

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

第 3 次対がん総合戦略研究事業

難治性肺がんに対する治療応答群及び術後再発危険度群捕捉のための
新規バイオマーカーの同定

平成 2 5 年度 総括研究報告書

研究代表者 白石 航也

平成 2 6 (2 0 1 4) 年 5 月

別添 2

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

I . 総括研究報告

難治性肺がんに対する治療応答群及び術後再発危険度群捕捉のための新規バイオマーカーの同定

白石 航也 ----- 2

II . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 14

別添 3

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業） 総括研究報告書

難治性肺がんに対する治療応答群及び術後再発危険度群捕捉のための新規バイオマーカーの同定

研究代表者 白石航也 国立がん研究センター 研究所 研究員

研究要旨：

当初の計画通り、原発肺腺がんに対して外科的治療を受けた症例のうち再発し、かつプラチナダブレット療法を受けた40例の原発性肺腺がん凍結組織を用いた網羅的なmiRNA発現プロファイルを取得した。治療応答群と無応答群との比較により、候補となるmiRNAを絞り込み、さらに検証研究用検体63例を用いて同様の検討を行ったところ、再現性のある2個のmiRNAを同定した。本研究では、検証研究にホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体を用いている。実際の診療現場では凍結組織を保存することが難しいことから、普段から診療に用いられているFFPEサンプルでの検証は臨床応用の観点から、意義は大きい。さらに、複数のmiRNAを用いたROC曲線による本検査の精度評価を行ったところ、77%以上の精度で治療応答群を同定できる結果を得た。本研究により、当初の目的通り治療応答性に関わるバイオマーカーを同定できたことから、現在論文投稿中である。

もう一つのテーマである遺伝子多型を用いた全ゲノム関連解析による術後再発予後解析に関わるバイオマーカーの同定を試みた。原発性肺腺がん症例の内、病理学的にstage I-IIの1,057症例による2段階スクリーニングの結果、統計学的に有意な差を示した1 SNPを同定するに至った。これにより早期の術後再発リスク群を見分けるバイオマーカーを同定した。しかしながら、多施設での検証研究では再現されなかったことから、さらなる検討を必要としている。

A. 研究目的

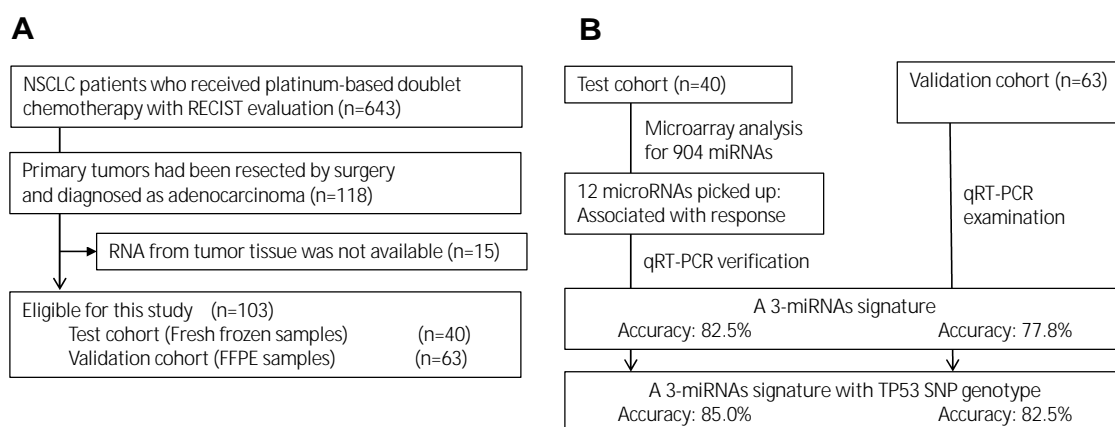
本邦における肺がんはがん死因第一位を占める難治がんであり、罹患数は男女ともに年々増加傾向にある。しかし現状では肺がんの発症や再発を予防する手段がなく、予後や治療効果の予測因子の同定が望まれている。これまでにがん細胞の遺伝子変異・発現動態を中心とした研究が行われてきたが、予後や治療効果の予測は実現できていない。その理由として、他の主要因が存在することが考えられる。本研究では、肺がんの術後再発や治療応答性などに関わる遺伝子多型（個々人の体質）や既知の遺伝子変異・発現変動・構造異常などを組み合わせることによる、予後や治療効果に関連する遺伝子の同定を目的とする。本研究は検証研究用の試料を収集・解析を行うために研究費を申請している。検証研究を行うことで、バイオマーカーとしての感度・特異性を明らかにする。

