

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：82123

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08754

研究課題名(和文) 喀痰材料を用いた肺癌発見率の向上への試み

研究課題名(英文) Improving the detection rate of lung cancer using sputum sample

研究代表者

南 優子 (Minami, Yuko)

独立行政法人国立病院機構茨城東病院(臨床研究部)・病理診断部・病理診断部長

研究者番号：20466676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：喀痰に含まれる核酸を用いた新しい診断法の開発を目的とした。収集した喀痰検体611例よりDNAを抽出し、濃度100ng/ul以上かつClassIV,Vの腺癌5例、扁平上皮癌5例、Class I,II5例を用い48癌遺伝子パネルを用いAmplicon sequenceを行った。結果、腺癌、扁平上皮癌でALK, KDR, PTEN, KRAS, FLT3, RB1, TP53, ABL1の8遺伝子9lociで変異が見つかり、一方で年齢、遺伝子変異数は正の相関を示すことを見出した。以上より喀痰から 遺伝子解析に耐えうるDNAの抽出が可能であり、発癌を予測できる遺伝子変異を検出する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抽出が難しい高粘度の基質を有する喀痰より次世代シーケンスに耐えうる品質、量のDNAを抽出し、がん関連遺伝子を検出できたことは学術的意義が高い。また、喀痰細胞診検査は通常の診療に加え、検診の場でも用いる手技であり、形態診断として診療、検診で用いた後は残余検体が出る。通常は廃棄されるものであるがこの残余検体から発がんに関わるがん関連遺伝子を追加情報として得られ、肺がんの早期発見ないしは高リスク患者を検出できる可能性がある。検診の場で用いれば、被験者に侵襲がなく、簡便に行える検査で、肺がん高リスク患者を抽出、追跡し肺がんを早期発見できれば、医療経済に貢献できる点、本研究は社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a new diagnostic method using sputum sample that contained with tumor cell used for morphological diagnosis but also the fragment of nucleic acids from tumor cell. DNA was extracted from the collected 611 cases of sputum. Among 611 samples collected, 15 samples including 5 adenocarcinoma (Class IV and V), 5 squamous cell carcinoma (Class IV and V), and 5 non-neoplastic diseases (Class I or II) were examined by amplicon sequence. More than 6600ng DNA could be extracted from each case. As results, we found oncogenic mutation in 9 loci of 8 oncogenes of ALK, KDR, PTEN, KRAS, FLT3, RB1, TP53, and ABL1 in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in each, and found that age and the number of gene mutations showed a positive correlation. As conclusions, it was possible to extract DNA from sputum that can withstand genetic analysis, and the analysis of many cases has showed the possibility of detecting gene mutations that can predict carcinogenesis.

研究分野：肺腫瘍病理

キーワード：喀痰 がん関連遺伝子 遺伝子変異 DNA 次世代シーケンス(NGS)

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

国立がん研究センターがん対策情報センターの報告では肺癌の罹患数は2014年時点の死亡数は男性第1位、女性第2位と高い死亡率を示している。また肺癌検診率は2010年では男性26.4%、女性23%であったが、2013年には男性47.5%、女性37.4%と胃癌、大腸癌、乳癌、子宮癌の中で最も高い検診率を示している。しかしながら、国の指針による肺癌の1次検診として行われている喀痰による検診は発見率が平均0.1%程度と低くその有効性が問題視されている。

本研究に関わる研究施設がある茨城県内の肺がん検診も平成元年の11,394人をピークに減少していて、発見者数の減少がみられるものの発見率は0.1~0.2%で推移し、受診者の減少がみられても発見率の変化は乏しい。

また肺癌の発生と深く関連する喫煙率は2014年度で男性32.2%、女性8.5%(成人喫煙率、国立がん研究センターがん対策情報センター)と緩やかに低下はみられるものの、諸外国との比較では未だ高い喫煙率を示している。近年、高分解能CTなどの画像診断機器の進歩により肺末梢での腫瘍の早期診断が可能となり、早期発見早期治療に結びつくようになった。しかしながら近年広く普及している肺癌のCT検診は肺末梢に発生する腺癌の発見には適した機器であるが、肺門部の肺癌はみつきりにくく、肺門部発生 of 肺癌の発見に効果がある喀痰細胞診の役割はいまだ大きいといえる。

