

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07217

研究課題名(和文) 進行性肺腺がんに対する治療応答性に影響を与える遺伝要因の同定

研究課題名(英文) Identification of genetic factors with response to chemotherapy in advanced non-small cell cancer

研究代表者

白石 航也 (Shiraishi, Kouya)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：80609719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、内科的試料51例を用いて50遺伝子のホットスポット変異と治療応答性との関連について検討を行った。その結果、5%以上に遺伝子変異を認められたのは、EGFR遺伝子変異(21例)とTP53遺伝子変異(13例)であった。さらに解析対象となる症例を治療応答群(治療により腫瘍が30%以上縮小した)と不応答群(それ以外)の二群に分けて5%以上の頻度で変異が認められたEGFR変異並びにTP53変異に関して関連解析を実施した。その結果、EGFR変異を持つ症例では治療応答性が良い傾向を示し、TP53変異を持つ症例では治療応答性が悪い傾向を示したものの、統計学的に有意な差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は進行肺腺がん症例に対する治療効果に関わる遺伝子異常の同定を目的としており、同定された場合より効果の高い治療方法の選択に繋がると考えられる。内科試料よりDNA抽出を行ったが、DNA量並びに質が悪かったため目標症例数まで確保できなかった。しかしEGFR変異陽性肺腺がんでは化学療法応答性が良い傾向が示された。今後は術後再発された症例も加えて解析することで、本結果が再現されるか検証する予定である。

研究成果の概要(英文)：We performed the targeted sequencing of 51 DNA samples using the Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2. As a result of sequencing, genes detected in 5% or more genomic mutation were EGFR and TP53, and 21 patients with EGFR gene mutation and 13 patients with TP53 gene mutation in this study. Patients were divided into two categories: responders were those with complete response and partial response, and non-responders were those with stable disease and progressive disease. Next, we examined whether hotspot mutations in EGFR and TP53 genes were associated with response to chemotherapy in 51 advanced lung adenocarcinoma patients. Patients with the TP53 mutation tended to better respond to chemotherapy than patients without the TP53 mutation, however, the association was not statistically significance.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：治療応答性 遺伝子変異 肺腺がん 次世代シーケンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム研究の進歩により、複数の分子標的薬が開発されているが、一時的に劇的な効果が認められるものの、多くのがん患者が再発する。そのため、治療標的となる遺伝子変異が認められなかった進行性肺がん患者や再発した患者の多くが、二次治療として昔から使われてきた白金製剤を含む2剤併用療法を受ける。従って、状態管理が難しい高齢者や病状が思わしくない患者に対して、治療を受ける前に治療効果が期待できるようなバイオマーカーの同定は極めて重要である。申請者は、国立がん研究センター中央病院にて非小細胞肺がんと診断された進行性肺がん患者640例を対象に研究同意が得られた血液試料よりDNAを抽出し、TaqMan法などを用いて30個のDNA修復遺伝子多型を決定した。これらの多型情報と治療応答性との関連解析を行い、*TP53* 遺伝子多型が治療応答性と関連することを見出した (Shiraishi et al., J. Clin. Oncol., 2010)。一方で、治療応答性に関わると考えられるがん組織中でのmicroRNAが複数報告されているが、臨床検体を用いた検討は少なかった。そこで上記の640例の内、原発性肺がんに対する外科的治療を受けた後再発し、化学療法を受けた症例103例を抽出し、治療応答性を予測できる3つのmicroRNAを同定した (Saito et al., Clin. Cancer Res. 2014)。またStage IIIAで放射線化学療法を受けた非小細胞肺がん症例より得られた内科試料を用いた体細胞変異解析により、*EGFR* 変異を伴う場合とそれ以外と比べて場合予後が良好であり、一方で*KRAS* 変異を伴うとそれ以外と比べて予後が不良であることを報告した (Yagishita et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2015, Yagishita et al., Cancer Sci. 2015)。一方で、早期肺腺がん症例由来の200例の肺がん組織を対象とした全エクソーム・RNAシーケンスを行い、*ALK*融合、*ROS*融合、*RET*融合遺伝子を伴うがん組織中での遺伝子変異の蓄積が、*EGFR*変異肺腺がんや他のドライバー変異を伴う肺腺がんに比べて優位に遺伝子変異の蓄積が少ないことを明らかにした (Saito et al., Cancer Res. 2015)。また、2,000例近くの非小細胞肺がんを対象とした*HER2*並びに*BRAF*遺伝子の変異頻度を測定したところ、全体として数%に*HER2*, *BRAF*遺伝子変異が認められている (Suzuki et al., Lung Cancer 2015, Kinno et al., Ann. Oncol. 2014)。

以上のように今までの研究では手術検体を主に解析を行ってきたが、本研究では進行肺腺がん症例から診断のために採取された内科試料 (Biopsy sample) を用いてゲノム解析を行うことで、より現状に沿った治療応答性との関連性を検討した。

