

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19934

研究課題名(和文) 浸潤性肺腺癌の腫瘍内多様性とリンパ節転移機構の解明

研究課題名(英文) Intratumoral heterogeneity of invasive lung adenocarcinoma and mechanism of lymph node metastasis

研究代表者

春木 朋広 (Haruki, Tomohiro)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20529416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：浸潤性肺腺癌は小型でも高い局所浸潤能や転移能を有することが多く、根治術後も局所や遠隔再発を起こすことが多い。腫瘍内多様性とリンパ節転移能獲得機構の解明するために、複数の組織亜型が混在する浸潤性肺腺癌の外科切除検体を用いて、各組織亜型を構成する腫瘍細胞集団の遺伝子変異を個別に解析した。また、同時に、同一症例のリンパ節転移巣の遺伝子変異も解析した。結果として、各組織亜型やリンパ節転移巣には共通して認める遺伝子変異が多く存在しており、原発巣のみ、転移巣のみで認める遺伝子変異は少なかった。今後さらに症例数を増やし、腫瘍内多様性を解明するための検討を深めていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Even small invasive lung adenocarcinomas have local invasiveness and metastatic potential, and often occur local recurrence or remote recurrence after curative surgery. In order to elucidate the intratumoral heterogeneity, we analyzed gene mutations of surgically resected invasive lung adenocarcinoma mixed with some subtypes using next generation sequencer. At the same time, gene mutations of tumor cells from lymph node metastasis foci were also analyzed to clarify the mechanism of acquiring lymphatic metastatic potential. As a consequence, many common genetic mutations were observed in tumor cells from each subtype and lymph node metastatic foci, and there were few mutations recognized only in the primary tumor and metastatic lesion. It is necessary to increase the number of cases and further explore intratumoral diversity of invasive lung adenocarcinomas.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：浸潤性肺腺癌 腫瘍内多様性 リンパ節転移 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

浸潤性肺腺癌は小型でも高い局所浸潤能や転移能を有することが多く、根治術後も局所や遠隔再発を起こすことが多い。形態学的に浸潤性肺腺癌は、複数の組織亜型を伴いながら増大し、その発育段階において driver mutation とは別に、様々な遺伝子異常が過剰に蓄積され、複雑な腫瘍内多様性を有する腫瘍へと進化していくと考えられる。この、浸潤性肺腺癌における遺伝子変異の腫瘍内不均一性は、治療を困難にしている最大の障壁であり、その解明なしでは、根治あるいは再発転移の予防、あるいは予後を改善する革新的治療の開発は望めないと考えられる。

こうした背景の中、我々は、複数の組織亜型が混在する浸潤性肺腺癌の外科切除検体を用いて、各組織亜型を構成する腫瘍細胞集団の遺伝子変異を個別に解析し、加えて同一症例のリンパ節転移巣の腫瘍細胞集団の遺伝子変異も同時に解析することにより、腫瘍が特にリンパ行性の転移能を獲得する上で重要な遺伝子変異を推定することが可能と考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、浸潤性肺腺癌を構成する各組織亜型、及びリンパ節転移巣から抽出した腫瘍細胞由来の DNA を用いて遺伝子変異解析を行い、腫瘍内多様性と転移能獲得機構の解明を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 当院で根治切除を行った原発性肺腺癌 225 例のうち、予期せぬ肺門縦隔リンパ節転移により upstage を認めた症例 (Unexpected diseases: N = 41) のデータを集積し、upstage のなかった症例 (expected diseases: N = 184) との臨床病理背景因子、リンパ節転移巣のサイズ比較、転移予測因子の多変量解析などの検討を行った。
- (2) 当院で根治切除を行ったリンパ節転移を有し、充実亜型 (Solid) と腺房亜型 (Acinar) を同一組織内に有する 2 例の切除検体の HE 染色スライドで、腺房亜型 (A)、充実亜型 (S)、転移リンパ節 (Positive lymph node: P)、正常リンパ節 (Normal lymph node: N) を再評価した。
- (3) 再評価した HE 染色の所見をもとに、同症例の FFPE ブロックより 10 μm で薄切を行い、標本を専用スライドに固定後ヘマトキシリン染色した。Leica™LMD7000 を用いて、Laser

