

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07664

研究課題名(和文)食道癌マルチオミクスデータを用いた術前化学療法耐性機序の解明

研究課題名(英文)Overcoming the drug resistance through multi-omics analysis in esophageal cancer

研究代表者

川久保 博文(KAWAKUBO, Hirofumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：20286496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌に対する薬物療法耐性機序の解明を目的とした。食道癌臨床検体を収集し、臨床病理学的因子に加えて、マルチオミクス解析を用いた。また、食道扁平上皮癌細胞株を用いて、現在の食道扁平上皮癌の標準治療であるドセタキセル、シスプラチン、5-FU療法を併用したDCF療法に対する耐性株を樹立することに成功した。炎症凝固指標の1つである血中フィブリノゲン値に着目し、その予後予測因子としての有用性を検証し報告した。さらに、血中フィブリノゲンのが、腫瘍における免疫微小環境に関与していることを明らかにし、血中フィブリノゲン高値群においては、原発巣に腫瘍関連マクロファージが多く集まっていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道扁平上皮癌は、本邦の食道癌の90%程度を占める組織型であり、化学療法の奏効が予後に直結する。その機序解明を目的とした本研究において、最新の併用レジメンへの薬剤耐性株の樹立は、今後の治療開発に有用と考えている。さらに、これまで予後不良因子として報告されてきたフィブリノゲン値と、原発巣における免疫抑制性微小環境の関連の解明は、免疫チェックポイント阻害薬が治療の中心的な役割を果たす食道癌治療の成績向上に寄与すると考えている。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the drug resistance mechanism in esophageal squamous cell carcinoma through multi-omics analysis. Using esophageal cancer cell line, we established drug resistance clone against chemotherapeutic drugs which are used in Japan as a standard treatment. Focusing on coagulation marker plasma fibrinogen, we validated its prognostic impact in esophageal cancer patients. Furthermore, based on the RNA sequence and immunogram, we identified that, in patient with increased plasma fibrinogen level, the immunosuppressive tumor microenvironment existed with accumulation of tumor associated macrophages.

研究分野：食道癌における集学的治療

キーワード：食道癌 薬剤耐性 炎症凝固

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食道癌に対しては、術前化学療法[シスプラチン+5FU(CF療法)]と手術を併用した集学的治療の開発が進み治療成績は向上している(Ando N et al. Ann Surg Oncol. 1;68-74,2012)。本研究申請当初、申請者らは Japan clinical oncology group (JCOG)においてCF療法にドセタキセル療法を加えたDCF療法の有効性を検証するためのランダム化第3相試験(JCOG1109)を行っていた(Nakamura K et al. Jpn J Clin Oncol.7:752-755,2013)。DCF療法は奏効率がCF療法と比較して高いことが想定され、さらに申請者は自施設の後ろ向き研究において、術前化学療法の奏効が予後規定因子であることを明らかにしており、術前化学療法の奏効率向上が臨床的に大変重要であることと考えていた。

申請者はこれまで、食道癌治療の主要薬剤であるシスプラチンとフルオロウラシル(5-FU)に対する薬剤耐性遺伝子変異を明らかにするため、遺伝子変異を無作為に惹起するトランスポゾンシステムを用いて、耐性遺伝子を明らかにしてきた。(Tsutsui M, Kawakubo H, et al. Int J Oncol 2015 47:867-874, Takesue T, Kawakubo H, et al. Oncol Lett 2017 14:4220-24)そして最近、新たに THUMPD2 遺伝子に変異が生じた細胞株においてシスプラチン耐性が生じ、さらに耐性株についてその RNA 発現が低下していることを確認していた状況であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者がすでに報告した JAK2、THUMPD2 の食道癌術前化学療法不応群における検証ならびに、臨床検体を用いたマルチオミックス解析によるあらたな原因遺伝子の同定であった。

さらに、JCOG1109 によって検証されていた、DCF療法耐性株を樹立し、既存の1200薬剤を用いたドラッグスクリーニングシステムを用いて、「治療抵抗性食道癌の新規治療開発」を行うことを目的としていた。

### 3. 研究の方法

#### 目的(1)-1. 耐性株から同定した薬剤耐性遺伝子の臨床検体における検証

慶應義塾大学病院に対して術前化学療法後に手術を施行された食道癌検体の術前化学療法前と治療後検体を対象に whole exome シーケンスを行うことを計画した。治療後遺残腫瘍は薬物療法耐性形質を有していると考えているため、同検体において、耐性株において変異を有していた DNA 変異が存在しているかを検証予定とした。遺残腫瘍において THUMPD2 を中心とした候補遺伝子の発現低下の有無も検証し、その後は、shRNA を用いた発現抑制、ならびに機序の解明を進める予定とした。

#### 目的(1)-2. ドラッグスクリーニングシステムを用いた新規治療薬剤の同定

申請者が過去に作成したシスプラチンやフルオロウラシルに加えて新規治療となる DCF療法耐性株をあらたに作成し、慶應義塾大学病院臨床研究推進センターロボットスクリーニングラボが有する High throughput drug screening を用いて、市販の1200薬剤から奏効薬を特定することを計画した。同薬剤は、すでに他疾患に対して安全性が証明されて市販されているものであり、ドラグリポジショニングにより速やかに新規治療開発につなげることができると考えていた。さらには、共通の機序を有する薬剤が選出された場合には、同薬剤によって阻害されているシグナル等が耐性克服に寄与している可能性があるため、機序の解明にもつなげることができると想定した。

