

182. ドライバー遺伝子変異肺癌の高悪性転化の分子機序解明

岡本 龍郎

九州がんセンター 呼吸器腫瘍科

Key words : 肺癌, ドライバー遺伝子変異, *EGFR* 遺伝子変異, 高悪性化, NGS 解析

緒言

非小細胞肺癌ではドライバー遺伝子変異を有する肺癌が全体の半数以上を占めるが、その発育・進展過程に関してはほとんどが不明のままである。*EGFR* 変異肺癌は、肺野末梢に発生する肺胞上皮由来の腫瘍であり、癌の発育段階初期は肺胞上皮置換型増殖を示し、徐々に乳頭型増殖や腺房型増殖を伴うようになる [1]。癌細胞の置換型増殖部は、高分解能 CT 画像でスリガラス状陰影 (GGO) を呈し、この形態を示す癌組織は浸潤・転移を伴わない。癌の発育に伴い、腫瘍内に充実性陰影が出現・増大し (Part-solid GGO)、この充実性部分が乳頭型増殖や腺房型増殖の部位に相当し、浸潤・転移を伴うようになる。ごく早期の *EGFR* 変異肺癌は、他の肺癌に比較して再発が少ない一方で、浸潤・転移を示す II/III 期になると、他の肺癌に比べて再発が多く予後不良となる。したがって、*EGFR* 変異肺癌は発癌初期では低悪性 (非浸潤性) であるが、癌の進化的発育過程において劇的に高悪性 (浸潤・転移性) へ転化することが示唆される [2]。しかしながら、この高悪性転化の機序は明らかになっておらず、この機序を解明することは、新たな分子標的治療の開発に繋げることが可能となる。

今回の研究では、高分解能 CT 画像に加えて、病理学的情報を参考にした非浸潤癌・浸潤癌の選別を行い、それぞれに対応する肺切除組織の新鮮凍結サンプルを用いて、NGS トランスクリプトーム解析による遺伝子発現・遺伝子変化の網羅的解析を行うことで、臨床的意義のある分子異常を探索することを目的とした。

方法

1. 症例選択

2007~22 年に肺切除が行われ腫瘍の凍結組織が保存された、*GFR* exon 19 欠失変異を有する肺癌症例のうち、高分解能 CT 画像および臨床病理所見から、早期群、進行期群をそれぞれ下記のごとく選択した。

- 1) 早期群 (cT1mi~T1a, C/T 比 \leq 0.6 かつ pTis~T1bN0 : 早期群) : 12 例
- 2) 浸潤群 (C/T 比 $>$ 0.6 かつ pN1/2 陽性 : 進行期群) : 26 例

2. RNA-Seq (タカラバイオ株式会社)

切除肺癌組織から切り出して凍結保存しておいた標本から RNA を抽出し、品質検定後にシーケンスライブラリー作成 (SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA) を行い、NovaSeq6000 によるシーケンス解析を行った。シーケンス解析で得られたリード配列をリファレンスゲノム配列にマッピングし、遺伝子単位および転写産物単位の発現量を算出した。Ensemble データベース (<https://www.ensembl.org/biomart/martview>) を用いてアノテーションを行い、発現解析を行った。

3. 変動遺伝子の抽出

100 万マッピングフラグメントあたりのフラグメント数 (Transcripts per million : TPM) を用いて、正規化処理およびフィルタリングを行い、倍率変化を算出した。早期群と進行期群の mRNA 発現量比較 (t 検定) を行い、発現が有意に変動した遺伝子を抽出し、高悪性化に関与する候補遺伝子を探索した。

4. Gene Ontology 解析

両群間で統計学的有意に mRNA 発現の差があった遺伝子を DAVID (<https://David.ncifcrf.gov>) 上の Web ツールにて解析を行った。

結果および考察

1. 患者臨床背景

年齢は早期群/進行期群がそれぞれ平均値 72.4/65.2 歳であり、進行期群が高齢の傾向があった。性別に差はなかったが、進行期群に喫煙歴のある患者が多かった。臨床/病理ステージを含め表 1 に示す。

表 1. 患者臨床背景の比較

因子	分類	早期群 (n=12)	進行期群 (n=26)	P value
年齢	平均値(範囲)	72.4 (SE 2.97)	65.2 (SE 2.11)	0.059
性別	男	4	14	0.307
	女	8	12	
喫煙歴	Never	10	12	0.04
	Current/Ex	2	14	
cT	T1mi	8	0	<0.01
	T1a	4	0	
	T1b	0	8	
	T1c	0	3	
	T2	0	13	
	T3	0	2	
pT	T1s	2	0	<0.01
	T1mi	2	0	
	T1a	4	0	
	T1b	3	4	
	T1c	1	5	
	T2	0	14	
	T3	0	3	
pN	N0	12	0	<0.01
	N1	0	15	
	N2	0	11	

