

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03446

研究課題名(和文) 早期病変、原因およびドライバー変異に焦点をおいた肺腺癌のゲノム解析

研究課題名(英文) Genome analysis of lung adenocarcinoma with particular reference to early lesions, etiology and driver mutations

研究代表者

石川 雄一 (ISHIKAWA, Yuichi)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：80222975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺がんの早期病変における特徴的な遺伝子変化を検出するため、がん組織、非がん組織からDNAを抽出して、全エクソーム解析によりがん関連遺伝子や変異シグネチャーを分析した。がん関連遺伝子についてはEGFR変異陰性例でKRAS, BRAF, ERBB2変異などが見られ、がんの進行度の違いより喫煙の有無による差が大きかった。変異シグネチャーについては、喫煙者EGFR肺癌ではC>A substitutionの有意な増加は見られず、非喫煙者EGFR肺癌におけるSBS2/13のシグネチャーが着目された。喫煙者に生じた喫煙関連でない癌の新規シグネチャーが抽出された可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで解明されていなかった早期肺腺癌の遺伝子変化を解明することで、肺癌の原因に迫ることができる。本研究では、EGFR変異肺癌のなかで喫煙者と非喫煙者の癌を比べることで、喫煙者に発生したEGFR変異肺癌は、非喫煙者のEGFR変異肺癌とは異なる癌である可能性が示され、またEGFR陰性肺癌を特徴付ける新たなシグネチャーが抽出された可能性が浮上した。

研究成果の概要(英文)：To investigate characteristic genetic changes of early lung adenocarcinoma, we examined cancer related genes and mutation signatures by whole exome sequence. Regarding cancer related genes, mutations of KRAS, BRAF and ERBB2 were detected in EGFR-wild tumors. Regarding mutation signatures, there were no significant increase of C/A substitutions in smokers' EGFR-mutated tumors, and the SBS2/13 signature was noted. These may be novel characters of genetic signatures for smoking-unrelated tumors arising in smokers.

研究分野：医学

キーワード：肺がん 腺がん 早期がん がん関連遺伝子 変異シグネチャー 喫煙

1. 研究開始当初の背景

いわゆる次世代シーケンスの開発導入により全ゲノムのシーケンスが行われるようになって以降、種々のがんにおいて全ゲノムが解析され、肺がんにおいても、腺がん、扁平上皮がん、小細胞がんのゲノムの変化が詳細に報告された。肺腺がんでは EGFR, STK11 などのがん遺伝子の変異が高率に見出された¹⁾。肺腺がんの主要な遺伝子変異はほぼ解明され、ドライバー変異とパッセンジャー変異とが区別されるようになった。

近年、がんの腫瘍内での「進化」が仮定され、「中立進化」「選択」などの進化の概念が、がんのプログレッションにも応用されるようになった。これはまだ、仮説的なバイオインフォマティクス研究の段階にとどまっているが、がん発生の初期に生じたドライバー変異が全腫瘍中で優位となり、さらに途中で生じた変異が次第に優勢となっている様子を、計算で描き出すことも試みられている²⁾。

腫瘍の「進化」がこのようになっているとすると、見方を変えれば進行がんの中で優位を占める変異が、必ずしもがん発生初期の変異とは限らないことになる。すなわち、がんの原因を探るには、がん発生の最初期に生じたドライバー変異を同定する必要がある。肺がんの中でも腺がんはその大半を占めるが、これまで行われてきた肺腺がんの遺伝子解析は、大部分進行がんを対象にしてきた。進行がんにおける遺伝子変化は、がんのプログレッションによる二次的变化を見ている可能性があり、がんの原因を示唆するとは限らない。本研究では、上皮内腺がん (AIS) および微少浸潤腺がん (MIA) を対象とすることで、がんの原因を反映する遺伝子変化を抽出することを目指した。具体的には、末梢型の腺がんは、異型腺腫様過形成 (AAH) 上皮内腺がん (AIS) 早期浸潤がん (微少浸潤腺がん MIA) 転移のある腺がんとプログレッションしていると推定されている。