2. 研究の目的

進行性肺がんや術後に再発を来した患者の多くが白金製剤を含む2剤併用療法を受けるが、治療前に治療効果が分かれば、高齢者や病状が思わしくない患者に対する治療選択になりうる。そこで本研究では、

Stage III-IVの進行性肺腺がん症例を対象に診断目的に採取された余剰試料を用いて遺伝子変異検索を行い、白金製剤を含む2剤併用療法に対する治療応答性と体細胞由来の遺伝子異常との関連並びに体細胞と胚細胞変異との交互作用の有無について検討した。

この情報を基に、外科的手術を受けた早期肺腺がん症例 (既取得体細胞の遺伝子変異情報) と比べることで、術後再発・がんの進行度に関わる遺伝子異常の抽出・比較検討を行った。本研究では、化学療法施行前の内科試料を用いて50のがん関連遺伝子の変異を検索し、治療応答性や術後再発・がんの進展に関わる胚細胞・体細胞変異を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

2000年から2008年に国立がん研究センター中央病院にて進行肺腺がん症例と診断され、白金製剤を含む2剤併用療法を受けた549例を選別した。症例は、外科的手術を受けた後に再発を来した91例と初診で進行肺腺がんと診断された439例からなり、本研究では初診で進行肺腺がんと診断された症例を解析対象とした。439例の内、病理診断のために採取されかつ余剰生検試料が得られた183例を選択し、FFPEからのDNA抽出を行った。そのうち、Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2を行うために必要なDNA量1.5ng/ul 8ulに満たなかった91例を解析から除外し、92例をCancer Panelの解析対象とした。ライブラリー作成は、キットに添付されているプロトコールに従い行い、全例のシーケンスをIon Protonシステムを用いて行った。平均depth量が1000以上でかつシーケンスクオリティスコアであるQ20(1%で誤りが認められる確率)が全リードの90%以上を示した症

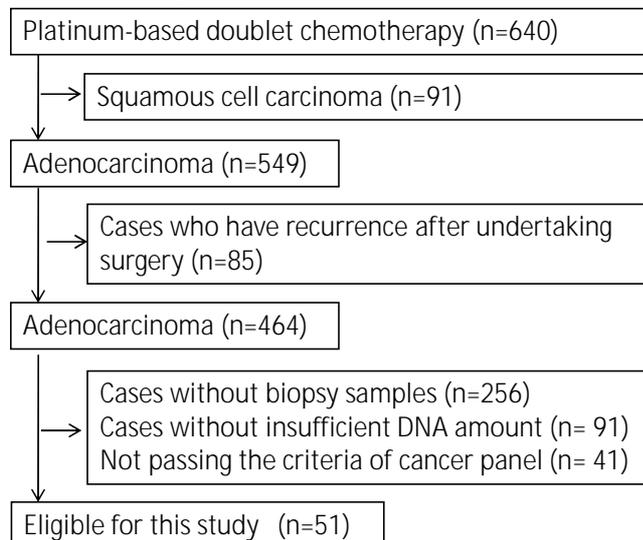


図1. 症例選択の流れ

例を Quality Control をパスした症例としたところ、最終的には 51 例となった (図 1)。Quality Control をパスしなかった理由としては、DNA が断片化したため、精度の高いシーケンスデータが得られなかったためと考えられる。選別された肺腺がん症例 51 例は、男性が 62.8%、非喫煙者が 36.4% を占めており、一般的な肺腺がんに類似する集団であることを確認した (Table 1)。

次に 51 症例で認められた遺伝子変異の意義付けを行う前に、まず遺伝子多型ではないことを確認するため、東北メディカルバンクに登録されている 3,552 例の健常群において、1% 以上で認められたバリエーションを除外した。さらに ClinVar で pathogenic もしくは likely pathogenic mutation として登録されているか、また OncoKB で oncogenic mutation と登録されている遺伝子変異群のみを抽出し、これらを病的意義のある変異とした。51 例の内、何かしらの遺伝子異常が認められた症例は 26 例であった。その中で、5% 以上に遺伝子変異を認めた遺伝子は EGFR 変異 (21 例) と TP53 遺伝子変異 (13 例) であった。さらに解析対象となる症例を治療応答群 (治療により腫瘍が 30% 以上縮小した) と不応答群 (それ以外) の二群に分けて 5% 以上の頻度で変異が認められた EGFR 変異並びに TP53 変異に関して関連解析を実施した。その結果、EGFR 変異を持つ症例では治療応答性が良い傾向を示し、TP53 変異を持つ症例では治療応答性が悪い傾向を示したものの、統計学的に有意な差は認められなかった。また TP53 遺伝子多型と TP53 体細胞変異との交互作用の有無を検討したものの、症例数が少なく、統計学的な有意差は得られなかった。

