

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17202

研究課題名(和文)食道癌のCRT後再発の遺伝的機序解明とパネルによるctDNA評価法の実装性の検討

研究課題名(英文)Elucidation of the genetic mechanisms of post-CRT recurrence of esophageal cancer and the implementability of panel-based ctDNA evaluation.

研究代表者

本村 有史(MOTOMURA, YUSHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00826365

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):食道扁平上皮癌の化学放射線治療抵抗性をもたらす遺伝子異常を、サブクローンを含めて包括的評価すべくリキッドバイオプシーにおける循環腫瘍DNAを用いた評価の前検討として。感受性群特異的変異遺伝子(EP300など)と抵抗性群特異的変異遺伝子(NOTCH1等)を同定し、さらに食道癌CRT後の再発ではMYCの増幅がfounderイベントであることを報告した(Hirata H, Motomura Y. et al. Cancer Res, 2021) また免疫微小環境に着目し、感受性群と非感受性群でのRNA-seq解析では治療抵抗性群で免疫チェックポイントや免疫疲弊に関わる遺伝子の発現変動を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切除不能食道癌に対して、化学放射線治療は確立された治療ではあるものの再発する症例も多く、未だに予後不良である。今回の食道癌の遺伝子解析の結果、MYC遺伝子の遺伝子増幅が治療抵抗性につながる原因として明らかになった。RNA発現解析では、免疫チェックポイント関連遺伝子の遺伝子発現レベルによって、治療の効果が分かれる可能性が示され、免疫チェックポイント阻害薬など、免疫を標的とした治療の有効性について検討する一助となり得る。

研究成果の概要(英文):As a preliminary study for evaluation using circulating tumor DNA in liquid biopsy for comprehensive evaluation of genetic abnormalities causing resistance to chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma, including treatment-resistant subclones. We identified mutated genes specific for treatment sensitivity (e.g., EP300) and resistance (e.g., NOTCH1), and reported that amplification of MYC is a founder event in recurrence after CRT for esophageal cancer (Hirata H, Motomura Y. et al. Cancer Res, 2021). In addition, focusing on the immune microenvironment, RNA-seq analysis between the sensitive and insensitive groups showed that the expression of genes related to immune checkpoints and immune exhaustion varied.

研究分野：放射線治療

キーワード：化学放射線治療 抵抗性特異的癌遺伝子変異 リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌に対する化学放射線療法(CRT)は標準治療であるが、予後は不良で再発も多い。再発を予測する確立されたバイオマーカーはなく、治療の個別化や再発リスクに応じた治療戦略の検討も困難である。

癌の複雑な病態・治療抵抗性の原因として、一腫瘍内の遺伝子異常の不均一な分布「腫瘍内不均一性(intra-tumor heterogeneity)」が注目され、次世代シーケンサーによる包括的遺伝子解析技術の進歩に伴い、「ゲノムレベルにも腫瘍内不均一性が存在する」ことがマルチサンプリングした腫瘍の解析で明らかとなり(Yachida et al. *Nature* 2010)、複数の癌種でも確認された。癌が進展する過程で遺伝子異常を蓄積しながら生存に有利なクローンが選択されて生き残り、多様性を獲得するという「癌のクローン進化」が明らかにされ、「治療」に対しても癌は多様性を以て変化自在に対応し、治療後に生き残った耐性クローンが引き金となって、再発・再増大に至ると考えられてきた(Faltas B. M. et al. *Nat Genet* 2016)。グリオーマ術後化学療法(Johnson et al. *Science* 2014)や、食道腺癌術前化学療法 (Murugaesu et al. *Cancer Discov* 2015)では時系列(化学療法前・後)で腫瘍内不均一性の変遷を解析し、再発のドライバーとなる治療耐性クローンの特徴・創出機構が報告されている。

我々はこれまでに進行大腸癌の原発巣内における遺伝子変異の多様性を明らかにしており、食道癌でも腫瘍内の遺伝的多様性が治療抵抗性の要因として考えた。しかし通常の生検は腫瘍の部分的な評価に過ぎず、少ないサブクローンは物理的に評価困難である。他方、癌細胞から血中に漏出する循環腫瘍 DNA を用いる手法は低侵襲な診断手法としての臨床応用が期待されており、理論的には腫瘍の包括的な評価も可能となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では食道扁平上皮癌の CRT 後再発例において、治療前/再発後のマルチサンプリングの腫瘍遺伝子解析を検討し、CRT により濃縮された変異遺伝子を抽出し癌パネルを作成、経時的に採取した血漿検体において、このパネル実装性の検討と再発関連遺伝子の同定を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)CRT の抵抗性遺伝子の候補として ctDNA において検索対象とする遺伝子変異の絞り込みを行うため全エクソーム解析の検討を行った。手術不能食道がん 29 例を 1 年以内の再発例 15 例を非感受性群、非再発例 14 例を感受性群として遺伝子解析(再発前後でのマルチサンプリング全エクソーム解析)を行い、感受性/非感受性群および再発前/後での遺伝子変異を検索した。