一方で、喀痰検診に用いられる喀痰には、細胞診で発見される癌細胞以外にも腫瘍細胞産物、破壊物が含まれている可能性が高く、被験者の肺内の環境を表している貴重な試料である。現在まで、喀痰を用いた細胞診断は喀痰に含まれる異型細胞を形態学的に診断してきたが、本研究では細胞のみならず喀痰に含まれる核酸を用いた新しい診断法の開発を行うことが目的で、患者に対する侵襲性がない。実際、採取された喀痰は通常は全量を診断には用いず、標本作成後の残余検体は廃棄されているので、廃棄される試料をさらに有効的に利用できるようになるのは、患者にとって診断の機会が増すことにつながる。最終的に検診に用いられている喀痰細胞診断の診断率を向上させることは肺がんの早期発見のために重要で必要性が高い。我々は過去にp16, APC, RAR のメチル化が肺癌患者の喀痰で有意に多くみられることを報告した。(Cancer:2004)さらに、極めて初期の肺腺癌に観察されるゲノム異常としてECT2 遺伝子の増幅、タンパク発現の亢進があること、気管支擦過および気管支洗浄細胞診検体に含まれる癌細胞をStratifin やOCIAD2 で免疫染色を行うことで癌の検出率を向上させること、DNMT3a の免疫染色は腺癌の予後と相関があることなどを報告している。(Cancer Sci:2014, Cytopathology:2015, Lung cancer:2016)そこで、我々はこれまでの研究結果をさらに発展させ、喀痰を細胞診断のみの診断材料として用いる他に、喀痰中の癌細胞関連核酸を用いた安価でかつ簡易な診断法を開発し、肺癌高危険群の抽出や、癌そのものの発見率向上を目指し、効果的なスクリーニングや分子標的薬のための再生検に代わる方法としての一助も担いたい。

## 2. 研究の目的

簡易な方法で採取できる喀痰での癌発見率を向上させるため、診断後廃棄される喀痰検体を用いて、遺伝子変異の解析を行って、癌の発見及び癌発生高危険群の抽出を試み、喀痰材料を用いた肺癌発見率の向上を図る。

将来的には得られた結果を利用して実際に茨城県総合健診協会で行われている喀痰検診に応用し、肺癌発見あるいは検診の効率化に資するか否かを検証することを最終目標とする。

### 3. 研究の方法

本研究は筑波大学医の倫理審査委員会および国立病院機構茨城東病院胸部疾患・療育医療センターで承認を受けた。

#### (1) 診断後残余喀痰検体の収集

- ・ サコマノ畜痰法(3日間連続早朝畜痰)を用いて提出された喀痰の診断後残余検体を用いた。

#### (2) 喀痰よりDNAを抽出

- ・ 喀痰 1500ul を 2000rpm、5分遠心する。
- ・ 上清を取り除き、その後沈渣と上清の一部を混濁し、全体量を 180ul 試料とする。
- ・ 180ul 試料にプロテイナーゼ K 溶液 (Promega)20ul を加える。
- ・ 56 90分で加温する。
- ・ MagLead 6GC (Precision System Science)を用い、DNAを抽出する。
- ・ Nano drop (Thermo Scientific)でDNA濃度を定量する。

#### (3) 次世代型シーケンス法で class I, II (陰性) 喀痰と class IV, V (陽性) 喀痰の遺伝子変異差の比較

- ・ DNA 濃度 100ng/ul 以上の検体かつ
- ・ 最終組織診断が腺癌であった症例 5 例、扁平上皮癌であった症例 5 例、悪性腫瘍が確認されなかった症例 5 例を選択する。
- ・ Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Thermo Fisher Scientific, USA).を用い、NextSeq500(Illumina CO, USA)でシーケンスを行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 診断後残余喀痰検体の収集

2019年度末までに611例の喀痰からDNAが抽出できた。class I, II 403例、class III 99例 class IV, V 60例、判定不能49例を集積した。喀痰以外の検体で最終的に悪性診断がついたものは Class I, II 中 101例(腺癌(AD)41例、扁平上皮癌(SQ)33例、小細胞癌(SM)10例、その他(Other)17例)、Class III 中 64例(AD 17例、SQ 28例、SM 10例、Other 9例)で、Class IV, V の中で組織型はAD 22例、SQ 23例、SM10例、Other 5例であった。(表1)

#### (2) 喀痰よりDNA抽出

喀痰よりDNAが抽出できた症例は611例である。内訳を表2に示す。抽出できなかった症例は粘度が高く沈渣が分離できず、上清が取り除けなかったものやDNA抽出中に粘度が高いためチップが詰まってしまい、最終的に抽出できなかったもの、また喀痰が採取できておらず、細胞診でも細胞が確認できなかったものがみられた。

(3) 次世代型シーケンス法で class I, II (陰性) 喀痰と class IV, V (陽性) 喀痰の遺伝子変異差の比較

表3に示す15症例の検体を用い、次世代シーケンス法で解析し、以下の結果を導き出した。

1: 腺癌(AD)、扁平上皮癌(SQ)で ALK, KDR, PTEN, KRAS, FLT3, RB1, TP53, ABL1 の8遺伝子9 loci に共通する変異を見出した。なお、KDR, P53 は SNP であり、Class I, II の悪性否定 (NC) でも見出された。(表4)

2: 癌症例10例を含む全症例15例でいずれも年齢と遺伝子変異数は正の相関を示すことを見出した。(表5) 年齢とともに変異遺伝子数は増加し、相関係数0.74931 と高い相関を示した(図1)

