

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17669

研究課題名(和文) 間質性肺炎合併肺がんの特徴的な発がんメカニズムの探索

研究課題名(英文) Search for the unique carcinogenic mechanisms of lung cancer with interstitial pneumonia

研究代表者

本多 隆行 (Honda, Takayuki)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教

研究者番号：30827259

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)：本研究では、間質性肺炎(IP)に合併した肺がんのドライバー遺伝子に非依存的に発がん機能の特徴を全ゲノムシーケンスを用いて描出を試みた。細胞系特異的な遺伝子であるNKX2-1が、染色体構造異常を含めて高頻度に認められる遺伝子異常であることを同定し、それが発現量の低下をもたらすことを明らかにした。また、切除肺を用いた空間的拡がりの検討では、非腫瘍部にもがん関連遺伝子の変異が蓄積していること、またそれが同一肺葉内で広く分布している可能性を示した。この結果は通常の既存のドライバー遺伝子に依存しない新たな発がん機能の基盤情報となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常型肺癌と比較して予後不良である間質性肺炎(IP)合併肺癌であるが、既存のドライバー遺伝子の異常では説明できない特徴的な発がん関連遺伝子を有することが明らかになった。これまで研究対象として捉えられることが少なかった肺癌において、その発がん機構の解明に繋がる基礎データが得られ、かつそれは既存の分子標的薬が存在せず、新たな標的遺伝子候補とも考えられた。

研究成果の概要(英文)：Driver oncogene-independent oncogenic mechanism of lung cancer associated with interstitial pneumonia (IP) was analyzed using whole genome sequencing. Lineage specific gene, NKX2-1, was identified as frequently mutated gene including structural variant in this tumor. These gene aberrations associated with lower expression level of this gene. Target sequencing using surgically resected lung lobe showed accumulation of cancer associated gene mutations in non-cancerous area. These results would be a basis for potentially novel lung carcinogenesis independent from driver oncogene aberrations.

研究分野：がんゲノム

キーワード：肺がん 遺伝子変異 間質性肺炎 発がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎(IP)は肺の炎症後における線維化の脱制御化で特徴づけられる慢性呼吸器疾患である、疫学的に肺発がんリスクが10倍になることが知られており腫瘍促進的な微小環境の本態と考えられる。また、IP 合併肺癌の臨床転帰は予後不良であり、標準治療が使えない場合も多く、呼吸器内科診療における Unmet Needs である。

申請者らの先行研究から IP に合併した肺腺がんが既存のドライバー遺伝子に依存せず発がんしていること、また肺サーファクタント遺伝子群の変異が予後に関連する特徴的遺伝子異常であることを明らかにした。以上から帰結される科学的疑問としては、①IP 合併肺がんでは認められるドライバー遺伝子に非依存的な肺発がんの機構、②肺発がん母地と考えらる IP にはすでにゲノム異常が存在するのか、が挙げられ、この謎の解明が必要と考えられた。

2. 研究の目的

IP に合併した肺腺がんの特徴的なゲノム異常を腫瘍部と IP 部や正常部の全ゲノムシーケンスの比較を行って抽出する。また、そこから同定された萌芽的と思われる変異などが肺葉内でのように起こりうるかをターゲットシーケンス等で検証する。

3. 研究の方法

<対象症例>

既存のデータや共同研究者のデータの二次利用を許可してもらい、データ解析の中心としては、まずは、IP 合併肺がんを特徴づけるような腫瘍中心的なゲノム異常の同定のための Bulk 組織から網羅的なゲノム解析を行う方針に軌道修正した。対象患者は、(a) 筆者の先行研究例 (Honda T, et al. JCO Precision Oncology. 2018) の重複を含む 72 例 (IP 合併例 33 例、非喫煙例 143 例、能動喫煙例 196 例) を候補とした。これらの症例のデータは 1997~2008 年まで国立がん研究センター中央病院で手術されて凍結保存された生体試料を解析した。また、非腫瘍部におけるゲノム異常の拡がりの探索研究には、東京医科歯科大学呼吸器外科で 2019 年~2020 年に手術を受けた症例の中で、(b) 手術直後の手術試料の中から生体試料の多数箇所生検を施行できた 12 例を候補とした。

IP 合併の定義として、(a) においては American Thoracic Society/European Respiratory Society IPF criteria (2002 年度版および 2011 年度版) に基づき病理学的に Usual interstitial pneumonia (UIP) が証明されて、その辺縁あるいは隣接して腫瘍形成を認めた症例を抽出した。(b) においては、術前の胸部 High-resolution computed tomography (HRCT) 検査で IP の存在を疑う HRCT 所見を有するものを選択した。すべての患者は UICC 第 7 版または第 8 版で病期分類されて手術治療を受け、年齢・性別・喫煙歴・その他の臨床情報は後方視的に診療録から抽出した。また、本研究は本学及び国立がん研究センターの IRB の了承を得て遂行している。

<シーケンスと変異検出>

gDNA の抽出は QIAamp DNA Mini kit (Qiagen 社) を用いて腫瘍部および非腫瘍部から行った。tRNA の抽出は RNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen 社) で行いクオリティチェックは 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社) で行った。

ターゲットシーケンスでは Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies 社) を用いて、がん関連遺伝子の Hot spot のスクリーニングを行った。全エクソン解析 (WES) については先行研究で得られた結果 1 を二次利用した。RNA シーケンスは 200 ng の tRNA から TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina 社) でライブラリ作成を行い Paired-end sequencing (75-bp reads) を HiSeq 2500 (Illumina 社) でシーケンスした。全ゲノム解析 (WGS) 用のライブラリ作成は TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit (Illumina 社) を用いて行い、シーケンスは NovaSeq 6000 (Illumina 社) で、ペアエンドリード (150bp) で行った。リード深度は平均で腫瘍部が 100x、非腫瘍部が 30x となるようにした。ゲノムマッピングは参照ヒトゲノムを hg38 とし、GATK Best Practice に準拠し、BWA-MEM を用いて行った。単塩基置換 (SNV) は Mutect2 (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360036733771-Mutect2>) を用いて、挿入・欠失変異 (INDEL) は Strelka2 を用いて検出した。アノテーションは ANNOVAR、SnpEff、OncoKB を用いて検討した。

<染色体コピー数および染色体構造異常 (SV) の解析>

染色体コピー数は WES のデータを用いて GISTIC2.0 で計算した。また、染色体構造異常は WGS のデータを用いて Manta 及び Gridss を用いて抽出した。VAF>0.05 および Total Reads >5 で条件フィルターを設定して、それを満たすもののみを採用し、その結果を SURVIVOR9 ツールキットを

用いて統合した。

4. 研究成果

<IP 合併肺癌における中心的ゲノム異常候補の同定>

筆者が行った先行研究 1 で用いた手法は肺腺癌に対する全エクソン解析であった。その解析結果を踏まえつつ、本研究では、新たに Non-coding 領域や染色体構造異常も含めて検出・同定を行うため全ゲノム解析で再度シーケンスを行う方針とした。UIP 合併の肺腺癌 (UIP-LADC) に加えて、通常の浸潤型肺腺癌のデータについては、共同研究先である国立がん研究センター研究所ゲノム生物学研究分野の河野隆志分野長が別プロジェクトで遂行していた解析結果を二次利用させていただいた。まず、患者背景と大局的変異数の概要について図 1 に示す。UIP-LADC では IP の患者特性を反映して喫煙歴を有する男性が多く、UIP 非合併の通常型浸潤性肺腺癌の喫煙者集団に類似していた。コントロールの一つと考えられる非喫煙者集団においては女性が多く有意に多いことは対照的である (図 1. A)。

図 1. B には UIP-LADC 群と UIP 非合併の非喫煙者群、UIP 非合併の能動喫煙者群の 3 群における SNV と INDEL の総数を示す。UIP-LADC 群は非喫煙者群よりは変異数が多いものの、能動喫煙者群に比すると SNV・INDEL のいずれも変異総数は有意に低いことが判明した。喫煙がもたらす発がんの影響の機構として、ベンツピレンなどのアダクトが、ゲノム DNA 上に結合することで G>T の塩基置換をもたらすことが知られており、がん関連遺伝子において多数の変異による遺伝子の機能失調が考えられている。しかし、本研究の結果は能動喫煙者よりも変異数の蓄積が少なくても UIP-LADC 群では肺発がんに至ると解釈が可能であり、変異の蓄積以外のゲノム異常によって肺発がんがもたらされる可能性が考えられた。

