

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21590

研究課題名(和文) 胃癌術後補助療法に対する抵抗性を評価するバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of the biomarker to select gastric cancer being resistant to adjuvant chemotherapy

研究代表者

重松 康之(Shigematsu, Yasuyuki)

公益財団法人がん研究会・有明病院 病理部・医員

研究者番号：40749511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌II期およびIII期における術後補助化学療法についての有用性はほぼ確立した治療法として位置づけられているが、補助化学療法を施行したにもかかわらず再発する症例が存在する。術後補助化学療法施行後に再発した症例(治療抵抗群)と術後補助化学療法施行後5年以上再発がない症例(治癒群)を対象に、病理学的な特徴の抽出、ゲノム網羅的なDNAメチル化解析、免疫組織化学によるタンパク発現を評価することで、両者を識別しうる所見あるいはバイオマーカー候補を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、癌細胞内で起こるエピゲノム変化、特にDNAのメチル化という現象に着目することで、治療抵抗性を予測するバイオマーカー候補を見出した。このことは、癌細胞におけるエピゲノム修飾の重要性を示唆するとともに、その生物学的な変化が臨床的に応用可能な指標になりうる可能性を示した。社会的には、胃癌という死亡率の高い癌腫において、治療抵抗性を示唆する可能性があるマーカーを見出したことで、個々の患者ごとに応じた治療選択やフォローアップ期間の選定といった個別化医療の実現に寄与しうる知見の提供に貢献した。

研究成果の概要(英文)：Adjuvant chemotherapy after surgical resection with curative intent for gastric cancer (GC) is an established treatment strategy. However, there are patients who experience a recurrence even after the treatment. In the present study, we analyzed GC patients with and without recurrence, who underwent adjuvant chemotherapy at least six months, regarding pathological features, genome-wide DNA methylation status, and protein expression status of the tumor cells. Through the analyses, we found some morphological unique profiles and some genes with aberrant promoter DNA methylation affecting protein expression in treatment-resistance group. These findings can contribute to establish a personalized medicine.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：消化器癌 補助化学療法 治療抵抗性 胃癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本では、根治的切除が可能な胃癌に対する標準的な術後治療として抗癌剤 S-1 の1年間の内服治療(術後補助化学療法)が行われる。手術単独だけでは根治に至らない症例であっても、術後補助化学療法として抗癌剤 S-1 による治療を追加することで、有意に無再発生存期間および全生存期間を延長することが示されている^{1,2}。しかし、術後補助化学療法を追加しても依然として再発率が2割以上認められている。現時点で、再発する症例と治癒する症例を区別する手段がない。

(2) 再発率を減らすために、治療強度を上げた化学療法レジメンが開発されてきている³⁻⁵。一方で、標準治療で治癒に至る症例も存在する。一般に、治療強度の増加とともに副作用も増加するため、治療強度の高い補助療法の適応は慎重に行う必要がある。現時点では、治療強度を強くする必要がある症例を識別できないため、治療選択に非常に難渋しており、その適応を識別する基準が強く求められている。

(3) 胃癌はその発癌および進展過程でゲノムの変化のみならず、エピゲノムの変化も大きく関与することがわかってきた⁶⁻⁸。特に、遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドにおける DNA のメチル化はその下流遺伝子発現状況を予測する上で有用なマークとなることが知られており、遺伝子発現と密接に関係している。

上記背景を踏まえて、腫瘍のエピゲノム変化に着目することで、胃癌における補助化学療法 S-1 に対する抵抗性を示す症例の絞り込みが可能なバイオマーカーを、見いだせるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

胃癌における補助化学療法 S-1 に対する抵抗性を示すバイオマーカーを見出すために、以下に具体的な研究目的を記載する。

S-1 治療後に再発する症例と治癒する症例間での

- (1) 病理組織学的特徴の比較
- (2) (1)を踏まえた腫瘍における両者を識別しうるエピゲノム異常の抽出
- (3) 候補エピゲノム異常の遺伝子発現レベルでの還元可能性の評価

以上3点について検索を進め、病理組織学的な特徴を基準とした、網羅的なエピゲノム解析を通じて、術後補助化学療法に対する抵抗性を有する腫瘍の評価するためのバイオマーカーの探索および同定を目的とする。

3. 研究の方法

当初は、胃がん術後補助化学療法である S-1 治療を受けた症例を対象にした。観察期間が 5 年以上の症例のうち、再発したものを治療抵抗群、無再発の症例群を治癒群とみなした。しかし、2018 年に当院の胃がん術後症例を対象にした観察研究で、術後 S-1 療法の服用期間が再発率に深く関与することがわかった⁹。特に半年という期間が再発率を分けるポイントであったため、S-1 内服半年以上という条件を追加して対象を絞ることとした。手術により摘出された原発巣のホルマリン固定パラフィン包埋検体のうち、最大断面を用いて組織学的な評価を行った。形態学的な特徴をもとにスクリーニングにかける症例を選別し、治療抵抗群と治癒群の腫瘍部のホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いてゲノムを抽出し、ゲノム網羅的なメチル化解析 (Infinium Methylation EPIC BeadChip) を行った。得られた候補のうち、エピゲノム修飾によりタンパク発現変化をきたしうる領域に着目し、免疫組織化学的な手法を用いて発現レベルで両者を区別しうるか調べた。

4. 研究成果

本研究では当院で胃がんに対する根治的な切除術を施行されたあと、術後補助化学療法として S-1 内服を半年以上行い、5 年以上経過している 294 例が対象症例として登録した。

(1)については、分化度、リンパ管侵襲の有無、静脈侵襲の有無、深達度、リンパ節転移数の項目について調べた結果、臨床病期によりそのパラメータの影響度が異なることがわかった。具体的には、病期 II 期では、治癒群(102 例)における低分化成分を含まない腫瘍と含む腫瘍の割合はそれぞれ 25.4%と 74.6%であり、治療抵抗群(14 例)では全例が低分化成分を含む腫瘍であった。両者の分布には有意な差があり ($P = 0.03$)、低分化成分が治療抵抗性と関係することが示唆された。リンパ管侵襲の程度や脈管侵襲の程度、リンパ節転移数の個数については、治療抵抗性との関係性は見られなかった。臨床病期が III 期になると、腫瘍自体に低分化成分を有している割合が高く、分化度の治療抵抗性に寄与する影響が小さくなり治癒群と治療抵抗群でその分布に有意差は見られなくなる。一方で、リンパ節転移数の個数に代表される腫瘍量の多さが抵抗性と関係していることがわかった ($P < 0.001$)。抵抗性群と治癒群における臨床的なパラメータ(年齢、性別)には明らかな差は見られなかった。

(2) 腫瘍量が少ない段階では低分化成分の存在が治療の抵抗性と関係することが形態学的な検討から示唆されたため、低分化癌に注目してゲノム網羅的なエピゲノム解析を行った。治癒群と治療抵抗群のそれぞれ 8 症例ずつを年齢、性別、深達度をあわせて選び出し、各群における平均の DNA メチル化レベルを見てみると、治療抵抗群でゲノム全体のメチル化レベルが有意に低下していることがわかった ($P < 0.00001$)。腫瘍の悪性度とともに、ゲノム領域のメチル化レベルの低下が示唆された。CpG island からの距離ごとに見てみると、脱メチル化される領域の割合は、CpG shore や CpG shelf よりも CpG island で頻繁に起こる現象であることがわかった。転写開始領域(TSS)には CpG island が通常存在している。同部位の CpG アイランドの DNA メチル化は、その下流遺伝子の発現スイッチとなっており、その領域におけるエピゲノム変化により、下流遺伝子の

発現を間接的に予測する事ができる。今回のゲノム網羅解析に用いたアレイ (Infinium Methylation EPIC BeadChip) 中に含まれ、解析可能な TSS 領域の CpG island の中で、治療抵抗群と治療抵抗群で有意に変化を認めた CpG island は 26 遺伝子であることがわかった。これらの候補のうち、9 遺伝子 (*USF44*, *DMGDH*, *SEPT5*, *NINL*, *WNT2*, *DUOX1*, *LOC20076*, *SPSB4*, *ADAMTS12*) についてはそれぞれ単独のメチル化レベルの状態のみで治療抵抗群と治療群とを識別することが可能であった。これらの候補は、両者の選別に際して有用な候補マーカーと考えられた。

(3) ゲノム網羅解析により絞り込むことができた TSS 近傍の CpG アイランドでは転写調節と密接に関係することから、絞り込んだ候補マーカーをタンパク発現レベルで評価可能であれば実際の実務において比較的簡便に評価可能となる。そこで、得られた候補について、免疫組織化学的な手法を用いて、原発巣における腫瘍の発現状況を調べた。2018-2019 年に臨床病期 III 期を対象にした補助化学療法として従来の術後補助化学療法薬である S-1 に加えてドセタキセルの上乗せ効果が認められ(JACCRO GC-07)、今後の胃癌術後補助化学療法のレジメンとして S-1 単独治療の頻度が激減することが想定されたため、臨床病期 II 期に絞って検討を加えた。9 つのマーカー遺伝子のうち、*SEPT5* 遺伝子は、治療群における平均メチル化レベルが 0.612、治療抵抗群における平均メチル化レベルが 0.104 と、治療抵抗群の原発巣において著しい脱メチル化が見られていた候補であり、腫瘍細胞における同領域のタンパク発現を評価すると、治療抵抗群で治療群と比べて有意に高いことがわかった。発現する細胞の原発巣に占める割合を 4 段階 (0, 1+, 2+, 3+) に分けた際に、1+ をカットオフ値とするときの治療抵抗性群の予測の感度と特異度はそれぞれ 87% と 79% であった。両者の識別に有用なバイオマーカー候補と考えられた。追加検討として、他の消化器癌で化学療法の感受性との関係が指摘されている CDX2 の発現状況¹⁰⁻¹² と胃癌における治療群あるいは治療抵抗群の関係を評価したが、両者における有意な発現変化は認めなかった。

< 引用文献 >

1. Ito S, Ohashi Y, Sasako M. Survival after recurrence in patients with gastric cancer who receive S-1 adjuvant chemotherapy: exploratory analysis of the ACTS-GC trial. *BMC Cancer* 2018;18:449.
2. Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N Engl J Med* 2007;357:1810-20.
3. Bang YJ, Kim YW, Yang HK, et al. Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2012;379:315-21.
4. Yamada Y, Boku N, Mizusawa J, et al. Docetaxel plus cisplatin and S-1 versus cisplatin and S-1 in patients with advanced gastric cancer (JCOG1013): an open-label, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2019;4:501-10.

5. Yoshida K, Kodera Y, Kochi M, et al. Addition of Docetaxel to Oral Fluoropyrimidine Improves Efficacy in Patients With Stage III Gastric Cancer: Interim Analysis of JACCRO GC-07, a Randomized Controlled Trial. *J Clin Oncol* 2019;37:1296-304.
6. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, et al. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res* 2006;12:989-95.
7. Shigematsu Y, Niwa T, Yamashita S, et al. Identification of a DNA methylation marker that detects the presence of lymph node metastases of gastric cancers. *Oncol Lett* 2012;4:268-74.
8. Kim JG, Takeshima H, Niwa T, et al. Comprehensive DNA methylation and extensive mutation analyses reveal an association between the CpG island methylator phenotype and oncogenic mutations in gastric cancers. *Cancer Lett* 2013;330:33-40.
9. Kano Y, Ohashi M, Hiki N, et al. Favorable long-term outcomes of one-year adjuvant S-1 monotherapy for pathological stage II or III gastric cancer treated at a high-volume center. *Gastric Cancer* 2018;21:1024-30.
10. Dalerba P, Sahoo D, Paik S, et al. CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med* 2016;374:211-22.
11. Shigematsu Y, Inamura K, Mise Y, et al. CDX2 expression is concordant between primary colorectal cancer lesions and corresponding liver metastases independent of chemotherapy: a single-center retrospective study in Japan. *Oncotarget* 2017-2018;9:17056-65.
12. Shigematsu Y, Inamura K, Yamamoto N, et al. Impact of CDX2 expression status on the survival of patients after curative resection for colorectal cancer liver metastasis. *BMC Cancer* 2018;18:980.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 6件）

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----