

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10156

研究課題名(和文)全エクソンシーケンスによる直腸癌術前放射線化学療法効果予測遺伝子の同定

研究課題名(英文) Genomic Profile of Responders to Preoperative Chemoradiotherapy for Advanced Rectal Cancer

研究代表者

秋吉 高志 (Akiyoshi, Takashi)

公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・医長

研究者番号：50625598

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)：術前放射線化学療法(CRT)施行前の進行直腸癌の生検癌組織の全エクソンシーケンスを施行した。74例の全エクソンシーケンスを施行し、5例のhypermutatorを認め、これら5例は全例効果良好群であった。Hypermutators 5例を除く69例においても、効果良好群では効果不良群に比べnon-silent mutationの数およびCD8陽性腫瘍浸潤Tリンパ球密度(TIL)が有意に多く、CRTの効果はCRT施行前の腫瘍のmutation burdenと、変異によって生じたネオ抗原を認識するTILによって規定されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed whole-exome sequencing (n=74) using pre-treatment biopsies from patients with advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy (CRT). We identified five hypermutated tumors, all of which were responders. A comparative analysis among the non-hypermutated tumors (n=69) showed a significantly higher number of non-silent mutation and higher CD8+ T-cell infiltration in responders than in non-responders. Our finding suggests that mutation burden and resultant neoantigen burden before CRT might be a critical determinant of patient responses to CRT.

研究分野：大腸外科

キーワード：直腸がん 術前放射線化学療法

### 1. 研究開始当初の背景

下部進行直腸癌(clinical stage II/III)は大腸癌の中でも最も治療困難であり、下部進行直腸癌の治療成績向上は世界的な課題である。特に、直腸癌術後の局所再発は患者のQOLを著しく損なう原因となる。これまで欧米の複数の大規模無作為比較試験により、術前放射線化学療法(CRT)が手術単独や術前放射線療法(RT)よりも有意に局所再発を低減させることが示され、現在欧米では術前CRTが下部進行直腸癌に対する標準治療となっている。しかしながら、術前CRTの効果は無効から完全奏効(complete response)まで様々であるため、術前CRTの効果を実測することができれば、不必要な術前CRTの省略や、より強力な術前全身化学療法と組み合わせるなどの戦略をとることが可能になると考えられる。

### 2. 研究の目的

CRT施行前の癌組織の全エクソンシーケンスを行い、CRT耐性に関わる遺伝子変異や pathway の異常を同定し、臨床応用可能なCRT効果予測バイオマーカーを発見するための基盤研究を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 術前CRT施行前の新鮮凍結生検検体より laser-capture microdissection より癌細胞を抽出した。正常対照組織として正常大腸粘膜あるいは血液を用い、癌組織あるいは正常組織のDNAをQIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA)を用いて抽出した。SureSelect Human All Exon V4 or V5 (Agilent Technologies)を用いてエクソン領域の濃縮を行い、シーケンスはHiSeq2500 or HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA)を用いて行った。

(2)術前CRTの効果判定として、切除検体の病理学的効果判定(tumor regression grade: TRG)を用いた。癌細胞が全く認められないTRG4とごくわずかに癌細胞が遺残するTRG3を効果良好群とし、ほとんど効果が見られないTRG1を効果不良群とした。癌細胞よりも線維化が有意なTRG2は効果中間群としてエクソーム解析からは除外した。

(3) Optitype algorithm を用いてHLAタイピングを行った。体細胞 single nucleotide variant(SNV)あるいはinsertion/deletion(indels)から生じる8-11塩基長の変異ペプチドとHLA class Iに対する結合親和性をNetMHCpanv2.8を用いて解析し、結合親和性50nM未満の変異ペプチド数をネオ抗原数とした。

(4)生検検体における腫瘍浸潤CD8陽性Tリンパ球の密度を免疫染色およびAperio ImageScope system (Leica Biosystems)を用

