

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82606
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26461206
 研究課題名(和文) 次世代シーケンサを用いた胸腺癌新規治療標的遺伝子の同定

 研究課題名(英文) The genomic and epigenomic landscape in thymic carcinoma

 研究代表者
 藤原 豊 (Fujiwara, Yutaka)

 国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長

 研究者番号：70464261
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、胸腺癌組織のゲノム・トランスクリプトーム解析により、治療標的となりうる変異・増幅・融合等の遺伝子異常の同定を行うことである。胸腺癌52例のFFPE腫瘍組織で IonAmpliseq Cancer Hotspot Panel v2によるがん遺伝子hot spotの遺伝子変異解析が行われ、7人の患者に TP53, KRAS, FBXW7, NRASの変異が同定された。腫瘍組織および正常組織の新鮮凍結組織(10例)で次世代シーケンサー解析を行い、C>T transitionsが63.4%と優位であり、TET2変異と高頻度のメチル化、mRNA発現レベルの低下の相関を認めた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the genomic and epigenomic alterations by next generation sequencing of thymic cancer as target for anti-cancer therapy. Sixty-four consecutive patients with thymic carcinoma treated at the National Cancer Hospital between 1973 and 2014 were included in this study. Tissue samples of 52 patients (81.3%) were available for targeted sequencing of mutation hot spots in 50 cancer-related genes by IonAmpliseq Cancer Hotspot Panel v2. The genetic alterations of TP53, KRAS, FBXW7, and NRAS were detected in 7 patients (13.5%). In whole exome and transcriptome sequencing from paired snap-frozen cancerous or non-cancerous tissues (n=10), we identified a mutation signature consisting of enrichment for C>T substitutions at CpG dinucleotides. And we also identifies thymic cancers with TET2 mutations had more hypermethylated genes than those without, and hyper-methylation was associated with downregulation of gene expression.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：胸腺癌 化学療法 遺伝子Profile 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

胸腺癌は10万人あたり約0.15人/年発症とされる希少疾患であり、進行期において予後不良の悪性縦隔腫瘍である。化学療法に関してはプラチナ製剤併用、アンスラサイクリン系抗がん薬併用の治療レジメンが多く用いられてきたが、希少性故にほとんどが第2相試験であり、標準治療は確立されていない。2004年にNEJMにおいてKIT遺伝子変異を有する胸腺癌にKIT阻害剤でもあるImatinibでの奏効が報告され、2015年にMulti-targeted therapyであるSunitinibの有効性が示された。近年のゲノム網羅的な遺伝子解析は、いくつもの癌種において治療標的となりうる遺伝子異常を同定し、その遺伝子異常に対する画期的新薬の開発が治療成績を向上させている。胸腺癌でこのような解析が行われた報告は少なく、Memorial Sloan-Kettering Cancer CenterにおけるFFPE組織7例、当センター東病院におけるFFPE組織17例で、KIT、EGFR、KRAS等の遺伝子変異が検索され、数例の変異が報告されたのみである。胸腺癌に対する新たな治療標的を同定するために、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、有効な薬物療法のない胸腺癌において新しい治療標的分子を同定することである。本研究では、患者がん組織のゲノム・トランスクリプトーム解析により、治療標的となりうる変異・増幅・融合等の遺伝子異常の同定を行う。

3. 研究の方法

国立がん研究センター中央病院において治療を受けた胸腺癌患者において臨床情報、新規抗癌薬を含む化学療法の治療効果を解析する。国立がん研究センターバイオバンクに保存される全52例の胸腺癌(胸腺腫を含まず)の中で凍結組織の入手できる17例において、次世代シーケンサを用いた全エクソーム解析、全トランスクリプトーム解析等を行い、遺伝子異常を網羅的に同定する。FFPE組織を含む全52例の検体を用いて、見出された遺伝子異常のprevalenceを把握する。

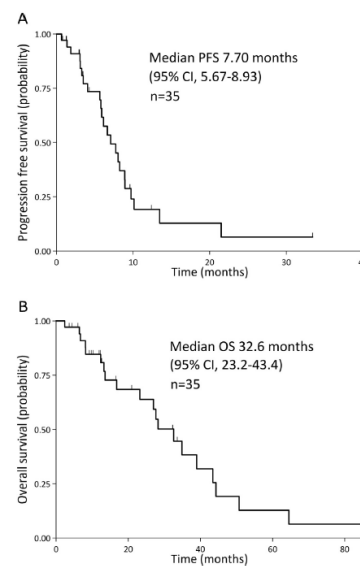
図1: 患者背景

Patient characteristics		All patients (n=64)	Patients who received chemotherapy (n=36)
Age, years	Median	57	53
	Range	22-77	22-72
Sex	Female	26 (40.6)	24 (33.3)
	Male	38 (59.3)	12 (66.7)
Histology	Squamous cell carcinoma	47 (73.4)	25 (69.4)
	Adenocarcinoma	2 (3.1)	1 (2.8)
	Small cell carcinoma	1 (1.6)	1 (2.8)
	Poorly differentiated carcinoma	7 (10.9)	3 (8.3)
	Thymic carcinoma, NIS	7 (10.9)	6 (16.7)
Stage (Masaoka classification) n, %	I	3 (4.7)	-
	II	5 (7.8)	-
	III	18 (28.1)	7 (19.4)
	IVa	18 (28.1)	14 (38.9)
	IVb	20 (31.3)	15 (41.7)
Smoking status	Current smoker	18 (28.1)	14 (40.0)
	Former smoker	16 (25.0)	9 (25.7)
	Never smoker	23 (35.9)	12 (33.3)
	Data not available	7 (10.9)	1 (2.8)
Performance status	0	33 (48.4)	14 (38.9)
	1	31 (48.4)	20 (55.6)
	2	1 (1.6)	1 (2.8)
	3	1 (1.6)	1 (2.8)
Initial treatment	Surgery	34 (53.1)	-
	Chemotherapy	29 (45.3)	-
	Radiotherapy	1 (1.6)	-

4. 研究成果

【胸腺癌の治療成績】1973年4月から2014年3月までに国立がん研究センター中央病院で治療を受けた全ての症例(n=64)が登録された。化学療法がおこなわれた36例のうち35例で治療効果が解析可能であった(図1)。初回治療としてカルボプラチン、パクリタキセル療法が24人(66.7%)に、11人(30.6%)に他のプラチナ併用化学療法が、1人に非プラチナ療法が実施された。初回化学療法の無増悪生存期間(PFS)、全生存期間(OS)は各々7.07か月(95%CI, 5.67-8.93)、32.6か月(95%CI, 23.2-43.6)であった(図2)。カルボプラチン、パクリタキセル療法の奏効割合、病勢制御割合は各々27.8%(95%CI, 12.3-48.6)、86.1%(95%CI, 73.1-100)、PFS、OSは各々8.9か月(95%CI, 5.7-13.5)、34.8か月(95%CI, 13.6-50.7)であった

図2: 初回化学療法における無増悪生存期間(A)、全生存期間(B)



3人(20.3%)の患者が24の新規抗がん剤の試験を受けた。内訳はMulti-targetedチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)が8(33.3%)、殺細胞薬が5(15.1%)、免疫チェックポイント阻害薬が2(8.3%)であった。2例(8.3%)で部分奏効(Multi-targeted TKI 1、殺細胞薬 1)が、10人(41.7%)で病状の安定(SD)が認められた。6人(25%)で6か月以上の治療効果持続が認められ、Multi-targeted TKIの患者ではより長い傾向が認められた(図3)。

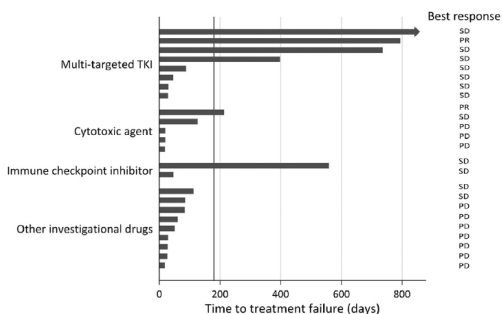


図3: 新規抗癌薬の治療効果

【胸腺癌 FFPE 標本 52 例のがん関連遺伝子解析】

国立がん研究センター中央病院においてホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織が入手できた 52 例から library 解析のための DNA 10ng が抽出された。Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel v2[®] (Thermo Fisher Scientific) (図 4) により 50 のがん関連遺伝子において 2790 の Hot spot が解析された。

図 4 : 50 のがん関連遺伝子のリスト

ABL1	EGFR	GNA11	KRAS	PTPN11
AKT	ERBB2	GNAQ	MET	RB1
ALK	ERBB4	HNFA	MLH1	RET
APC	EZH2	HRAS	MPL	SMAD4
ATM	FBXW7	IDH1	NOTCH1	SMARCB1
BRAF	FGFR1	IDH2	NPM1	SMO
CDH1	FGFR2	JAK2	NRAS	SRC
CDKN2A	FGFR3	JAK3	PDGFRA	STK11
CSF1R	FLT3	KDR	PIK3CA	TP53
CTNNB1	GNAS	KIT	PTEN	VHL

7人(13.5%)の患者において9の遺伝子変異が確認された。内訳は TP53(n=4, 7.5%)、KRAS (n=2, 3.8%)、FBXW7 (n=2, 3.8%)、NRAS (n=1, 1.9%)であり KIT、BRAF、EGFR、FGFR、MET 変異は認めなかった。2人の患者で2つの変異 (TP53/KRAS と TP53/FBXW7) が併存していた。

【胸腺癌における全エクソーム、トランスクリプトーム解析】

国立がん研究センターバイオバンクにおいて腫瘍組織および正常組織の新鮮凍結のペア組織が入手できた 10 例が解析された。全エクソーム解析及び全トランスクリプトーム解析には、Illumina 社の HiSeq2000 シークエンサーを用いた。遺伝子変異の検出には MuTect プログラムを、融合遺伝子の検出には TopHat-Fusion と deFuse の二つのプログラムを用いた。

全エクソーム解析における遺伝子変異数 (synonymous と nonsynonymous) の平均は 45.1 (range, 11-83) であり、nucleotide substitution は C>T transitions が 63.4% を占めていた (図 5)。遺伝子変異 Profile を図 6 に示すが、TET2、STED2 の変異は複数の症例で確認された。

図 5 : 胸腺癌における nucleotide substitution

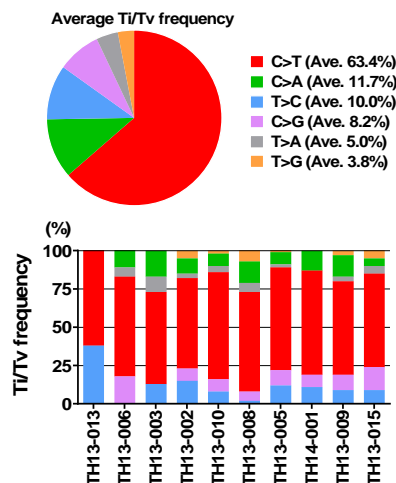
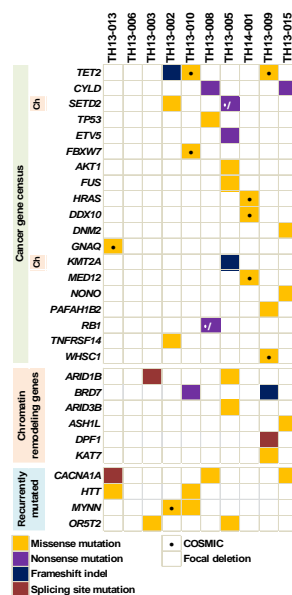
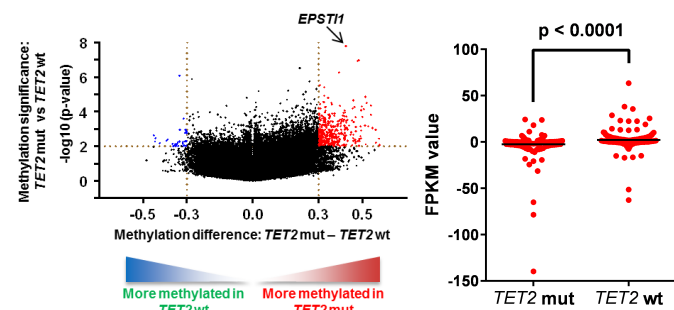