場合によっては、他施設から得られた詳細な診療情報が付加した検体を用いて追加解析を行う。本研究で得られる予後・治療効果の予測は、本邦での肺がん個別化予防・診療のためのバイオマーカーの基盤となるものであり、将来的な国民のがん死亡の減少・がん医療の向上をもたらすと期待できる。

B. 研究方法

がん組織検体を用いた化学療法応答性に関わる因子の探索：

2000年～2008年において国立がん研究センター中央病院でプラチナダブルット治療を受けた非小細胞肺がん686症例から、RECISTによる治療効果判定が可能であった643症例をeligible caseとして選出した(Shiraishi et al., J. Clin. Oncol. 2010)。さらに治療効果判定がなされた643例の内、化学療法施行前に原発肺腺がんに対して外科的手術を受けていた118例を解析対象とした(図1-A)。



国立がん研究センターバイオバンクにて凍結肺腺がん組織検体が保管されていた40例について、Agilent SurePrint G3 Human miRNA 8×60K Rel.14.0を用いてmicroRNAの発現量を測定した。腫瘍が30%以上縮小しかつ、一カ月以上その効果が持続した症例を治療応答群とし、それ以外を無応答群と定義した。治療応答群と無応答群の間でmicroRNAの発現量が5倍以上の差が認められた12個のmicroRNAを抽出した(図1-B、図2-A)。さらに、検出方法による違いが認められるか確認するため、TaqMan法を用いて再検証した。候補となるmicroRNAに対して独立したサンプルを用いて検証研究を行うため、原発性肺腺がんに対して外科的手術を受けていた118例の内78例について、マイクロダイセクションによりホルマリン固定パラフィン包埋(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded: FFPE)肺腺がん組織から、microRNAを

抽出した。抽出した RNA を用いて、内在性コントロールである RNU66 の発現量を測定したところ、15 例について十分な発現量が得られなかった。したがって、解析不適格な検体を除外した 63 例を用いて検証研究を行った（図 1-B）。

TP53 遺伝子の多型情報は、既存のデータ(Shiraishi et al., J. Clin. Oncol. 2010)を活用した。また統計解析は JMP ソフトウェアを用いて行った。

胚細胞由来検体（血液・肺正常組織検体）を用いた術後再発に関わるバイオマーカー探索：

早期肺がんと診断された患者の多くは外科的治療を受けるが、肉眼でかつ病理学的に完全に腫瘍を摘出して、手術後に再発することは珍しくない。本研究では、先行研究で殆ど解析されてこなかった宿主自身の遺伝要因、即ち遺伝子多型で規定される術後再発に関する遺伝要因（体質）に着目し、解析を行った。我々は 1997 年～2008 年において国立がん研究センター中央病院で外科的治療を受けた症例の内、肉眼でかつ病理学的に完全切除された stage I-II の早期肺腺がん症例 624 例について、末梢血より DNA を抽出し、100 万個の遺伝子多型を対象とした全ゲノム関連解析を行った。その結果、 10^{-5} ～ 10^{-7} レベルの関連を示す遺伝子多型が数十個見出された。さらに検証研究として、1997 年～2008 年において国立がん研究センター中央病院で外科的治療を受けた stage I-II の早期肺腺がん症例 433 例について、末梢血もしくは肺正常組織由来の FFPE 検体より DNA を抽出し、Top SNP について TaqMan 法を用いて遺伝子型を決定し、関連解析を行った。その結果、1 SNP (rs1464452) のみ再現された。しかしながら、この多型は染色体 4 番に位置するものの遺伝子間に存在し、機能的な意義は不明であった。がん組織中での遺伝子発現変動に関する情報は特にないが、この領域に複数の lincRNA が存在するという報告があった。そこで肺正常組織より RNA を抽出し、逆転写により得られた cDNA を用いて TaqMan による発現解析を行ったが、肺正常組織中での発現は認められなかった。

（倫理面への配慮）

遺伝子多型解析においては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、書面での同意を得て試料提供を受け、試料を匿名化することで、試料提供者のプライバシーを保護する。