表1 喀痰検体内訳

表2 喀痰検体の属性、DNA量および品質

	症例数	症例数	悪性症例数	組織型	全体(歳)	男性(歳)	女性(歳)	抽出DNA平均量 (ng/ul)	抽出DNA平均 A260/280
全症例数	611								
Class I, II		403							
* 腺癌			41	年齢	70.6				
* 扁平上皮癌			33	検体数	611	438	173	153.6	1.7743
* 小細胞癌			10	保留		26	23		
* その他			17	Class I, II		284	119	204.4	
Class III		99		Class III		83	16	206.9	
* 腺癌			17	Class IV, V		45	15	148.9	
* 扁平上皮癌			28	SQ		19	4	263.8	
* 小細胞癌			10	AD		13	9	143.9	
* その他			9	SM		8	2	148.5	
Class IV, V		60		Other		5	0	420.9	
腺癌			22						
扁平上皮癌			23						
小細胞癌			10						
その他			5						
判定不能		49							

\* 別の検体で診断された最終組織型

SQ:扁平上皮癌、AD:腺癌、SM:小細胞癌

表3 次世代シーケンスに用いた検体

	年齢	細胞診Class	組織型または疾患名	DNA量 (ng/ul)
1	66	IV	扁平上皮癌	540
2	65	IV	扁平上皮癌	253
3	70	V	扁平上皮癌	678
4	78	IV	扁平上皮癌	353
5	64	V	扁平上皮癌	167
6	73	V	腺癌	138
7	71	IV	腺癌	210
8	72	V	浸潤性粘液腺癌	369
9	67	V	腺癌	133
10	70	V	腺癌	132
11	93	I	陳旧生肺炎	145
12	94	II	気管支炎	492
13	86	II	肺炎	406
14	75	I	気管支炎	505
15	56	I	気管支拡張症	433

表 4 次世代シーケンスで検出した遺伝子変異

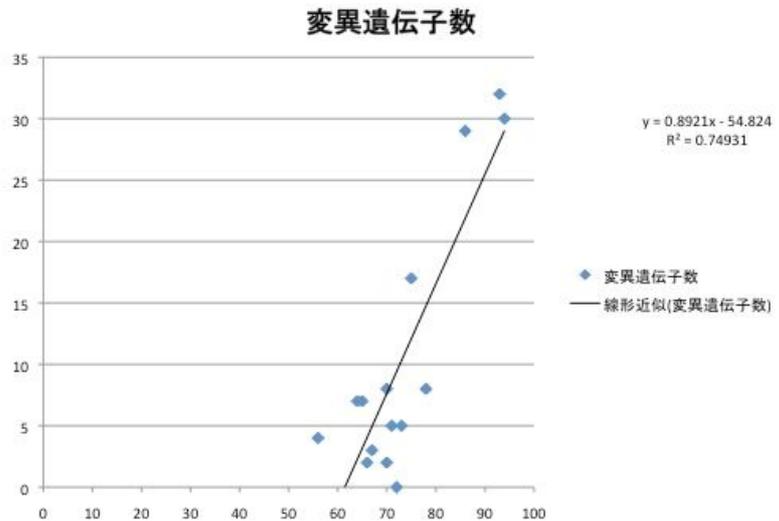
癌と悪性疾患否定症例で共通する変異がみられる遺伝子										
	ABL1 937A>C	ALK 3803T ins G	KDR 1416A>T SNP	PTEN 682A>G	PTEN 684_685insC	KRAS 11A>C	FLT3 1983A>T	RB1 2039T>C	TP53 215C>G SNP	
症例	I313L	G1269fs	Q472H	N228D	S229fs	Y4S	E661D	I680T	P72R	
SQ	1		133/133					6/71		
	2						14/30			
	3		24/60	340/650	30/43			36/436	9 /024	
	4		9 /24	172/345	18/21	27/30	9/32	9/21	14/201	27/41
	5		13/32	350/350	14/21	15/21	7/33	11/27	24/255	68/68
AD	6		12/031	146/294	13/21	19/26	7/27		13/205	26/36
	7	19/23				14/22	13/42		16/221	44/49
	8	16/21				18/29	5 /20		19/168	31/39
	9							8 /25	5/85	31/33
	10	146/157				146/162				
NC	11			4423/8396					2059/2059	
	12								6566/6570	
	13								9285/9294	
	14			3128/6135					1502/1502	
	15			404/790					171/171	

各症例の遺伝子セル内の数値はヒット数/リード数を示す。

表 5 年齢と遺伝子変異数

図 1：年齢と変異遺伝子数は正の相関を示す。

年齢	遺伝子変異数
56	4
64	7
65	7
66	2
67	3
70	8
70	2
71	5
72	0
73	5
75	17
78	8
86	29
93	32
94	30



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 南優子
2. 発表標題 肺癌早期発見に向けた喀痰を用いた遺伝子解析
3. 学会等名 第34回茨城臨床細胞学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南優子
2. 発表標題 Application of next-generation sequencing for screening of sputum samples
3. 学会等名 2019 World conference of Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南優子
2. 発表標題 肺癌検診及び診断の現状と今後の課題病理
3. 学会等名 第39回日本画像医学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	野口 雅之  (Noguchi Masayuki)  (00198582)	筑波大学・医学医療系・教授    (12102)	