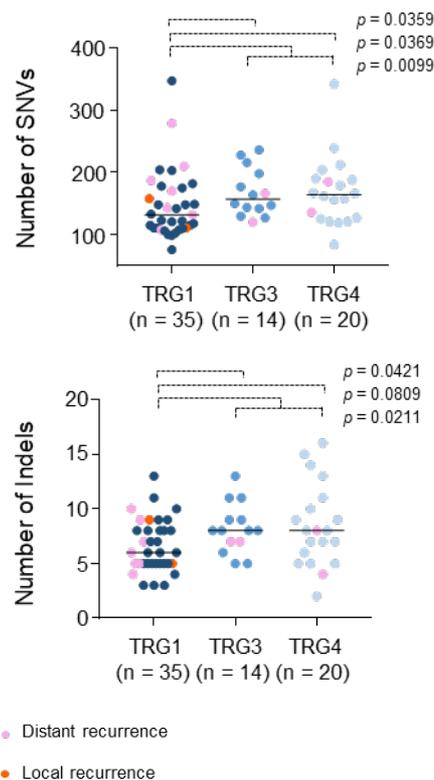
いて評価した。

### 4. 研究成果

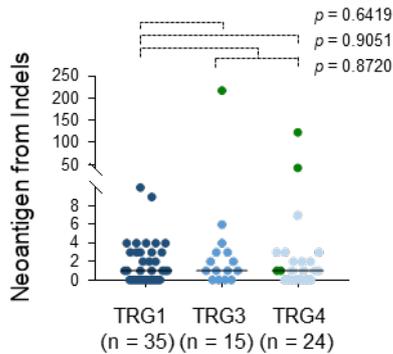
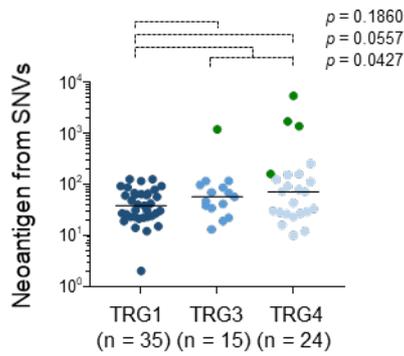
(1)74症例のエクソーム解析を行った。男性46例/女性28例、年齢の中央値60歳(31-81)、腫瘍肛門縁距離の中央値:40mm(0-80)、clinical stage II:39例/III:35例、術前CRTのレジメンは5-FU:60例/TS-1+oxaliplatin:14例、TRGはTRG1:35例/TRG3:15例/TRG4:24例であった。

Non-silent SNVおよびindelの中央値はそれぞれ150(76-21,336)、8(2-698)であった。74例中5例にhypermutated tumorを認め、うち3例はPOLE proof-reading domainの変異を認め(p.S297F, p.S461T, and p.P286R)、POLE変異のない残り2例はMSH2のgermline mutationを伴うMSI-H症例であった。これら5例のhypermutated tumorはいずれも効果良好群であった(TRG4:4例、TRG3:1例)。

Hypermutated tumor5例を除くnon-hypermutated tumor 69例において、SNVの数、indelの数を比較したところ、SNV、indelともに効果良好群で有意に多かった。

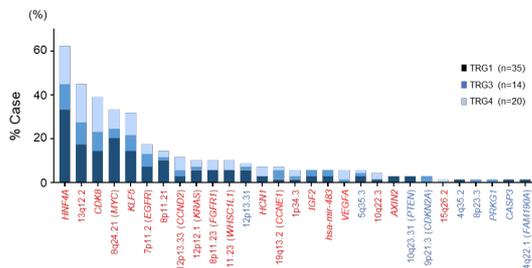
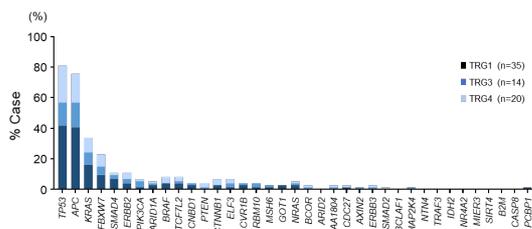


(2)変異数が効果良好群で有意に多かったことから、ネオ抗原数と効果の相関を検討した。SNV由来の予測ネオ抗原数はHypermutator5例を含む74例で解析したところ効果良好群で有意に多かったが(p=0.043)、症例数が少ないためかhypermutator5例を除いた69例で解析したところ有意差は消失した(p=0.2)。Indel由来のネオ抗原数は効果良好群と不良群の間で有意差はなかった。

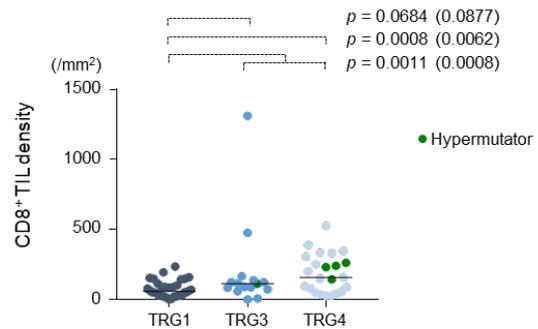


- TRG1
- TRG3
- TRG4
- Hypermutator

(3)特定のドライバー遺伝子変異と治療効果の相関を検討したが、non-hypermulator 69例において治療効果と相関するドライバー遺伝子変異を認めなかった。コピー数異常についても同様に治療効果と相関するコピー数異常は認めなかった。



(4)CD8 陽性腫瘍浸潤リンパ球密度と治療効果の相関を検討したところ、治療効果良好群でCD8 陽性腫瘍浸潤リンパ球密度は有意に高かった (hypermulator 含む;  $p=0.0011$ 、hypermulator 除く;  $p=0.0008$ )。SNV/indelの総数とCD8 陽性腫瘍浸潤リンパ球密度の相関を検討したところ、有意な相関を認めた [Spearman rank correlation;  $r=0.3178$ ,  $p=0.0065$  (hypermulator 含む);  $r=0.241$ ,  $p=0.0495$  (hypermulator 除く)]。以上より、CRT治療前の癌細胞の non-silent mutation によって生じたネオ抗原を認識するCD8 陽性腫瘍浸潤リンパ球の存在が治療効果発現に重要である可能性が示唆された。



