

令和元年6月15日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11029

研究課題名（和文）TP53 signature診断法による前立腺がん個別化医療の開発

研究課題名（英文）Development of personalized medicine for prostate cancer by TP53 signature diagnostic method

研究代表者

加藤 俊介（Kato, Shunsuke）

順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：40312657

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：前立腺がん臨床検体50症例を用い、TP53遺伝子の構造変異を予測する遺伝子発現プロファイルTP53 signatureの予後予測能について検証した。その結果、TP53 signatureはGleason scoreなどの既存の臨床因子より正確に予後予測可能であることを明らかにした。また、公共オミックスデータベースを用いて、TP53 signature変異型の分子生物学的特徴を解析した結果、TP53構造変異の有無にかかわらず、MDM2、4のコピー数増、低アンドロゲンホルモン依存性、総体細胞変異が多いなどの特徴を有することが明らかになり、新規治療法の開発のための基礎的データを得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期前立腺がんの予後予測に、遺伝子発現プロファイルTP53signatureが有用であることを明らかにしたはじめの研究であり、臨床因子に加えてTP53 signatureを解析することで、過小・過剰医療を回避することができ、より患者に合った精緻医療の実現が可能となることが期待される結果を得ることができた。さらに予後不良群であるTP53 signature変異型の前立腺がん細胞の分子生物学的な特徴がオミックスデータから明らかになり、これら患者群に対する新規治療法の開発につながる基礎的データの収集ができた。

研究成果の概要（英文）：Using 50 clinical specimens of prostate cancer, the usefulness of the gene expression profile TP53 signature as a prognostic biomarker was evaluated. As a result, recurrence risk is high in cases which TP53 signature was judged to be a mutant type, comparing to a wild type. TP53 signature was revealed extremely high ability to predict recurrence even in comparison with clinical factors such as Gleason score. In addition, as a result of analyzing the molecular features of TP53 signature mutant type using public omics database, it is clarified that it has features such as increase in copy number of MDM2 and MDM4, low dependency of androgen hormone, and high tumor mutation burden. These results provide the basic data for development of new treatment for the patients with TP53 signature mutant type.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：TP53 前立腺がん 発現プロファイル 予後予測バイオマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本の前立腺がんの罹患者数は約 65,000 人 (2010 年現在) で、男性がん罹患の第 2 位を占め、高齢化社会の進行に従い今後もその罹患者数は増加傾向を示すことが予測されている。前立腺がんは比較的予後が良く、高齢者に発生する癌であるため、過剰治療に伴う患者 QOL の低下の回避、医療経済への負担の軽減を目的に、監視療法が選択されることがある。監視療法の適応を考えるうえでのリスク評価因子として PSA や Gleason スコアなどの臨床因子が用いられるが、それら指標を用いて監視療法を選択した場合でも、早期に病勢進行・再発をきたす群が一定程度存在する。

一方、遠隔転移を伴う無治療性前立腺がんにおいては内分泌療法単独と内分泌療法と化学療法の併用療法を比較した第 III 相試験 (CHARTEED 試験) において、併用療法において良好な治療成績が報告されているが、高齢者が多くを占める前立腺がん全症例に併用療法を行うこと患者リスクと医療経済的な側面を考慮すると、強い治療強度が必要な高リスク患者群と、弱い治療強度でも十分な低リスク患者群を適切に分別しうるバイオマーカーの開発が、前立腺がんにおいては重要である。

前立腺がん同様に性ホルモンに依存的なサブタイプ分類がある早期乳がんにおいては、リンパ節転移や腫瘍径などの臨床因子に加えて、OncotypeDx, MammaPrint などの多遺伝子発現プロファイルによる再発リスクを予測し、その結果に応じて化学療法やホルモン療法などの治療法が個別に選択されることが行われるようになってきた。さらに近年、我々はその後の早期乳がん検体を用いた解析において、TP53 signature が既存の多遺伝子発現プロファイルよりも優れた予後予測能を有していることを明らかにした。TP53 signature は、がん抑制遺伝子 TP53 遺伝子の構造異常の有無を予測する遺伝子発現プロファイルとして当初確立された。しかし興味深いことに、TP53 signature は必ずしも TP53 構造変異とは一致せず、TP53 遺伝子構造が野生型であっても TP53 signature が変異型と予測されるケースも存在し、さらに TP53 遺伝子構造変異の有無による分類よりも TP53 signature による分類の方が、予後を正確に予測できることも明らかにした。

