

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15636

研究課題名(和文) 胸腺癌におけるトランスクリプトームおよび全コピー数解析、有効な薬剤の探索

研究課題名(英文) Comprehensive analyses of transcriptome and DNA copy number variations in thymic cancer

研究代表者

伊達 洋至 (Date, Hiroshi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60252962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現とコピー数をiClusterPlusを用い統合解析しクラスターにわけるとおおむね組織型にそって分類される一方、再発していない胸腺癌はタイプB2/3のクラスターに、再発したタイプB3胸腺腫は胸腺癌のクラスターに分類され、組織型にこれらの遺伝子発現・コピー数異常解析結果を追加することで予後予測に有用なデータが得られることが示された。今後は遺伝子データの解析に加えわれわれの有する組織標本を用いた免疫染色にて胸腺癌に特徴的なタンパク発現について検討を行いたい。

研究成果の概要(英文)：The analyses of the expressions of mRNA and the copy number variation of DNA in thymic epithelial tumors were performed by using HTA2.0 and Oncoscan of Affymetrix, and were integrated by the software, iClusterPlus. The unsupervised clustering showed that these samples were almost classified into the groups according to their histological types. Furthermore, the recurrent case of type B3 thymoma was classified to the group of type C. On the other hand, type C thymic cancer without recurrence was classified to the group of type B2/3. These results proved that integrated data of mRNA and CNV of DNA in addition to the histological types probably work as the more accurate prognostic factor.

In future, we have a plan that the molecular expressions specific to thymic carcinoma are examined by immunohistochemical stainings of our clinical samples and integrated with the analyzed genetic data.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：胸腺癌 トランスクリプトーム DNAコピー数変化 胸腺上皮性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

胸腺癌は、胸腺上皮性腫瘍の中でも非常に稀であり、有効な治療法が現在でも未確立で、予後不良な疾患である。本邦の胸部外科学会による全国的な調査報告によれば2012年度に切除された胸腺癌は271例であり、全胸腺上皮性腫瘍切除例の約6%となっている(日本胸部外科学会年次報告、2012)。早期にリンパ節転移、遠隔臓器転移を来し、発見時に既にadvanced stageであることも珍しくない。このような疾患に対しては手術以外に放射線、化学療法の併用といった集学的治療法が必要となってくる。既報ではカルボプラチンとパクリタキセル併用療法の有効性が示されているが、奏効率は21.7%と十分ではない(Lemma et al, JCO2011)。また実臨床において有効な分子標的治療薬は報告されておらず、新たな治療標的の選定が期待されている。これまでの報告で次世代シーケンサーによる胸腺癌の全遺伝子変異解析が行われてはいるが、遺伝子変異数は少ないことが示された(13.5%; Asao et al., 2016)。コピー数異常と遺伝子変異の頻度は反比例すると報告されており(Ciriello et al., 2013)、胸腺癌の発症には主としてはコピー数異常が強く関与していると考えられた。

2. 研究の目的

DNA Microarray を用いて胸腺癌の網羅的遺伝子発現および全コピー数検索を行い、これらの異常を胸腺腫症

例と比較することにより、胸腺癌発症に關与する細胞内シグナルの経路を推定するとともに、治療ターゲットとなりうるタンパクを検索し、有効な治療薬(とくに分子標的治療薬)の発見に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

2009年以降に当院で行われた胸腺上皮性腫瘍(胸腺癌、タイプA胸腺腫およびタイプB2/B3胸腺腫)のFFPE標本よりDNAおよびRNAを抽出し、コピー数についてはOncoScan、遺伝子発現についてはGeneChip HTA2.0(いずれもThermo Fisher Scientific Inc.)を用いて検出を行う。コピー数異常解析にはNexus expression for OncoScan (BioDiscovery)を、遺伝子発現解析にはTranscriptome Analysis console (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用い、両者の統合解析にはR(主としてiCluster)を使用する。以上の解析より見出された遺伝子領域に存在するタンパクに対し、当科の保有するTissue Microarrayを用い免疫染色を行い、その発現と組織型、予後との関連を検索する。また胸腺癌細胞株を樹立し、それらのタンパクに対し操作を加えることで細胞への影響を調べ、最終的には有効な薬剤の検索を行う。

4. 研究成果

まず本研究においてはFFPEより抽出したDNA, RNAを使用しており、特にRNAでは断片化が進んでいたが、DNA microarrayを用いることで十分に検

討に耐えうるデータが得られることが示された。コピー数異常解析ではタイプ A 胸腺腫ではほとんどコピー数異常を認めなかったが、タイプ B2/B3 胸腺腫および胸腺癌では、Ch1q gain および Ch6 の loss を両者にみとめ、胸腺腫と胸腺癌の連続性を示唆する所見が認められた一方で Ch16q loss は胸腺癌に特異的な所見であり、胸腺癌の発症に関与する領域と考えられた。また遺伝子発現とコピー数を iCluster を用い統合解析しクラスターにわけるとおおむね組織型にそって分類される一方、再発していない胸腺癌はタイプ B2/3 のクラスターに、再発したタイプ B3 胸腺腫は胸腺癌のクラスターに分類され、組織型にこれらの遺伝子発現・コピー数異常解析結果を追加することで予後予測に有用なデータが得られることが示された。われわれは胸腺癌の発症に関しては CH16 loss に注目しており、この領域には CYLD, CBFB, CDH1, CDH11, CTCF, ZFX3 といった腫瘍抑制に関連する遺伝子が存在するが、今回のコピー数異常・遺伝子発現統合解析においてはこれらの遺伝子の特定には至らなかった。