図 6 : 胸腺癌全エクソーム解析における遺伝子変異 Profile



全トランスクリプトーム解析において TET2 変異を有する症例 (n=3) では無い症例 (n=7) よりもより高頻度のメチル化と、mRNA の発現レベルの低下を認めた (図 7)。

図 7 : TET2 遺伝子変異とエピジェネティック変異との相関



引用文献

1. P. Strobel, M. Hartmann, A. Jakob, et al. Thymic carcinoma with overexpression of mutated KIT and the response to Imatinib, NEJM. 350 (2004) 2625-2626.
2. A. Thomas, A. Rajan, A. Berman, et al. Sunitinib in patients with chemotherapy-refractory thymoma and thymic carcinoma: an open-label phase 2 trial, Lancet Oncol. 16 (2015) 177-186.
3. N. Girard, R. Shen, T. Guo, et al. Comprehensive genomic analysis reveals clinically relevant molecular distinctions between thymic carcinomas and thymomas, Clin. Cancer Res. 15 (2009) 6790-6799.
4. M. Shitara, K. Okuda, A. Suzuki, et al. Genetic profiling of thymic carcinoma using targeted next-generation sequencing, Lung Cancer 86 (2014) 174-179.
5. Y. Wang, A. Thomas, C. Lau, et al., Mutations of epigenetic regulatory genes

are common in thymic carcinomas, Sci. Rep. 4 (2014) 7336.

6. I Petrini, PS Meltzer, IK Kim, et al. A specific missense mutation in GTF2I occurs at high frequency in thymic epithelial tumors. Nat Genet 46 (2014) 844-9.

7. Y Wang, A Thomas, C Lau, et al. Mutations of epigenetic regulatory genes are common in thymic carcinomas. Sci Rep 4 (2014) 7336.

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 1件)

Tetsuhiko Asao, Yutaka Fujiwara, Kuniko Sunami, Shinsuke Kitahara, Yasushi Goto, Shintaro Kanda, Hidehito Horinouchi, Hiroshi Nokihara, Noboru Yamamoto, Hitoshi Ichikawa, Takashi Kohno, Koji Tsuta, Shun-ichi Watanabe, Kazuhisa Takahashi, Yuichiro Ohe. Medical treatment involving investigational drugs and genetic profile of thymic carcinoma. Lung Cancer、査読有り、93 (2016) 77-81.

〔学会発表〕(計 2件)

1. T Asao, Y Fujiwara. Retrospective analysis of 64 consecutive patients with thymic cancer.

APLCC 2014 NOV. Kuala Lumpur (Malaysia)

2. 朝尾哲彦, 藤原豊. 胸腺癌 64 例の後方視的検討

日本内科学会 2015 年 4 月国際フォーラム(東京)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原豊 (FUJIWARA, Yutaka)

国立がん研究センター中央病院先端医療科/呼吸器内科・医長

研究者番号：70464261

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

朝尾哲彦 (Asao, Tetsuhiko)

河野隆志 (Kohno, Takashi)

市川仁 (Ichikawa, Hitoshi)

齋藤元伸 (Saito, Motonobu)