進行期群に高齢、喫煙歴のある患者が多かった。T/N 因子は両群間で明らかな差を示した。

2. 両群間の mRNA 発現に有意差のあった遺伝子

両群間で統計学的有意に mRNA 発現の差があった遺伝子は 53 個であった (図 1 上段)。そのうち進行期群で発現量が低かった遺伝子が 31 個、発現量が高かった遺伝子が 22 個存在した。その中で、Collagen XI alpha 1 遺伝子 (*COL11A1*) が進行期群において最も発現が上昇していた (9.4 倍、 $p < 0.0001$)。

3. 変動遺伝子の Ontology 解析

46 遺伝子が抽出され、細胞代謝/組織発達/遺伝子発現制御/細胞周期/細胞外マトリックスに関連した遺伝子群に、それぞれ 43%/35%/35%/13%/11%が分類された (図 1 下段)。

4. EGFR exon 19 del 変異を有する進行期肺癌切除例における *COL11A1* 発現の意義

上記の解析に用いた進行期群 26 例において、*COL11A1* mRNA の発現量 < 1 TPM (Transcripts Per Million) を *COL11A1* mRNA 低値群、 ≥ 1 TPM を *COL11A1* mRNA 高値群として、*COL11A1* 発現差と術後無再発生存期間との関係を検討した。2 群間の臨床背景に有意差はなかった (表 2)。*COL11A1* 発現高値群 (n=16) の無再発生存中央値は 26.8 ヶ月であったのに対して、*COL11A1* mRNA 低値群 (n=10) は未到達であり、*COL11A1* 高発現群が術後再発において予後不良の傾向があった (HR 1.83、 $p = 0.31$) (図 2)。

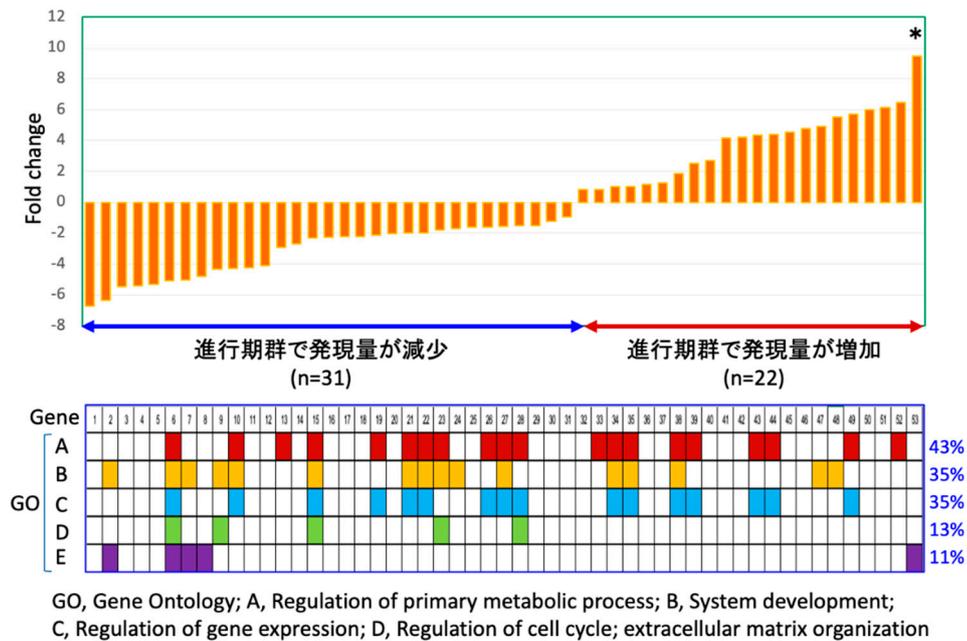


図 1. 両群間で mRNA 発現量に有意な差があった遺伝子の発現差

上段) Transcripts per million (TPM) を用いて、倍率変化を算出し、早期群と進行期群の mRNA 発現量比較 (t 検定) を行い、有意に差のあった遺伝子を抽出した。
*Collagen XI alpha 1 遺伝子 (COL11A1) が進行期群において最も発現が上昇していた (9.4 倍, $p < 0.0001$) 下段) 上記遺伝子の Ontology 解析では A: 細胞代謝/B: 組織発達/C: 遺伝子発現制御/D: 細胞周期/E: 細胞外マトリックスに関連した遺伝子群に分類された。

