

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462142

研究課題名(和文)次世代シーケンス解析による喫煙関連肺癌に対する新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Search for new therapeutic targets of the tobacco-related lung cancer

研究代表者

守屋 康充 (MORIYA, Yasumitsu)

千葉県がんセンター(研究所)・がんゲノムセンター・客員研究員

研究者番号：90375692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌症例の遺伝子発現情報の解析を行い、喫煙関連肺癌、特に肺扁平上皮癌において発現が亢進している遺伝子群、マイクロRNA(miRNA)群を抽出した。正常肺組織、肺腺癌と肺扁平上皮癌で比較検討したところ、扁平上皮癌の予後に関連するmiRNAを見出すことができた。マイクロRNA-mRNAのネットワーク解析から、これらのmiRNAの標的遺伝子が同定され、この遺伝子は予後に関連していた。これらの結果より喫煙関連癌、肺扁平上皮癌の発癌過程の解明、治療標的の開発に応用できる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Squamous cell carcinoma (SqCC) is second major histological subtype of lung cancer. Unlike in the case of lung adenocarcinoma (Ad), SqCC has only few molecular target drugs. In the mature microRNA(miR) fragments, 34 miRs were identified as the candidates especially for SqCC distinguished from Ad. Furthermore, four miRs were up regulated in amplified regions and independently associated with poor prognosis in SqCC. Moreover, those who had the tumor with high expression in three of four miRs simultaneously showed the worst prognosis. To explore miR-mRNA network, we also predicted the target genes for each miRs. MicroRNA will regulate target molecules related to carcinogenesis and malignancy in SqCC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺癌 ゲノム マイクロRNA 遺伝子 外科

1. 研究開始当初の背景

WHO による The Global Burden of Disease project では、2030 年の世界規模の疾患構成を予測した死因ベスト 10 で、肺癌は 6 位にランクされ、悪性腫瘍では群を抜いてトップである。わが国でも肺癌による死亡者は、1998 年に 5 万人に達してわが国の癌死因第一位となり、2011 年には 70,292 人と 7 万人を突破、さらに 20 年後には 1.9 倍に増加すると予想されている。このように、原発性肺癌は世界の癌死亡原因の 1 位であり、本邦においても急増しており、最も予後不良な悪性腫瘍である。

肺癌の発症要因で最も重要なのは喫煙であるが、その関連の程度は組織型により異なる。扁平上皮癌および小細胞癌は喫煙との関連が極めて強いが、腺癌では比較的軽度である。今後の原発性肺癌に対する治療戦略は、がん細胞の起源(幹細胞)や発癌過程(喫煙・非喫煙)を考慮して、手術・化学療法・放射線による集学的治療を組み立てる、個別化医療が必要とされている。

近年、分子標的治療薬の治療効果は、非喫煙者の肺腺癌における EGFR 変異陽性例や ALK 転座例に著効を示し、注目を浴びている。しかし、扁平上皮癌など主に喫煙を発症要因とする肺癌(全肺癌の約 60%)に対する分子標的治療薬は未だ開発されていない。

近年の技術の進歩により、ヒトの全ゲノムを 1000 ドルで調べることができるような時代に突入している。次世代シーケンサー Ion Torrent Proton を利用して、がんゲノム配列の検討が可能となっている。このようなシーケンシング技術の進歩により、7000 以上の多くの症例で遺伝子一つ一つではなく、全遺伝子の変異を検討すること(Pan-Cancer analysis)で遺伝子変異の Signature としてそれぞれのがんを分子レベルで細く分類することが可能となることが報告されている。ミスマッチリペア遺伝子の変異の特徴や抗がん剤や老化による変異パターンを判断でき、癌種ごとの特徴も検出可能となる。このように直接遺伝子変異を見るのではなく、その変異のパターンを見ることで個々のがんにおける遺伝子パスウェイの異常を予測できることが解ってきた。さらに遺伝子配列変異(Mパターン)とコピー数変異(Cパターン)は逆相関し、遺伝子配列変異が少ないがんではコピー数変異を解析する重要性も認識されている。

2. 研究の目的

喫煙関連肺癌において、次世代シーケンシング解析により癌関連遺伝子の全エクソン解析を行い、我々がすでに有する肺癌 cDNA 発現プロファイルおよびマイクロ RNA 発現プロファイルとの比較検討から喫煙関連肺癌の新しいシグナルパスウェイを解明し、核酸医薬として応用できるような治療標的を探索し、検証することを目的とする。

また、バイオマーカー探索とその解析結果のパターン自体がバイオマーカーとなる可能性を追求し、個々の患者の治療法選択や予後予測、再発診断、さらに診断プロトコルの変更、治療レジメの変更、放射線治療の適応等を予測できる、実用化可能なレベルでの包括的な分子診断技術の開発および新規治療標的の探索を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 過去の当施設での喫煙関連肺癌症例について、腫瘍組織と正常組織由来の DNA を抽出精製し、第 3 世代次世代シーケンサーを用いた CCP パネルで解析を行う。

Hot Spot の解析:50 以上の Hot Spot (p53 や RAS などのがん頻度の高い遺伝子変異)について、通常のサンガーシーケンシング法では見逃すことが多い 15%以下の腫瘍 DNA 変異(正常組織の混入によりがん由来 DNA 比率が低くなる)を解析する。

がん関連遺伝子の機能的変異解析:本研究では 409 のがん関連遺伝子の全エクソンを解読することで、比較的希少ながん関連遺伝子が機能的にがんに関与すると考えられるアミノ酸の変化や転写終了コドンを生み出す変異を同定する。この変異の中で、喫煙関連肺癌に新たに関連する遺伝子を検討する。

がん関連遺伝子のコピー数変異(CNV)解析:次世代シーケンサーによる解読回数が多い(Coverage が高い)Exome 解析では、その解読の回数の大小でゲノムコピー数の変化を読み取ることができる。遺伝子増幅や欠失がどの遺伝子で起こっているかを、CGH 解析と比較し検討する。

(2) 喫煙関連肺癌に関する次世代シーケンサーによる包括的な解析結果と、我々が既に有する肺癌手術検体の cDNA 発現プロファイルおよびマイクロ RNA 発現プロファイルの統合解析と公共のデータベースも用いて、新たな Mutation Signature の提唱をこころみる。その Signature そのものが最終的に新たなバイオマーカーとして活用できるかは確約できないが、上記解析結果を統合、さらに既存の臨床症状や生化学、病理検査等を検討に加えることで包括的な診断法の確立を試みる。

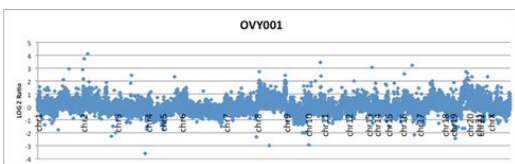
4. 研究成果

(1) ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック(FFPE)サンプルからと凍結サンプルからの DNA の比較解析を行ったところ、ホルマリン固定時間の長い症例と脱灰処理を行った症例では DNA のクオリティに問題があったが、250 塩基の PCR 増幅ができた DNA においては FFPE サンプルであっても、シーケンシング結果に問題は認められなかった。ホルマリンによ

る C から T への変異も、少なくとも当施設で検討した症例では報告されている様な増加傾向は認められなかった。我々の施設でのチップへのローディング効率率は 80% の高率、シーケンスリードと平均解読長は、7.8Gb を平均 103 塩基解読と好成績であった。

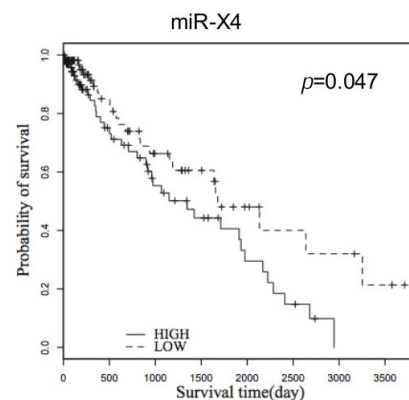
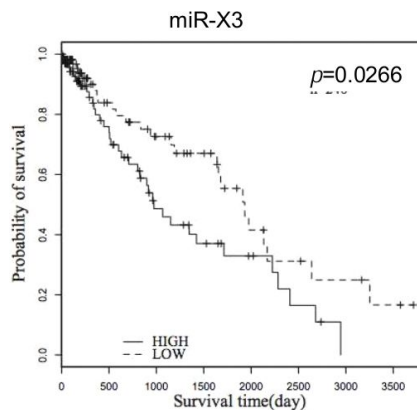
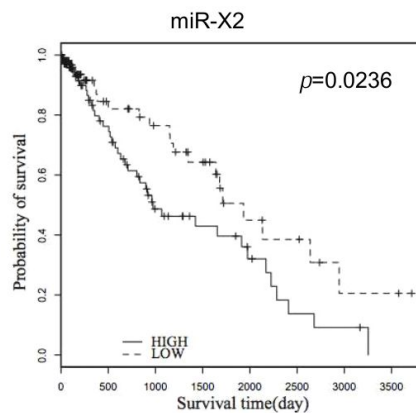
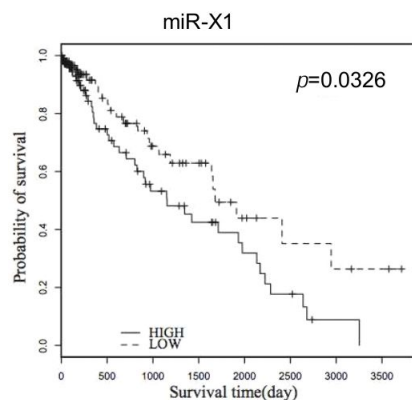


(2) 次世代シーケンサーによる解読回数の Coverage depth は、FFPE のサンプルで、3 ペアを一度に一つのチップで解析しても、平均 1000 回以上、95% 以上の領域が 100 回以上解読されており、高深度の Exome 解析であった。この遺伝子ごとの解読回数をゲノムの物理地図上にプロットすると、下図のごとくゲノムコピー数の変化を類推することができた。

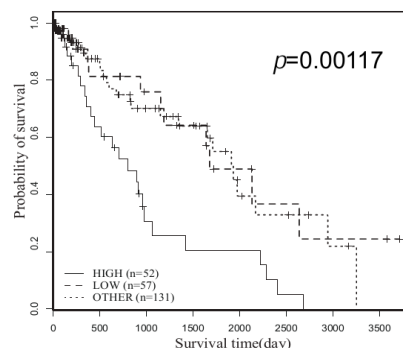


(3) The Cancer Genome Atlas に公開されている肺扁平上皮癌、肺腺癌の RNA sequencing および SNP array のデータを用いて情報学的解析を行い、今までの発現データ解析結果を統合して探索を行ったところ、肺扁平上皮癌において有意に発現が上昇する 34 のマイクロ RNA を同定した。

(4) これらのマイクロ RNA の中で、4 種類のマイクロ RNA (miR-X1, X2, X3, X4) の発現が上昇 (下図、HIGH) している肺扁平上皮癌症例は有意に予後不良であった。

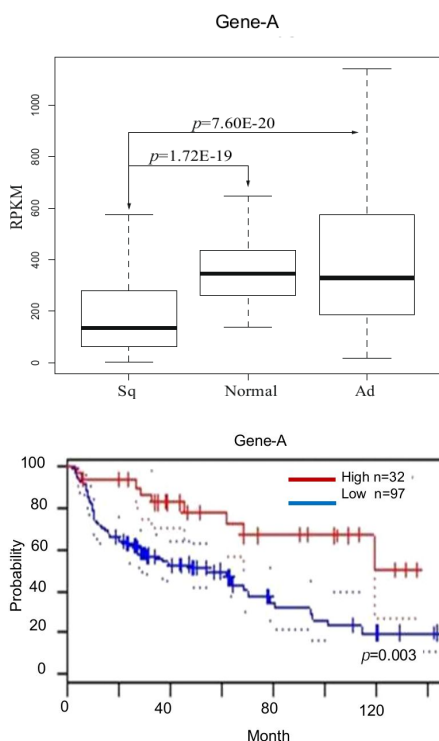


この中で 3 種類のマイクロ RNA (miR-X2, X3, X4) が同様に発現上昇している症例 (下図、HIGH) の予後は特に不良であった。



(5) miR-mRNA のネットワーク解析から、3 種類のマイクロ RNA (miR-X2, X3, X4) と関連

する標的遺伝子が同定され、中でも Gene-A は肺扁平上皮癌症例の予後と関連していた。
(下図)



横井 左奈 (YOKOI, Sana)
千葉県がんセンター・がんゲノムセンター・部長
研究者番号：30372452

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)

[学会発表](計2件)

横井左奈、夏恩迪、守屋康充、他 肺扁平上皮癌の予後に協調して関わる3つのマイクロRNA、第75回 日本癌学会学術総会、2016年10月、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Sana Yokoi, Endi Xia, Yasumitsu Moriya, Toshihiko Iizasa, Ichiro Yoshino, Three microRNAs associated with poor prognosis are up-regulated in amplified regions of squamous cell lung carcinoma, IASLC 17th World Conference on Lung Cancer, 2016年12月、Wien (Austria)

6. 研究組織

(1)研究代表者

守屋 康充 (MORIYA, Yasumitsu)
千葉県がんセンター・がんゲノムセンター・客員研究員
研究者番号：90375692

(2)研究分担者

飯笹 俊彦 (IIZASA, Toshihiko)
千葉県がんセンター・医療局・医療局長
研究者番号：10272303