体細胞変化の解析については、「疫学指針」に従い、診療での残余試料を用い、試料を匿名化することで、試料提供者のプライバシーを保護する。また、本研究は国立がんセンター遺伝子解析研究倫理審査委員会・倫理審査委員会において審査を受け、すでに承認を得ている。

C . 研究結果

がん組織検体を用いた解析：

(1) miRNA マイクロアレーを用いた治療応答性（抵抗性）に関わる因子の探索

2000 年～2008 年において国立がん研究センター中央病院でプラチナダブレット治療を受けた非小細胞肺癌 686 症例から、RECIST による治療効果判定が可能であった 640 症例を eligible case として選出した (Shiraishi et al., J. Clin. Oncol. 2010)。さらに治療効果判定がなされた 643 例の内、化学療法施行前に原発肺腺がんに対して外科的手術を受けていた 118 例を解析対象とした (図 1-A)。

国立がん研究センターバイオバンクにて凍結肺腺がん組織検体が保管されていた 40 例について、Agilent SurePrint G3 Human miRNA 8×60K Rel.14.0 を用いて microRNA の発現量を測定した。腫瘍が 30%以上縮小しかつ、一カ月以上その効果が持続した症例を治療応答群とし、それ以外を無応答群と定義した。治療応答群と無応答群の間で microRNA の発現量が 5 倍以上の差が認められた 12 個の microRNA を抽出した(図 1-B、図 2-A)。さらに、検出方法による違いが認められるか確認するため、TaqMan 法を用いて再検証した。その結果、3 個の microRNA が検出方法によらず再現された ($P<0.05$) (図 2-B)。

候補となる microRNA に対して独立したサンプルを用いて検証研究を行うため、原発肺腺がんに対して外科的手術を受けていた 118 例の内 78 例について、マイクロダイセクションによりホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded: FFPE) 肺腺がん組織から、microRNA を抽出した。抽出した RNA を用いて、内在性コントロールである RNU66 の発現量を測定したところ、15 例について十分な発現量が得られなかった。したがって、解析不適格な検体を除外した 63 例を用いて検証研究を行った (図 1-B)。その結果、同じ傾向が認められかつ、統計学的に有意となった microRNA を 2 個同定した ($P<0.05$)。さらに ROC 曲線による本検査の精度評価を行うため、検出研究で有意な差が認められた複数の microRNA を用いて検討したところ、3 つの microRNA を用いることで、検出・検証研究ともに 77%以上の精度で治療応答群を同定できる結果を得た (図 2.(C)、図 3)。

本研究では肺腺がんを対象としていることから、遺伝子変異情報と治療応答性との関連について検討した。遺伝子変異情報は、EGFR 変異、KRAS 変異、HER2 変異、BRAF 変異、ALK, ROS, RET 遺伝子融合を対象としている。但し検証研究は FFPE 由来のため、遺伝子融合の検出はできなかった。その結果、症例数が少ないものの特定の遺伝子変異に治療応答群が多い傾向は認められなかった。しかしながら症例数が少ないことから、今後大規模な解析や多施設での検証が必要である (図 4)。

TP53 遺伝子多型と miRNA とを組み合わせることで本検査の精度を評価したところ、わずかに精度が向上した (図 1-B)。今後は他施設での検証を行う必要がある。