表 2. COL11A1 mRNA の発現量別の患者臨床背景の比較

因子	分類	COL11A1 <1 TPM (n=10)	COL11A1 ≥1 TPM (n=16)	p
年齢	平均値 (範囲)	62.3 (SE 4.1)	67.0 (SE 2.3)	0.28
性別	男	4	10	0.42
	女	6	6	
喫煙歴	Never	5	7	1.00
	Current/Ex	5	9	
pN	N1	7	8	0.43
	N2	3	8	
pStage	IIB	6	6	0.42
	IIIA	4	10	

両群間で明らかな差は認めなかった。連続変数は t 検定、カテゴリー変数はカイ 2 乗検定。

5. COL11A1 について

COL11A1 は fibrillar collagen (繊維製コラーゲン) の一つであり、卵巣癌、乳癌、甲状腺癌、膵癌、非小細胞肺癌、膀胱癌などの癌で発現亢進していることが報告されている [3]。インテグリン $\alpha 1 \beta 1$ や DDR2 受容体を介して、細胞内で AKT、AMPK、NF- κ B などの細胞内シグナル経路の制御に関係することで、細胞増殖に関与することが推測されている。肺癌においては、現在までの複数の研究結果が報告されており、いずれも肺癌の増殖や進展に関与することが示唆されている。Shen らは、非小細胞肺癌において、リンパ節転移や再発のあった

患者で発現が上昇しており、肺癌細胞株において SMAD シグナリングに関与していることを報告している [4]。

今回の研究において、EGFR 変異肺癌の高悪性化には、癌関連遺伝子のダイナミックな発現変化が関与していることが明らかとなった。また、COL11A1 発現亢進が EGFR 変異肺癌における高悪性化に関与する可能性が示唆された。今後、同定した分子変化をもとに、*in vitro*/*in vivo*での分子生物学的解析を行い、腫瘍生物学的意義を検討し、新たな分子標的となり得るかどうかを検討していく予定である。

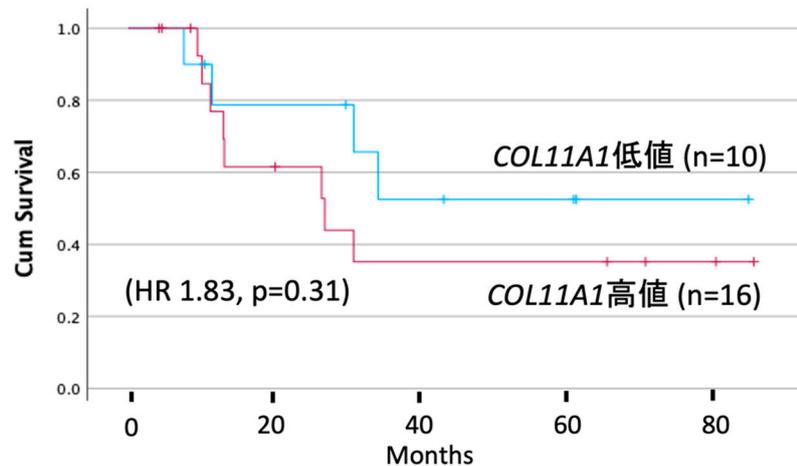


図 2. COL11A1 mRNA の発現量別の無再発生存 (進行期群 26 例)
COL11A1 mRNA の発現量 < 1 TPM (Transcripts Per Million) を COL11A1 mRNA 低値群、 ≥ 1 TPM を COL11A1 mRNA 高値群として、COL11A1 発現差と術後無再発生存期間との関係を検討した。

文 献

- 1) Inamura K. Clinicopathological Characteristics and Mutations Driving Development of Early Lung Adenocarcinoma: Tumor Initiation and Progression. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr 23;19(4):1259. doi:10.3390/ijms19041259.
- 2) Deng C, Zhang Y, Ma Z, Fu F, Deng L, Li Y, Chen H. Prognostic value of epidermal growth factor receptor gene mutation in resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2021 Sep;162(3):664-674.e7. doi:10.1016/j.jtcvs.2020.05.099.
- 3) Liu Z, Lai J, Jiang H, Ma C, Huang H. Collagen XI alpha 1 chain, a potential therapeutic target for cancer. *FASEB J.* 2021 Jun;35(6):e21603. doi:10.1096/fj.202100054RR.
- 4) Shen L, Yang M, Lin Q, Zhang Z, Zhu B, Miao C. COL11A1 is overexpressed in recurrent non-small cell lung cancer and promotes cell proliferation, migration, invasion and drug resistance. *Oncol Rep.* 2016 Aug;36(2):877-85. doi:10.3892/or.2016.4869.