

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08791

研究課題名(和文)染色体不安定性を有する肺癌に不可欠なゲノム維持機構の解明と合成致死治療への応用

研究課題名(英文) A study for mechanisms that maintain the genomic integration in lung cancer with chromosomal instability

研究代表者

岡本 龍郎 (Okamoto, Tatsuro)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・呼吸器腫瘍科部長

研究者番号：80568626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子コピー数変化と同様の変化を示したMDM2遺伝子に着目し、EGFR変異陽性肺癌におけるMDM2遺伝子発現の意義に関する検討を行った。また、術前CT画像におけるEGFR変異陽性肺癌の進化的発育を示唆する所見から、肺癌を発育段階別に分け、EGFR遺伝子変異別に発育の特徴を調べた。発育段階別のEGFR肺癌サンプルの次世代シーケンスにより網羅的遺伝子変異の解析を行い、悪性化形質獲得に重要な遺伝子変化を検討した。これらの結果から、EGFR変異陽性肺癌は発育の過程で、腫瘍内の細胞構成が変化する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドライバー遺伝子変異の代表格であるEGFR遺伝子変異は日本人に発生する肺腺癌の約半数に認められる。臨床肺癌においては、EGFR変異を有する腫瘍は発生初期では低悪性であるが、癌の進化的発育過程において高悪性の性質に変化することが示唆されている。EGFR遺伝子変異肺腺癌においても、腫瘍内不均一性が認められており、これが薬剤耐性に関与する可能性が報告されている。本研究は、肺癌の腫瘍内不均一性を生むと考えられる、がん関連遺伝子変化を明らかにすることで、肺癌細胞の生存に不可欠なゲノム維持機構の同定に繋げることを目的とした基盤的研究である。

研究成果の概要(英文)：Focusing on MDM2 gene that had shown a copy number alteration similar to that of EGFR gene in the intratumor heterogeneity, we investigated the significance of MDM2 gene expression in EGFR mutation-positive lung cancer. In addition, based on the findings suggestive of evolutionary growth in EGFR mutation-positive lung cancer on preoperative CT images, tumors were classified according to the developmental stage. Comprehensive gene mutation analyses were done by next-generation sequencing of EGFR lung cancer samples by the developmental stage, and genetic changes important for the acquisition of malignant traits were examined. These results suggested that EGFR mutation-positive lung cancer may have altered cell composition within the tumor during the evolutionary development.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 EGFR遺伝子変異 腫瘍内不均一性 進化的発育 ゲノム不安定性

1. 研究開始当初の背景

癌は通常、ゲノム不安定性形質により、常にゲノムを動的な状態に維持している。ゲノム不安定性は腫瘍内不均一性 (intratumor heterogeneity) を生み、治療抵抗性の根本となっている。最近、肺癌切除検体の多領域シーケンスを用いた系統樹解析により、染色体不安定性 (chromosomal instability: CIN) が肺癌の進化的発育に重要であり、遺伝子コピー数変化 (copy number alteration: CNA) が生物学的不均一性に強く関わっていることが示された。一方で、行きすぎたゲノム不安定性は癌細胞の生存に不利となるため、CIN を有する肺癌では温存されたゲノム維持機構にその生存・増殖を強く依存していることが予想される。

一方、非小細胞肺癌においては、その半数以上に相互排他的な癌関連遺伝子変異を伴っていることが報告されている。この変異遺伝子産物に、癌細胞がその発育・進展を強く依存しているため、ドライバー遺伝子変異と呼称され、臨床肺癌において重要な治療標的として捉えられている。ドライバー遺伝子変異の代表格である EGFR 遺伝子変異は日本人に発生する肺腺癌の約半数に認められる。臨床肺癌においては、EGFR 変異を有する腫瘍は発生初期では低悪性であるが、癌の進化的発育過程において高悪性の性質に変化することが示唆されている。EGFR 遺伝子変異肺腺癌においても、腫瘍内不均一性が認められており、これが薬剤耐性に関与する可能性が報告されている。したがって、EGFR 変異肺癌における高悪性形質の獲得に、染色体不安定性 (chromosomal instability: CIN) が関与することが示唆されるが、詳細は以前不明のままである。

2. 研究の目的

本研究は、肺癌の腫瘍内不均一性を生むと考えられる、クローナルな CIN 関連遺伝子変化を明らかにすることで、CIN 癌細胞の生存に不可欠なゲノム維持機構の同定に繋げることを目的とした基盤的研究である。今回は上述の背景から、ドライバー遺伝子変異の代表格である EGFR 遺伝子変異を有する肺腺癌に注目した。以前、我々は EGFR 変異蛋白に対する特異的抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、不均一に染色された腫瘍の陽性部と陰性部でそれぞれ網羅的遺伝子解析を施行した。CNV 解析において、EGFR、CCNE1、MDM2 各遺伝子コピー数の腫瘍内不均一性を認め、遺伝子変異蛋白の不均一性発現は EGFR コピー数の差によると考えられた。また、CCNE1、MDM2 のコピー数変化に伴い、細胞分裂やアポトーシスの頻度といった細胞活性に差が認められた。これを基に、EGFR 遺伝子コピー数変化と同様の変化を示した MDM2 遺伝子に着目し、EGFR 変異陽性肺癌における MDM2 遺伝子発現の意義に関する検討を行った。また、術前 CT 画像における EGFR 変異陽性肺癌の進化的発育を示唆する所見から、肺癌を発育段階別に分け、EGFR 遺伝子変異別に発育の特徴を調べた。発育段階別の EGFR 肺癌サンプルの次世代シーケンスにより網羅的遺伝子変異の解析を行い、悪性化形質獲得に重要な遺伝子変化の探索を行った。

3. 研究の方法

1. EGFR 変異陽性肺癌における MDM2 遺伝子発現の検討

2012 年以降に大分大学医学部呼吸器・乳腺外科学にて手術が行われた肺腺癌 (EGFR 遺伝子変異陽性 100 例、陰性 20 例) における MDM2 mRNA 発現を定量的 PCR 法にて解析した。内因性コントロールとして β -actin を用いた。MDM2 mRNA 発現量と臨床病理学的因子、予後との関係を検討した。

2. EGFR 変異肺癌における進化的発育に関与する因子の検討

2006-2016 年に手術が行われた肺腺癌のうち、検体が利用可能な 344 例のパラフィン包埋切片より DNA を抽出し、EGFR 遺伝子変異検査を施行した。EGFR 遺伝子変異は Exon18-21 の変異を含めた。

術前の thin slice CT 画像より、GGO を含めた最大径と充実径を測定し、充実径/最大径 (C/T 比) を計算した。C/T=0、 $0 < C/T \leq 50$ 、 $50 < C/T \leq 100$ 、C/T=100 をそれぞれ pure ground glass tumors (pGGT)、GGO 優位型、Solid-part (SP) 優位型、solid tumor (ST) とした。

同症例の EGFR 遺伝子変異方および臨床病理学的因子、予後との関係を検討した。

2012-2018 年に切除された EGFR 変異陽性肺腺癌症例 (exon19 欠失) から、CT 画像にて C/T 比 $< 50\%$ かつ pT1mi 以下の腫瘍を group 1 (G1)、C/T 比 $> 50\%$ かつ術後病理診断で Acinar predominant であった腫瘍を group 2 (G2) とし、解析に用いた。G1 腫瘍 9 例、G2 腫瘍 7 例のパラフィン包埋切片より DNA を抽出し、Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel (409 遺伝子) にて遺伝子変化を検討した。Variant Effect Predictor (Ensembl GRCh37) により既知の遺伝子変化を検出し、Minor allele frequency が 1% より大きいものを common variant として除外した。

4. 研究成果

1. EGFR 変異陽性肺癌における MDM2 遺伝子発現の意義

最終的に、EGFR 変異陽性肺癌 79 例および陰性肺癌 16 例が解析可能であった。EGFR 変異陽性

肺腺癌と陰性肺腺癌で、MDM2 遺伝子の発現量を比較したが、発現量に明らかな差を認めなかった。次に、再発を認めた肺癌と再発を認めていない肺癌の両群で MDM2 遺伝子発現を比較したところ、再発ありの肺癌において有意に MDM2 遺伝子発現が低値であった（図 1）。さらに、無再発生存期間を用いた ROS curve より求めたカットオフ値(0.006)により、MDM2 低発現群と高発現群に分けて、2 群での臨床病理学的因子および無再発生存期間の比較を行った。その結果、EGFR 変異陽性肺癌では、MDM2 低発現群で進行癌が多く、MDM2 低発現群で有意に無再発生存における予後が不良であった（図 2）。

図1. 再発の有無とMDM2mRNA発現量との関係

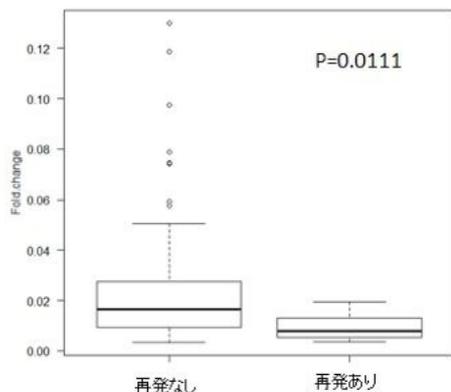
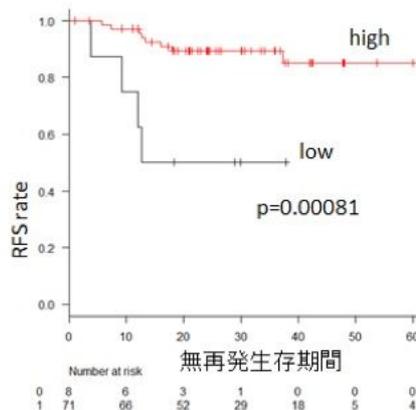


図2. MDM2 mRNA発現量別の無再発生存期間



2. EGFR 変異肺癌における進化的発育に關与する因子の検討

EGFR 遺伝子変異型の内訳は、野生型 / Exon (Ex) 18 G719 / Ex19 del / Ex20 ins / Ex21 L858R / Ex21L861Q / L858R+T790M がそれぞれ 177 / 7 / 78 / 1 / 77 / 2 / 2 例であった。EGFR 変異陽性肺癌は陰性肺癌より GGO を有する腫瘍の割合が多かった(49.1% vs. 29.9%, p=0.0004)。GGO 優位型と SP 優位型の割合には差がなかった(p=0.60)。変異タイプ別の解析では、Ex21L858R 陽性肺癌は Ex19del 陽性肺癌より GGO を有する腫瘍の割合が多く(59.3% vs. 38.5%, p=0.011)(表 1)、無再発生存が良好であった。GGO を有する肺癌は EGFR 変異有無およびタイプにかかわらず無再発生存期間に差を認めなかった(表 2)。今回の検討では、肺癌手術症例において、EGFR exon 21 変異型腺癌は exon19 変異型および野生型腺癌に比べ GGO を有するものが多く、早期に切除される割合が高いことが示唆された。現在までの報告でも、Exon 21 変異型腫瘍で他の変異型や野生型に比べ腫瘍における GGO 割合が多かった[Lung Cancer 2018;123:52-9]とする報告がある。

表1. GGO成分の有無と臨床因子との関係

因子	分類	GGOあり (135)	GGOなし (209)	p
年齢	< 70	79	111	0.33
	≥ 70	56	98	
性別	女	81	34	0.014
	男	54	21	
EGFR遺伝子変異	なし	53	124	0.003
	あり	82	85	
EGFR変異 (n=159)	Exon 19 del	30	48	0.008
	L858R	46	31	

表2. 無病生存に關係する因子 (Cox生存解析)

因子	分類	HR	95% C.I.	p
年齢	< 75	1		0.55
	≥ 75	1.20	0.66 - 2.18	
性別	女	1		0.025
	男	2.01	1.09 - 3.69	
EGFR変異	なし	1		0.95
	あり	0.99	0.80 - 1.23	
EGFR変異種類 (n=159)	Exon 19 del	1		0.025
	L858R	0.24	0.07 - 0.83	
GGOの有無	なし	1		0.0002
	あり	0.17	0.07 - 0.44	
GGOの割合 (n=135)	GGO優位	1		0.11
	SP優位	5.9	0.66 - 53.1	

2012-2018 年に切除された EGFR 変異陽性肺腺癌症例 (exon19 欠失) は、臨床背景は年齢: 67.5 (41-77) 歳、男/女: 4/12 例。G1 (9 例) は cTis/T1mi/T1a: 3/5/1 例、pTis/T1mi: 4/5 例で全例 NOMO。G2 (7 例) は cT1a/T1b/T1c/T2a: 1/2/3/1 例で、N2, M1a が 1 例ずつであった。

1) 観察された variant 総数は平均 379 (coding 領域 159) であり、frame shift+stop/misense/synonymous/ins-del: 9/61/85/5 個であった。

2) variant 総数は G1/G2: 400/353 で、G1 に有意に多かった(p=0.0138)。variant 種類別に差は無かったが、ins-del は G1/G2: 4/5 で G2 に多い傾向があった(p=0.084)。

これらの結果から、EGFR 変異陽性肺癌は発育の過程で、腫瘍内の細胞構成が変化する可能性が示唆された。

図3. 遺伝子変異の総数の比較

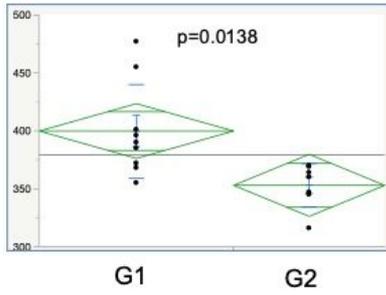
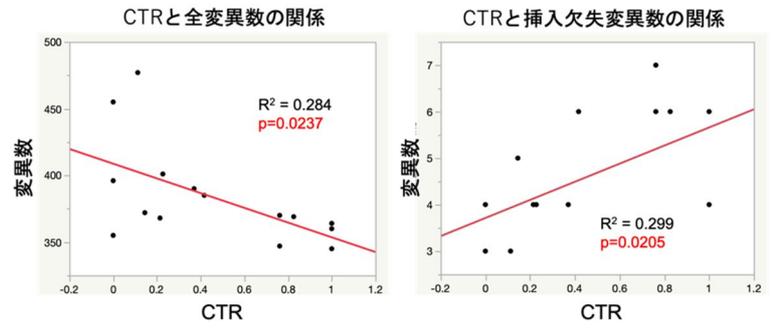


図4. CTIによるC/T比と遺伝子変異数の関係



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 6. Takamori S, Shimokawa M, Matsubara T, Haratake N, Toyozawa R, Miura N, Yamaguchi M, Seto T, Tagawa T, Okamoto T, Takenoyama M, Maehara Y, Mori M	4. 巻 28
2. 論文標題 Prognostic Impact of Smoking Period in Patients with Surgically Resected Non-small Cell Lung Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 685-694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-020-08851-6	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 13. Osoegawa A, Takada K, Okamoto T, Sato S, Nagahashi M, Tagawa T, Tsuchida M, Oki E, Okuda S, Wakai T, Mori M	4. 巻 13
2. 論文標題 Mutational signatures in squamous cell carcinoma of the lung	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Thorac Dis	6. 最初と最後の頁 1075-1082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/jtd-20-2602	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本龍郎、野田大樹、辛島高志、安部美幸、内匠陽平、阿南健太郎、宮脇美千代、武内秀也、杉尾賢二
2. 発表標題 EGFR陽性肺腺癌の進化的発育における遺伝子変化の検討
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 龍郎、辛島 高志、安部 美幸、内匠 陽平、橋本 崇史、宮脇 美千代、武内 秀也、杉尾 賢二
2. 発表標題 肺腺癌切除例におけるEGFR遺伝子変異癌の画像的特徴と予後
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019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	宮脇 美千代 (Miyawaki Michiyo) (30404388)	大分大学・医学部・講師 (17501)	
研究分担者	杉尾 賢二 (Sugio Kenji) (70235927)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	小副川 敦 (Osoegawa Atsushi) (90432939)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	

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
---------	---------