Capture Microdissection (LMD) で組織を回収 (平均組織回収量: 127mm²)、DNA を抽出した。抽出した DNA 量を Qubit™ (ThermoFisher Scientific) で測定した。

- (4) DNA ライブラリ調整後、次世代シーケンサー (Ion Proton™: ThermoFisher Scientific) にて遺伝子変異解析を行った。変異解析する遺伝子リストは Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel Target Gene List: ThermoFisher Scientific) にある 409 遺伝子とした。

4. 研究成果

- (1) Unexpected disease の 41 例と Expected disease 184 例のうち術前よりリンパ節転移のあった 9 例 (cN1 および N2) のリンパ節転移巣のサイズの比較では、Unexpected vs Expected: 5.7 ± 3.8 mm vs 12.9 ± 7.2 mm ($p < 0.01$) で群間に統計学的有意差を認めた。多変量解析で、Unexpected diseases の予測因子は、若年 (70 歳以下)、左肺原発、腫瘍径 (3cm 以上)、および微小乳頭亜型であった。

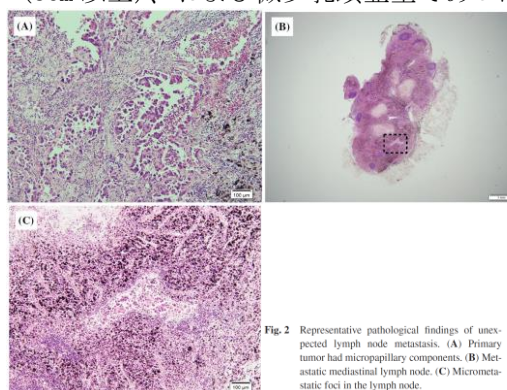


図 1 Unexpected disease 症例の原発巣における微小乳頭亜型 (Micropapillary component) とリンパ節における微小転移巣

予期せぬ肺門縦隔リンパ節転移を認めた症例においては、上記 Figure 2C に見られるような、非常に微少なリンパ節転移巣を有し、また原発巣に Figure 2A に見られるような微小乳頭亜型が含まれることが多く、これらと強い関連があることが判明した。PET/CT での Standard uptake value (SUV) との関連や、EGFR 遺伝子変異との関連など、今後さらに検討を深めていく必要があると考えられた。

- (2) 遺伝子変異検索を行った対象症例 2 例の病理診断は下記の通りであった。

症例①：

左上葉肺癌：Invasive adenocarcinoma
Acinar-predominant (60%)、solid (35%)、
lepidic (5%)

pT3a (3.4cm, p13)N1 (#12u)M0, stage IIIA

症例②：

左下葉肺癌：Invasive adenocarcinoma
Solid-predominant (60%)、acinar (30%)、
papillary (10%)

pT2b (4.4cm, p11)N2 (#7/10/11i)M0 stage IIIA

(3)

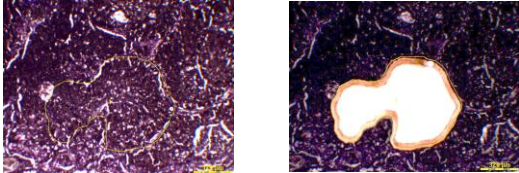


図2 LMDによる腫瘍細胞の回収

Leica™LMD7000 を用いて LMD を行い、同一腫瘍内の亜型別、およびリンパ節転移巣より腫瘍細胞のみを採取し、RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (ThermoFisher Scientific) により DNA を抽出した。各症例の組織回収量は以下の通りであった。

症例①

- N1 (Normal LN) : 110, 433, 177um²
- P1 (Positive LN) : 113, 431, 620um²
- A1 (Acinar) : 182, 126, 633um²
- S1 (Solid) : 111, 738, 775um²

症例②

- N2 : 108, 944, 910um²
- P2 : 103, 511, 856um²
- A2 : 182, 644, 437um²
- S2 : 103, 518, 031um²