そこで本研究では、末梢型の肺腺がん発生における早期過程に焦点を置き、次世代シーケンスによって最初期に生じた遺伝子変化を同定する。遺伝子変化の種類としては、突然変異と変異シグネチャーに着目する。

2. 研究の目的

本グループでこれまで確立してきた病理標本の組織評価法およびホルマリン固定パラフィン包埋切片からの DNA 抽出法にもとづき、実際の肺腺がんの早期病変から次世代シーケンス解析 (全エクソーム解析) を行い、肺腺がんの早期病変における特徴的な遺伝子変異や変異シグネチャーの特徴を検出することを目的とする。

喫煙者に生じるがんは非喫煙者のがんとは性質が異なっているので、喫煙の有無は重要な属性である。他に、性別、進行度 (AIS, MIS) に応じて、遺伝子変化の様態を調べ、がん発生初期の変化を確立する。それを用いて、腫瘍から発癌因子を推測する方法の解明をめざす³⁾。

3. 研究の方法

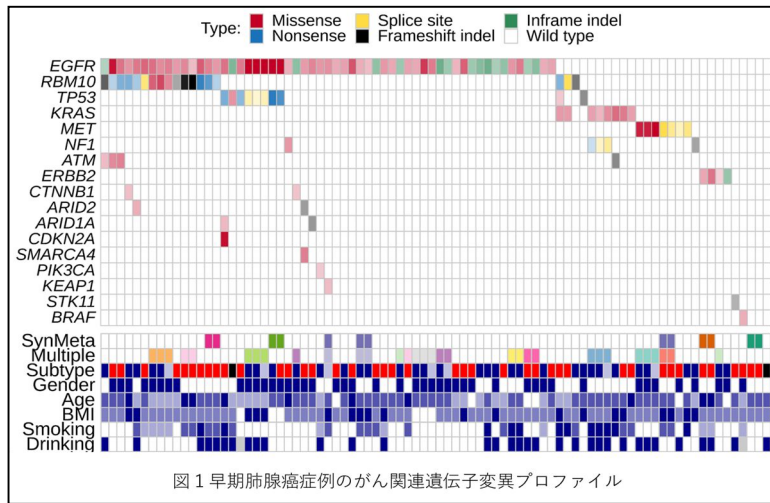
手術切除された AIS, MIA 計 60 症例を対象とした。それぞれの症例の病変部位および非病変部肺組織をマクロダイセクションし、DNA を抽出して、ライブラリ調整のうえ全エクソームシーケンスを施行した。

得られた結果から、がん関連遺伝子や変異シグネチャーの抽出を行ない、早期肺腺がんの遺伝子的特徴をまとめる。それらの特徴と患者ないしがんの属性 (年齢、性別、組織型 (AIS or MIA)、喫煙指数、単発/多発、BMI、飲酒量など) とを比較検討する。

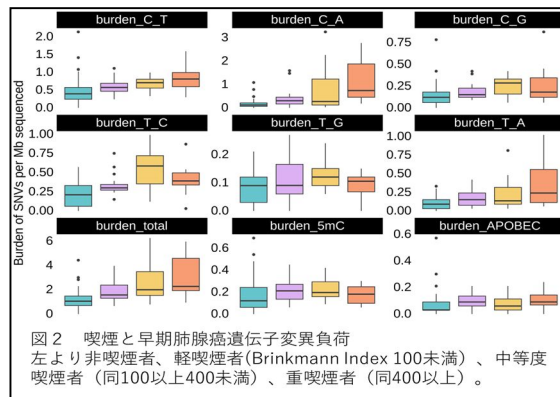
症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片より病変部位および非病変部肺組織をマクロダイセクションし、FormaPure XL Total (BECKMAN COULTER, Tokyo, Japan) を用い、そのプロトコールにしたがって DNA を抽出した。抽出した DNA を NEBNext FFPE DNA Repair Mix で修復し、NEBNext dsDNA Fragmentase を用いて断片化した後、NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit を用いて、次世代シーケンサーのライブラリ調整を行った (New England Biolabs)。ヒト全エクソン領域をキャプチャーするためのプローブとして xGen Exome Research Panel v2 (Integrated DNA Technologies) を用いた。

4. 研究成果

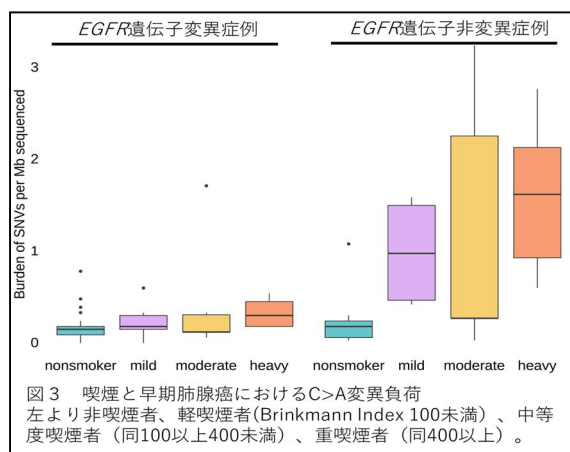
対象とした症例のがん関連遺伝子変異プロファイルを示す (図1)。がん関連遺伝子の異常については 1) EGFR 変異陰性例で Kras, BRAF, ERBB2, PDGFRA 変異などを見ること、2) EGFR 変異陽性例で RBM10, p53 遺伝子変異を併存することが多いこと、2) AIS/MIA の違いより性別、喫煙の有無に左右されていること、が示された。年齢、BMI (Body Mass Index)、飲酒と関わるがん関連遺伝子の異常はあきらかではなかった。



つぎに、対象とした症例の single base substitution プロファイルを示す (図2)。喫煙と total substitution および C>A substitution 負荷の量反応関係がうかがわれる結果であった。



一方、喫煙者の EGFR 変異陽性症例においては、興味深いことに C>A substitution 負荷と喫煙の関係があきらかではなかった (図3)。



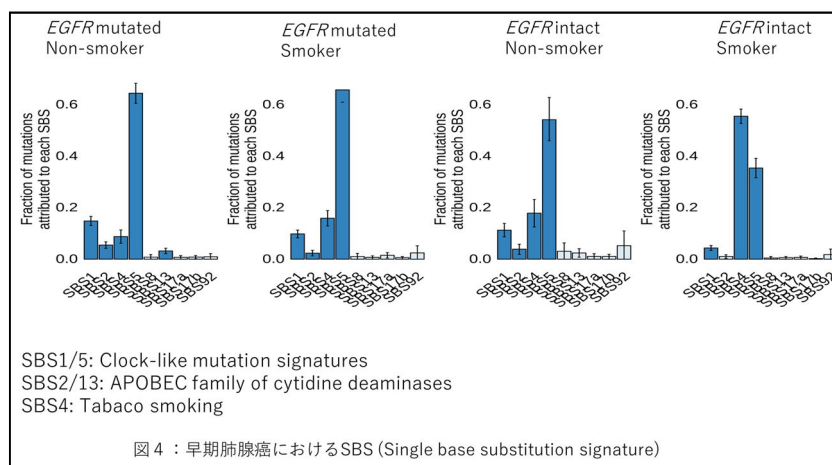
また、SBS(Single base substitution signature)につき、対象として症例を EGFR 遺伝子変異の有無と喫煙の有無でグループ分けし、解析した (図4)。非喫煙者 EGFR 変異陽性症例における SBS2/13 が着目された (APOBEC 活性による C>T 変異)。

結論として、肺腺がんの早期病変 60 症例につき、全エクソームシーケンスよりがん関連遺伝子変異の特徴や変異の特徴を抽出した。その結果、がん関連遺伝子の異常については EGFR 変異陰性例で KRAS, BRAF, ERBB2, PDGFRA 変異などが見られることが判明し、肺腺がんにおいては発がんの初期から主たるドライバー遺伝子異常を異にするいくつかのグループが存在することが示された。一方、がん関連遺伝子の異常は AIS/MIA の違いよりも性別、喫煙の有無に左右されているようであり、進行した肺腺がんで見られる多

数かつ複雑な遺伝子異常がどの段階で発生するかに示唆を与える結果と考えられた。さらに、一塩基置換にもとづきシーケンスデータを解析すると、想定されるごとく、喫煙者は非喫煙者より *C>A substitution* が多いことが確認された一方で、*EGFR* 変異陽性例、とりわけ非喫煙者における *SBS2/13* の寄与が着目される。これは、*APOBEC* 活性による *C>T* 変異の誘導によるものとされている。非喫煙者における肺腺癌の発生原因については現在のところ不明であるので *APOBEC* 活性の寄与が証明できれば、その一因の解明につながる重要な知見と考える。さらに、*EGFR* 変異陽性例は喫煙者であっても *C>A* 変異負荷の点から考えると癌の発生、進展への喫煙の関与は軽度と見受けられ、興味深い結果であった。

肺腺癌の早期病変 60 症例につき、全エクソームシーケンスよりがん関連遺伝子変異の特徴や変異の特徴を抽出することができた。これらの病変は、画像診断技術の進んだ日本での手術例が多く、本邦発の知見は世界的にも重要性が高い。日本及び中国の症例 52 例の解析が同種の研究の最大規模のものであるが 4)、本研究はそれをうわまわる規模かつ、新規のバイオインフォマティクス手法 (*SBS* 抽出) を導入したものである点で新規性がある。今後は肺腺癌の発生初期段階における遺伝子異常とその要因 (*APOBEC* 活性化など) や、免疫反応 (腫瘍関連マクロファージ、リンパ球浸潤の程度) と遺伝子異常の相関を検討する。

本研究は、秋田大学後藤明輝教授、佐々木研究所中岡博史部長との共同研究である。



< 引用文献 >

- 1) Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014 Jul 31;511(7511): 543-50. doi:10.1038/nature13385.
- 2) Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014 Mar 6;14(3):275-91. doi: 10.1016/j.stem.2014.02.006.
- 3) Travis WD, Brambilla E, Burke A, Marx A, Nicholson AG (2015) WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC, Lyon
- 4) Hu X, Fujimoto J, Ying L, et al. Multi-region exome sequencing reveals genomic evolution from preneoplasia to lung adenocarcinoma. *Nat Commun*. 2019 Jul 5;10(1):2978.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- Ninomiya H., Inamura K, Mun M., Nishio M., Ishikawa Y. Relationship between pT1 categories and pathological factors affecting prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *JTO Clin Res Rep*, 3 (4): 100293, 2022. doi.org/10.1016/j.jtocrr.2022.100293, PMID: 35400083
- Iizuka T, Nagano H, Ishikawa Y et al. The combined use of long non-coding RNA HOTAIR and polycomb group protein EZH2 as a prognostic marker of lung adenocarcinoma. *Cancer Treat Res Commun*. 2022;31:100541.
- Osako T, Kurisaki-Arakawa A, Dobashi A, Togashi Y, Baba S, Shiozawa S, Ishigame H, Ishige H, Ohno S, Ishikawa Y, Takeuchi K. Distinct clinicopathologic features and possible pathogenesis of localized ALK-

positive histiocytosis of the breast. *Am J Surg Pathol*. 2022; 46(3): 344-352. doi: 10.1097/PAS.0000000000001794.

Saito R, Ninomiya H, Okumura S, Mun M, Sasano H, Ishikawa Y. Novel histologic classification of small tumor cell nests for lung adenocarcinoma with prognostic and etiological significance: small solid nests and pure micropapillary nests. *Am J Surg Pathol*. 2021 May 1;45(5):604-615.

