

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10777

研究課題名(和文) 特発性肺線維症合併肺癌における遺伝子解析

研究課題名(英文) DNA analysis in lung cancer with idiopathic pulmonary fibrosis Gene analysis in lung cancer with idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

岩田 剛和 (Iwata, Takekazu)

千葉県がんセンター(研究所)・呼吸器外科・部長

研究者番号：30586681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では特発性肺線維症(IPF)合併肺扁平上皮癌の臨床手術検体を用いて、ビーズアレイ、エクソンシーケンスを用いた網羅的遺伝子解析を行った。DNA異常メチル化解析により2つのepigenotype(高メチル化群、低メチル化群)を同定し、IPF合併例では低メチル化傾向を示すタイプの腫瘍が多い事が分かった。さらにパイロシーケンスによる検証を行い、低メチル化が独立した予後不良因子である事がわかった。さらに変異解析では変異スペクトラムとしてはC>Tのパターンが多く、Signature 1を主な変異シグニチャーとして同定した。また特異的な遺伝子変異を認め、予後不良因子となっている事を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症(IPF)合併肺癌は予後不良である事が報告されているが、その分子生物学的詳細は不明であった。

今回我々が行ったIPF合併肺扁平上皮癌に対する網羅的DNAメチル化解析は世界初の試みであり、これにより予後不良なタイプとして同定された低メチル化扁平上皮癌とIPF症例に相関を認めた事、遺伝子変異解析によりIPF症例で予後不良因子となる特有の遺伝子変異を認めた事から、これらの分子異常はIPF合併肺扁平上皮癌の生物学的悪性度を示している事が示唆され、さらにバイオマーカーとしての有用性が示唆された。本研究は肺扁平上皮癌の層別化やIPF合併肺癌の分子生物学的詳細に新たな知見を与える研究である。

研究成果の概要(英文)：We conducted DNA methylome analysis and mutation analysis of clinical lung squamous cell carcinoma (SCC) associated with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) using Infinium BeadChip and targeted exon-sequencing.

Analyses stratified SCC into two distinct epigenotypes, low methylation and high methylation. The low-methylation epigenotype was significantly associated with IPF. The correlation between low-methylation subgroup and IPF was further validated by five markers specifically hypermethylated in high-methylation subgroup using pyrosequencing. Furthermore, low-methylation epigenotype significantly correlated with poorer prognosis.

Using target-exon sequencing to survey somatic mutation, we investigated genetic landscape and specific gene alterations of SCC with IPF. We found that C>T and Signature 1 predominantly contributed to SCC with IPF, and that a specific gene mutation was significantly associated with SCC with IPF and poor prognosis.

研究分野：呼吸器外科、特発性肺線維症、肺移植

キーワード：特発性肺線維症合併肺癌 肺扁平上皮癌 網羅的DNAメチル化解析 網羅的遺伝子変異解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維(idiopathic pulmonary fibrosis; IPF)は肺癌発症のリスク因子であり、その発生リスクは非 IPF 患者の 7~14 倍と報告され、肺癌は IPF 患者死亡原因の第 3 位を占める。IPF 合併肺癌は非合併癌に比べて有意に予後が悪いことが大規模疫学調査で確認されている。IPF では繰り返し生じる炎症による組織障害と修復が発癌を誘発する事が複数の研究結果から示唆されているが、肺癌発症に関連するバイオマーカーは明らかにされていない。一方 IPF 合併肺癌では放射線・抗癌剤・手術の後に IPF の致死性急性増悪(acute exacerbation; AE)が生じての治療関連死が多い。IPF 合併肺癌の治療では AE と肺癌再発リスクという 2 つの課題を克服しなければならないが、AE のリスクから手術症例が少ないため十分な検体を採取して遺伝子レベルで検討した報告は現在までのところ少ない状況である。

2. 研究の目的

本研究では千葉大学病院呼吸器外科にて手術を施行された症例のうち、凍結もしくはパラフィン包埋にて保存されている肺扁平上皮癌手術検体に対して、ビーズアレイを用いた網羅的 DNA メチル化解析や次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現、遺伝子変異の網羅的解析を行い、IPF 合併肺癌における発癌機構の解明、並びに新規バイオマーカーの探索を行う。さらに TGF- β 阻害薬であるピルフェニドンによる EMT 抑制等の抗腫瘍効果に対しても同様にして分子生物学的に検証する事を目的とした。

3. 研究の方法

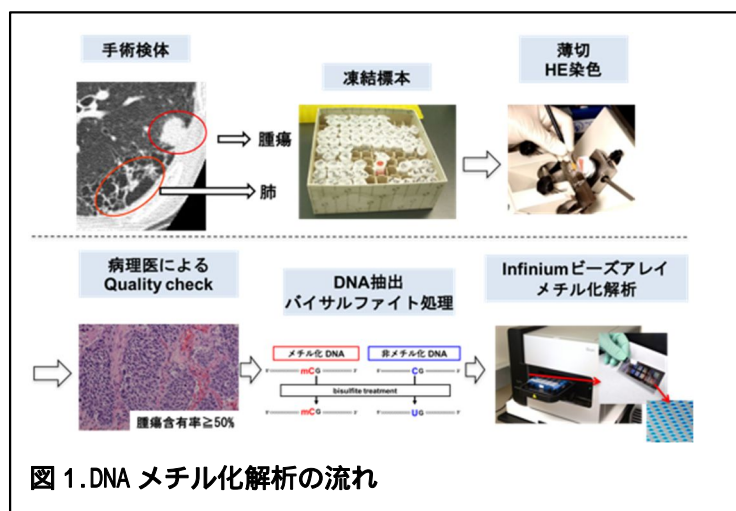
(1)外科切除検体からの RNA, DNA 抽出

当院で手術を施行した原発性肺扁平上皮癌で、凍結保存、または FFPE 検体として保存している症例のうち、IPF 合併肺扁平上皮癌(IPF(+))に対して、腫瘍検体 35 例から、またコントロールとして、43 例の IPF 非合併例(IPF(-))から RNA, DNA を抽出した。腫瘍検体は腫瘍含有率が高いもの(50%以上)を病理医によりスライド上で確認の上、使用した。また上記症例に対し、各症例の背景肺も同様に核酸抽出を行った。

(2)IPF 合併肺癌における遺伝子網羅的解析

DNA 異常メチル化解析

凍結保存検体の中から IPF(+):10 症例、対照群として IPF(-):10 症例を抽出し、それぞれ腫瘍部位と背景肺組織から抽出した DNA に対し、バイサルファイト処理後、45 万個のプロブを搭載した Illumina 社のビーズアレイを用いて、DNA メチル化網羅的解析を行った(図 1)。さらに抽出された代表的な遺伝子を用いて計 77 例の症例に対し、パイロシーケンス法による検証を行った。自験例に加え、The Cancer Genome Atlas(TCGA)データを用いて、メチル化、遺伝子変異に対して比較検討を行った。



さらに抽出された代表的な遺伝子を用いて計 77 例の症例に対し、パイロシーケンス法による検証を行った。自験例に加え、The Cancer Genome Atlas(TCGA)データを用いて、メチル化、遺伝子変異に対して比較検討を行った。

遺伝子変異解析

同様に凍結検体から抽出した DNA を用いて IPF(+):16 例、IPF(-):31 例の腫瘍部に対し、キア

ゲン社の Lung Cancer Panel®を用いた次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析を行い、IPF 合併肺扁平上皮癌に特徴的な遺伝子変異を検証した。

(3)臨床病理学的検討

上記遺伝子異常に関して、IPF 合併の有無に加え、性別、喫煙歴、病理病期、予後を含めた臨床病理学的検討を行った。

4. 研究成果

(1)DNA メチル化解析

網羅的 DNA メチル化解析

ビーズアレイの結果より遺伝子プロモーターに存在するプローブのみを抽出し、階層的クラスタリングを行ったところ、腫瘍部と背景肺で大きく2つのクラスターを形成した(図2)。腫瘍部は全体にメチル化が高く、さらに高メチル化群と低メチル化群の2つのサブクラスター(エピジェノタイプ)に分類された。それぞれの群での IPF 症例の比率を検

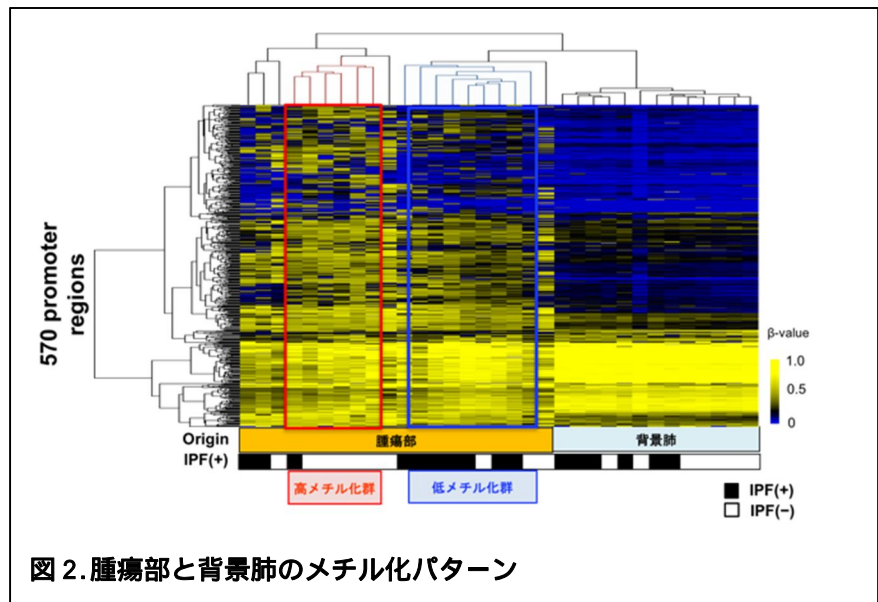


図2. 腫瘍部と背景肺のメチル化パターン

証すると、低メチル化群では77.8%(7/9)、高メチル化群では17%(1/6)と、有意に低メチル化群において IPF 症例が多い事がわかった($P=0.04$)。次に高メチル化群において特異的にメチル化された遺伝子群を抽出し、GO (Gene Ontology) 解析を行うと、“regulation of gene silencing” や “negative regulation of growth” といった増殖抑制機能を持つ遺伝子群が抽出された。

パイロシーケンスによる検証

高メチル化群に特異的な5つのメチル化遺伝子(*DLEC1*, *CFTR*, *MTM*, *ALDH7A1*, *CRIP3*)を高メチル化マーカーとし、パイロシーケンスによる検証

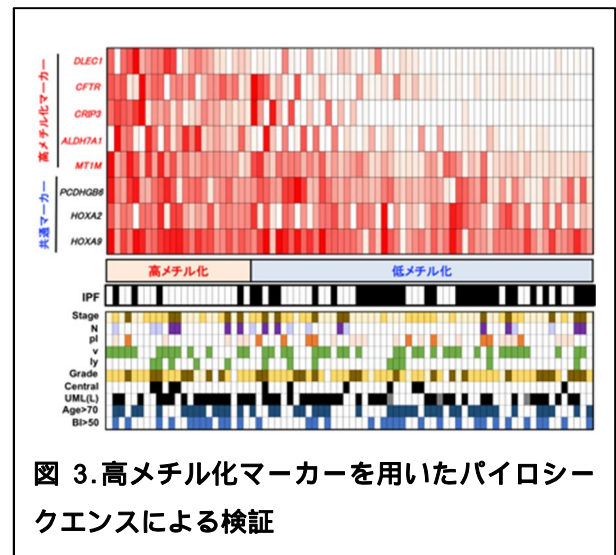


図3. 高メチル化マーカーを用いたパイロシーケンスによる検証

を77例の肺扁平上皮癌を用いて検証したところ同様に IPF(+)群では有意に低メチル化と相関していた($P<0.01$) (図3)。予後解析では低メチル化群は予後不良因子となっていた(図3)。またTCGAを用いた解析でも同様の傾向が見られた。その他の臨床病理学的項目との相関はみられなかった(図4)。

背景肺組織における検証では、腫瘍部の解析結果とは反対に non-IPF より IPF でメチル化遺伝子が多く、102 個の遺伝子で癌組織と共通した異常メチル化を認めた。

(2) 次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析

遺伝子変異解析（エクソン変異解析）では IPF(+)で有意に変異を認めた遺伝子を複数同定し(Hata et al. manuscript in preparation)、そのうちの一つは予後不良因子となっていた (図 5)。

IPF(+)における変異スペクトラムとしては C>T のパターンが多く、Signature 1 を主な変異シグニチャーとして同定した。またエピジェノタイプ間での比較では変異数や変異スペクトラムに有意差は認めなかったが、低メチル化群で有意に変異が少ない遺伝子を検出した。

(今後の展望)

今後は IPF 合併肺癌において、癌の発生源となる上皮系細胞や腫瘍微小環境を担う肺線維芽細胞や血管内皮細胞といった特定の細胞集団に焦点を当てた研究を行う予定である。

また当初肺癌の遺伝子解析に加え、ピルフェニドンの影響を網羅的遺伝子発現解析にて検証する予定であったが、RNA の保存状態が悪く、結果的に施行する事が出来なかった。今後は前向きにサンプル収集を行い、遺伝子発現についても検証する予定である。

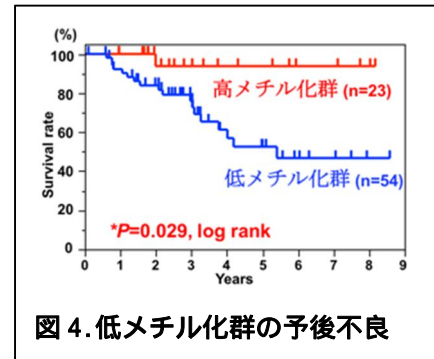


図 4. 低メチル化群の予後不良

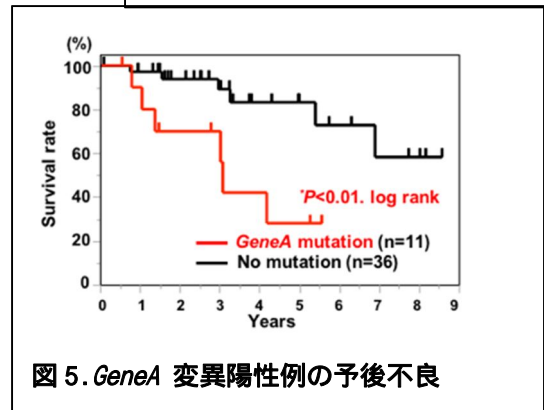


図 5. GeneA 変異陽性例の予後不良

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 畑 敦, 中島 崇裕, 大枝帆高, 西井開, 海竇大輔, 大橋康太, 佐田諭己, 椎名裕樹, 豊田行英, 坂入 祐一, 田村創, 藤原 大樹, 和田 啓伸, 鈴木 秀海, 山田義人, 千代 雅子, 岩田剛和, 福世真樹, 松坂 恵介, 金田 篤志, 吉野 一郎
2. 発表標題 DNA低メチル化扁平上皮肺癌の特発性肺線維症合併および予後不良
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畑 敦, 中島崇裕, 福世真樹, 松坂恵介, 吉野一郎, 金田篤志
2. 発表標題 DNA低メチル化肺扁平上皮癌と特発性肺線維症合併の関連性
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018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
研究分担者	吉野 一郎 (Yoshino Ichiro) (40281547)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	畑 敦 (Hata Atsushi) (30750806)	千葉大学・医学部附属病院・特任助教 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	坂入 祐一 (Sakairi Yuichi) (30551949)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	
研究分担者	中島 崇裕 (Nakajima Takahiro) (20400913)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	鈴木 秀海 (Suzuki Hidemi) (60422226)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	
研究分担者	金田 篤志 (Kaneda Atsushi) (10313024)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	