図 2 は肺腺癌のこれまでのゲノム解析報告で高頻度に見られるゲノム異常について、各群での分布を俯瞰的に表したものになる。通常の浸潤性肺腺癌では約 30-50%の頻度で認めるはずの EGFR 遺伝子変異は UIP-LADC 群では 1 例も認めず、明らかに通常型肺腺癌の発がんメカニズムとは異なる経路を辿ることを再検証した。筆者の先行研究の全エクソン解析の結果から UIP-LADC の特徴的な遺伝子として報告した NKX2-1 の変異は非喫煙者や喫煙者の肺腺癌でも少数例に認められた。

図 2

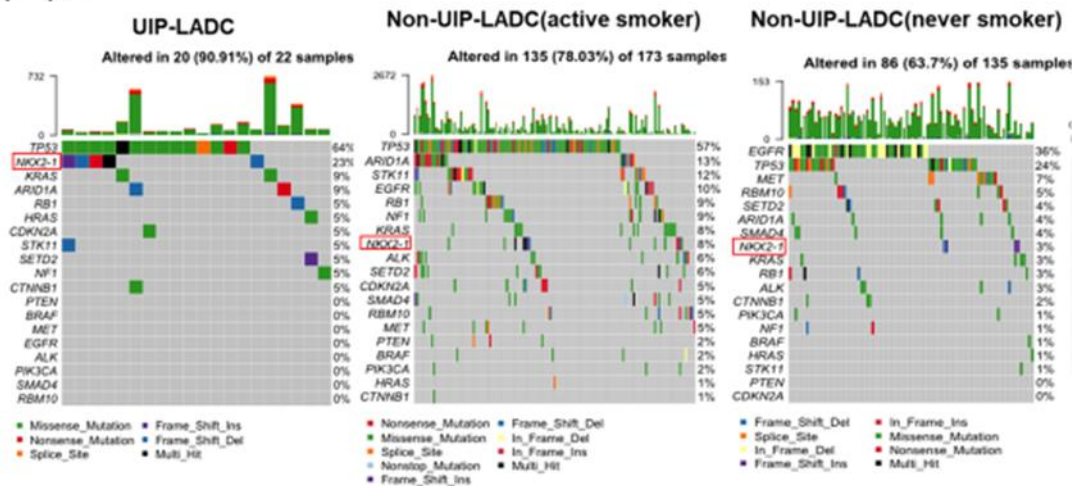


図 1

(A)

	UIP-LADC (n=33)	Non-UIP-LADC (Never smoker) (n=143)	Non-UIP-LADC (Active smoker) (n=196)
性別(男/女)	27/6	21/122	169/27
年齢 mean±SD (歳)	66.8±8.1	67.0±11.3	60.9±9.42
喫煙(あり/なし)	28/5	0/143	196/0
Brinkman Index mean±SD	839±588 喫煙者: 1008±496 *P<0.01 FDR	0	961±614 **P<0.001 FDR

(B)

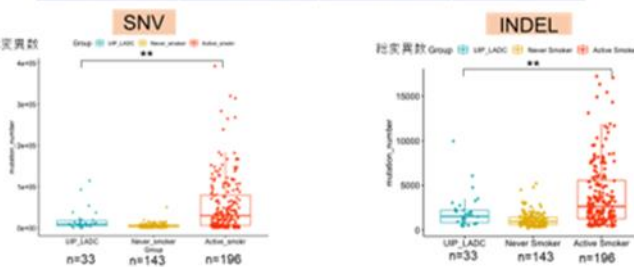
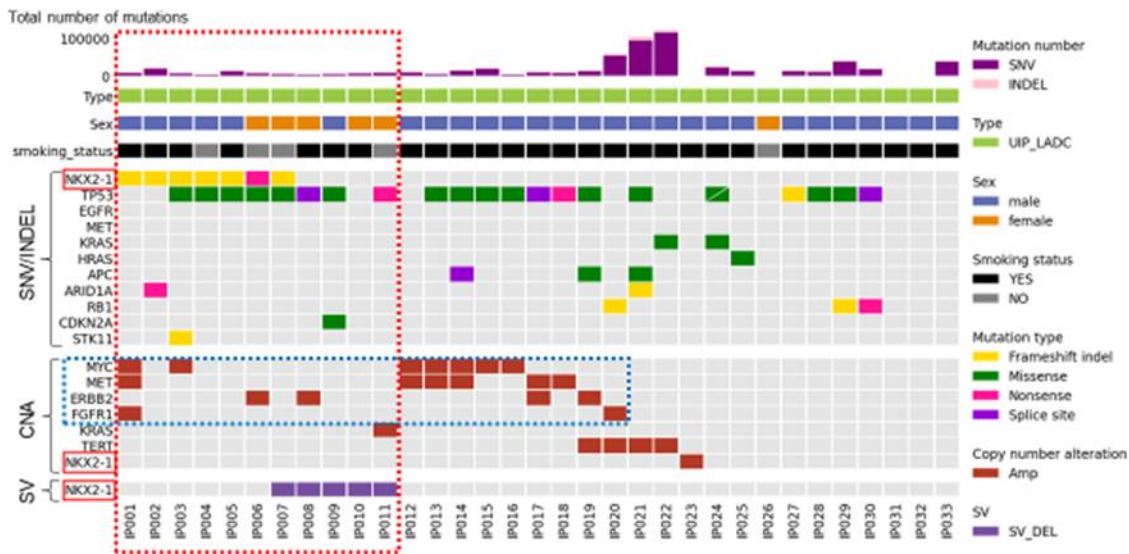


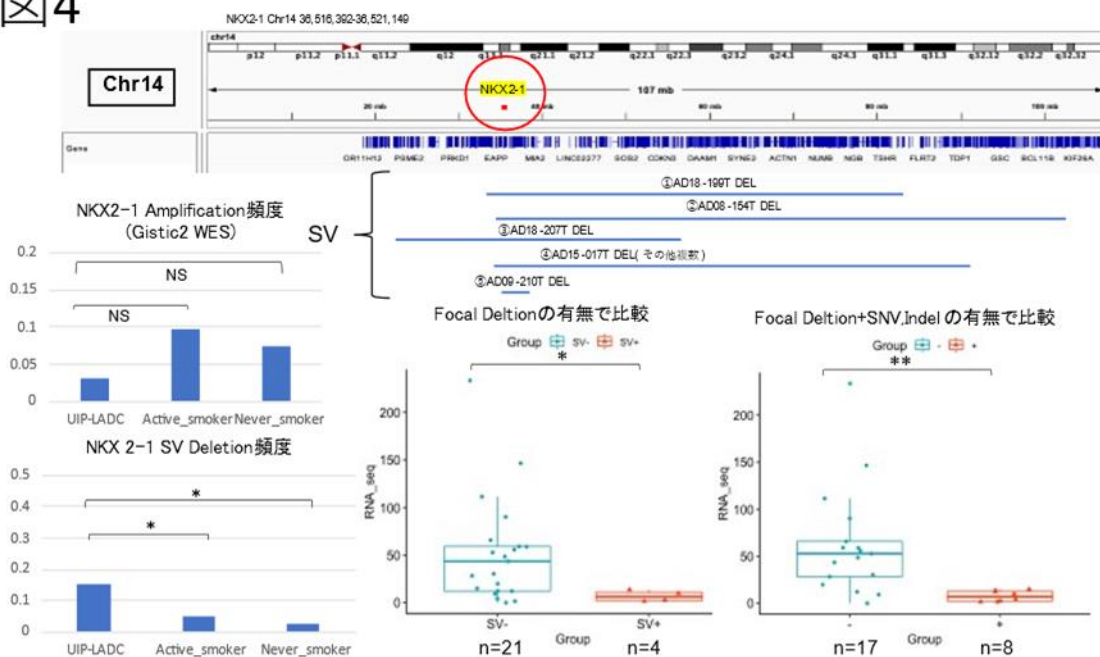
図3はUIP-LADC群のゲノム異常について着目して変異に加えて染色体コピー数、SVの解析を統合した結果である。最も高頻度に変異を認めた遺伝子はTP53で、次いでNKX2-1であった。興味深いのはこのNKX2-1については、SVがUIP-LADC群の約15%に存在して、その変異とほぼ排他的に存在している。NKX2-1は変異・SV合わせて約33%と高頻度に見られるUIP-LADCに特徴的なドライバー遺伝子であることが明らかになった。NKX2-1は別名TTF-1 (Thyroid transcription factor-1)と呼ばれ、通常は肺及び甲状腺に高発現している。NKX2-1は胎児期に肺上皮細胞で産生が開始される肺上皮細胞特異的遺伝子(肺サーファクタント遺伝子群)の転写制御に重要な役割を果たす転写因子として知られる。肺サーファクタント遺伝子群の胚細胞変異は遺伝性間質性肺炎や家族性肺癌の発症原因としても知られている。その機能的意味からも、UIP-LADCにおいてNKX2-1が一つのターゲットとして高頻度にゲノム異常が蓄積していることは、現時点では支配原理については未解明であるものの、肺癌の発生・分化に、間質性肺炎の成立やその影響が、密なるクロストークの存在が示唆されているように思われる。

3



さらにNKX2-1の構造異常について、UIP非合併の症例でも検討した(図4)。いくつかの症例ではUIP非合併の肺腺癌でも染色体コピー数異常とSVを有したものの、UIP-LADC群ではNKX2-1の染色体コピー数増幅が少なくSVは多い。逆にUIP非合併の肺腺癌の群においては、NKX2-1の染色体コピー数増幅がUIP-LADC群より多くSVは少ないという傾向を認めたことである。NKX2-1のSVの遺伝子発現に対する影響をRNAシーケンスで検討したところ、NKX2-1のFocal Deletionが起こるとその発現量が低下することが示され、UIP-LADCではNKX2-1の発現量低下がもたらされていることが示された。

4

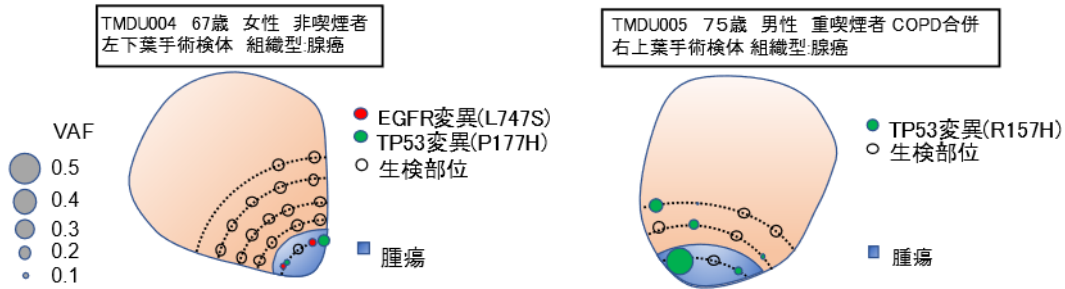


<IP 合併肺癌における Field Cancerization の探索>

以上の結果を踏まえると NKX2-1 のゲノム異常は UIP を合併する肺癌の特徴的ゲノム異常の可能性が高く、そのゲノム異常が萌芽的に非癌部にも広がりを見せているのか (Field Cancerization) の探索を行う計画を立てて予備的検討を行った。

一般的に生体試料から核酸を収集する場合、腫瘍部と異なり非癌部から収集できる DNA・RNA の量が少ない。正常肺の多くは肺胞構造を維持しており組織学的に粗な状態であり、生検量に対する実質臓器の割合が少ないことが予想される。まずはゲノム解析に足る核酸の収量が得られるかの予備実験を行っている。採取した生検部位で OCT コンパウンドを作成、さらにそこから薄切を行い、DNA 抽出を行ったが、いくつかのサンプルでは平均 DNA 収量が 3-4ng/μl 程度しか得られず。試みに、入力 DNA 量が極めて少量で行える Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 でターゲットシーケンスを行ってはみたものの、エラーとなる現象が多発した。

図5



現時点では、生検方法(大きさなど)について再検討中である。一部の症例ではターゲットシーケンスが可能であったが、その症例では非癌部にも腫瘍内で認める変異を同じがん関連遺伝子の変異が検出されており(図5)、生検方法の改良により安定的な DNA 収量が得られたのちには、カスタムパネルとしては図6に上げた候補遺伝子の非癌組織への分布を探索していく予定としている。

