

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月28日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19941

研究課題名(和文) Driver遺伝子変異を有する肺癌における、空間・時間的な腫瘍内不均一性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of space-time in-tumor heterogeneity in lung cancer with Driver gene mutation

研究代表者

橋本 崇史 (Hashimoto, Takafumi)

大分大学・医学部・特任助教

研究者番号：40738126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR陽性肺癌(L858R陽性)をEGF Receptorを用いて反応させ、3例(全20例)が不均一染色であった。陽性部と陰性部から核酸に対し網羅的解析を行い、一塩基多型とコピー数多型での比較では、1例目は陽性部においてEGFRとCCNE1のCNVが陰性部より高値、2例目は陽性部においてEGFRとMDM2のCNVが陰性部よりも高値、3例目はCNVの変化は認めなかった。SNVに関しては3例とも不均一性を認めなかった。陽性部と陰性部の細胞分裂と細胞死の状態の相違は、症例1はki-67ラベルインデックスが陽性部で高く、症例2はTUNEL染色で陽性部により断片化DNAによるシグナルが認められた。

研究成果の概要(英文)：Resected primary lung cancers harboring EGFR L858R were performed using an L858R mutant-specific antibody and scored by staining intensity (0-3) and proportion. Among 20 cases, 3 showed heterogeneous staining. For these cases, the nucleic acids were extracted from each differently stained lesion, and targeted sequencing was performed. Single nucleotide variations (SNVs) and copy number variations (CNVs) were then analyzed. Genetic analyses revealed an increase in the copy number of EGFR and CCNE1 in the IHC-positive part compared to the negative part in one case (case 1), and an increase in the copy number of EGFR and MDM2 was observed in the IHC-positive part compared to the negative part in another case (case 2). An increase in the ki-67 labeling index in the L858R-positive part in case 1 and increased apoptosis in the L858R-positive part in case 2 were observed, suggesting the functional significance of CNV changes.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：非小細胞肺癌 上皮成長因子受容体 tumor evolution 腫瘍内不均一性 次世代シーケンス 免疫染色 RT-PCR

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌においては、上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異や未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)融合遺伝子などの Driver 遺伝子変化を標的とした治療として、チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)をはじめ、様々な薬剤が開発されている。実際、EGFR 遺伝子変異陽性の再発・進行非小細胞肺癌における生存期間は、EGFR-TKI が開発される前と比べると約2倍近くまで延長している。

一方で、これら薬剤の病勢コントロール期間は約1年であり、ほとんど全ての症例で薬剤に耐性となることが知られている。EGFR-TKI における耐性のメカニズムとして、gate keeper の遺伝子変異 (T790M) や、シグナル伝達のバイパス作用 (MET 増幅や HGF の発現など)、上皮間葉移行の関与や小細胞癌への変化が明らかにされてきた。しかしながら、これらの耐性と、腫瘍内不均一性に着目した報告は少ない。T790M 変異については、EGFR-TKI 未治療の症例にも一部存在しており、この割合が TKI の奏効に影響を与えている可能性があるという報告がある (PMID 18785203)。

悪性腫瘍を構成する腫瘍細胞の不均一性は、治療への耐性や抵抗性を説明するモデルとして使われてきた。古典的な多段階発癌のモデルだけでなく、肺癌における EGFR 遺伝子変異や、ALK 融合遺伝子、慢性骨髄性白血病における BCR-ABL 融合遺伝子などの Driver 遺伝子変異による発癌モデルにおいても、腫瘍内の不均一性が注目されている。近年の遺伝子解析の進歩により、この不均一性が遺伝学的に証明されつつあり、AML の Patient-derived xenograft (PDX)モデルを用いた研究では、同一患者よりクローンの異なった PDX 系列を確立したと報告され (PMID 24613412)、腎細胞癌の症例研究では、原発巣内の異なった部位、及び転移巣からサンプリングされた組織間で、共通した VHL の変異の他に、異なった遺伝子変化を認め、遺伝学的な腫瘍内不均一性を証明している (PMID 22397650)。

2. 研究の目的

非小細胞肺癌においては、受容体型チロシンキナーゼを標的とした治療により、予後の改善が得られている。しかしながら、チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)の効果は短期的で、ほとんどの場合腫瘍細胞が耐性を獲得する事が判明している。現在のところ、TKI 治療前に、TKI の奏効期間、耐性化の機序を予測するバイオマーカーは、Driver 遺伝子変異以外には見つかっていない。本研究では、Driver 遺伝子変異を伴う肺癌において、腫瘍内の空間・時間的な不均一性と、それが TKI 治療の奏効に及ぼす影響について解析し、新たなバイオマーカーの発見と TKI 治療の新たな糸口を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

1. L858R 変異陽性肺腺癌の EGFR 変異蛋白の不均一発現

EGFR L858R 陽性肺腺癌の FFPE を用いて、免疫組織化学染色を用いて L858R 変異特異的蛋白の分布を調べる。

EGFR L858R 陽性の症例の FFPE を用いて、EGF Receptor (L858R Mutant Specific) (43B2) Rabbit mAb(CST)を一次抗体として反応させ、染色強度(score 0-3)で行い、腫瘍全体で染色 score の割合を記録。陽性細胞が存在し、かつ陰性細胞が10%以上を占める症例を不均一染色と評価した。

2. 同一腫瘍内の異なる2か所からの網羅的遺伝子解析

L858R 不均一染色症例を用いて、染色強度の異なる2か所で、それぞれ Oncomine Cancer Research Panel (SRL)によるターゲットシーケンスを行い、腫瘍関連遺伝子の変異の差異を検出する。

3. Tumor heterogeneity が細胞活性に与える影響の解析

遺伝学的不均一性を認めた症例で、細胞増殖を Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen Clone MIB-1 (M7240) (DAKO)を用いて Ki-67 index を、細胞死を in situ 細胞死検出キット フルオレセイン (Roche)によりそれぞれ評価する。

4. 研究成果

2014年1月から2015年12月に当科で外科切除を行われた、EGFR 陽性肺癌 (L858R 陽性)を対象とし、対象は20例であった。このうち3例は(15%)が、不均一染色であった (図1)。

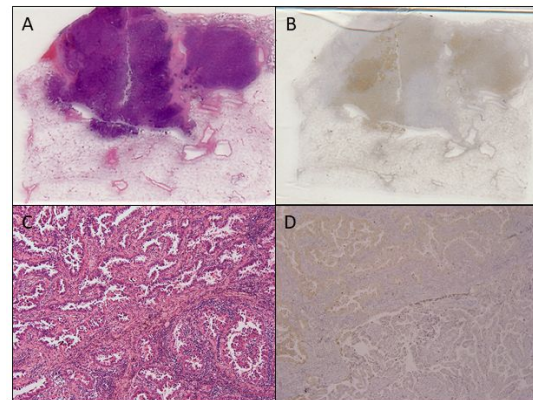


図1. 不均一染色の代表例

A: HE 染色ルーペ像, B: L858R 染色ルーペ像
C: HE 染色拡大像, D: L858R 染色拡大像

不均一染色症例において、染色陽性部と陰性部からそれぞれ核酸を抽出し、ターゲットシーケンスを行い、比較した結果、1例目は陽性部において EGFR と CCNE1 の CNV が陰性部よりも高値であった (EGFR: 陽性部 19.54/ 陰性部 3.03, CCNE1: 陽性部 18.59/

陰性部 2.59)。2 例目は陽性部において EGFR と MDM2 の CNV が陰性部よりも高値であった (EGFR: 陽性部 8.21/ 陰性部 2.90, MDM2: 陽性部 6.65/ 陰性部 4.37)。3 例目は CNV の変化は認めなかった。SNV に関しては 3 例とも不均一性を認めなかった。

1 例目で ki-67 染色を行ったところ ki-67 ラベルインデックスが陽性部で陰性部よりも高く (陽性部 60.5%/ 陰性部 16.5%) (図 2)、2 例目で TUNEL 染色を行ったところ、陽性部で陰性部よりも多く断片化 DNA によるシグナルが認められた (図 3)。

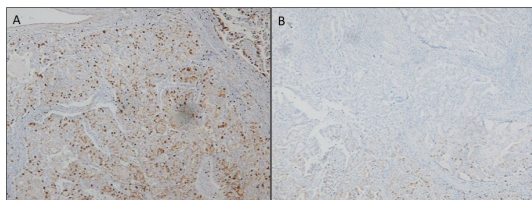


図 2 ki-67 染色 (1 例目)
A: L858R 染色陽性部, B: L858R 染色陰性部

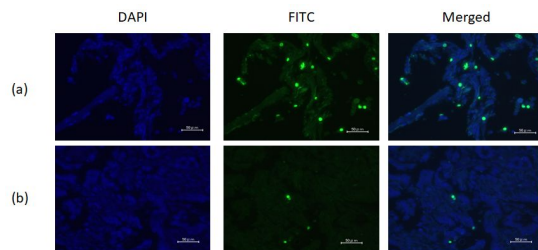


図 3 TUNEL 染色 (2 例目)
(a) L858R 染色陽性部, (b) L858R 染色陰性部

以上より、EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌において、コピー数の腫瘍内不均一性を有する症例を確認した。L858R 変異蛋白の発現の差は、EGFR コピー数の腫瘍内不均一性によるものと考えられた。また、EGFR と併存する遺伝子変異の腫瘍内不均一性により、細胞活性の差を生じている。これは臨床的に予後因子、効果予測因子となる可能性があると考えられる。

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 2 件)

Osoegawa A, Hashimoto T, Takumi Y, Abe M, Yamada T, Kobayashi R, Miyawaki M, Takeuchi H, Okamoto T, Sugio K. Acquired resistance to an epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) in an uncommon G719S EGFR mutation. Invest New Drugs. 査読有 2018 Mar 28, in press

Osoegawa A, Hiraishi H, Hashimoto T, Takumi Y, Abe M, Takeuchi H, Miyawaki M, Okamoto T, Sugio T. The

positive relationship between γ H2AX and PD-L1 expression in lung squamous cell carcinoma. 査読有 2018 32(1): 171-177

〔学会発表〕(計 15 件)

橋本 崇史、小副川 敦、安部 美幸、内匠 陽平、小林 良司、宮脇 美千代、武内 秀也、岡本 龍郎、杉尾 賢二・EGFR 陽性肺腺癌における腫瘍内不均一性の検討・第 58 回日本肺癌学会九州支部学術集会・第 41 回日本呼吸器内視鏡学会九州支部総会・2018/2/24

Osoegawa A, Hashimoto T, Takumi Y, Kobayashi R, Miyawaki M, Takeuchi H, Okamoto T, Sugio K. Acquired resistance to EGFR-TKI in the Lung Cancer. 2017/10/18

小副川 敦、橋本 崇史、内匠 陽平、安部 美幸、小林 良司、宮脇 美千代、武内 秀也、岡本 龍郎、杉尾 賢二・EGFR G719S 変異に対する EGFR-TKI 獲得耐性のメカニズム・第 76 回日本癌学会学術集会・2017/9/30

Osoegawa A, Yamada T, Hashimoto T, Takumi Y, Kobayashi R, Suehiro S, Miyawaki M, Takeuchi H, Okamoto T, Sugio K. Acquired resistance to EGFR-TKI in an uncommon G719S EGFR mutation. AACR Annual Meeting 2017. 2017/4/4

橋本 崇史、小副川 敦、安部 美幸、内匠 陽平、小林 良司、末廣 修治、宮脇 美千代、杉尾 賢二・EGFR 特異的抗体を用いた EGFR 変異蛋白の腫瘍内不均一発現の検討・第 117 回日本外科学会定期学術集会・2017/4/28

内匠 陽平、安部 美幸、小林 良司、橋本 崇史、末廣 修治、小副川 敦、宮脇 美千代、杉尾 賢二・非小細胞肺癌のリンパ節転移と FDG-PET の原発巣 SUV 値との関連の検討・第 117 回日本外科学会定期学術集会・2017/4/28

小副川 敦、橋本 崇史、内匠 陽平、小林 良司、末廣 修治、宮脇 美千代、杉尾 賢二・稀な EGFR 遺伝子変異 G719S 変異の TKI 耐性メカニズムに関する検討・第 117 回日本外科学会定期学術集会・2017/4/29

小副川 敦、橋本 崇史、内匠 陽平、安部 美幸、小林 良司、末廣 修治、宮脇 美千代、杉尾 賢二・ROCK 阻害剤を使ったヒト肺癌細胞の初代培養・第 57 回日本肺癌学会学術集会・2016/12/21

橋本 崇史、安部 美幸、内匠 陽平、小林 良司、末廣 修治、小副川 敦、宮脇 美千代、杉尾 賢二・当科における EGFR-TKI 耐性肺癌に対する Re-biopsy の現状・第 57 回日本肺癌学会学術集会・2016/12/20

小副川 敦、橋本 崇史、内匠 陽平、安部 美幸、小林 良司、末廣 修治、宮脇 美千代、杉尾 賢二・Invasive mucinous adenocarcinoma における遺伝子異常の解析・第 57 回日本肺癌学会学術集会・2016/12/20

小副川 敦、内匠 陽平、橋本 崇史、安部 美幸、宮脇 美千代、杉尾 賢二・肺扁平上皮癌における PD-L1 発現と DNA 損傷との関連・第 33 回日本呼吸器外科学会総会・2016/5/12

Osoegawa A, Hashimoto T, Takumi Y, Abe M, Hiraishi H, Suehiro S, Miyawaki M, Sugio K・Positive correlation between the gamma-H2AX and PD-L1 expression in lung squamous cell carcinoma.・AACR Annual Meeting 2016・2016/4/18

小副川 敦、平石 瞳美、内匠 陽平、安部 美幸、橋本 崇史、亀井 美玲、末廣 修治、宮脇 美千代、杉尾 賢二・肺扁平上皮癌における PD-L1 の発現に関する検討・第 116 回日本外科学会定期学術集会・2016/4/14

橋本 崇史、安部 美幸、末廣 修治、小副川 敦、宮脇 美千代、杉尾 賢二・EGFR-TKI 耐性肺腺癌に対する Re-biopsy による耐性機序の検討・第 56 回日本肺癌学会学術集会・2015/11/27

小副川 敦、橋本 崇史、内匠 陽平、安部 美幸、末廣 修治、宮脇 美千代、杉尾 賢二・小細胞癌転化を来した EGFR-TKI 治療後の獲得耐性肺腺癌の一例・第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会・2015/7/18

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 崇史 (HASHIMOTO, Takafumi)

大分大学・医学部・特任助教

研究者番号：40738126

(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

()

〔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：