### 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 14 件)

(1) Takeda Y, Akiyoshi T, et al. Skeletal muscle loss is an independent negative prognostic factor in patients with advanced lower rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. PLoS One. 2018 Apr 9;13(4):e0195406. doi: 10.1371/journal.pone.0195406. 査読有

(2) Ogura A, Akiyoshi T, Yamamoto N, Kawachi H, Ishikawa Y, Mori S, et al. Pattern of programmed cell death-ligand 1 expression and CD8-positive T-cell infiltration before and after chemoradiotherapy in rectal cancer. Eur J Cancer. 2018 Mar;91:11-20. doi: 10.1016/j.ejca.2017.12.005. 査読有

(3) Honda M, Oba K, Akiyoshi T, et al. Development and validation of a prognostic nomogram for colorectal cancer after radical resection based on individual patient data from three large-scale phase III trials. Oncotarget. 2017 Oct 12;8(58):99150-99160. doi: 10.18632/oncotarget.21845. 査読有

(4) Hiyoshi Y, Akiyoshi T, Inoue R,

Murofushi K, Yamamoto N, Fukunaga Y, Ueno M, Baba H, Mori S, Yamaguchi T. Serum miR-143 levels predict the pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer. *Oncotarget*. 2017 Mar 31;8(45):79201-79211. doi: 10.18632/oncotarget.16760. 査読有

(5) Miki H, Akiyoshi T, et al. Pretreatment Serum Carbohydrate Antigen 19-9 Concentration Is a Predictor of Survival of Patients Who Have Undergone Curative Resection of Stage IV Rectal Cancer. *Dig Surg*. 2017 Sep 1. doi: 10.1159/000480247. [Epub ahead of print] 査読有

(6) Osumi H, Shinozaki E, Suenaga M, Wakatsuki T, Nakayama I, Matsushima T, Ogura M, Ichimura T, Takahari D, Chin K, Nagasaki T, Konishi T, Akiyoshi T, et al. Change in clinical outcomes during the transition of adjuvant chemotherapy for stage III colorectal cancer. *PLoS One*. 2017 May 31;12(5):e0176745. doi: 10.1371/journal.pone.0176745. 査読有

(7) Ogura A, Akiyoshi T, et al. Does the depth of mesorectal invasion have prognostic significance in patients with ypT3 lower rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy? *Int J Colorectal Dis*. 2017 Mar;32(3):349-356. doi: 10.1007/s00384-016-2716-1. 査読有

(8) Honda M, Akiyoshi T, et al. Patient-centered outcomes to decide treatment strategy for patients with low rectal cancer. *J Surg Oncol*. 2016 Oct;114(5):630-636. doi: 10.1002/jso.24376. 査読有

(9) Ogura A, Akiyoshi T, et al. Feasibility of Laparoscopic Total Mesorectal Excision with Extended Lateral Pelvic Lymph Node Dissection for Advanced Lower Rectal Cancer after Preoperative Chemoradiotherapy. *World J Surg*. 2017 Mar;41(3):868-875. doi: 10.1007/s00268-016-3762-0. 査読有

(10) Nagasaki T, Akiyoshi T, et al. Preoperative Chemoradiotherapy Might Improve the Prognosis of Patients with Locally Advanced Low Rectal Cancer and Lateral Pelvic Lymph Node Metastases. *World J Surg*. 2017 Mar;41(3):876-883. doi: 10.1007/s00268-016-3748-y. 査読有

(11) Osumi H, Shinozaki E, Suenaga M,

Matsusaka S, Konishi T, Akiyoshi T, et al. RAS mutation is a prognostic biomarker in colorectal cancer patients with metastasectomy. *Int J Cancer*. 2016 Aug 15;139(4):803-11. doi: 10.1002/ijc.30106. 査読有

(12) Murata A, Akiyoshi T, et al. Clinicopathological characteristics of young patients with sporadic colorectal cancer. *Surg Today*. 2016 Oct;46(10):1166-75. doi: 10.1007/s00595-015-1298-9. 査読有

(13) Nagasaki T, Akiyoshi T, et al. Prognostic Impact of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Patients with Advanced Low Rectal Cancer Treated with Preoperative Chemoradiotherapy. *Dig Surg*. 2015;32(6):496-503. doi: 10.1159/000441396. 査読有

(14) Akiyoshi T, Matsueda K, Hiratsuka M, et al. Indications for Lateral Pelvic Lymph Node Dissection Based on Magnetic Resonance Imaging Before and After Preoperative Chemoradiotherapy in Patients with Advanced Low-Rectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015 Dec;22 Suppl 3:S614-20. doi:10.1245/s10434-015-4565-5. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) Hiyoshi Y, Akiyoshi T, et al. Low expression of miR-143 in serum as a predictive marker for good pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *European Society of Coloproctology 2016, Milan, Italy*

〔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  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋吉 高志 (AKIYOSHI TAKASHI)

公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・医長

研究者番号: 50625598

(2)研究分担者

森 誠一 (MORI SEIICHI)  
公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター 次世代がん研究シーズ育成プロジェクト・プロジェクトリーダー  
研究者番号：10334814

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし