

ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦИОННОГО ЛАНДШАФТА ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЁГКОГО С ВЫСОКИМ РИСКОМ ГЕМАТОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

ЩЕГОЛЕВА А.А.^{1,2}✉, ГЕРАЩЕНКО Т.С.¹, КИСЕЛЁВ А.М.^{1,3}, ХОЗЯИНОВА А.А.^{1,2}, РОДИОНОВ Е.О.¹, ПАНКОВА О.В.¹, ПЕРЕЛЬМУТЕР В.М.¹, ДЕНИСОВ Е.В.^{1,2}

¹ НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Россия, Томск, Россия

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

MUTATION LANDSCAPE OF LUNG SQUAMOUS CELL CANCER WITH A HIGH RISK OF DISTANT METASTASIS

SCHEGOLEVA A.A.^{1,2*}, GERASHCHENKO T.S.¹, KISELEV A.M.^{1,3}, KHOZYAINOVA A.A.^{1,2}, RODIONOV E.O.¹, PANKOVA O.V.¹, PERELMUTER V.M.¹, DENISOV E.V.^{1,2}

¹ Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia

²Tomsk State University, Tomsk, Russia

³Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia

Ключевые слова: плоскоклеточный рак лёгкого, прогрессия, метастазирование, соматические мутации, базальноклеточная гиперплазия.

Рак лёгкого является одной из важнейших медицинских и социально-экономических проблем в большинстве развитых стран мира в связи с его лидирующей позицией в структуре онкологической заболеваемости и смертности [1]. Основными причинами высокой смертности пациентов с раком лёгкого являются позднее обнаружение опухолевого процесса и высокая частота гематогенного метастазирования (ГМ) [2]. Однако, даже при своевременной диагностике, пятилетняя выживаемость больных раком лёгкого, главным образом, немелкоклеточным раком лёгкого (НМРЛ), составляет чуть более 50% ввиду высокой частоты ГМ [3]. По-

Keywords: lung squamous cell cancer, progression, metastasis, somatic mutations, basal cell hyperplasia.

Lung cancer is one of the most important medical and socio-economic problems in most developed countries in the world due to its leading position in cancer incidence and mortality [1]. The main causes of high mortality in patients with lung cancer are the late detection of the tumor and the high incidence of distant metastasis (DM) [2]. However, even with timely diagnosis, the five-year survival of patients with lung cancer, mainly non-small cell lung cancer (NSCLC), is slightly more than 50% due to the high incidence of DM [3]. The development of approaches to predict the metastasis risk in NSCLC patients is important for improving disease outcome.

Цитирование: Щеголева А.А. и др. Характеристика мутационного ландшафта плоскоклеточного рака легкого с высоким риском гематогенного метастазирования. *Russian Scientist*. 2020. т.4 №1: 13-16

Citing: Schegoleva et al. Mutation landscape of lung squamous cell cancer with a high risk of distant metastasis. *Russian Scientist*. 2020. v.4 №1: 13-16

✉ shegolmay@gmail.com

Работа поддержана грантом РФФИ // This work is supported by RSF grant № 20-75-10060

Материал прошёл одностороннее слепое рецензирование.

The manuscript took a single-blind peer review.

иск способов предсказания вероятности метастазирования НМРЛ является актуальной задачей.

Известно, что формированию злокачественного новообразования в лёгком предшествуют морфологические изменения в бронхолёгочном эпителии, протекающие на фоне хронического воспаления. Патогенез плоскоклеточного рака лёгкого (ПРЛ) включает в себя серию предопухолевых изменений: базальноклеточная гиперплазия (БКГ), плоскоклеточная метаплазия, дисплазия I-III степеней и карцинома *in situ* [4].

Ранее коллективом НИИ онкологии Томского НИМЦ было показано, что наличие изолированной БКГ (иБКГ) в эпителии мелких бронхов больных НМРЛ связано с высокой частотой ГМ [5]; однако механизмы данной ассоциации не известны.

Целью настоящего исследования была оценка мутационного ландшафта НМРЛ у больных с наличием иБКГ.

В исследование были включены 10 пациентов (от 48 до 77 лет) с ПРЛ, разделенные на три группы: 1) пациенты с иБКГ и ГМ; 2) пациенты с иБКГ, но без ГМ; и 3) пациенты без предопухолевых изменений и ГМ. Наличие предопухолевых изменений в бронхах определяли с помощью световой микроскопии гематоксилин-эозин окрашенных срезов формалин-фиксированных образцов нормальной ткани, взятых на расстоянии 3-5 см от опухоли. ДНК выделяли из свежзамороженных образцов опухолевой ткани лёгкого и периферической крови колоночным методом с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США). Подготовка экзомных библиотек проводилась с помощью набора SureSelect XT v. 7.0 (Agilent, США). Анализ качества и концентрации образцов ДНК и ДНК-библиотек оценивали с помо-

It is known that lung cancer is preceded by morphological changes in the bronchial epithelium. The development of lung squamous cell cancer (LUSC) includes the following premalignant changes: basal cell hyperplasia (BCH), squamous metaplasia, grade I-III dysplasia and carcinoma *in situ* [4].

In previous studies, the researchers of the Tomsk Cancer Research Institute revealed that DM are more often observed in the NSCLC patients with “isolated” BCH (iBCH) in small bronchi at distance from the primary tumor [5]. At the moment, the mechanisms of this association are not understood.

Thus, this study was aimed to assess the mutational landscape of NSCLC associated with isolated BCH.

The study included 10 patients (48 to 77 years old) with LUSC divided into three groups: 1) patients with iBCH and DM; 2) patients with iBCH but without DM; and 3) patients without premalignant bronchial lesions and DM. Premalignant lesions were analyzed in hematoxylin-eosin-stained sections of formalin-fixed paraffin-embedded samples of small bronchi distant (3-5 cm) from the tumor. DNA from fresh frozen samples of lung tumor and peripheral blood was isolated by the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA). DNA libraries were prepared using the SureSelect XT v. 7.0 (Agilent, USA). The size and quantity of DNA samples and libraries was assessed using Qubit 4.0 (ThermoFisher Scientific, USA) and 4150 Tape Station (Agilent, USA). Whole-exome sequencing was performed on a NextSeq 500 (Illumina). The data was analyzed using GATK, Mutect2, ANNOVAR and Enrichr instruments.

The study showed that the number of mutated genes is different in the LUSC patients depending on the presence of iBCH and DM. The patients with iBCH and DM demonstrated mutations in 1013 genes, among which 902 genes were specific. In the

щью спектрофлуориметра Qubit 4.0 (ThermoFisher Scientific, США) и станции автоматического гель-электрофореза 4150 Tape Station (Agilent, США). Секвенирование проводили на платформе NextSeq 500 (Illumina, США). Анализ данных секвенирования выполняли с помощью инструментов GATK, Mutect2, ANNOVAR и Enrichr.

В результате исследования обнаружено, что количество генов, содержащих мутации, различалось у больных ПРЛ в зависимости от наличия иБКГ и ГМ. Так, у пациентов с иБКГ и ГМ обнаружено 1013 генов с мутациями, из них 902 гена оказались уникальными для данной группы. Для пациентов с иБКГ, но без ГМ, обнаружены нарушения в 464 генах, из них 376 генов были специфичны для данной группы. У больных ПРЛ без предопухолевых изменений и ГМ мутации найдены в 286 генах (из них 228 уникальных). Интересно, что среди пациентов с иБКГ мутаций было в 1,8 раза больше в случаях с ГМ, чем без ГМ. Данное наблюдение, вероятно, указывает косвенным образом на то, что наличие иБКГ не является абсолютным прогностическим критерием риска развития ГМ.

Различия между исследуемыми группами больных ПРЛ также наблюдались в количестве генов-драйверов канцерогенеза. Так, наибольшее число драйверов канцерогенеза, в частности *TP53*, *ARID1B*, *RBI*, *CDH10*, *FLT4*, *KEAP1*, *PTEN* и др., было характерно для пациентов с наличием иБКГ и ГМ. Помимо этого, у больных ПРЛ с наличием иБКГ и ГМ чаще обнаруживались мутации в генах, кодирующих белки межклеточной адгезии (*CDH8*, *CDH9*, *CDH10*, *CDH20*, *CD177*, *ITGAL*, *TENM3*, *SDK1*, *SDK2*, *SELP*, *PTPRT*, *PTPRD*, *PTPRM*, *PCDHB6*, *PCDHB14*, *PCDHB9*, *PCDHB2*, *PCDHB5*, *REG3A*, *PLXNB2*) и вовлеченных в сигнальные

patients with iBCH but without DM, alterations were found in 464 genes (376 specific genes). The patients without premalignant lesions and DM showed mutations in 286 genes (228 specific genes). Interestingly, in patients with iBCH, mutations were 1.8 times more in metastatic tumors than in non-metastatic tumors. This result probably indirectly indicates that the presence of iBCH is not an absolute prognostic factor for developing DM.

Differences between the studied groups of LUSC patients were also observed in the number of cancer driver genes. The largest number of drivers, particularly *TP53*, *ARID1B*, *RBI*, *CDH10*, *FLT4*, *KEAP1*, *PTEN*, etc., was detected in patients with iBCH and DM. In addition, in these cases, mutations were more often found in genes encoding cell adhesion proteins (*CDH8*, *CDH9*, *CDH10*, *CDH20*, *CD177*, *ITGAL*, *TENM3*, *SDK1*, *SDK2*, *SELP*, *PTPRT*, *PTPRD*, *PTPRM*, *PCDHB6*, *PCDHB14*, *PCDHB9*, *PCDHB2*, *PCDHB5*, *REG3A*, and *PLXNB2*) and involved in carcinogenesis signaling pathways (*TP53*, *RBI*, *MMP1*, *MMP2*, *EGFR*, and *RAF1*). It is important to note that mutations in the tumor-suppressor gene *TP53* were found in all patients with iBCH and DM.

Thus, LUSC patients with iBCH in the bronchial epithelium at a distance from the primary tumor and DM show a highly mutable phenotype. Probably, these results explain the mechanism of the association between iBCH and DM in patients with NSCLC.

References:

1. Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. Clin Chest Med. 2020 Mar;41(1):1-24. DOI: 10.1016/j.ccm.2019.10.001.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
3. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, Nicholson AG, Groome P, Mitchell A, Bolejack V; International Association for the Study of Lung

пути канцерогенеза (*TP53*, *RBI*, *MMP1*, *MMP2*, *EGFR*, *RAF1*). Важно отметить, что у всех больных ПРЛ с наличием иБКГ и ГМ обнаружены соматические мутации в геном-онкосупрессоре *TP53*.

Таким образом, для больных ПРЛ с наличием иБКГ в эпителии бронхов в отдалении от первичного очага и ГМ характерен более выраженный мутаторный фенотип опухоли. Вероятно, данные результаты объясняют механизм ассоциации иБКГ с высоким риском ГМ у пациентов с НМРЛ.

Список литературы:

1. Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. Clin Chest Med. 2020 Mar;41(1):1-24. doi: 10.1016/j.ccm.2019.10.001.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
3. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, Nicholson AG, Groome P, Mitchell A, Bolejack V; International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, Advisory Boards, and Participating Institutions; International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee Advisory Boards and Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. J Thorac Oncol. 2016 Jan;11(1):39-51. doi: 10.1016/j.jtho.2015.09.009.
4. Denisov EV, Schegoleva AA, Gervas PA, Ponomaryova AA, Tashireva LA, Boyarko VV, Bukreeva EB, Pankova OV, Perelmuter VM. Premalignant lesions of squamous cell carcinoma of the lung: The molecular make-up and factors affecting their progression. Lung Cancer. 2019 Sep;135:21-28. doi: 10.1016/j.lungcan.2019.07.001.
5. Пат. 2489718 РФ. МПК G01N 33/48. Способ прогнозирования возникновения гематогенных метастазов при плоскоклеточном раке легкого / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер. Заявлено 22.06.2012; Оpubл. 10.08.2013, Бюл. № 22.

Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, Advisory Boards, and Participating Institutions; International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee Advisory Boards and Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. J Thorac Oncol. 2016 Jan;11(1):39-51. DOI: 10.1016/j.jtho.2015.09.009.

4. Denisov EV, Schegoleva AA, Gervas PA, Ponomaryova AA, Tashireva LA, Boyarko VV, Bukreeva EB, Pankova OV, Perelmuter VM. Premalignant lesions of squamous cell carcinoma of the lung: The molecular make-up and factors affecting their progression. Lung Cancer. 2019 Sep;135:21-28. doi: 10.1016/j.lungcan.2019.07.001.
5. Пат. 2489718 РФ. МПК G01N 33/48. Способ прогнозирования возникновения гематогенных метастазов при плоскоклеточном раке легкого / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер. Заявлено 22.06.2012; Оpubл. 10.08.2013, Бюл. № 22.