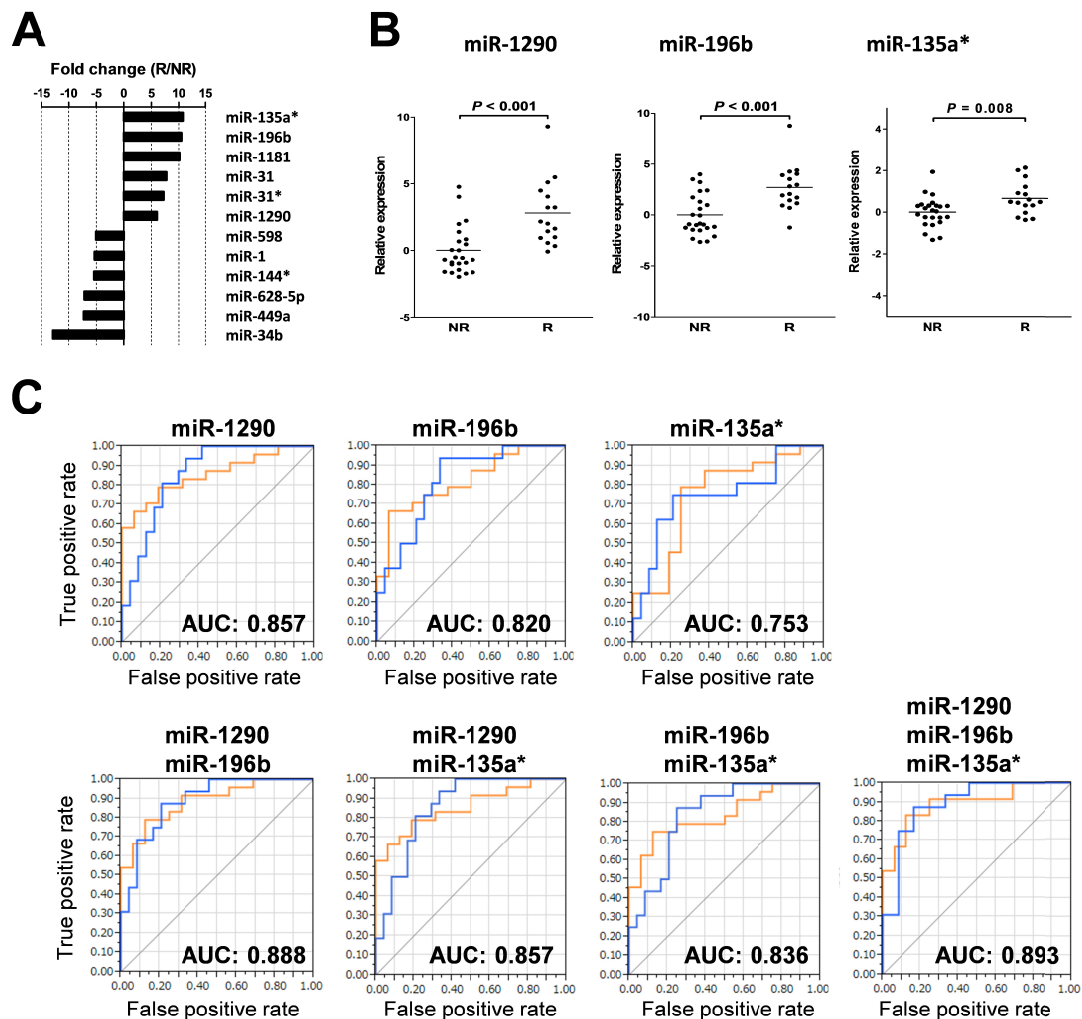


Figure 2. Selection of the three miRNAs whose expression was associated with responses to platinum-based doublet chemotherapy upon lung adenocarcinoma (LADC) recurrence.

A. Twelve miRNAs differentially expressed in responders and non-responders to platinum doublet chemotherapy in the test cohort. The diagram depicts miRNAs showing > 5-fold changes in expression and with a P -value < 0.05. The -fold change is represented by the ratio of responders (R) to non-responders (NR) derived from the microarray data.

B. Expression of miRNAs in non-responders (NR) and responders (R) in the test cohort, as measured by quantitative reverse transcriptase-PCR. Dot plots represent miRNA relative threshold cycle values. Expression levels were normalized to the expression of RNU66. Threshold cycle values relative to the mean value in non-responders are shown on a log2 scale. Horizontal bars indicate the mean expression value. P -values (Mann-Whitney test) are indicated.

C. Receiver operating characteristics (ROC) analysis was performed for miR-1290, miR-196b, and miR135a* in the test cohort. The area under the curve (AUC) value is shown. The blue line represents the results for responders and the orange line represents the results for non-responders.

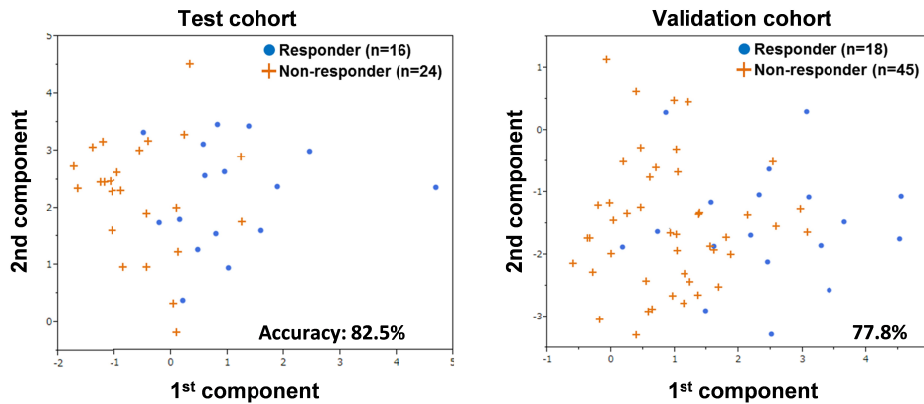


Figure 3. Principal component analysis (PCA). A PCA-SVM strategy using three miRNAs (miR-1290, miR-196b, and miR135a*) was used to construct a classifier, which could distinguish responders from non-responders. The blue dots represent the responders and the orange crosses represent the non-responders in the test (left) and validation cohorts (right). The classifier had a predictive accuracy of 82.5% for the test cohort and an accuracy of 77.8% for the validation cohort.

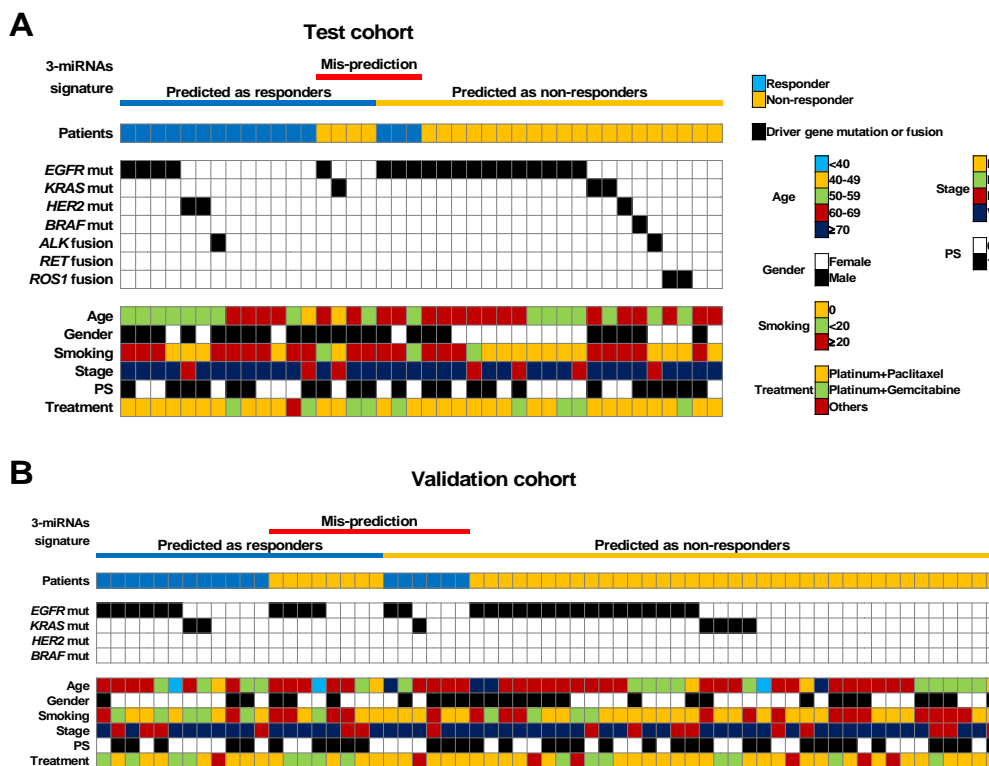


Figure 4. Response prediction by the three-miRNA signature according to clinic-pathological factors. Driver gene mutations and clinical features are shown: patients (blue, responder; orange, non-responder); driver gene (black, EGFR, KRAS, HER2, BRAF mutation- or ALK, RET, or ROS1 fusion-positive; white, negative); age (blue, < 40; orange, 40–49; green, 50–59; red, 60–69; navy blue, ≥ 70); gender (white, female; black, male); smoking (orange, pack years = 0; green, < 20; red, ≥ 20); tumor stage (orange, I; green, II; red, III; navy blue, VI); PS (performance status) (white, 0; black, 1); treatment (orange, platinum + paclitaxel; green, platinum + gemcitabine; red, other).

胚細胞由来検体（血液・肺正常組織検体）を用いた術後再発に関わるバイオマーカー探索：

早期肺がんと診断された患者の多くは外科的治療を受けるが、肉眼でかつ病理学的に完全に腫瘍を摘出して、手術後に再発することは珍しくない。本研究では、先行研究で殆ど解析されてこなかった宿主自身の遺伝要因、即ち遺伝子多型で規定される術後再発に関する遺伝要因（体質）に着目し、解析を行った。我々は1997年～2008年において国立がん研究センター中央病院で外科的治療を受けた症例の内、肉眼でかつ病理学的に完全切除された stage I-II の早期肺腺がん症例 624 例について、末梢血より DNA を抽出し、100 万個の遺伝子多型を対象とした全ゲノム関連解析を行った（図 3）。その結果、 $10^{-5} \sim 10^{-7}$ レベルの関連を示す遺伝子多型が数十個見出された。先行研究（Huang et al., J. Clin. Oncol. 2008）で報告されていた早期肺がんの術後再発に関わる遺伝子多型は、本研究でも関連が再現された（STK39: rs10176669, $P = 1.1 \times 10^{-3}$, HR1.50）。

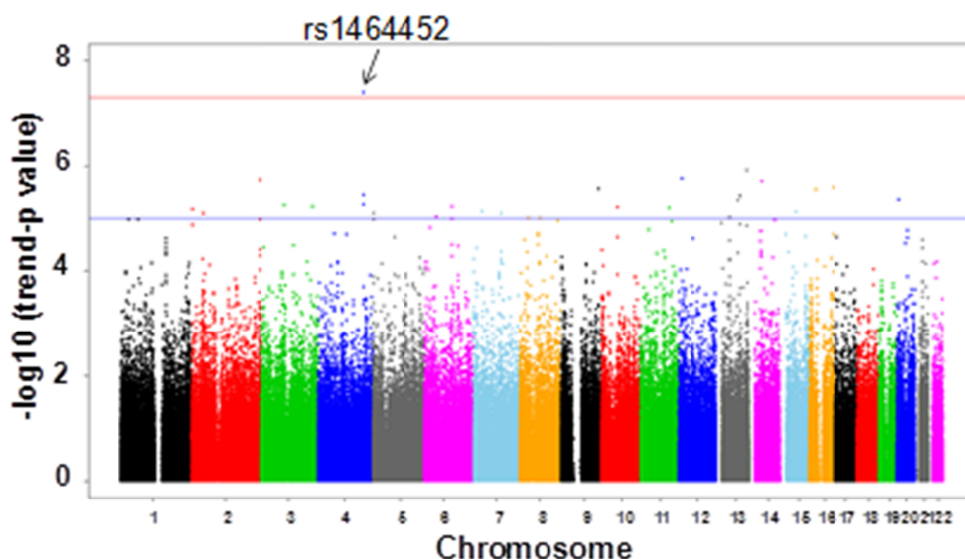


図3. 全ゲノム関連解析で得られた結果を「マンハッタン」プロットで示したもの。横軸は各SNPが存在する染色体上の位置、縦軸は術後再発リスクとの関連の強さを示す。縦軸の高い位置にあるSNPほど、再発リスクとの関連が強い。

さらに検証研究として、1997年～2008年において国立がん研究センター中央病院で外科的治療を受けた stage I-II の早期肺腺がん症例 433 例について、末梢血もしくは肺正常組織由来の FFPE 検体より DNA を抽出し、Top SNP について TaqMan 法を用いて遺伝子型を決定し、関連解析を行った。その結果、1 SNP (rs1464452) のみ再現された。しかしながら、この多型は染色体 4 番に位置するものの遺伝子間に存在し、機能的な意義は不明であった（表 1）。

Stage	Case		P value	HR (95% CI)*
	Total (n)	MAF		
(1) Stage I-II				
GWAS	624	0.148	3.97×10^{-8}	2.41 (1.76-3.29)
Replication	433	0.158	4.48×10^{-5}	2.50 (1.63-3.78)
Combined all studies	1,057	0.152	8.93×10^{-10}	2.21 (1.73-2.79)
(2) Stage I				
GWAS	546	0.153	2.04×10^{-5}	2.26 (1.55-3.29)
Replication	380	0.153	2.83×10^{-3}	2.49 (1.38-4.41)
Combined all studies	926	0.153	2.00×10^{-7}	2.37 (1.73-3.23)
(3) Stage II				
GWAS	53	0.158	3.50×10^{-4}	3.41 (1.80-6.15)
Replication	78	0.148	8.30×10^{-3}	2.60 (1.29-5.05)
Combined all studies	131	0.152	3.31×10^{-4}	2.21 (1.46-3.25)

*Adjusted for age, gender, smoking and stage.