Nakashima Y, Inamura K, Ninomiya H, Okumura S, Mun M, Kirimura S, Kobayashi M, Okubo K, Ishikawa Y. Frequent expression of conventional endothelial markers in mesothelioma: Claudin-5 is useful to distinguish mesothelioma from angiosarcoma. *Lung Cancer*, 2020 Oct;148:20-7. doi:10.1016/j.lungcan.2020.07.029

Wakejima R, Inamura K, Ninomiya H, Nagano H, Mun M, Okumura S, Okubo K, Ishikawa Y. Mucinous lung adenocarcinoma, particularly referring to EGFR-mutated mucinous adenocarcinoma. *Pathol Int*. 2020 Feb; 70(2):72-83.

Matsuda M, Ninomiya H, Wakejima R, Inamura K, Okumura S, Mun M, Kitagawa M, Ishikawa Y. Calretinin-expressing lung adenocarcinoma: Distinct characteristics of advanced stages, smoker-type features, and rare expression of other mesothelial markers are useful to differentiate epithelioid mesothelioma. *Pathol Res Pract*. 2020 Mar; 216(3):152817. doi: 10.1016/j.prp.2020.152817. Epub 2020 Jan 10. PMID: 32008868

Sakakibara R, Kobayashi M, Takahashi N, Inamura K, Ninomiya H, Wakejima R, Kitazono S, Yanagitani N, Horiike A, Ichinose J, Matsuura Y, Nakao M, Mun M, Nishio M, Okumura S, Motoi N, Ito T, Miyazaki Y, Inase N, Ishikawa Y. Insulinoma-associated Protein 1 (INSM1) is a better marker for the diagnosis and prognosis estimation of small cell lung carcinoma than neuroendocrine phenotype markers such as chromogranin A, synaptophysin, and CD56. *Am J Surg Pathol*. 2020 Jun;44(6):757-764. doi: 10.1097/PAS.0000000000001444. PMID: 32118626

Hokari S, Tamura Y, Kaneda A, Katsura , Morikawa M, Murai F, Ehata S, Tsutsumi S, Ishikawa Y, Aburatani H, Kikuchi T, Miyazono K, Koinuma S. Comparative analysis of TTF 1 binding DNA regions in small cell lung cancer and non small cell lung cancer. *Mol Oncol*. 2020 Feb;14(2):277-293. doi: 10.1002/1878-0261.12608. Epub 2019 Dec 15. PMID: 31782890

Oka N, Kasajima A, Konukiewitz B, Sakurada A, Okada Y, Kameya T, Weichert W, Ishikawa Y, Suzuki H, Sasano H, Klöppel G. Classification and Prognostic Stratification of Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms. *Neuroendocrinology*. 2020;110(5):393-403. doi: 10.1159/000502776. Epub 2019 Aug 19. PMID: 31422400

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

Ishikawa Y. Histologic classification of tumors of the pleura: How has the WHO classification progressed after 2015? In: *Malignant pleural mesothelioma-Advances in pathogenesis, diagnosis, and treatments*, ed. by Nakano T, Kijima T. Springer Nature, Singapore, pp. 89-99, 2021. doi: 10.1007/978-981-15-9158-7_8.

[産業財産権] (計 0 件)