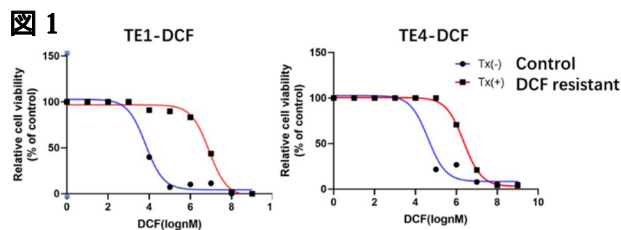
#### 目的(2). マルチオミックス解析を用いた網羅的アプローチによる薬剤耐性機序の解明

申請者が所属する慶應義塾大学医学部においては、2018年より全固形癌患者を対象として遺伝子パネル検査を行っており(倫理委員会承認番号:20180015、課題名:次世代統合的病理・遺伝子診断システムの開発「網羅的遺伝子解析と形態学的病理診断を同時並行して実施し、次世代型の統合的ながんの診断システムを開発する研究」)、さらに、共同研究者の松田諭は、慶應義塾大学医学部腫瘍センターゲノムユニット西原研究室と共同で食道癌の術前化学療法前後の検体の RNA シーケンスを「腫瘍微小環境における細胞老化を介した食道癌に対する集学的治療抵抗性機序の解明(2019年研究活動スタート支援)」において解析を開始していたことから、これらから得られる DNA 変異、RNA 発現データを使用することにより、網羅的アプローチを介した薬物療法耐性遺伝子を同定することができると考えた。臨床検体からのアプローチと、薬物療法耐性細胞株を用いたアプローチの結果を統合解析することにより、食道癌に対する術前化学療法抵抗性機序を明らかにすることを予定した。

### 4. 研究成果

食道扁平上皮癌細胞株に対して、DCF 療法を間欠的に継続し耐性株を樹立した。さらに、既

存の薬剤1200種類を含むパネルのうち900化合物を2種類のDCF耐性株に対して、DCFとあわせてスクリーニングを行った結果、**44種類の薬剤が細胞株横断的に効果を示したことを確認した**(図2)。その中には、内服薬としての処方頻度が高い、循環器系薬剤なども含まれており、同一の作用機序を示す薬剤が、複数同定されているサブグループが存在



する結果を得た。

あわせて、過去に慶應義塾大学病院において、術前化学療法後に、手術を施行した食道扁平上皮癌に対して、**160遺伝子を対象とした遺伝子パネル検査である、PleSSisionの結果を得た**。結果として、奏効例と非奏効例において、明らかなGenetic alterationの差異は認められなかった。(図3)

図2

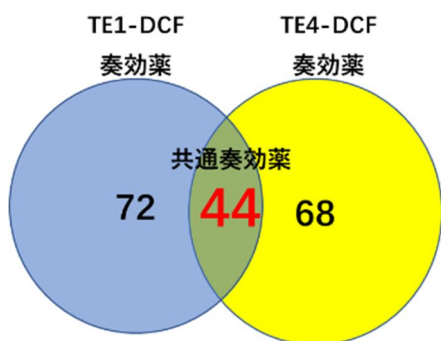
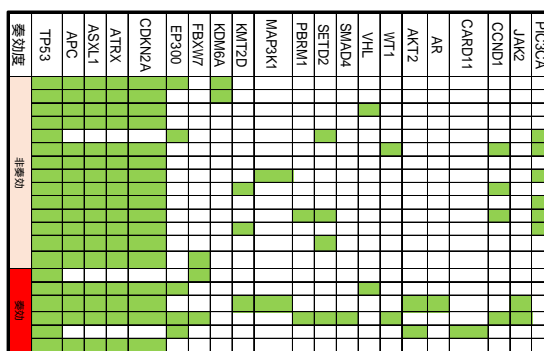


図3



本研究の過程において、研究分担者 松田諭 と協同し、炎症凝固指標の1つである血中フィブリノゲン値に着目し、その予後予測因子としての有用性を検証し報告した。さらに、血中フィブリノゲンのが、腫瘍における免疫微小環境に関与していることを明らかにし、血中フィブリノゲン高値群においては、原発巣に腫瘍関連マクロファージが多く集まっていることを示した。さらに、同群においては、免疫チェックポイント阻害薬に抵抗性であり、生存成績が不良であることを報告した。

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 Hoshino Shota, Matsuda Satoru, Kawakubo Hirofumi, Yamaguchi Shigeo, Nakamura Kohei, Aimoto Eriko, Matsui Kazuaki, Irino Tomoyuki, Fukuda Kazumasa, Nakamura Rieko, Okita Hajime, Nishihara Hiroshi, Takeuchi Hiroya, Kitagawa Yuko	4. 巻 29
2. 論文標題 Elevation of the Prognostic Factor Plasma Fibrinogen Reflects the Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 6894 ~ 6904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-022-11974-7	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0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
研究分担者	松田 諭  (MATSUDA Satoru)  (30594725)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教   (32612)	

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