平均回収組織量：127, 043, 680um² → 127mm²

また各組織より抽出された DNA の濃度は以下の通りであった。

症例①

- N1 : 38.4 ng/uL
- P1 : 34.4 ng/uL
- A1 : 10.6 ng/uL
- S1 : 21.2 ng/uL

症例②

- N2 : 62.0 ng/uL
- P2 : 28.4 ng/uL
- A2 : 34.8 ng/uL
- S2 : 18.9 ng/uL

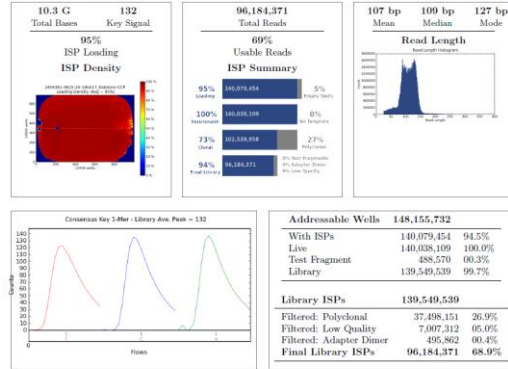
(4)

抽出された DNA を用いて、次世代シーケンサー (Ion Proton™ : ThermoFisher Scientific) にて遺伝子変異解析を行った。

詳細な結果については現在解析中である

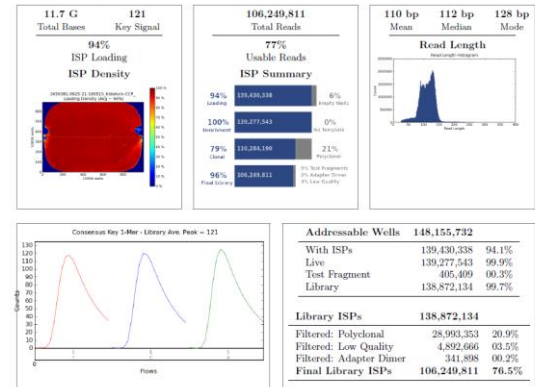
が、結果の概要を分析すると、原発巣の中の亜型別、またリンパ節転移巣との比較において、変異遺伝子は共通のものが多く、原発巣のみ、または転移巣のみで認められる遺伝子変異は少ないと考えられた。

Run Summary



Barcode Name	Sample	Bases	≥ Q20	Reads	Mean Read Length
No barcode	none	345,023,564	299,203,109	3,046,078	113 bp
IonXpress_009	N1	782,082,354	695,298,359	7,382,664	106 bp
IonXpress_010	N2	6,265,615,128	5,598,534,889	58,408,429	107 bp
IonXpress_011	P1	2,389,016,096	2,141,886,930	22,188,346	108 bp
IonXpress_012	P2	552,969,139	500,965,852	5,129,041	108 bp

Run Summary



Barcode Name	Sample	Bases	≥ Q20	Reads	Mean Read Length
No barcode	none	600,040,857	517,711,605	4,974,796	121 bp
IonXpress_013	A1	116,789,021	98,077,945	1,066,413	110 bp
IonXpress_014	A2	10,417,539,318	9,086,185	94,991,163	110 bp
IonXpress_015	S1	356,771,641	304,998,483	3,320,500	107 bp
IonXpress_016	S2	198,719,501	171,284,972	1,889,151	105 bp

図3 次世代シーケンサーによる変異解析の Run Summary

この点については、これまでの多くの報告と同様であった。すなわち、腫瘍として確立する進化の早期では、病変のすべての領域に共通して存在する変異 (founder 変異) が発生し、後期には、付加的に起こる変異 (progressor 変異) が発生するが、それらの多くは中立的であり、このことが浸潤性肺腺癌におけるがんゲノム進化が、一般に中立進化優勢型であると言われる所以である。

今後は解析症例数を増やし、原発巣とリンパ節転移巣の変異遺伝子の比較、さらには発現遺伝子の比較検討も行い、肺腺癌が進化していく過程で獲得される多様性についての検討を深めていきたい。

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)

① Haruki T, Wakahara M, Matsuoka Y, Miwa K, Araki K, Taniguchi Y, Nakamura H. Clinicopathological characteristics of lung adenocarcinoma with unexpected lymph node metastasis. Ann Thorac Cardiovasc Surg. (2017) 23: 181-187 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① Kidokoro Y, Haruki T, Fujiwara T, Ohno K, Hosoya K, Kubouchi M, Yurugi Y, Takagi K, Miwa K, Araki K, Taniguchi Y, Nakamura H. Evaluation of clinical associated factors for lung adenocarcinoma by TNM 8th edition with unexpected N2 disease. 18th World Conference on Lung Cancer, October, 15-18, 2017, Yokohama, Japan.

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者:

春木朋広 (Haruki Tomohiro)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 20529416