前立腺がんの予後予測としては、臨床因子として確立されたものはあるが、乳がんにおける発現プロファイルのような分子生物学的あるいは遺伝的背景に立脚したリスク分類法はこれまでに確立されていない。また、TP53 遺伝子は臓器横断的に多くの腫瘍細胞でその構造変異が報告されているものの前立腺がんにおいてはその頻度は高くないことが知られており、TP53 signature が前立腺がんにおいてどのような臨床的特徴を有し、さらに早期乳がん同様に予後予測能として有用であるかについてのデータはこれまで報告がない。

### 2. 研究の目的

前立腺がん検体の TP53 signature による分類が予後予測能において有用かを検証する。さらに TP53 遺伝子の構造変異の頻度が低い前立腺がんにおいて、TP53 signature 変異型を示す腫瘍細胞の分子生物学的特徴について公共オミックスデータを利用して網羅的な解析を行い、新たな治療法開発のための基礎的データを収集する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 解析コホート

前立腺がんにおける TP53 signature の予後予測能の検討のため公共データとして、Gene Expression Omnibus (GEO) に登録されている GSE21034、GSE25136 を再解析した。また臨床検体として神奈川県立がんセンターより提供された 47 人の前立腺がんコホートの実検体を使用した。また、予後不良群の分子生物学的背景の解明のために TCGA 前立腺がんのオミックスデータを再解析した。

#### (2) 公共のデータベースの発現値及びその他のデータの入手法

GSE21034、GSE25136 に関してはマイクロアレイにより発現データ及び臨床情報を GEO よりダウンロードし利用した。TCGA は RNA-seq による発現データ、DNA-seq による体細胞変異情報とコピー数情報、及び臨床情報を、cBioPortal を通してダウンロードした。

#### (3) nCounter による TP53 signature の診断

TP53 signature を構成する 33 種類の各遺伝子の発現値を測定するために、多遺伝子解析装置である nCounter (Nanostring technology, Washington, CA, USA) を使用した。検体は 10  $\mu$ m の厚さに切片化した連続する薄切検体の一部を HE 染色し、がん部の同定を行い、未染色プレパラートをマクロダイセクションした後、キアゲン社の RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)、RNeasy FFPE kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を使用し、凍結切片、FFPE 切片より total RNA を抽出した。TP53 signature 診断キットは、検出がうまくいかなかった 2 遺伝子を除いた 31 遺伝子と内部コントロール遺伝子 (5 遺伝子) からなる nCounter 用プローブセットで構成した。

#### (4) TP53 signature による分類およびリスクスコアの診断方法

TP53 signature は元来 33 種類の遺伝子発現パターンにより変異型、野生型にサンプルを診断するものである。MT type では 33 種類のうち 22 種類の遺伝子 (TP53 upregulation genes) の発現が上昇し、11 種類の遺伝子 (TP53 downregulation gene) の発現が低下する。WT type ではその逆の発現パターンになる (Yamaguchi S, et al. Oncotarget. 9:14193-14206, 2018)。

GEO より GSE21034、GSE25316 コホートの正規化された遺伝子発現データから、TP53 signature を構成する遺伝子群の発現値の発現データを抽出し、階層的クラスタリングにより、各サンプルを2群にわけ、このうち upregulation genes が上昇し、down regulation genes が低下している群を TP53 変異型、逆の発現パターンを示す群を TP53 野生型とした。TCGA データは cBioPortal を利用して、正規化済みの RNA-seq 発現データをダウンロードし、GEO データと同様の方法で TP53 signature 分類を行った。

臨床検体は nCounter により得られたカウントデータを使用し、以下の方法で TP53 signature リスクスコアの計算を行った。

TP53 signature リスクスコア = (22 種類の発現上昇遺伝子のカウント数) / (9 種類の発現低下遺伝子のカウント数)

#### (5) 臨床情報を利用した統計学的解析

すべての解析は R(ver3.52) を利用し行った。実検体と公共のデータベースに関して、nCounter によって決定された TP53 signature 分類と臨床因子 (年齢、腫瘍径、リンパ節転移の有無、PSA 値、Gleason スコア) の間の独立性の検定を行った。独立性の検定は年齢に関しては Kruskal-Wallis 検定、年齢以外の臨床因子はカイニ乗検定を行った。各データセットで定義されている RFS に関して、カプランマイヤー法による生存曲線を描き、各臨床因子間、TP53 status 間でログランク検定を行った。ログランク検定にて有意差を認められた各因子に関して RFS に関する比例ハザードモデルによる多変量解析を行った。カプランマイヤーの描写および全ての検定はすべて R のパッケージである "survival ver2.38" (URL: <http://CRAN.R-project.org/package=survival>) を用いて行った。

#### (6) 分子生物学的背景の検討

##### CNV および SMN の解析

TCGA データを用いて、TP53 signature で分類される各群の総体細胞変異(SNV)数の比較を行った。SNV は cBioportal からダウンロードを行った。TP53 signature 分類の決定は、階層的クラスタリングにて行っている。TP53 signature 分類間の SNV 数の合計数の比較は Mann-Whitney 検定によって行った。

MDM 2 及び MDM 4 のコピーナンバー数異常について、TP53 signature の status 間での比較を行った。MDM2、MDM4 のコピー数に関しては cBioPortal を利用してダウンロードを行っている。SNV 同様に TP53 signature の分類間の MDM2 及び MDM 4 のコピー数の多型の検定は Mann-Whitney 検定を行った。

##### AR signal score 及び AR signal に関する single sample Gene Enrichment Analysis

TCGA コホートにおいて TP53 signature status 間の AR signal に関する依存度を比較するために各サンプルが有する AR signal score、及び AR signal に関する GESA で定義されている "HALLMARK\_ANDROGEN\_RESPONSE" に関する ssGESA 解析による enrichment score を利用した。TP53 signature の status 間の AR signal score 及び enrichment score の比較のために Mann-Whitney 検定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) TP53 signature status と臨床因子との関係、及び予後予測能

GSE21034 コホートでは 61 人の臨床情報が入手可能であった。このうち TP53 signature 変異型と診断されたのは 22 人、野生型と診断されたのは 39 人であった。無再発期間に関する単変量解析の結果、リンパ節転移の有り、Gleason score 8 以上、TP53 signature 変異型が無再発生存期間に関する予後不要因子であり、この 3 因子に関して cox ハザード比による多変量解析を行ったところ TP53 signature 変異型のみが予後不良因子となった。Gleason score と TP53 signature は独立した関係であったため、Gleason score と TP53 signature を組み合わせた形で、「Gleason score 7 以下かつ TP53 signature 野生型(低リスク群)、Gleason score 8 以上かつ TP53 signature MT(高リスク群)、その他(中間リスク群)の 3 群に分類して予後比較を行うと、予想通り、高リスク群、中間リスク群、低リスク群の順に予後不良であった。同様の結果が、GSE25316 コホートデータおよび TCGA データからも得られた。さらに、臨床検体 47 検体について nCounter により算出された TP53 signature リスクスコアと再発状況との関連を解析したところ、リスクスコアが高いと有意に再発が高いことが示された(下図参照)。

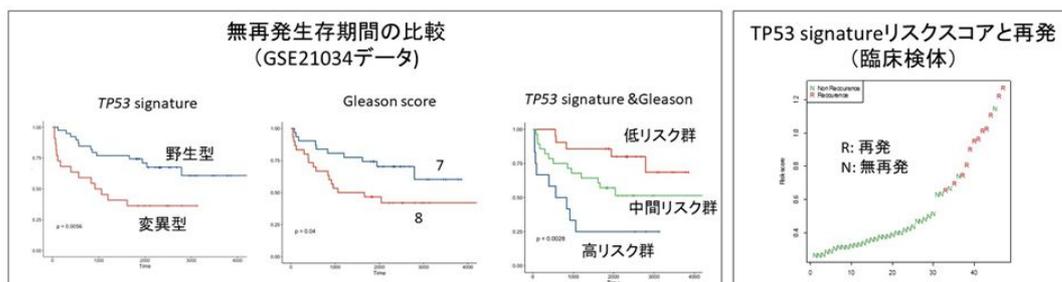


図1. 前立腺がんにおけるTP53 signatureの予後予測能

## (2) TP53 signature 変異型の分子生物学的特徴

TCGA コホートでは 333 人のデータが解析対象となった。このうち 60 人が変異型、273 名が野生型と診断された。TP53 遺伝子構造変異と TP53 signature の関係を解析した結果、統計学的には TP53 signature 変異型群には TP53 構造変異が多かったが、TP53 signature 変異型群と診断された 60 名のうち、51 名は TP53 遺伝子構造変異を有していなかった。しかし、TP53 signature 変異型群では野生型群と比較し、統計学的に有意に MDM2 もしくは MDM4 遺伝子コピー数の増幅を認めた。また MDM2 もしくは MDM4 遺伝子コピー数増加と TP53 遺伝子構造変異は相互排他的な関係にあった。次に各群における総体細胞変異(SNV)数を比較したところ、TP53 signature 変異型群では TP53 signature 野生型群よりも有意に変異数が高かった。最後にアンドロゲン依存性を示す AR signal score と TP53 signature との関連を調べたところ、TP53 signature 変異型群では TP53 signature 野生型群よりも AR score は有意に低く、これらの群ではアンドロゲン依存性が低いことが示された(表参照)。

表: TP53 signature の生物学的特徴の比較

	TP53 signature 変異型	TP53 signature 野生型
MDM2, MDM4 コピー数	増幅	正常
総体細胞変異数	多い	少ない
アンドロゲン依存性(AR score)	低い	高い

今回の研究結果から、TP53 signature 分類は前立腺がん患者の予後予測に有用であることが示され、Gleason score などの臨床因子と組み合わせることで、予後予測に関してさらに高い分別能を有する可能性も示された。

さらに今後の臨床応用への展開としては、臨床因子と TP53 signature から再発に関して高リスク群と判断された患者については、監視療法ではなく積極的な治療を行うなどの選択肢も考えられる。さらに変異型群ではアンドロゲンシグナルへの依存性が低いことから、早期にホルモン療法への抵抗性を獲得する可能性が考えられるため、早期から抗がん剤治療を行う選択肢も考えられる。さらに MDM2 や MDM4 などの増幅が見られる患者においては、現在開発中である MDM2, MDM4 阻害剤などの分子標的薬の効果が期待される可能性や、総体細胞変異数が多いことから免疫チェックポイント阻害剤などの治療も期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yamaguchi S, Takahashi S, Mogushi K, Izumi Y, Nozaki Y, Nomizu T, Kakugawa Y, Ishida T, Ohuchi N, Ishioka C, Kato S. Molecular and clinical features of the TP53 signature gene expression profile in early-stage breast cancer. *Oncotarget*. 2018;9(18):14193-14206.

Kato S, Hayashi T, Suehara Y, Hamanoue H, Yamanaka S, Ichikawa Y, Higurashi T, Ohashi K, Yamaguchi S, Nozaki Y, Terao Y, Saito T, Yao T, Nakajima A, Syed A, Zehir A, Ladanyi M, Kato S. Multicenter experience with large panel next-generation sequencing in patients with advanced solid cancers in Japan. *Jpn J Clin Oncol*. 2018 Dec 12. doi: 10.1093/jjco/hyy173.

Miura Y, Horie S. The role of hormone therapy and chemotherapy in oligometastatic prostate cancer. *ESMO Open*. 2019 Mar 12;4(Suppl 1):e000471

Ohtaka A, Aoki H, Nagata M, Kanayama M, Shimizu F, Ide H, Tsujimura A, Horie S. Sarcopenia is a poor prognostic factor of castration-resistant prostate cancer treated with docetaxel therapy. *Prostate Int*. 2019 Mar;7(1):9-14. doi: 10.1016/j.pnrl.2018.04.002. Epub 2018 Apr 27.

〔学会発表〕(計 2 件)

山口茂夫、高橋信、石田考宣、角川陽一郎、野水整、大内憲明、加藤俊介、石岡千加史。シンポジウム 3 多遺伝子アッセイの現状と展望 「早期乳がん予後予測バイオマーカー TP53 signature の簡易測定法の開発と分子生物学的意義」 第 26 回日本乳癌学会学術総会 京都 京都大学 2018 年 5 月 17 日

Molecular feature and clinical use development of gene expression profile "TP53 signature" in early stage breast cancer.

S. Yamaguchi, S. Takahashi, T. Nomizu, Y. Kakugawa, T. Ishida, S. Kato, C. Ishioka ESMO 2017 Congress, Madrid Spain September 10 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：堀江 重郎

ローマ字氏名：(HORIE, shigeo)

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学(系)研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：40190243

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：山口 茂夫

ローマ字氏名：(YAMAGUCHI, Shigeo)

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学(系)研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：40747797

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。