

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300346

研究課題名(和文)小細胞肺癌のゲノムワイド網羅的解析による発生分子基盤の解明と治療標的の探索

研究課題名(英文)Comprehensive genomic analysis of small cell lung cancer exploring mechanisms of the proliferation and therapeutic targets

研究代表者

後藤 功一 (GOTO, Koichi)

独立行政法人国立がん研究センター・東病院・科長

研究者番号：90435719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：分子生物学的な発生機序が解明されていない小細胞肺癌を対象として、切除例と進行例の両者において網羅的な遺伝子解析を行ったところ、PI3K/AKT/mTOR経路に高頻度で遺伝子変異を認めた。またPI3K/AKT/mTOR経路の変異は、小細胞肺癌の発生に関わるとされるMYCファミリー遺伝子群の変異と、相互排他性を認めた。更に、PIK3CAの活性化型変異を有する細胞株(H1048)において、PIK3CAをノックダウンしたところ、細胞の増殖が抑制されることを確認した。これらの結果により、PI3K/AKT/mTOR経路が、小細胞肺癌の発生において生物学的に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of the proliferation of small cell lung cancer (SCLC) is not well identified. We conducted a comprehensive genomic analysis in both surgical resected and advanced SCLC cases and found a high penetrance of genetic alterations in the PI3K/AKT/mTOR pathway. These alterations were mutually exclusive with alterations in MYC family members which were reported to play a role in SCLC biology. Additionally, PIK3CA silencing induced a decrease in the proliferation of H1048 cells harboring activating mutation in PIK3CA gene. These results suggested the biological importance of PI3K/AKT/mTOR pathway in the proliferation of SCLC.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：小細胞肺癌 全エクソン解析 SNPアレイ 候補遺伝子 臨床情報 網羅的 予後不良 PI3K/AKT/mTOR経路

1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌は、増殖が速く、他臓器やリンパ節に転移しやすい悪性度が高い腫瘍である。化学療法や放射線治療の感受性は比較的良好であるが、いったん治療で奏効が得られても、その多くの患者で再発/増悪が認められる。予後に関して、限局型小細胞肺癌では生存期間中央値が20-28ヵ月、進展型小細胞肺癌では9-13ヵ月程度であると報告されており、長期生存が得られることは非常に稀である。

小細胞肺癌の予後の改善には、従来の作用機序とは異なる新たな治療法の開発が極めて重要である。これまで15種類を超える様々な分子標的治療薬の臨床試験が行われたが、シスプラチン+イリノテカン療法あるいは、シスプラチン+エトポシド療法などの既存の殺細胞性抗癌剤を上回る新規薬剤は見つかっておらず、予後の改善がほとんど得られていなかった。この原因としては、小細胞肺癌の分子生物学的な発生機序が解明されておらず、治療標的が定まっていないことが挙げられる。したがって、今後の治療の進歩のために、網羅的な遺伝子解析による分子生物学的な発生メカニズムの解明が、必須であり急務である。

小細胞肺癌は進行が早く大部分が切除不能なため、遺伝子解析に足る十分な量の組織検体を得ることが極めて困難であり、研究開始当初、大規模な遺伝子解析は、世界中で実施されていなかった。我々は、20年間で1000例以上の小細胞肺癌を経験し、この中に、頻度が少ない切除例が多数(70例)含まれていた。これら切除検体を用いれば、小細胞肺癌の網羅的な遺伝子解析が可能と考え、本研究を企画提案した。

2. 研究の目的

5年生存率が10%未満と予後不良の疾患である小細胞肺癌を対象として、国内有数のコホートを用いた、大規模網羅的な遺伝子解析を行い、分子遺伝学的発生メカニズムを解明することにより、新しい治療法を開発することを目的とする。

なお、網羅的ゲノム解析データについては、小細胞肺癌の治療法の開発を目的とした次世代がん研究戦略推進プロジェクトで収集されるデータを最大限利用し、その解析データと統合しながら、本研究では特に小細胞肺癌の分子生物学的発生メカニズムについて重点的に解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 対象症例の選択(切除例): 国立がん研究センター東病院、肺癌データベース(1992年~2011年肺癌全体約12000例; うち小細胞肺癌約1000例)の中から、肺切除術が行われていて、術後病理診断が小細胞肺癌であった症例を抽出する。これら切除例に関しては、HE標本を再度レビューし、

形態学的に小細胞肺癌の特徴を有していることを確認する。さらに chromogranin, synaptophysin, CD56 等、神経内分泌マーカーの染色も行い、免疫組織学的に標本の均質性が保たれているかについても再確認を行う。

(2) ゲノム DNA の抽出: (1) で得られた対象症例において、ホルマリン固定もしくはメタノール固定のパラフィン包埋病理組織標本を薄切し、鏡視下特異的に肺癌組織を取り出す。その後、ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) からのゲノム抽出に最適な DNA 抽出キットを用いて、ゲノム DNA を抽出する。

(3) ゲノム DNA の網羅的解析: ゲノム DNA よりキャプチャー法により全エクソン領域を濃縮し、Illumina Genome Analyzer 等を用いて平均 50 以上の冗長性を目標に超並列シーケンスを行う。更に、がん細胞における体細胞性変異を、生殖細胞系列の変異・多型と区別するために、がん部と非がん部の両方でシーケンスを行う。ここで検出された変異、異常については、適宜サンガー法による確認を行う。

(4) 遺伝子コピー数異常の解析: ゲノム DNA 上の一塩基単位の網羅的変異解析に加え、遺伝子コピー数異常を検出するため、Illumina iScan 等を用いた SNP アレイを行う。

(5) 二次集計による特徴づけ: 遺伝子変異(全エクソン解析) 遺伝子増幅、欠失 (SNP アレイ解析) が見られた遺伝子を統合的に収集し、既知の細胞内シグナル経路へのマッピングや、遺伝子産物のもつ機能ドメインによる分類を行い、小細胞肺癌症例で重複して異常が検出される遺伝子群の同定を行う。この中から細胞増殖(疾患の発生)に関与すると考えられる遺伝子変異を中心に、治療標的となり得る新しいドライバー遺伝子変異候補の同定を行う。

(6) 別コホート: 進行例生検標本での確認
a) 対象症例の選択: 国立がん研究センター東病院、肺癌データベースの中から、経気管支肺生検もしくは CT ガイド下針生検等の生検により小細胞肺癌との診断が得られた症例を抽出し、その中から比較的十分な量の組織が得られている進行例を選択する。

b) ドライバー遺伝子の進行例生検標本での確認: 小細胞肺癌切除例の網羅的解析の結果得られたドライバー遺伝子候補の中で、細胞増殖(疾患の発生)に関与すると考えられる変異遺伝子を中心に、進行例でも DNA を抽出し、ターゲットシーケンスを行いその発現と変異頻度を確認する。

(7) 培養細胞実験系を用いた遺伝子産物の細胞生物学的機能確認: 小細胞肺癌細胞株の、ゲノム構造異常や遺伝子発現パターンの結果を、前述の(5)で検討した臨床例での結果と参照する。細胞株に RNA 干渉法による発現抑制を行い、腫瘍微小環境を模倣した条件での細胞増殖、生存、運動、間質との相互

作用等を検討する。更に、既存あるいは新規の各種抗がん剤や分子標的薬に対する感受性が、遺伝子変異の有無により変化をきたすかどうかの検証を行う。

4. 研究成果

(1) 対象症例(切除例)の選択とゲノム DNA の抽出：独立行政法人国立がん研究センター東病院の肺がんデータベースの中から、肺切除術が行われ、術後病理診断で小細胞肺がんと確認された症例を検索したところ、全体で 70 例が存在した。その 70 例の病理組織標本を再レビューし、ゲノム DNA の網羅的解析に足る程度の十分な量の組織が得られ、非腫瘍部と腫瘍部がペアで存在する症例を選択したところ、60 例が抽出された。腫瘍部と非腫瘍部から、それぞれ 60 例ずつ、合計 120 例の検体からゲノム DNA を抽出したが、シーケンスに足る十分な DNA が得られ、腫瘍部と非腫瘍部がペアで存在する検体は 55 例(腫瘍部 55 例+非腫瘍部 55 例、合計 110 例)であった。これら 55 例の詳細な臨床情報の抽出も行った。

(2) 予後不良であった小細胞肺がん切除例の網羅的遺伝子解析：(1)で選択された 55 例のうち、早期再発を認め予後不良であった 10 例(腫瘍部 10 例+非腫瘍部 10 例、合計 20 例)につき、全エクソン解析と SNP アレイを行った。この結果と次世代がん研究戦略プロジェクトの研究で得られた網羅的遺伝子解析の結果を統合したところ、日本人小細胞肺がん切除例の遺伝子変異の詳細なカタログ情報が得られた。

(3) 小細胞肺がんの発生メカニズムに関わる遺伝子群の同定と層別化：切除例の全エクソン解析及びコピー数異常解析にて、変異、増幅、欠失が見られた遺伝子を統合的に収集し、既知の細胞内シグナル経路へのマッピングと遺伝子産物が持つ機能ドメインによる分類を行い、重複して異常が検出される遺伝子群の同定を行った。この中から、がん関連経路の 1 つ(=PI3K/AKT/mTOR 経路)に高頻度で遺伝子変異を認めた。この経路のサンプル毎の遺伝子変異は、経路を構成する遺伝子群(PIK3CA, PTEN, AKT2, AKT3, RICTOR, mTOR)の中で、相互排他性を認めた。更に小細胞肺がんの発生に関わるとされる、他の既知の遺伝子群(=MYC, MYCL1, MYCN)の変異とも相互排他性を認めたため、小細胞肺がんの発生に関与していると考えられた。

(4) 培養細胞実験系の構築と遺伝子産物の細胞生物学的機能確認：(2)の切除例臨床検体の網羅的遺伝子解析の結果から、PI3K/AKT/mTOR 経路が、小細胞肺がんの発生に関与していることが示唆されたため、培養細胞実験系を構築し、細胞生物学的機能の確認を行った。具体的には、PI3K/AKT/mTOR 経路に変異を有する細胞株 H1694 (AKT3 増幅)において AKT の強発現を確認した。更に細胞

株 H446 (PTEN 欠失)と細胞株 H1048 (PIK3CA 変異)でリン酸化 AKT の発現を確認し、これらが PI3K/mTOR 阻害剤により抑制されることを確認した(図 1)。

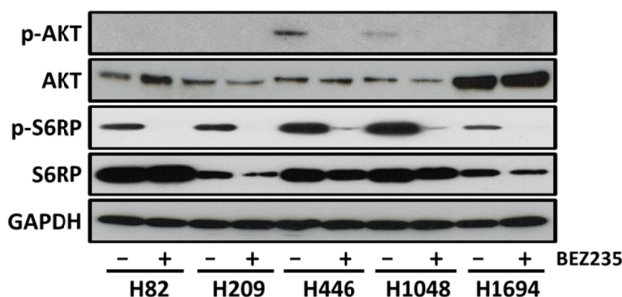


図 1：小細胞肺がん細胞株における PI3K/mTOR 阻害剤 (BEZ235) 処理前後のリン酸化 AKT の変化

更に H1048 細胞株においてリン酸化プロテオーム解析を行い、PI3K/mTOR 阻害剤処理前後における、PI3K/AKT/mTOR 経路のリン酸化タンパクの変動を確認した。加えて H1048 において、siRNA を用いて PIK3CA をノックダウンしたところ、細胞の増殖が抑制されることを確認した(図 2)。

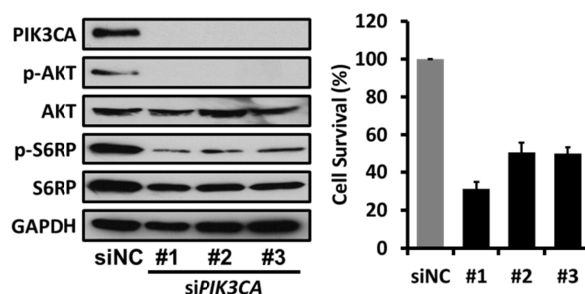
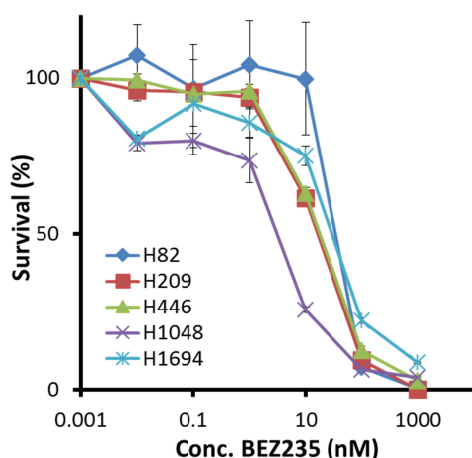


図 2：H1048 細胞株における PIK3CA ノックダウンによる細胞増殖の変化

以上の結果から、PI3K/AKT/mTOR 経路に変異を有する細胞株では、この経路が腫瘍の発生に関与していることを、細胞生物学的にも確認した。

(5) PI3K/AKT/mTOR 経路に変異を有する細胞株と、変異を有さない細胞株での、新規分子標的治療薬の感受性比較：PI3K/AKT/mTOR 経路に変異を有する細胞株 (H1048, H446, H1694)と、変異を有さない細胞株(H82, H209)の両者を用いて、PI3K 経路の各種阻害剤 (PI3K 阻害剤、mTOR 阻害剤、AKT 阻害剤、PI3K/mTOR 阻害剤) の感受性試験を行った。この結果により、PI3K 経路の 4 種類の阻害剤の中で、PI3K/mTOR 阻害剤 (BEZ235) が、PIK3CA の活性化型変異を有する細胞株：H1048 の増殖を、最も特異的に阻害することを確認した(図 3)。



(図 3) 小細胞肺癌細胞株における PI3K/mTOR 阻害剤 (BEZ235) の感受性比較

(6) 進行小細胞肺癌における候補遺伝子異常の疫学情報の収集: 国立がん研究センター東病院において、経気管支肺生検もしくは CT ガイド下針生検により小細胞肺癌との診断が得られたサンプルにおいて、カスタムパネル (244 遺伝子、1.5Mb) を用いた標的遺伝子解析を実施した。

この結果と次世代がん研究戦略プロジェクトの研究で得られた変異情報を集計し、合計 90 例の小細胞肺癌進行例において、候補遺伝子異常の疫学情報の収集を行った。このうち小細胞肺癌進行例 28 例 (31%) に PI3K/AKT/mTOR 経路に遺伝子異常を認め、小細胞肺癌で既知のドライバーとして知られている MYC family と相互排他性の傾向を認めた。これらの結果より、PI3K/AKT/mTOR 経路が、進行小細胞肺癌の発生においても生物学的に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Matsumura Y, Umemura S, Ishii G, Tsuta K, Matsumoto S, Aokage K, Hishida T, Yoshida J, Ohe Y, Suzuki H, Ochiai A, Goto K, Nagai K, Tsuchihara K. Expression profiling of receptor tyrosine kinases in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung: a comparative analysis with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, [Epub ahead of print] DOI:10.1007/s00432-015-1989-z (査読有)

Umemura S, Mimaki S, Makinoshima H, Tada S, Ishii G, Ohmatsu H, Niho S, Yoh K, Matsumoto S, Takahashi A, Morise M, Nakamura Y, Ochiai A, Nagai K, Iwakawa

R, Kohno T, Yokota J, Ohe Y, Esumi H, Tsuchihara K, Goto K. Therapeutic priority of the PI3K/AKT/mTOR pathway in small cell lung cancers as revealed by a comprehensive genomic analysis. J Thorac Oncol, 2014, 9(9):1324-31. DOI:10.1097/jto.0000000000000250 (査読有)

Umemura S, Tsuchihara K, Goto K. Genomic profiling of small-cell lung cancer: the era of targeted therapies. Jpn J Clin Oncol, 2015, 45(6):513-19. DOI:10.1093/jjco/hyv017 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

S Umemura, K Tsuchihara., S Mimaki, S Matsumoto, G Ishii, H Ohmatsu, S Niho, K Yoh, Y Ohe, K Goto. High frequency of therapeutically relevant genomic alterations in advanced small cell lung cancer detected by targeted next-generation sequencing from small biopsy samples. ESMO congress. 2014.9.26-30 (Madrid. Spain)

梅村茂樹、土原一哉、三牧幸代、松本慎吾、石井源一郎、大松広伸、仁保誠治、葉清隆、大江裕一郎、後藤功一: 進行小細胞肺癌の次世代シーケンサーを用いた標的遺伝子解析による新しい治療法の探索. 第 55 回日本肺癌学会学術集会 2014.11.16 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

S Umemura, K Goto S Mimaki, G Ishii, H Ohmatsu, S Niho, K Yoh, S Matsumoto, A Takahashi, K Nagai, Y Ohe, H Esumi, K Tsuchihara. Comprehensive genomic analysis of small cell lung cancer in Asian patients. ASCO 2013.5.11 (Chicago.USA)

S Umemura, S Mimaki, H Makinoshima, G Ishii, A Takahashi, H Ohmatsu, S Matsumoto, K Nagai, Y Ohe, H Esumi, K Tsuchihara, K Goto. Comprehensive genomic analysis of small cell lung cancer in Asian patients. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013.10.3-5 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

梅村茂樹、土原一哉、三牧幸代、牧野嶋秀樹、石井源一郎、大松広伸、仁保誠治、葉清隆、松本慎吾、高橋明子、森瀬昌宏、永井完治、大江裕一郎、江角浩安、後藤功一: 小細胞肺癌における driver mutation の探索

第 54 回日本肺癌学会総会 2013.11.21
ホテルニューオータニ(東京都・千代田
区)

梅村 茂樹、後藤 功一、土原 一哉、三
牧 幸代、高橋 明子、松本 慎吾、葉 清
隆、仁保 誠治、大松 広信、石井 源一
郎、江角 浩安、永井 完治、大江 裕一
郎：小細胞肺癌の網羅的遺伝子変異解析
による治療標的の探索 第 53 回日本肺
癌学会総会 2012.11.9 岡山コンベンシ
ョンセンター(岡山県・岡山市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 功一(GOTO, Koichi)
国立がん研究センター・東病院・科長
研究者番号：90435719

(2) 研究分担者

梅村茂樹(UMEMURA, Shigeki)
国立がん研究センター・東病院・医員
研究者番号：80623967

土原一哉(TSUCHIHARA, Katsuya)
国立がん研究センター・早期/探索臨床研究
センター・分野長
研究者番号：00415514

石井源一郎(ISHII, Genichiro)
国立がん研究センター・東病院・臨床開発セ
ンター・ユニット長

研究者番号：00270869

江角浩安(ESUMI, Hiroyasu)
国立がん研究センター・東病院・院長
研究者番号：70160364
(24年度のみ)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：