

令和 4 年 9 月 13 日現在

機関番号：87105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10482

研究課題名(和文) 肺癌の個別化ゲノム医療に向けた定位放射線治療感受性のバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Biomarker of radiation sensitivity for precision genomic medicine in stereotactic radiotherapy for lung cancer

研究代表者

大賀 才路 (OHGA, SAIJI)

独立行政法人国立病院機構九州医療センター(臨床研究センター)・その他部局等・放射線科医長

研究者番号：90380427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Stage I 原発性肺癌に対して定位放射線治療を行った症例の遺伝子発現異常と治療成績の関連性を確認する研究では対象4症例全例に再発を認めなかった。そのため、非小細胞肺癌の遺伝子発現と放射線感受性との関連をみるため、公共データベースにおける非小細胞肺癌株の遺伝子発現のデータと論文で報告されている放射線感受性データを用いて Gene set enrichment 解析を行った。その結果、放射線抵抗性の肺腺癌細胞株において G2/M チェックポイント関連遺伝子群や転写関連因子 E2F の標的遺伝子群が有意に抑制されていたが、扁平上皮癌では有意な遺伝子群は抽出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非小細胞性肺癌の遺伝子発現と放射線感受性との関連を解析し、肺腺癌において放射線治療抵抗性と G2/M チェックポイント関連遺伝子群や転写関連因子 E2F の標的遺伝子群とが関連していることが判明した。本研究の結果から非小細胞性肺がんの遺伝子発現の状態によっては放射線治療における治療戦略の調整が必要なが示唆された。本研究の結果はこれからの非小細胞性肺癌の個別化ゲノム医療において有意な結果と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the association between abnormal gene and treatment outcomes in 4 patients who treated by stereotactic radiotherapy for stage I lung cancer. However, there were no recurrence of all patients. Therefore, we analyzed the associations between gene expression and radiation sensitivity by using public data of gene expression of lung cancer cell line and report data of radiation sensitivity. G2/M checkpoint related gene and transcription related factor E2F gene were suppressed significantly in radiation resistant lung adenocarcinoma. However, there were no significant factors in lung squamous cell carcinoma.

研究分野：放射線治療

キーワード：原発性肺癌 定位放射線治療 mRNA 遺伝子発現異常

研究当初の背景

肺癌は癌による死亡者数第1位の高頻度・高悪性度の癌であり、臨床病期や患者の医学的背景に応じて放射線治療を行うが、治療抵抗性であり、耐性獲得機構の解明が喫緊の課題である。様々な癌において、放射線治療に対する耐性獲得機構に遺伝子異常が関与することは知られているが、肺癌における耐性のドライバーとなる原因遺伝子(機構)は解明されていない。癌の「治療耐性のドライバーとなる遺伝子異常」を捉えるために、実際の肺癌放射線治療症例を対象とした包括的な遺伝子解析手法が必須である。

研究の目的

本研究では、I期肺癌に対して実施される定位放射線治療抵抗性に寄与する癌の遺伝子異常を明らかにする。肺癌の放射線治療症例を対象とした包括的な遺伝子解析手法を用いて、肺癌における耐性のドライバーとなる原因遺伝子(機構)の解明を目的とする。次世代シーケンサーで包括的遺伝子解析する新たな手法を用いる。

研究の方法

- (1) 原発性肺癌に対する組織学的確定診断を得るために、CTガイド下針肺生検を行う。日常診療においては通常ひとつの腫瘍より複数の検体(通常3検体程)を採取するが、そのうち診断で用いた後の余剰分を分割し、最大で2検体(凍結保存とホルマリン固定)を本研究用に用いる。なお生検検体が1検体であった場合は凍結保存用のみとする。
- (2) 組織学的に肺癌であることが確定した症例については、凍結保存した検体から total RNA および genome DNA を抽出する。癌組織より抽出した total RNA は、定位放射線治療の感受性を規定する遺伝子の mRNA 発現異常を網羅的に検出するために発現アレイを行う。一方、genome DNA に関しては放射線治療感受性との関連が報告されており、非小細胞肺癌で高頻度に体細胞変異を認める *NFE2L2* 変異や *KEAP1* 変異の有無を各症例で次世代シーケンサーにて検出する。ホルマリン固定を行った生検検体に関しては、mRNA で検出された遺伝子発現異常の蛋白レベルでの発現を評価するために免疫染色を行う。
- (3) 上記により得られた各症例の肺癌細胞における遺伝子発現レベルおよび *NFE2L2*・*KEAP1* 遺伝子の体細胞変異の有無の結果を用い、定位放射線治療の治療効果との関連を解析し、治療感受性に寄与する遺伝子異常を明らかにする。

研究成果

倫理審査通過後、臨床病期I期の非小細胞肺癌に対する体幹部定位放射線治療 48 Gy/4回を実施した4名の患者から、研究参加の同意取得後に放射線治療開始前のCTガイド下針肺生検によって得られた腫瘍組織のうち余剰試料を本研究に用いた。臨床検体由来の腫瘍 RNA は、質の担保が難しく、さらに針肺生検由来の腫瘍サンプルは微量であるが、遺伝子発現解析を行う品質・量を確保できた。その詳細を以下に示す。

分解されていない高品質の腫瘍 RNA を得るために、針肺生検で採取された腫瘍組織の一部を、採取後直ちに RNAlater に十分浸透後に凍結し、新鮮凍結検体を得た。4 症例のうち病理組織学的に腺癌の診断が得られた肺癌 1 例の腫瘍組織において total RNA の抽出を行った。抽出した RNA の濃度は 75ng/μl (サンプル量 : 30 μl) NanoDrop を用いた吸光度の測定では、A260/280 は 2.02 であり、タンパク質・フェノールの混入は認められなかった。A260/230 は 1.28 であり、吸光スペクトルに問題なく、スピンカラム抽出のためバッファーなどの残存・混入は否定的と考えられた。

研究開始当初は、定位放射線治療後の「再発群」対「非再発群」による遺伝子発現プロファイルの比較検討により、放射線治療の効果にかかわる遺伝子異常を検出する予定であった。しかし、観察期間内で再発例はなく、4 例全てで良好な治療効果を認めたことから、「再発群」対「非再発群」の比較検討は困難と考えられた。

そこで、非小細胞肺癌の細胞株を用いた解析を行い、放射線感受性にかかわる遺伝子発現の特徴を同定する方針とした。初めに RNA シークエンスによって算出された様々な肺癌細胞株における約 19000 遺伝子の mRNA 発現を、the Cancer Dependency Map portal サイト (<https://depmap.org/portal/>) より得た。続いて、様々な肺癌細胞株の *in vitro* 放射線感受性データは既報 (1) より抽出した。この *in vitro* 放射線感受性データは、広く実施されているコロニー形成法に基づく放射線照射後の生存曲線と近似した結果を示す、高スループットプラットフォームを用いられ算出され、感受性データとして妥当な結果と評価されている。最終的に、69 種の非小細胞肺癌細胞株の遺伝子発現データならびに放射線感受性データの両者を取得できた。非小細胞肺癌細胞株 69 種のうち、50 種の肺腺癌細胞株 (表 1) と、19 種の肺扁平上皮癌 (表 2) それぞれについて、組織型別に解析を実施した。

表 1 : 肺腺癌の細胞株一覧 (50 種の細胞株)

CALU3	CORL105	EKVX	HCC1171	HCC1833
HCC2108	HCC2279	HCC2935	HCC4006	HCC44
HCC78	HCC827	HOP62	MORCPR	NCIH1355
NCIH1373	NCIH1395	NCIH1435	NCIH1563	NCIH1568
NCIH1573	NCIH1623	NCIH1650	NCIH1651	NCIH1666
NCIH1755	NCIH1781	NCIH1792	NCIH1793	NCIH1838
NCIH1944	NCIH1975	NCIH2030	NCIH2087	NCIH2122
NCIH2228	NCIH2291	NCIH23	NCIH2342	NCIH2405
NCIH322	NCIH358	NCIH522	NCIH650	NCIH838
PC14	RERFLCAD1	RERFLCAD2	RERFLCMS	SW1573

表 2 : 肺扁平上皮癌の細胞株一覧 (19 種の細胞株)

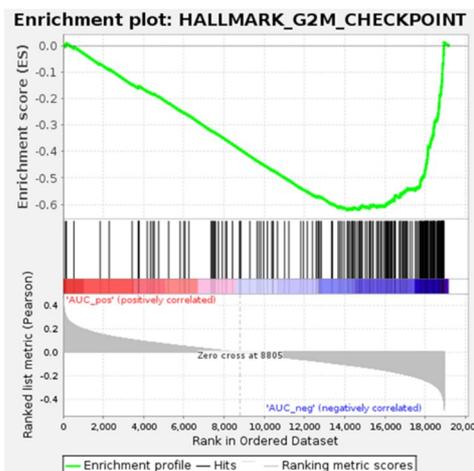
CALU1	EBC1	EPLC272H	HARA	HCC15
-------	------	----------	------	-------

HCC95	KNS62	LC1SQSF	LK2	LOUNH91
LU520	NCIH1703	NCIH1869	NCIH2170	NCIH226
NCIH520	RERFLCAI	SKMES1	SQ1	

放射線感受性良好もしくは放射線抵抗性の肺癌細胞株において、遺伝子発現が統計的に有意に変化(亢進または抑制)している遺伝子群を検出するために、Gene set enrichment 解析を行った。本研究では、Molecular Signatures Database に登録されている生物学的に重要な 50 のパスウェイによって構成された hallmark gene set (2) のうち、放射線感受性良好もしくは放射線抵抗性の肺腺癌細胞株において、有意に変化(亢進または抑制)しているパスウェイ (gene set) の有無を評価した。各細胞株の放射線感受性の連続値データと、各細胞株における遺伝子発現データを Gene set enrichment 解析の入力データとした。統計学的解析は、nominal p -value < 0.05 ならびに多重検定補正として false discovery rate (FDR) q -value < 0.1 の両者を満たした場合のみ、有意差ありとした。

肺腺癌における遺伝子発現と放射線感受性

50 種の肺腺癌細胞株を用いた放射線感受性にかかわる Gene set enrichment 解析の結果、細胞周期チェックポイントにかかわる「G2/M チェックポイント関連遺伝子群」が有意に放射線抵抗性の肺腺癌細胞株において抑制されていた (Nominal p -value = 0.004, FDR q -value = 0.012 : 図 1)。一般に放射線照射後の細胞は、細胞周期を一旦停止することが知られている。細胞周期チェックポイントには G1/S チェックポイントや G2/M チェックポイントが存在するが、放射線抵抗性の肺腺癌細胞株において「G2/M チェックポイント関連遺伝子群」の発現が抑制されていることは、G2/M チェックポイント後に細胞死に至る機序が抑制されている可能性が考えられる。



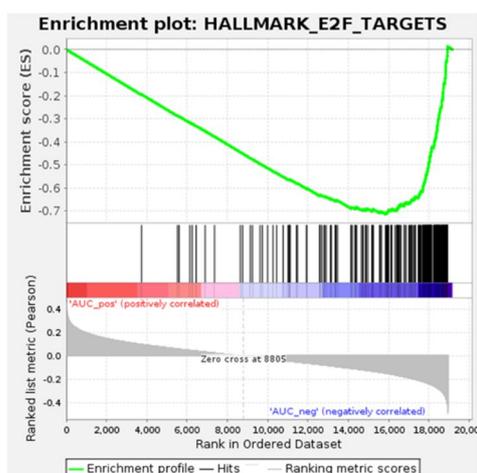
- HALLMARK_G2M_CHECKPOINT (199 遺伝子)
- Normalized Enrichment Score = -1.9
- Nominal p -value = 0.004
- FDR q -value = 0.012

放射線抵抗性の肺腺癌細胞株において、有意にG2/Mチェックポイント関連遺伝子群が抑制

図 1 G2/M チェックポイント関連遺伝子群と肺腺癌の放射線感受性

G2/M チェックポイント関連遺伝子群に加えて、細胞増殖にかかわる「転写因子 E2F の標的遺伝子群」も有意に抑制されていた (Nominal p -value < 0.001, FDR q -value = 0.002 : 図 2)。他方、放射線感受性との関連が報告されている「アポトーシス関連遺伝子群」や「低酸素応答

に関連する遺伝子群」などの重要な生物学的パスウェイ (Hallmark gene set) は、肺腺癌細胞株 50 種において放射線感受性と有意な関連は認めなかった。



- HALLMARK_E2F_TARGETS (200 遺伝子)
- Normalized Enrichment Score = -2.1
- Nominal p -value < 0.001
- FDR q -value = 0.002

放射線抵抗性の肺腺癌細胞株において、有意にE2F標的遺伝子群が抑制

図2 E2F 標的遺伝子群と肺腺癌の放射線感受性

肺扁平上皮癌における遺伝子発現と放射線感受性

19 種の肺扁平上皮癌細胞株に対する Gene set enrichment 解析の結果、50 の重要な生物学的パスウェイ (Hallmark gene set) はいずれも有意に放射線感受性と関連しなかった (Nominal p -value < 0.05 の gene set を複数認めたが、FDR q -value > 0.1 であった)。肺腺癌の細胞株で有意に放射線抵抗性と関連していた「G2/M チェックポイント関連遺伝子群」や「転写因子 E2F の標的遺伝子群」は、肺扁平上皮癌の細胞株では放射線感受性と有意な関連を認めなかった。

本研究では、非小細胞肺癌における放射線感受性と遺伝子発現の関連を検討した。肺腺癌および肺扁平上皮癌の細胞株の解析では、組織型の違いにより異なる結果であった。近年、非小細胞肺癌に対する体幹部定位放射線治療において、肺扁平上皮癌は肺腺癌より体幹部定位放射線治療に抵抗性であり、投与線量増加を含めた肺腺癌と異なる治療開発の必要性が提唱されている(3)。このような治療感受性の違いは、本研究結果の組織型の違いによる放射線感受性に関与する遺伝子発現の違いを反映している可能性がある。本研究で放射線感受性に関与する遺伝子異常の多様性の一端が明らかになり、放射線感受性と遺伝子異常に注目したさらなる研究が必要であることが示唆される。

(1) Yard BD et al. Nat Commun. 2016 Apr 25;7:11428.

(2) Liberzon A et al. Cell Syst. 2015 Dec 23;1(6):417-425.

(3) D'Angelillo et al. J Thoracic Oncol. 2018; 13(10):1441-1442.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	神谷 武志 (Kamitani Takeshi) (20419534)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	浅山 良樹 (Asayama Yoshiki) (40380414)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	吉武 忠正 (Yoshitake Tadamasa) (40452750)	九州大学・医学研究院・講師 (17102)	
研究分担者	浅井 佳央里 (Asai Kaori) (40635471)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	本田 浩 (Honda Hiroshi) (90145433)	九州大学・大学病院・教授 (17102)	
研究分担者	野元 諭 (Nomoto Satoshi) (90258608)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	平田 秀成 (Hirata Hidenari) (90721267)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	塩山 善之 (Shioyama Yoshiyuki) (10323304)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	高木 正統 (Takagi Masanori) (30814420)	独立行政法人国立病院機構九州医療センター（臨床研究センター）・その他部局等・放射線科医師 (87105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関