(2) (1)の結果から、MYC はがん免疫微小環境のマスターレギュレーターとしての役割も注目されており、今回検出標的遺伝子についての更なる検討のため、RNA-seq 解析の検討を行った。

4. 研究成果

(1)再発症例において NOTCH1 など 4 つの変異遺伝子が再発時に新たに同定されたが、個々の症例に特異的なものであった。治療感受性/非感受性群の検討において MYC の増幅のみが founder イベントとなっており、in vitro の検討でも放射線抵抗性につながることを報告した (図 1, Hirata H, Motomura Y. et al. *Cancer Res*, 2021)

再発時に症例間で共通してみられる新たな変異遺伝子が検出されなかったこと、また今回検出された治療抵抗性因子である MYC 遺伝子の増幅については、治療前の生検検体においても既に検出されており、治療抵抗性のサブクローンが治療後に濃縮されるという当初の想定とは異なる結果であった。このため再発関連因子の検出目的としては当初勘案していた、血漿検体を用いて治療抵

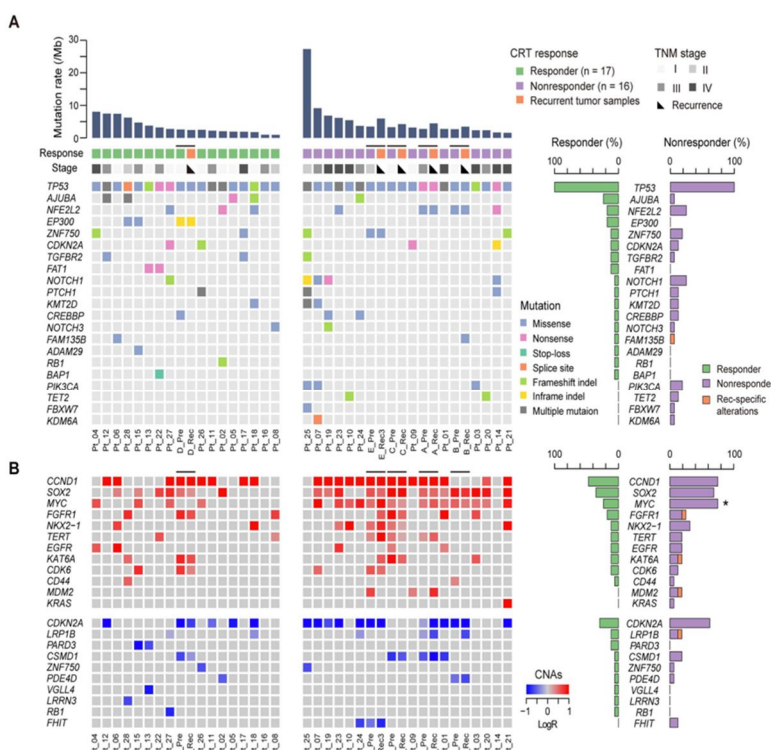


図 1

抗性サブクローンを検出する方針は最適ではないと判断した。今後化学放射線治療の感受性予測や新たな治療標的検出に向けたアプローチを検討予定である。

(2)

感受性群と非感受性群で遺伝子発現差異解析を行い、治療感受性群で免疫関連の遺伝子として CTLA4 および LAG3 が優位に高発現であった (図 2) いずれも免疫応答を負に調整する受容体であるため、その高発現がどのような機序で治療感受性に関連するのかが今後の検討課題であり、より症例数を増やした検討や single-cell RNA-seq 等による研究を進めていく予定である。

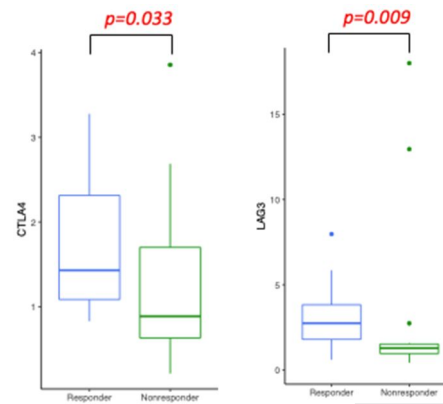


図 2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hirata Hidenari, Motomura Yushi, Mimori Koshi	4. 巻 81
2. 論文標題 The Evolving Genomic Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Under Chemoradiotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4926 ~ 4938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-21-0653	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10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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------