatani H, Ishikawa Y. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype in surgically resected small cell lung carcinoma. *Cancer Sci*. 2016 Mar;107(3):320-5. doi: 10.1111/cas.12876. Epub 2016 Feb 19

Kuroda H, Sakao Y, Mun M-y, Motoi M, Ishikawa Y, Nakagawa K, Yatabe Y, Okumura S. Therapeutic value of lymph node dissection for right middle lobe non-small-cell lung cancer. *J Thorac Dis*. 2016 May;8(5):795-802. doi: 10.21037/jtd.2016.03.30.

Inamura K, Ishikawa Y. MicroRNA in lung cancer: Novel biomarkers and potential tools for treatment. *J Clin Med*. 2016 Mar 9;5(3). pii: E36. doi: 10.3390/jcm5030036.

Inamura K, Yokouchi Y, Sakakibara R, Kobayashi M, Subat S, Ninomiya H, Nagano H, Nomura K, Okumura S, Ishikawa Y. Relationship of tumor PD-L1 expression with EGFR wild type status and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2016 Oct;46(10):935-941. Epub 2016 Aug 10. PMID: 27511990 DOI: 10.1093/jjco/hyw087

Noma D, Inamura K, Mun M, Terauchi T, Matsuura Y, Nakao M, Ninomiya H, Nakagawa K, Masuda M, Okumura S,

Ishikawa Y. Thymic oncocyctic carcinoid with a markedly elevated level of maximum SUV: a case report and literature review. *Pathol Int*, 2016 Oct;66(10):593-595. doi: 10.1111/pin.12449. Epub 2016 Sep 11.

Nishikawa S, Tambo Y, Ninomiya H, Oguri T, Kawashima Y, Takano N, Kitazono S, Ohyanagi F, Horiike A, Yanagitani N, Ishikawa Y, Nishio M. A case treated with nivolumab after small cell lung cancer transformation of mutant EGFR non-small cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2016 Dec; 27(12):2300-2302. doi: 10.1093/annonc/mdw431. PMID: 27760736

榊原里江, 石川雄一. 神経内分泌癌 - 他の臓器との相違を含めて - 「肺癌 II」病理と臨床 34(4): 346-350, 2016

佐藤由紀子, 東山聖彦, 石川雄一. 【新しい疾患】肺の筋上皮種/筋上皮癌「肺癌 II」病理と臨床 34: 384-386, 2016

蛭田啓之, 阿江啓介, 杉浦善弥, 石川雄一. 骨肉腫の組織学的効果判定と切除縁評価. 野島孝之, 小田義直 (編) 『腫瘍病理鑑別診断アトラス 骨腫瘍』pp. 214-220, 2016, 文光堂, 東京

稲村健太郎, 二宮浩範, 石川雄一. 13. 肺癌. 第2部 がんの分子病理学 臨時増刊号 vol.34 『癌の分子病理学-病理診断から治療標的探索まで』病理と臨床, pp.146-154, 2016, 文光堂, 東京

稲村健太郎, 石川雄一. 肺癌の新 WHO 分類. 成人病と生活習慣病, 46(4): 419-425, 2016

二宮浩範, 石川雄一. 肺癌: 実地診療の基本とその臨床への活用 新 WHO 肺癌分類と診断に有用な免疫組織化学・遺伝子診断の活用のしかた. *Medical Practice*, 33(2): 168-175, 2016

中島康裕, 小島勝雄, 瀧玲子, 櫻井うらら, 瀧和博, 石川雄一. 混合型小細胞癌が扁平上皮癌への腫瘍内転移を来した同時に重癌の一例. *肺癌*, 56(5): 397-398, 2016

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

石川雄一 (ISHIKAWA, Yuichi)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 病
理部・部長
研究者番号：80222975

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし