

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 10 月 26 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10799

研究課題名(和文) 肺癌の先制医療を可能にするGermline遺伝子変異診断開発の基盤研究

研究課題名(英文) fundamental research for the development of germline mutation diagnosis enabling preemptive medicine for lung cancer

研究代表者

大塚 弘毅(Ohtsuka, Kouki)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号：70439165

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)：本研究では、発がんリスクEGFR V843I germline変異を有する肺腺がん多発家族を調べた。EGFR V843I変異は、この家族性肺腺がんの原因となる遺伝的リスクである。また、がん関連遺伝子の次世代シーケンスは、がんの素因を有する症例のがん組織におけるTP53変異などの追加の遺伝子異常を検出するのに役立ち、予後を予測するための貴重な情報を提供することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺がんにおける発がんリスクgermline変異情報は、発がんリスクを把握して、早期発見・早期治療すれば、長期生存を可能にする肺がんの先制医療に活用できる。また次世代シーケンスはそのような発がんリスク変異を有する肺がんの予後を予測することを可能にする。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated a family with multiple lung adenocarcinoma with an oncogenic EGFR V843I germline mutation. The EGFR V843I mutation is the causative genetic risk for this familial lung adenocarcinoma. In addition, next-generation sequencing of cancer-associated genes can help detect additional genetic aberrations, such as TP53 mutations, in cancer tissue from cancer-predisposed cases, providing valuable information for predicting prognosis.

研究分野：がんゲノム医療

キーワード：肺がん EGFR germline変異 発がんリスク 次世代シーケンス TP53変異 予後予測 早期発見早期治療 先制医療

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は日本人のがん死因の第1位である。進行肺癌では、EGFR somatic (体細胞性) 変異非小細胞肺癌(NSCLC)に感受性のあるゲフィチニブ・エルロチニブ・アファチニブのEGFR 阻害剤、EGFR 阻害剤に耐性となったEGFR T790M somatic 耐性変異陽性 NSCLC に有効なオシメルチニブ、ALK 融合遺伝子陽性 NSCLC に効果的なクリゾチニブ・アレクチニブ・セリチニブといった分子標的治療薬やEGFR 変異 ALK 融合遺伝子陰性 PD-L1 高発現 NSCLC に極めて有望な抗 PD-1 抗体のニボルマブ・ペンブロリズマブなどの免疫チェックポイント阻害剤が登場した。我々はこれまでに約1000 症例の肺癌遺伝子検査を行い、進行肺癌の治療に関与してきたが、進行肺癌はこれらの治療でも無効例や治療後の再発などの治療抵抗性が見られ未だ難治性が課題である。さらに特にニボルマブでは1 症例当たり年間約3500 万円という超高額医療費が大きな問題となっている。

従来の予防医療が集団を対象にしているのに対し、最近個々の症例において疾患のリスクとなる遺伝子異常を精密に診断して、リスク保因者に対し予防や早期発見早期治療などの医療介入を行う先制医療が注目されている。先制医療は、疾患が進行した状態で治療するより治療効果が高く、コストも低く抑えられると考えられている。BRCA などのDNA 損傷修復遺伝子の germline (生殖細胞性) 遺伝子変異を有する保因者は、乳癌や卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌を高率に発症し、予防的手術やPARP 阻害剤などで癌の発症の予防が可能である。悪性度が極めて高い膵臓癌では、BRCA germline 変異など発癌リスクを有する遺伝性膵臓癌家系において、膵臓超音波検査を徹底的に行うことにより癌を早期で発見し早期に手術して治療効果を高めようとする癌検診が行われている。遺伝性大腸癌のリンチ症候群はDNA ミスマッチ修復遺伝子の germline 変異が発癌リスクであり、アスピリンで発癌予防が可能である。また本症候群の癌は腫瘍浸潤リンパ球が多く、手術による治療成績が良好である。一方肺癌ではこのような germline 変異の情報が乏しいのが現状である。そこで肺癌においても germline 変異を十分に研究し、例えば上記のような発癌リスクとなる germline 変異を精密に診断できれば、その変異に効果的な治療を活用することで予防や早期発見早期手術といった先制医療が可能になると考えた。

我々は家族内に肺癌が多発する遺伝性肺癌家系の研究を行い、肺癌を発症する家族はEGFR V843I germline 変異を保因していることを見出した。進行肺癌で発見された発端者は治療抵抗性で予後不良であったが、発癌リスクの保因者を知って肺癌検診を受検し肺癌の早期発見早期手術が可能であった家族は長期無再発生存していることを明らかにした。

また同一症例の肺内に肺癌が多発する多発肺癌の研究で、全ての腫瘍を手術し良好な経過を得ている症例を見出した。遺伝子解析ですべての腫瘍のEGFR 阻害剤感受性のEGFR somatic 変異とEGFR 変異肺癌発症のリスク遺伝子多型(germline)を検出した。EGFR 変異陽性多発肺癌では、リスク保因者を把握し、EGFR 阻害剤による手術後再発の予防や再発の早期発見早期手術することで、より効果的で低コストの治療が可能であると考えた。興味深いことに、本症例で判明した肺癌リスク保因者を危惧した家族が肺癌検診によって同じく多発肺癌が発見された。この家族も現在のところ全身転移が無く、高額抗癌剤でなく手術で治療可能であると考えた。

さらに同一症例の肺以外の他臓器にも癌が多発する重複癌の研究では、肺癌の家族歴を有する症例で悪性胸膜中皮腫、皮膚癌、急性骨髄性白血病が多発した。発癌リスクと思われるCYP2D6 germline 変異を検出し、それぞれの癌は早期に治療され経過は良好である。肺癌を含まないが、十二指腸癌と直腸癌(肝臓転移有り)の重複癌症例でもDNA 損傷修復遺伝子RAD50 germline 変異を検出した。肝臓転移も含め早期に手術し無再発生存中である。また十二指腸癌、胃癌、直腸癌(肝臓転移有り)の重複癌症例では、大腸癌のリスクとして有名なSTK11 germline 変異を検出し、十二指腸癌と胃癌は内視鏡切除手術、直腸癌も手術ですべての腫瘍を切除され現在経過良好である。肺癌を含む重複癌でも発癌の遺伝子リスクを精密に把握し、早期発見早期手術で費用対効果が高い治療が可能であると考えた。

以上のような我々の過去の研究から、肺癌のなかでも特に遺伝性肺癌は発癌のリスクとなりうる germline 変異を有することが予想され、症例ごとに germline 変異を精密に診断して発癌リスクを保因することを把握すれば、予防や早期発見早期治療といった先制医療を行うことで、進行肺癌で問題となる難治性やコストの問題を克服できると考えた。しかしながら、現在のように次世代シーケンスが普及する以前では、これらの肺癌の germline 変異は十分に検討されておらず、肺癌の先制医療を可能にする germline 遺伝子変異診断を開発するために、まずはこれらの肺癌において germline 変異の状況とその臨床的意義を明らかにすることが重要だと考え、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

EGFR V843I germline 変異による遺伝性肺癌症候群の詳細な臨床および遺伝子学的な特徴を把握し、早期発見、早期手術の重要性や予後予測因子を明らかにする。

## 3. 研究の方法

肺癌の先制医療を可能にする germline 遺伝子変異診断を開発するために、肺癌における

germline 変異の情報が必要であるが、いままで肺癌では germline 変異解析が十分に行われておらず、germline 変異の情報乏しい。そこで、先ず肺癌における癌関連 germline 変異の状況とその臨床的意義を明らかにする。

我々の過去の研究から、家族内のメンバーに肺癌が多発する遺伝性肺癌症例に germline 変異が高率に検出されると予想されたので、本研究の対象は遺伝性肺癌症例とする。

杏林大学医学部倫理委員会の承認を得て、患者および家族に本研究参加の説明を行い、同意を取得した症例で解析を行う。遺伝性肺癌症例がすでに集積され、肺癌患者の手術で摘出された正常組織と腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋検体、また正常組織として採取された肺癌患者および家族の血液検体を使用する。

本研究では全ゲノムシーケンスとターゲットシーケンスを行う。今回の解析では、正常部と腫瘍部の両方に検出される変異を癌関連 germline 変異と判定する。

(1)肺癌症例および家族の腫瘍及び正常組織検体から DNA を抽出する。

(2)次世代シーケンスの全ゲノムシーケンス{HiSeq X (イルミナ)}、EGFR など癌関連遺伝子を調べるターゲットシーケンス{Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2(サーモフィッシュャーサイエンティフィック)}を行う。

(3)得られたシーケンスデータを解析ソフトで解析し変異を検出する。

(4)検出された変異を ClinVar、COSMIC などの癌遺伝子異常国際データベースに照合し、変異の登録状況や病的意義を検討する。

(5)germline 変異が検出できた症例は、既往歴、家族歴、癌の病理像、ドライバー遺伝子 somatic 異常、治療歴の臨床病理学的解析を行う。

#### 4. 研究成果

本研究では、発癌リスク EGFR V843I 生殖細胞性変異を有する肺腺癌多発家族を調べた。発端者は進行肺腺癌と診断され、EGFR-TKI を含む各種治療に抵抗性を有し、癌死した。肺腺癌を発症した他の 2 人の家族は早期肺癌と診断され、肺癌手術後に長期無再発生存した。

全ゲノムシーケンスの結果、EGFR V843I 変異以外の遺伝性癌の原因となる既知の癌関連遺伝子生殖細胞系変異は検出されず、EGFR V843I 変異が肺腺癌の家族性発癌に寄与するという仮説を支持した。体細胞性 EGFR L858R および TP53 R248W 変異は、発端者から得られた肺癌組織に見出された。一方、他の 2 人の肺癌組織の DNA を用いて行ったターゲットシーケンスの結果、両腫瘍とも体細胞性 EGFR L858R 変異を有するが、TP53 R248W 変異は有していないことが明らかになった。

肺腺癌の発症にはこれら 3 例で EGFR L858R 変異が必要であると仮定したが、発端者の臨床転帰不良は肺腺癌における TP53 変異の獲得と関連している可能性がある。EGFR V843I 変異は、この家族性肺腺癌の原因となる遺伝的リスクである。また、癌関連遺伝子の次世代シーケンスは、癌の素因を有する症例の癌組織における TP53 変異などの追加の遺伝子異常を検出するのに役立つ、予後を予測するための貴重な情報を提供することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ohtsuka Kouki, Ohnishi Hiroaki, Fujiwara Masachika, Morii Takeshi, Matsushima Satsuki, Ogura Wataru, Yamasaki Satoko, Kishino Tomonori, Tanaka Ryota, Watanabe Takashi	4. 巻 ?
2. 論文標題 Predisposition to Lung Adenocarcinoma in a Family Harboring the Germline EGFR V843I Mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCO Precision Oncology	6. 最初と最後の頁 1~4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1200/P0.19.00104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ogura W, Ohtsuka K	4. 巻 ?
2. 論文標題 Use of a plasma test for verifying epidermal growth factor receptor gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respir Med Case Rep	6. 最初と最後の頁 ?
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rmcr.2020.101007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kojima Y, Ohtsuka K, Ohnishi H, Abe N, Furuse J, Watanabe T, Sugiyama M.	4. 巻 48(8)
2. 論文標題 APC:T1556fs and STK11 mutations in duodenal adenomas and adenocarcinomas.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surg	6. 最初と最後の頁 765-772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-018-1649-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大塚弘毅
2. 発表標題 RAD50 Germline Variantを有する家族性癌、消化管重複癌の一例
3. 学会等名 日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大塚弘毅
2. 発表標題 野生型マウスにおける自然発生がんの検討
3. 学会等名 日本臨床検査医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kouki Ohtsuka
2. 発表標題 Whole genome sequencing of family members with the germline EGFR V843i mutation predisposed to lung adenocarcinoma
3. 学会等名 WASPaLM 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017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	渡邊 卓 (Watanabe Takashi)  (00191768)	杏林大学・医学部・教授  (32610)	
研究分担者	藤原 正親 (Fujiwara Masachika)  (20407026)	杏林大学・医学部・教授  (32610)	
研究分担者	田中 良太 (Tanaka Ryota)  (40415063)	杏林大学・医学部・准教授  (32610)	

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	松島 早月  (Matsushima Satsuki)  (80231596)	杏林大学・医学部・その他    (32610)	
研究分担者	大西 宏明  (Ohnishi Hiroaki)  (80291326)	杏林大学・医学部・教授    (32610)	

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