

令和元年6月18日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07034

研究課題名（和文）個々の遺伝子プロファイルに適した抗がんウイルスの食道癌への応用

研究課題名（英文）Anti-cancer virus suitable for individual gene profile of esophageal cancer

研究代表者

丸岡 慎平（Maruoka, Shimpei）

和歌山県立医科大学・医学部・准客員研究員

研究者番号：70805738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：難治性食道がん患者の血漿中がん由来遺伝子circulating tumor DNA (ctDNA) を digital droplet PCR法 (ddPCR)にて検査し、がん特有の変異遺伝子や増幅遺伝子の特徴を同定し、これらをターゲットとした「遺伝子制御型抗がんウイルス」を開発することを目的とし研究を行いました。ddPCRによる遺伝子変異の検出は実際には困難で、最終的に食道扁平上皮がん症例30例について検討しましたが、そのうち明かな遺伝子変異を認めた症例はわずか1例でした。食道がんにおけるctDNAの変異検出頻度は低く、当初計画していた抗がんウイルスへの応用が難しい結果となりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子変異の検出は研究計画の際に想定していたよりも困難で、遺伝子変異の閾値設定が難しく、どれくらいの変異頻度をもって「変異あり」と決定するかという問題がありました。そこで正常組織として末梢血単核球細胞をddPCR法にて解析し、変異の疑いがあるサンプルと比較検討するなどの工夫を行いました。

最終的に食道扁平上皮がん150サンプルに対するddPCRによる変異遺伝子解析を行ないました。そのうち明かな遺伝子変異を認めた症例はわずか1例でした。

今回のctDNAを対象とした食道がんにおけるctDNAの変異検出頻度は低く、当初計画していた抗がんウイルス療法への応用が難しい結果となりました。

研究成果の概要（英文）：We examined circulating tumor DNA (ctDNA) derived from esophageal cancer patients with digital droplet PCR (ddPCR) to characterize cancer-specific mutation genes and amplification genes. We conducted research aimed at identifying and developing “genetically controlled anti-cancer viruses” targeting cancer-specific mutation.

Finally 30 cases of esophageal squamous cell carcinoma were examined. The detection of gene mutations was actually difficult, and only one patient was found to have obvious gene mutations. The frequency of mutation of ctDNA in esophagus cancer was extremely low, and making it difficult to apply to anti-cancer virus.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道癌 遺伝子 ウイルス療法

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

1. 研究開始当初の背景

食道がんは、我が国を含む東アジア地域において未だに罹患率が高く、我が国の食道がんに対する治療成績も一定の向上を示したとは言え、さらなる治療成績の向上が求められていました。研究開始当初、国内では日本臨床腫瘍グループの多施設ランダム化比較試験で、2剤併用の術前化学療法、3剤併用術前化学療法、そして、術前化学放射線療法の3つの術前治療を比較しているという状況でした。

一方、抗がんヘルペスウイルスに関しては、欧米にて悪性黒色腫に対して、世界で初めて薬剤として認可を受けたばかりでした。そして、我が国でも、2016年2月に医薬品医療機器総合機構が、抗がんヘルペスウイルスを先駆け審査指定制度の対象品目として承認されました。

和歌山県立医科大学外科学第2教室では、ヘルペスウイルスを遺伝子工学的に改良した抗がんウイルス療法の治療開発の研究を2002年より開始し、胃がんに対する抗がんウイルス療法の基礎的研究 (Int J Cancer, 2013)を行うとともに、その臨床応用にも精力的な研究を進めてきました。そこで、従来の化学療法と外科手術、放射線治療の他に有効性を示す治療法がない食道がんに対しても、抗がんウイルスの研究開発を行うことを考え、本研究を着想しました。

2. 研究の目的

本研究では、食道がんに対する新しい強力な治療の開発を目標とし、食道がん細胞の分子細胞学的特徴を加味した抗がんウイルスの新たな開発を目標としました。具体的には、食道がん患者の血漿中がん由来の遺伝子 circulation tumor DNA (ctDNA)を digital droplet PCR (ddPCR)にてスクリーニングして遺伝子変異や増幅遺伝子のプロファイルを同定し、これらをターゲットとした“遺伝子制御型抗がんウイルス”の開発を目標として研究を行いました。

3. 研究の方法

食道がん治療に適した抗がんヘルペスウイルスを新しく開発し、その基盤研究データを基に臨床応用へと展開するために、本研究では以下に記す研究項目を達成すべく行いました。

食道扁平上皮がん症例における ctDNA 遺伝子変異解析 (ddPCR 法を用います)

ヒト食道扁平上皮がん細胞株における遺伝子変異解析 (ddPCR 法を用います)

標的となる候補遺伝子の増幅と siRNA 発現プラスミドの構築

遺伝子制御型抗がんウイルスの作成

作成した遺伝子制御型抗がんウイルスの複製能と機能性の評価

食道がん新鮮切除標本を用いた抗がんヘルペスウイルスの効果予測モデル確率と前臨床試験計画

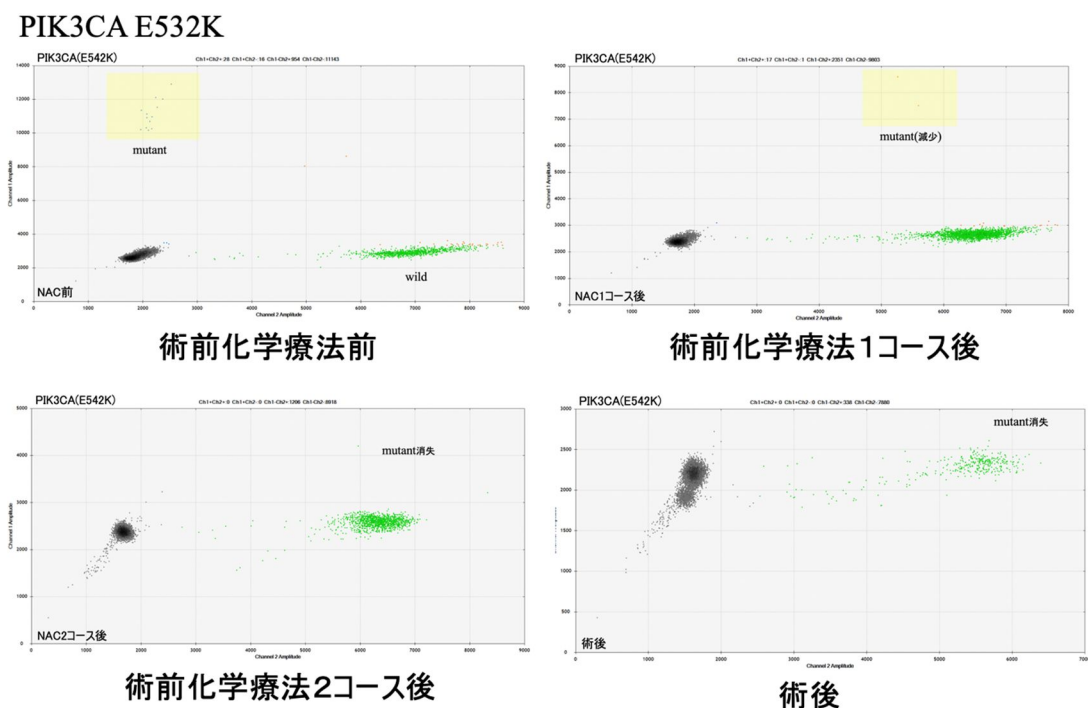
4. 研究成果

食道扁平上皮がん症例における ctDNA の遺伝子変異解析を行うにあたり、人を対象とする医学系研究、「食道癌手術症例に対する循環腫瘍 DNA 測定に関する前向き試験」として、和歌山県立医科大学倫理審査委員会へ研究計画書を提出し、同委員会において、平成29年9月5日に認可されました (受付番号 2095)。

その後、和歌山県立医科大学付属病院にて術前化学療法後に手術予定の進行食道癌症例の登録を行い、術前化学療法開始前、化学療法1コース後、化学療法2コース終了後、手術直前、術後7日目に血漿を採取し droplet digital PCR 装置を用いて、PIK3CA (E532K, E545K, H1047R), BRAF (V600E), KRAS (G12D, G12V, G13D, G12A, G12C, G12R, G12S)をターゲットとした ctDNA において、遺伝子変異の有無を検討しました。最終的に 30 症例 148 検体に対して検討を行い、結果は進行食道がんの1例で、化学療法開始前には PIK3CA E532K の有意な変異遺伝子を検出しました(図 1)。この症例の臨床経過をみると、化学療法1コース後には ctDNA における PIK3CA 532K の変異率の減少が確認され、化学療法を2コース施行後には、同変異遺伝子は消失しました。術後も継続して PIK3CA 532K の消失が確認されました。本症例は、臨床上も化学療法が著効し、Partial Response の症例でした。

ctDNA のみを対象に解析した結果 ddPCR による明らかな遺伝子変異を認めた症例はたったの1例でした。そこで、患者の正常組織に対しても ddPCR による遺伝子変異の解析を行い、ctDNA の変異率と比較することによって、遺伝子変異が検出できないかを、各症例において検討しました。結果としては、ctDNA と正常組織の遺伝子変異頻度に大きな違いはなく、食道扁平上皮がんにおいて ddPCR による遺伝子変異の変異検出率は低いという結果になりました。また、治療前の食道原発巣からの生検組織を解析した結果においても同様に、遺伝子変異の検出頻度は低く、ctDNA による検討と同様の結果でした。最終的に食道がんにおける ctDNA の変異検出頻度は低く、当初計画していた抗がんウイルスへ応用することが難しいという結論に至りました。

本研究では、ddPCR を用いる事で、採血という軽微な侵襲によって、食道がんの遺伝子変異プロファイルを検索し、情報が得られた個々の変異に対する抗がんウイルスを作成することを目標とし、研究を行いました。今後は ddPCR ではなく、抽出した腫瘍組織そのものを、次世代シーケンサーにて遺伝子解析し、そこから得られた遺伝子変異に基づいた抗がんウイルスの開発へシフトし、研究を継続して行う予定としています。



(図 1) 進行食道がん症例における PIK3CA E532K の変化

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 11 件）

1. Maruoka S, Ojima T, Nakamori M, Nakamura M, Hayata K, Katsuda M, Tsuji T, Yamaue H. Case report: Usefulness of indocyanine green fluorescence imaging: A case of laparoscopic distal gastrectomy after distal pancreatectomy with splenectomy. *Asian J Endosc Surg*, 2018 ISSN 1758-5902 DOI: 10.1111/ases.12447
2. Maruoka S, Ojima T, Nakamori M, Nakamura M, Katsuda M, Hayata K, Kitadani J, Shimokawa T and Yamaue H. Laparoscopic and endoscopic cooperative surgery plus sentinel lymph node navigation surgery for elderly patients with early gastric cancer – phase II trial: Study protocol. *Transl Sci*, 2018 doi: 10.15761/JTS.1000245
3. Ojima T, Nakamura M, Nakamori M, Hayata K, Katsuda M, Tsuji T, Maruoka S, Yamaue H. Original article: Prevention of Internal Hernia During Robotic Total Gastrectomy for Gastric Cancer. *J Gastrointest Surg*.2018. <https://doi.org/10.1007/s11605-018-3678-0>
4. Ojima T, Nakamura M, Nakamori M, Hayata K, Katsuda M, Kitadani J, Maruoka S, Yamaue H. Robotic versus laparoscopic gastrectomy with lymph node dissection for gastric cancer: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2018 Jul 31;19(1):409. doi: 10.1186/s13063-018-2810-5.
5. Ojima T, Nakamori M, Nakamura M, Hayata K, Maruoka S, Yamaue H. Fundoplication with 180-Degree Wrap During Esophagogastrectomy After Robotic Proximal Gastrectomy for Early Gastric Cancer. *J Gastrointest Surg*. 2018 Aug;22(8):1475-1476. doi: 10.1007/s11605-018-3765-2. Epub 2018 Apr 20.
6. Ojima T, Nakamura M, Nakamori M, Katsuda M, Hayata K, Maruoka S, Shimokawa T, Yamaue H. Phase I/II Trial of Chemotherapy with Docetaxel, Cisplatin, and S-1 for Unresectable Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus. *Oncology*. 2018;95(2):116-120. doi: 10.1159/000488861. Epub 2018 May 16.
7. Hayata K, Ojima T, Nakamori M, Nakamura M, Katsuda M, Kitadani J, Takeuchi A, Tabata H, Maruoka S, Yamaue H. Neoadjuvant Chemotherapy with Docetaxel, Cisplatin and S-1 for Resectable Advanced Esophageal Cancer. *Anticancer Res*. 2018 Sep;38(9):5267-5273. doi: 10.21873/anticancer.12852.
8. Ojima T, Nakamura M, Nakamori M, Katsuda M, Hayata K, Tsuji T, Maruoka S, Yamaue H. Endoscopic treatment of esophageal fistulas after esophagectomy with injection of an alpha-cyanoacrylate monomer: a phase II study. *Endosc Int Open*. 2018 Sep;6(9):E1093-E1099. doi: 10.1055/a-0581-9005. Epub 2018 Sep 11.

9. Tsuji T, Ojima T, Nakamori M, Nakamura M, Katsuda M, Hayata K, Kitadani J, Maruoka S, Shimokawa T, Yamaue H. Triangulating stapling vs functional end-to-end stapling for cervical esophagogastric anastomosis after esophagectomy for thoracic esophageal cancer: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2019 Jan 28;20(1):83. doi: 10.1186/s13063-019-3201-2.

10. Ojima T, Nakamura M, Nakamori M, Katsuda M, Hayata K, Kitadani J, Maruoka S, Shimokawa T, Yamaue H. Triplet chemotherapy with docetaxel, cisplatin and S-1 for unresectable advanced squamous cell carcinoma of the esophagus: phase I/II trial results. *Oncotarget*. 2019 Jan 25;10(8):847-855. doi: 10.18632/oncotarget.26614. eCollection 2019 Jan 25.

11. Ojima T, Nakamura M, Nakamori M, Hayata K, Katsuda M, Maruoka S, Yamaue H. Robotic radical lymphadenectomy without touching the pancreas during gastrectomy for gastric cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Mar;98(13):e15091. doi: 10.1097/MD.00000000000015091.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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
ありません
6 . 研究組織

(1)研究分担者
ありません

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者
ありません
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。