

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07956

研究課題名(和文)胆道がんFFPE検体を用いたトランスクリプトーム解析による遺伝子診断

研究課題名(英文)Molecular classification of biliary cancer by transcriptome analysis of FFPE specimens

研究代表者

新井 康仁(Arai, Yasuhito)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：80222727

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)：胆道がんは、日本を始めアジアでの発症が比較的多い難治がんである。我々は以前の研究によって分子標的としてFGFR2融合遺伝子を同定している。本研究では、新しい分子診断系を確立する目的で、生検FFPE検体を用いてFISH法とRNAシーケンス解析によってFGFR2遺伝子の再構成を調べた。進行もしくは再発の日本人胆道がん患者445名を対象にした前向きスクリーニングを行い、23例をFGFR2遺伝子再構成陽性と判別した。FGFR2遺伝子再構成は、肝内胆管がんの7.4% (20/272)、肝門部胆管がんの3.6% (3/83)に見られ、65歳未満やHBV/HCV陽性症例に有意に多いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道がんは、日本を始めアジアでの発症が比較的多いものの予後不良な難治性の稀少がんであり、新たな治療法の開発が望まれている。我々は以前の研究によって胆道がんの新しい分子標的治療対象としてFGFR2融合遺伝子を同定している。本研究では、日常診療での生検FFPE検体を用いてFGFR2遺伝子の再構成をFISHとNGS解析による分子診断系を確立した。445名の進行/再発の日本人胆道がん患者を対象にした前向きスクリーニングを行い、FGFR2遺伝子再構成を同定して臨床試験に繋げることができた。

研究成果の概要(英文)：Biliary tract cancer (BTC) is an intractable tumor with poor prognosis, whose incidence and mortality rates are high in East Asia and have been rapidly increasing worldwide. FGFR2 rearrangement is expected to be a novel therapeutic target in advanced/recurrent BTC. Paraffin-embedded tumor samples from formalin-fixed surgical or biopsy specimens of patients with advanced/recurrent BTC were analyzed for positivity of FGFR2 rearrangement by fluorescent in situ hybridization (FISH) and RNA sequencing. A total of 445 patients were enrolled (PRELUDE study). Twenty-three patients (20 ICC and 3 PCC) were recognized as FGFR2 rearrangement positive. Younger age (<65 years), and HCV/HBV-positivity were significantly associated with the presence of FGFR2 rearrangement.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：胆道がん 分子標的 分子診断 トランスクリプトーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆道がん(胆管がん・胆のうがん・乳頭部がん)は、発症早期の臨床症状に乏しくかつ浸潤性が高いことから、多くの症例では進行期で発見されることになり、その予後は不良な難治がんである。胆管がんは日本を含む東アジアを中心に発生頻度が高いが、近年欧米を含めて全世界的に発生頻度が増加している。手術切除が唯一の根治治療であるが、再発率が高く、5年生存率は手術可能症例の15~25%である。難治性進行胆道がんに対して分子標的治療を含む新たな治療法開発とその診断が強く求められている。

申請者らは、これまでの研究によって胆道がん外科手術凍結検体を用いたDNA/RNAのシーケンス解析からFGFR2融合遺伝子を同定している。FGFR2融合遺伝子を導入したNIH3T3細胞は免疫不全マウスへの皮下移植によって造腫瘍性を示し、胆道がんにおける重要なドライバーがん遺伝子であることを明らかにしている(Arai et al., 2014, Nakamura et al., 2015)。このアンメットメディカルニーズの高い胆道がんに対してFGFR2融合遺伝子を分子標的対象とした新たな治療法の開発を進める上で、分子診断を確立して患者群の臨床病理学的特性を分析することが重要と考えられた。

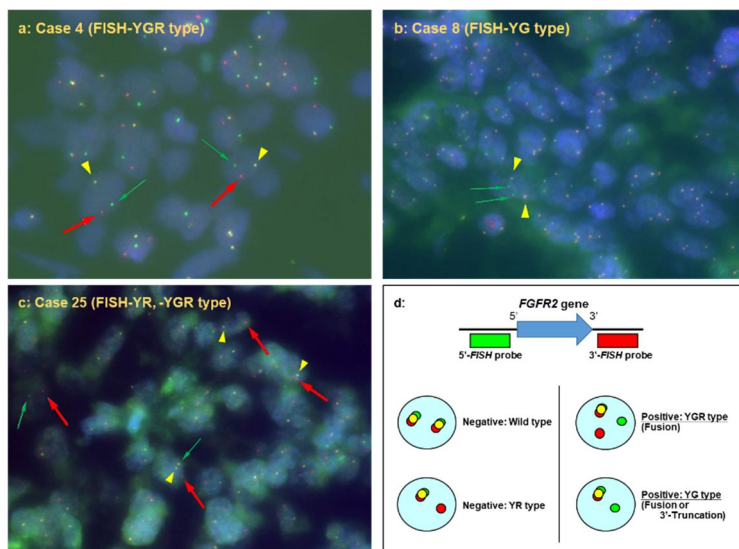
2. 研究の目的

前向き研究として診療で採取された微小な腫瘍組織のFFPE検体を用いてFISH解析やRNAシーケンス解析を行なって胆道がんにおけるFGFR2遺伝子再構成陽性の患者の臨床病理学的、分子生物学的特徴を明らかにする。胆道がんのFGFR2遺伝子再構成の分子診断を確立して、分子標的治療のための個別化診断と治験に結びつけることが目標である。

3. 研究の方法

a)-FFPE検体によるFISH解析と微量RNAシーケンス解析系の構築

診療時に採取したFFPE検体残余を用いたFISH解析と微量RNAシーケンス解析系の構築を行なった。FISH解析では、蛍光色素標識したBAC probeによるbreak-apart FISH解析を行なった。FGFR2遺伝子の5'側にSpectrum Green標識のRP11-78A18を用い、3'側にSpectrum Red標識のRP11-7P17を用いた。シグナルの重複や分離によってYGR(黄緑赤)のFISHシグナルを記録してFGFR2遺伝子再構成の様式をまとめた(図1)。

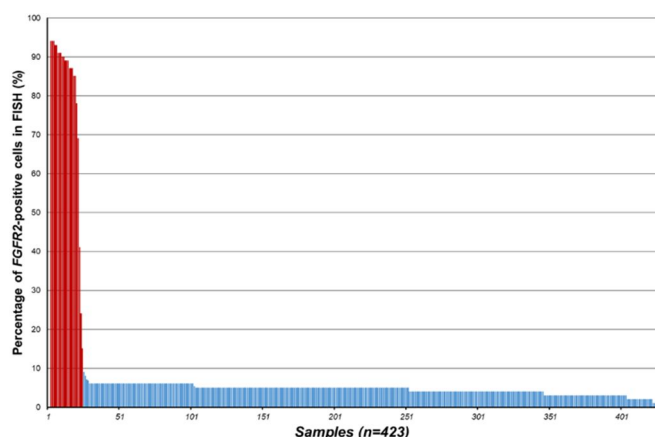


FFPE検体からの微量RNAシーケンスでは、ホルマリン固定標本より抽出したRNAは顕著に断片化されているので、1385遺伝子を対象とするTarget cDNA capture法を用いて遺伝子断片を濃縮して解析することとした。凍結腫瘍標本のある検体5例を選び、凍結標本とFFPEの両方からtotal RNA断片を抽出し、cDNA capture法を用いてRNAシーケンスを行ない、凍結標本とFFPEでの遺伝子発現データの相関が高いことを確認した。

b)-多施設共同前向き観察研究からのFFPE検体を用いた進行/再発胆道がんでの解析
多施設共同前向き観察研究(PRELUDE)に登録された症例の手術または生検のFFPE検体を用いてaの方法によってFISH解析とターゲットRNAシーケンス解析を行なった。

4. 研究成果

多施設共同前向き観察研究 (PRELUDE) に登録された症例の手術または生検の FFPE 検体を用いて FGFR2 融合遺伝子陽性胆道がんの前向きスクリーニングを行ない、FISH とターゲット RNA シークエンス解析による分子診断の検証と FGFR2 融合遺伝子陽性胆道がんの臨床病理学的特性の調査を行なった。



20 施設より進行または再発の日本人胆道がん患者 445 名が登録され、423 例において FISH 解析を行なった (図 2)。FISH 解析の成功率は生検検体で 97.5% (273/280)、外科手術検体で 100% (152/152)であり、ターゲット RNA シークエンス解析による検証も加えて 23 例を FGFR2 遺伝子再構成陽性と判定した (図 3)。FISH 陽性細胞率は 15-94%であった。

FGFR2 fusion gene	Rearrangement	Domain	Predicted structure
FGFR2-POC1B	translocation	CC	
FGFR2-PAWR	translocation	CC	
FGFR2-AHCL1	translocation	CC	
FGFR2-SHC1	translocation	PTB, SH2	
FGFR2-BICC1v1	inversion	SAM	
FGFR2-ZMYM4	translocation	ZF	
FGFR2-SLMAP	translocation	CC	
FGFR2-CCDC6	inversion*	CC	
FGFR2-BICC1v2	inversion	SAM	
FGFR2-BICC1v1	inversion	SAM	
FGFR2-TRIM55	translocation*	CC	
FGFR2-POC1B	translocation	CC	
FGFR2-SLMAP	translocation	CC	
FGFR2-SMARCC1	translocation*	CC	
FGFR2-AFF3	translocation	-	
FGFR2-HOOK1	translocation	CC	
FGFR2-BICC1v1	inversion	SAM	
FGFR2-SHROOM3	translocation	CC	
FGFR2-MYH9	translocation	CC	

これまで FGFR2 融合遺伝子は肝内胆管がんのみに見つけていたが、今回の研究によって FGFR2 遺伝子再構成は、日本人肝内胆管がんの 7.4% (20/272)、肝門部胆管がんの 3.6% (3/83)に同定された。更には 65 歳未満 (p=0.018) や HBV/HCV 陽性症例 (p=0.037) に有意に多いことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maruki Y, Morizane C, Arai Y, Ikeda M, Ueno M, Ioka T, Naganuma A, Furukawa M, Mizuno N, Uwagawa T, Takahara N, Kanai M, Asagi A, Shimizu S, Miyamoto A, Yukisawa S, Kadokura M, Kojima Y, Furuse J, Eguchi-Nakajima T, Sudo K, Kobayashi N, Hama N, Yamanaka T, Shibata T, Okusaka T.	4. 巻 56
2. 論文標題 Molecular detection and clinicopathological characteristics of advanced/recurrent biliary tract carcinomas harboring the FGFR2 rearrangements: a prospective observational study (PRELUDE Study)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 250-260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-020-01735-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida A, Arai Y, Hama N, Chikuta H, Bando Y, Nakano S, Kobayashi E, Shibahara J, Fukuhara H, Komiyama M, Watanabe SI, Tamura K, Kawai A, Shibata T.	4. 巻 76
2. 論文標題 Expanding the clinicopathologic and molecular spectrum of BCOR-associated sarcomas in adults.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 509-520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/his.14023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Umemoto K, Togashi Y, Arai Y, Nakamura H, Takahashi S, Tanegashima T, Kato M, Nishikawa T, Sugiyama D, Kojima M, Gotohda N, Kuwata T, Ikeda M, Shibata T, Nishikawa H.	4. 巻 32
2. 論文標題 The potential application of PD-1 blockade therapy for early-stage biliary tract cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 273-281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Goto T, Arai Y, Shibata T, Oyama T, Yoshida A.	4. 巻 476
2. 論文標題 Sarcoma with MGA-NUTM1 fusion in the lung: an emerging entity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 317-322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-019-02623-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida A, Arai Y, Tanzawa Y, Wakai S, Hama N, Kawai A, Shibata T.	4. 巻 75
2. 論文標題 KMT2A (MLL) fusions in aggressive sarcomas in young adults.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 508-516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.13926	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato M, Nakamura H, Nagai M, Kubo T, Elzawahry A, Totoki Y, Tanabe Y, Furukawa E, Miyamoto J, Sakamoto H, Matsumoto S, Sunami K, Arai Y, Suzuki Y, Yoshida T, Tsuchihara K, Tamura K, Yamamoto N, Ichikawa H, Kohno T and Shibata T	4. 巻 10
2. 論文標題 A computational tool to detect DNA alterations tailored to formalin-fixed paraffin-embedded samples in cancer clinical sequencing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Medicine	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13073-018-0547-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Natsuko Hama, Yasushi Totoki, Fumihito Miura, Kenji Tatsuno, Mihoko Saito-Adachi, Hiromi Nakamura, Yasuhito Arai, Fumie Hosoda, Tomoko Urushidate, Shoko Ohashi, Wakako Mukai, Nobuyoshi Hiraoka, Hiroyuki Aburatani, Takashi Ito and Tatsuhiro Shibata	4. 巻 9
2. 論文標題 Epigenetic landscape influences the liver cancer genome architecture	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-03999-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 M. Ikeda, Y. Maruki, M. Ueno, T. Ioka, A. Naganuma, M. Furukawa, N. Mizuno, T. Uwagawa, Y. Nakai, M. Kanai, A. Asagi, S. Shimizu, A. Miyamoto, S. Yukisawa, M. Kadokura, T. Yamanaka, Y. Arai, T. Shibata, C. Morizane, T. Okusaka.
2. 発表標題 Frequency and clinicopathological characteristics of biliary tract carcinomas harboring the FGFR2-fusion gene: a prospective observational study (PRELUDE study).
3. 学会等名 ESMO (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井康仁、吉田朗彦、濱 奈津子、向 和加子、知久田大史、十時 泰、小倉浩一、小林英介、元井 亨、川井 章、平岡伸介、柴田龍弘
2. 発表標題 肉腫におけるCIC遺伝子再構成の分子遺伝学的解析
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------