[その他] (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：後藤 明輝

ローマ字氏名：GOTO, Akiteru

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中岡 博史

ローマ字氏名：NAKAOKA, Hirofumi

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakashima Yasuhiro, Inamura Kentaro, Ninomiya Hironori, Okumura Sakae, Mun Mingyon, Kirimura Susumu, Kobayashi Masashi, Okubo Kenichi, Ishikawa Yuichi	4. 巻 148
2. 論文標題 Frequent expression of conventional endothelial markers in pleural mesothelioma: usefulness of claudin-5 as well as combined traditional markers to distinguish mesothelioma from angiosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 20 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2020.07.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuda Masanori, Ninomiya Hironori, Wakejima Ryo, Inamura Kentaro, Okumura Sakae, Mun Mingyon, Kitagawa Masanobu, Ishikawa Yuichi	4. 巻 216
2. 論文標題 Calretinin-expressing lung adenocarcinoma: Distinct characteristics of advanced stages, smoker-type features, and rare expression of other mesothelial markers are useful to differentiate epithelioid mesothelioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 152817 ~ 152817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2020.152817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakakibara Rie, Kobayashi Maki, Takahashi Naoko, Inamura Kentaro, Ninomiya Hironori, Wakejima Ryo, Kitazono Satoru, Yanagitani Noriko, Horiike Atsushi, Ichinose Junji, Matsuura Yosuke, Nakao Masayuki, Mun Mingyon, Nishio Makoto, Okumura Sakae, Motoi Noriko, Ito Takaaki, Miyazaki Yasunari, Inase Naohiko, Ishikawa Yuichi	4. 巻 44
2. 論文標題 Insulinoma-associated Protein 1 (INSM1) Is a Better Marker for the Diagnosis and Prognosis Estimation of Small Cell Lung Carcinoma Than Neuroendocrine Phenotype Markers Such as Chromogranin A, Synaptophysin, and CD56	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 757 ~ 764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Ryoko, Ninomiya Hironori, Okumura Sakae, Mun Mingyon, Sasano Hironobu, Ishikawa Yuichi	4. 巻 45
2. 論文標題 Novel Histologic Classification of Small Tumor Cell Nests for Lung Adenocarcinoma With Prognostic and Etiological Significance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 604 ~ 615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wakejima Ryo, Inamura Kentaro, Ninomiya Hironori, Nagano Hiroko, Mun Mingyon, Okumura Sakae, Okubo Kenichi, Ishikawa Yuichi	4. 巻 70
2. 論文標題 Mucinous lung adenocarcinoma, particularly referring to <i>EGFR</i> mutated mucinous adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 72 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12879	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hokari Satoshi, Tamura Yusuke, Kaneda Atsushi, Katsura Akihiro, Morikawa Masato, Murai Fumihiko, Ehata Shogo, Tsutsumi Shuichi, Ishikawa Yuichi, Aburatani Hiroyuki, Kikuchi Toshiaki, Miyazono Kohei, Koinuma Daizo	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparative analysis of TTF 1 binding DNA regions in small cell lung cancer and non small cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 277 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oka Naomi, Kasajima Atsuko, Konukiewitz Björn, Sakurada Akira, Okada Yoshinori, Kameya Toru, Weichert Wilko, Ishikawa Yuichi, Suzuki Hiroyoshi, Sasano Hironobu, Kippel Ginter	4. 巻 110
2. 論文標題 Classification and Prognostic Stratification of Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 393 ~ 403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000502776	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Osako Tomo, Kurisaki-Arakawa Aiko, Dobashi Akito, Togashi Yuki, Baba Satoko, Shiozawa Satoshi, Ishigame Hiroki, Ishige Hiroyuki, Ohno Shinji, Ishikawa Yuichi, Takeuchi Kengo	4. 巻 46
2. 論文標題 Distinct Clinicopathologic Features and Possible Pathogenesis of Localized ALK-positive Histiocytosis of the Breast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 344 ~ 352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001794	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iizuka Toshihiko, Nagano Hiroko, Nomura Kimie, Hiramatsu Miyako, Motoi Noriko, Mun Mingyon, Ishikawa Yuichi	4. 巻 31
2. 論文標題 The combined use of long non-coding RNA HOTAIR and polycomb group protein EZH2 as a prognostic marker of lung adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Treatment and Research Communications	6. 最初と最後の頁 100541 ~ 100541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ctarc.2022.100541	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ninomiya Hironori, Inamura Kentaro, Mun Mingyon, Nishio Makoto, Ishikawa Yuichi	4. 巻 3
2. 論文標題 Relationship Between Pathologic T1 Categories and Pathologic Factors Affecting Prognosis in Pulmonary Adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JTO Clinical and Research Reports	6. 最初と最後の頁 100293 ~ 100293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtocrr.2022.100293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
研究協力者	後藤 明輝 (GOTO Akiteru)		

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
研究協力者	中岡 博史 (NAKAOKA Masafumi)		

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