Table 1. Patient characteristics

Variable	No.	%
Total patients	51	
Age, years		
Mean (Standard deviation)	54.8 (9.3)	
Sex		
Male	31	62.8
ECOG performance status		
0	17	34.1
Smoking habit		
Never-smoker	16	36.4
Stage		
IIIB	10	23.1
IV	41	73.1
Tumor response		
Responder	18	36.1
PR	18	36.3
Non-responder	33	63.9
SD	13	36.3
PD	20	27.7

4. 研究成果

本研究において、内科的試料 51 例を用いて 50 遺伝子のホットスポット変異と治療応答性との関連について検討を行った。その結果、5% 以上に遺伝子変異を認めたのは、EGFR 変異 (21 例) と TP53 遺伝子変異 (13 例) であった。さらに解析対象となる症例を治療応答群 (治療により腫瘍が 30% 以上縮小した) と不応答群 (それ以外) の二群に分けて 5% 以上の頻度で変異が認められた EGFR 変異並びに TP53 変異に関して関連解析を実施した。その結果、EGFR 変異を持つ症例では治療応答性が良い傾向を示し、TP53 変異を持つ症例では治療応答性が悪い傾向を示したものの、統計学的に有意な差は認められなかった。以前の研究で、手術検体を用いた肺腺がん症例に対する体細胞変異解析により、約半数が EGFR 変異を伴う肺腺がんであることを示していることから、進行期では EGFR 変異陽性肺腺がんの頻度が低い可能性が考えられた。今後は外科的手術を受けた後に再発を来した 91 例に対して、50 遺伝子のホットスポット変異と治療応答性との関連について検討を行う予定である。また本研究で得られた遺伝子変異情報や治療応答性に関わる情報については、他研究にも二次利用した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Saito M, Shiraishi K, Goto A, Suzuki H, Kohno T, Kono K. Development of targeted therapy and immunotherapy for treatment of small cell lung cancer. Jpn J Clin Oncol. 2018; 48(7):603-608.
2. Saito M, Saito K, Shiraishi K, Maeda D, Suzuki H, Minamiya Y, Kono K, Kohno T, Goto A. Identification of candidate responders for anti-PD-L1/PD-1 immunotherapy, Rova-T therapy, or EZH2 inhibitory therapy in small-cell lung cancer. Mol Clin Oncol. 2018; 8(2):310-314.
3. Honda T, Sakashita H, Masai K, Totsuka H, Motoi N, Kobayashi M, Akashi T, Mimaki S, Tsuchihara K, Chiku S, Shiraishi K, Shimada Y, Otsuka A, Kanai Y, Okubo K, Watanabe S, Tsuta K, Inase N, Kohno T. Deleterious Pulmonary Surfactant System Gene Mutations in Lung Adenocarcinomas Associated With Usual Interstitial Pneumonia. 2018; JCO Precision Oncology
4. Lohavanichbutr P, Sakoda LC, Amos CI, Arnold SM, Christiani DC, Davies MPA, Field JK, Haura EB, Hung RJ, Kohno T, Landi MT, Liu G, Liu Y, Marcus MW, O'Kane GM, Schabath MB, Shiraishi K, Slone SA, Tardón A, Yang P, Yoshida K, Zhang R, Zong X, Goodman GE, Weiss NS, Chen C. Common *TDPI* Polymorphisms in Relation to Survival among Small Cell Lung Cancer Patients: A Multicenter Study from the International Lung Cancer Consortium. Clin Cancer Res. 2017; 23(24):7550-7557.

5. Goto A, Tanaka M, Yoshida M, Umakoshi M, Nanjo H, Shiraishi K, Saito M, Kohno T, Kuriyama S, Konno H, Imai K, Saito H, Minamiya Y, Maeda D. The low expression of miR-451 predicts a worse prognosis in non-small cell lung cancer cases. PLoS One. 2017; 12(7):e0181270.
6. George J, Saito M, Tsuta K, Iwakawa R, Shiraishi K, Scheel AH, Uchida S, Watanabe SI, Nishikawa R, Noguchi M, Peifer M, Jang SJ, Petersen I, Büttner R, Harris CC, Yokota J, Thomas RK, Kohno T. Genomic Amplification of *CD274* (PD-L1) in Small-Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res. 2017; 23(5):1220-1226.
7. Masai K, Tsuta K, Motoi N, Shiraishi K, Furuta K, Suzuki S, Asakura K, Nakagawa K, Sakurai H, Watanabe SI, Hiraoka N, Asamura H. Clinicopathological, Immunohistochemical, and Genetic Features of Primary Lung Adenocarcinoma Occurring in the Setting of Usual Interstitial Pneumonia Pattern. J Thorac Oncol. 2016; 11(12):2141-2149.
8. Saito M, Shiraishi K, Kunitoh H, Takenoshita S, Yokota J, Kohno T. Gene aberrations for precision medicine against lung adenocarcinoma. Cancer Sci. 2016; 107(6):713-20.

〔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

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。