図6

<i>EGFR</i>	<i>MET</i>	<i>SFTPA1</i>
<i>KRAS</i>	<i>RET</i>	<i>SFTPA2</i>
<i>NRAS</i>	<i>SMARCA4</i>	<i>SFTPB</i>
<i>BRAF</i>	<i>KEAP1</i>	<i>SFTPC</i>
<i>TP53</i>	<i>STK11</i>	<i>NKX2.1</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>ARID1A</i>	
<i>RB1</i>	<i>CDKN2A</i>	
<i>ERBB2</i>	<i>CTNNB1</i>	
Cancer associated genes		PSSGs

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wong Jason Y.Y., Zhang Han, Hsiung Chao A., Shiraishi Kouya, Honda Takayuki, Lan Qing, et al	4. 巻 112
2. 論文標題 Tuberculosis infection and lung adenocarcinoma: Mendelian randomization and pathway analysis of genome-wide association study data from never-smoking Asian women	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genomics	6. 最初と最後の頁 1223 ~ 1232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygeno.2019.07.008	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 Watanabe Tomoko, Honda Takayuki, Totsuka Hirohiko, Yoshida Masayuki, Tanioka Maki, Shiraishi Kouya, Shimada Yoko, Arai Eri, Ushiyama Mineko, Tamura Kenji, Yoshida Teruhiko, Kanai Yae, Kohno Takashi	4. 巻 182
2. 論文標題 Simple prediction model for homologous recombination deficiency in breast cancers in adolescents and young adults	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breast Cancer Research and Treatment	6. 最初と最後の頁 491 ~ 502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10549-020-05716-0	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 Inoue Yukihisa, Okamoto Tsukasa, Honda Takayuki, Nukui Yoshihisa, Akashi Takumi, Takemura Tamiko, Tozuka Minoru, Miyazaki Yasunari	4. 巻 8
2. 論文標題 Disruption in the balance between apolipoprotein A I and mast cell chymase in chronic hypersensitivity pneumonitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunity, Inflammation and Disease	6. 最初と最後の頁 659 ~ 671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iid3.355	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 Naoki Nishiyama, Takayuki Honda, Manabu Sema, Tatsuo Kawahara, Yasuto Jin, Ichiro Natsume, Tomoshige Chiaki, Takaaki Yamashita, Yoshikazu Tsukada, Reiko Taki, Yoshihiro Miyashita, Kazuhito Saito, Tomoya Tateishi, Hiroyuki Sakashita, Yasunari Miyazaki	4. 巻 25
2. 論文標題 The Utility of Ground-Glass Attenuation Score for Anticancer Treatment-Related Acute Exacerbation of Interstitial Lung Disease Among Lung Cancer Patients With Interstitial Lung Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 282-291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-019-01576-x	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 Wong JYY, Zhang H, Hsiung CA, Shiraishi K, Yu K, Matsuo K, et al.	4. 巻 112
2. 論文標題 Tuberculosis infection and lung adenocarcinoma: Mendelian randomization and pathway analysis of genome-wide association study data from never-smoking Asian women.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genomics	6. 最初と最後の頁 1223-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygeno.2019.07.008	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 Hirose S, Murakami N, Takahashi K, Kuno I, Takayanagi D, Asami Y, Matsuda M, Shimada Y, Yamano S, Sunami K, Yoshida K, Honda T, Nakahara T, Watanabe T, Komatsu M, Hamamoto R, Kobayashi Kato M, Matsumoto K, Okuma K, Kuroda T, Okamoto A, Itami J, Kohno T, Kato T, Shiraishi K, Yoshida H	4. 巻 156
2. 論文標題 Genomic Alterations in STK11 Can Predict Clinical Outcomes in Cervical Cancer Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 203-210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygyno.2019.10.022.	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Honda T, Sakashita H, Masai K, Motoi M, Kobayashi M, Akashi T, Mimaki S, Tsuchihara K, Shiraishi K, Okubo K, Watanabe S, Tsuta K, Inase N, Miyazaki Y, Kohno T
2. 発表標題 Distribution of Tumor Mutation Burden in Lung Adenocarcinoma Patients with Usual Interstitial Pneumonia
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of The Japanese Respiratory Society
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
研究協力者	河野 隆志 (Kohno Takashi)	国立がん研究所・ゲノム生物学研究分野・分野長 (82606)	

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