表1. 染色体4番に位置するrs1464452 SNPと術後再発リスクとの関連。(1) stage I-IIを対象とした解析結果、(2) stage Iを対象とした層別解析結果、(3) stage IIを対象とした層別解析結果

D . 考察

本研究では、がん組織並びに胚細胞を用いて化学療法応答性並びに術後予後に関わる因子の探索を行った。

化学療法応答性については、2個の microRNA が治療応答性に関わる可能性を示したことから、培養細胞を用いた薬剤感受性試験を検討した。しかし、薬剤感受性を評価するためコロニーフォーメーションアッセイを用いて評価を試みたが、薬剤を添加することでコロニーの形成能やその評価が難しく、現在細胞実験系の構築をあきらめ、現在までの結果だけで論文投稿を進めている。今後は、別の培養細胞を用いた評価系を用いた microRNA の標的となる遺伝子の同定を行うことで、本研究結果は分子標的となるようなシーズの提供に寄与できると考えられる。

術後予後解析については、1つの遺伝子多型について術後再発リスクと関連することを見出した。さらなる術後予後に関わる遺伝子多型の同定を目的に、Whole-genome imputation を用いた術後予後解析を愛知県がんセンターとの共同研究で進めており、遺伝子多型と症例の数を増やすことでさらなる感受性遺伝子座の同定を目指す。一方で、肺がん組織における遺伝子異常についても解析を進めており、がんの特性（例えば EGFR 変異や KRAS 変異など）も加味して検討することで、より精度の高い術後予後に関わるバイオマーカーの同定につなげ、将来個別化医療の推進に寄与できると考えられる。

E . 結論

本研究により、治療応答性に関わる2個のmicroRNAを同定した。また術後再発予後に関わると考えられる1SNPを同定するに至った。これらの結果が他施設での同様の評価が得られるかどうかを今後さらに検討する必要がある。

F．健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Saito M, Shiraishi K, Matsumoto K, Schetter AJ, Ogata-Kawata H, Tsuchiya N, Kunitoh H, Nokihara H, Watanabe S, Tsuta K, Kumamoto K, Takenoshita S, Yokota J, Harris CC, Kohno T. A three-microRNA signature predicts responses to platinum-based doublet chemotherapy in patients with lung adenocarcinoma. In submitted.

2. Suzuki T, Shibata T, Takaya K, Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, Tsuta K, Furuta K, Goto K, Hosoda F, Sakamoto H, Motohashi H, Yamamoto M. Regulatory Nexus of Synthesis and Degradation Deciphers Cellular Nrf2 Expression Levels. *Mol Cell Biol.* 2013; 33(12): p2402-2412.

3. Kinno T, Tsuta K, Shiraishi K, Mizukami T, Suzuki M, Yoshida A, Suzuki K, Asamura H, Furuta K, Kohno T, Kushima R. Clinicopathological features of nonsmall cell lung carcinomas with BRAF mutations. *Ann Oncol.* 2014; 25(1): p138-142.

4. Mizukami T, Shiraishi K, Shimada Y, Ogiwara H, Tsuta K, Ichikawa H, Sakamoto H, Kato M, Shibata T, Nakano T, Kohno T. Molecular mechanisms underlying oncogenic *RET* fusion in lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* 2014; 9(5): p622-630.

2. 学会発表

Shiraishi K, Sakamoto H, Kubo M, Daigo Y, Matsuo K, Yoshida T, Nakamura Y, Yokota J, Kohno T. Genetic factors underlying lung adenocarcinoma risk. 第72回日本癌学会総会シンポジウム：GWASの現在と今後の展望（2013年10月 横浜）

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

別添 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mizukami T et al	Molecular mechanisms underlying oncogenic RET fusion in lung adenocarcinoma.	J Thoracic Oncol	9	622-630	2014
Kinno T	Clinicopathological features of nonsmall cell lung carcinomas with BRAF mutations.	Ann Oncol	25	138-142	2014
Suzuki T et al	Regulatory nexus of synthesis and degradation decipher cellular Nrf2 expression levels.	Mol Cell Biol	33	2402-2412	2013