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 件)

Kobayashi M, Huang CL, Sonobe M,

Kikuchi R, Date H. Ad-shWint2b vector therapy demonstrates antitumor activity in orthotopic models as monitored with the invitro imaging system (IVIS). *Anticancer Res* 36(11):5887-5893, 2016

Kitamura Y, Suzuki K, Teramukai S, Sonobe M, Toyooka S, Nakagawa Y, Yokomise H, Date H; Japanese Association for Chest Surgery. Feasibility of pulmonary resection for lung cancer patients with coronary artery disease or atrial fibrillation. *Ann Thorac Surg* 103(2):432-40, 2017

Cho H, Matsumoto S, Fujita Y, Kuroda A, Menju T, Sonobe M, Kondo N, Torii I, Nakano T, Lara PN, Gandara DR, Date H, Hasegawa S. Trametinib plus 4-methylumbelliferone exhibits antitumor effects by ERK blockade and CD44 downregulation and affects PD1 and PD-L1 in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol* 12(3):477-90, 2017

Okumura N, Sonobe M, Okabe K, Nakamura H, Kataoka M, Yamashita M, Nakata M, Kataoka K, Yamashita Y, Soh J, Yoshioka H, Hotta K, Matsuo K, Sakamoto J, Toyooka S, Date H. Feasibility of adjuvant chemotherapy with S-1 plus carboplatin followed by single-agent maintenance therapy with S-1 for completely resected non-small-cell lung cancer: results of the Setouchi Lung Cancer Group Study 1001. *Int J Clin Oncol* 22(2) : 274-82, 2017

Sowa T, Menju T, Chen-Yoshikawa TF, Takahashi K, Nishikawa S, Nakanishi T, Shikuma K, Motoyama H, Hijiya K, Aoyama A, Sato T, Sonobe M, Harada H, **Date H**. Hypoxia-inducible factor 1 promotes chemoresistance of lung cancer by inducing carbonic anhydrase IX expression. *Cancer Med* 6(1):288-97, 2017

Rokutan-Kurata M, Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Menju T, Momose M, Koyama M, Shigeto S, Fujimoto M, Zhang M, Morita S, **Date H**, Haga H. Lung adenocarcinoma with MUC4 expression is associated with smoking status, HER2 protein expression, and poor prognosis: clinicopathologic analysis of 338 cases. *Clin Lung Cancer* 18(4):e273-e281, 2017

Matsuo Y, Shibuya K, Okubo K, Ueki N, Aoyama A, Sonobe M, Nakamura M, Mizowaki T, **Date H**, Hiraoka M. Long-term outcomes of intensity-modulated radiotherapy following extra-pleural pneumonectomy for malignant pleural mesothelioma. *Acta Oncol* 56(7):957-62, 2017

Kayawake H, Chen-Yoshikawa TF, Aoyama A, Motoyama H, Hijiya K, Menju T, Sato T, Sonobe M, **Date H**. Excellent outcome of donor lobectomy with various surgical techniques for the interlobar artery. *Eur J Cardiothorac*

Surg 51(2):279-83, 2017

Nakajima N, Yoshizawa A, Kondo K, Rokutan-Kurata M, Hirata M, Furuhashi A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Menju T, Momose M, Fujimoto M, **Date H**, Haga H. Evaluating the effectiveness of RNA-in situ hybridization for detecting lung adenocarcinoma with anaplastic lymphoma kinase rearrangement. *Histopathology* 71(1):143-9, 2017

Neri S, Miyashita T, Hashimoto H, Suda Y, Ishibashi M, Kii H, Watanabe H, Kuwata T, Tsuboi M, Goto K, Menju T, Sonobe M, **Date H**, Ochiai A, Ishii G. Fibroblast-led cancer cell invasion is activated by epithelial-mesenchymal transition through platelet-derived growth factor BB secretion of lung adenocarcinoma. *Cancer Lett* 395:20-30, 2017

〔学会発表〕(計 3件)

Takao Nakanishi, IASLC 17th World Conference on Lung Cancer (December 4 - 7 2016, Vienna, Austria); Comprehensive copy number alteration and gene expression analysis of surgically resected thymic carcinoma

Takao Nakanishi, 8th International Thymic Malignancy Interest Group Annual Meeting (September 21 - 23, 2017, Torino, Italy); Copy Number Alteration and Gene Expression

analysis of surgically resected
Thymic Carcinoma

中西崇雄、第 33 回日本呼吸器外科学
会総会 (2016 年 5 月 12 日 ~ 13 日、
京都); 当院における胸腺癌術後再発
因子の検討

〔 図書 〕 (計 件)

〔 産業財産権 〕

出願状況 (計 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 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 〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊達洋至 (DATE HIROSHI)

(京都大学 ・ 医学研究科 ・ 教授)

研究者番号 : 60252962

(2) 研究分担者

園部誠 (SONOBE MAKOTO)

(京都大学 ・ 医学研究科 ・ 准教授)

研究者番号 : 00432378

毛受暁史 (MENJYU TOSHI)

(京都大学 ・ 医学研究科 ・ 助教)

研究者番号 : 30527081

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()