

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08032

研究課題名(和文)放射線治療時の抗腫瘍免疫感受性を決定する遺伝子変異同定とリキッドバイオプシー開発

研究課題名(英文) Prediction of radiotherapy/immunotherapy treatment outcome of cervical cancer by liquid biopsy

研究代表者

吉本 由哉 (Yoshimoto, Yuya)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・准教授

研究者番号：80594390

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)：本研究の目的は、放射線治療抵抗メカニズムの解明と治療耐性群の同定法開発である。子宮頸癌根治的放射線治療症例における網羅的遺伝子解析を行ったところ、FGFR遺伝子変異が治療耐性・予後不良に関連していることを見出した。他コホートでの検証の結果、FGFR変異に加えてFGFRの一塩基多型が治療耐性・予後不良に関連していることが示された。実臨床への応用を目指し、ddPCR法での変異検出を行った。FGFRの一塩基多型および、子宮頸癌で比較的高頻度に認められるPIK3CAのE542K変異、E545K変異を、前向きに集積した患者の血液から抽出したcfDNAより検出した。これらの変異は血液から同定可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸癌は若年女性における主要な死因の一つである。標準治療は放射線治療であり、特に進行期は全例で放射線治療が行われる。そのため、放射線治療効果予測や再発予測のためのバイオマーカーが有用である。また、再発子宮頸癌に対する化学療法奏効率は低く、有効な分子標的の探索も必要である。子宮頸癌においてはこのような因子の研究が進んでおらず、治療耐性・予後不良に関連する遺伝子変異を見いだした本研究は非常に有意義と考えられる。本研究成果をもとに、再発予測のための血中cfDNAからの変異遺伝子測定、再発例に対するFGFR阻害剤による治療などが行われる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the mechanisms of radiotherapy resistance and to develop a method for identifying treatment-resistant groups. We performed a comprehensive genetic analysis of patients undergoing definitive radiotherapy for cervical cancer and found that FGFR mutations were associated with treatment resistance and poor prognosis. Validation in other cohorts showed that single nucleotide polymorphisms of FGFR in addition to FGFR mutations were involved in treatment resistance and poor prognosis. For clinical application, we used ddPCR to detect single nucleotide polymorphisms of FGFR and E542K and E545K mutations of PIK3CA, which are relatively frequent in cervical cancer, in cfDNA extracted from blood samples of prospectively collected patients. These mutations were identifiable from blood.

研究分野：放射線医学

キーワード：子宮頸癌 抗腫瘍免疫 放射線治療抵抗性 網羅的遺伝子解析 リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

放射線治療の効果が宿主の免疫に関係している可能性は古くより考えられていたが、そのことを直接明らかにするような研究は 2000 年代後半まで非常に少なかった。我々は、放射線治療によるがん特異的免疫の活性化を証明する研究を行い、抗腫瘍免疫が、がんの進展を制御する重要な因子であることを、臨床及び動物モデルを用いて示してきた。我々の研究結果は、放射線が DNA 障害による細胞死をメカニズムとした局所治療であるという従来の考えを覆し、新しい治療戦略の可能性を示しており、今後、放射線により誘導される免疫を積極的に利用する“免疫放射線療法”が確立される可能性がある。

子宮頸癌は若年女性の死因として重要な疾患であり、放射線治療の良い適応である。子宮頸癌患者の生検検体を用いた検討より、腫瘍浸潤リンパ球が多い症例ほど予後が良いこと、放射線治療開始によりリンパ球浸潤が増えることなど、この疾患においても抗腫瘍免疫とその放射線治療による活性化が重要な役割を持つと考えられる。一方で抗腫瘍免疫をコントロールする可能性のあるドライバー変異などは子宮頸癌において知られておらず、これを解明することで子宮頸癌の治療成績の向上、新たな治療法の開発が可能と考えられた。

2. 研究の目的

我々は以前、子宮頸癌の子宮頸癌根治的放射線治療症例における網羅的遺伝子解析を行い、日本人子宮頸癌患者における遺伝子変異プロファイルを明らかにした。また、*FGFR1-4* 遺伝子 (*FGFRs*) 変異が治療耐性・予後不良に関与していることを新たに見出した。

ドライバー変異とは、癌細胞の生存に重要な役割を果たす癌遺伝子または癌抑制遺伝子の変異をいい、良い予後予測マーカー、再発マーカー、治療標的となる可能性がある。子宮頸癌においては頻度の高いドライバー変異が同定されておらず、疾患に対する治療法開発の遅れをもたらしている。そこで変異部位や病原性を含むより詳細な検討をおこなうことでドライバー変異の同定を行い、同定した変異をリキッドバイオプシーで検出する系を確立することを本研究の目的とした。また同時に、*FGFRs* 変異が放射線治療不良予後と相関することを検証した。

3. 研究の方法

子宮頸癌患者 67 症例の腫瘍における体細胞変異を同定し、ドライバー変異を推定する変異解析、及び推定したドライバー変異を、子宮頸癌患者 11 症例において、腫瘍で検出された変異が血液から抽出した cfDNA から検出できることの実証を行った。

2013 年 12 月から 2017 年 7 月までに群馬大学医学部附属病院で根治的放射線治療を受けた Stage IB から IVA 期の患者で、治療前凍結腫瘍組織および正常 DNA のための血液が保管されている患者 67 名を対象とした。腫瘍および正常 DNA を抽出し、マルチプレックス PCR、次世代シーケンシング、データベース照合によるターゲットシーケンスを行った。対象は、子宮頸癌で高頻度に変異を認められた 41 遺伝子について独自パネルを作成し、体細胞変異を同定した。

今回用いた独自パネル、及びシーケンシングの詳細を述べる。以前行った研究では、がん関連 409 遺伝子のほぼ全長を対象とした、市販パネル Ion Ampliseq Comprehensive Cancer Panel を用いて、FFPE から抽出した DNA より変異検出を行った。この研究では対照となる正常 DNA はなく、一塩基多型などは、データベースとの照合、アレル頻度を目視で確認することなどで取り除き、腫瘍における体細胞変異を推定した。本研究では、前回のがん関連 409 遺伝子は、子宮頸癌においては変異頻度数%未滿、またはまったく検出されないものも多いため、全てを検査することは非効率と考え、高頻度または治療標的となる可能性のある遺伝子を中心に、図 1. に示す 41 遺伝子を選定した。本研究では凍結組織から DNA を抽出しておりホルマリンによる断片化がないこと、個々人の正常 DNA との比較で多型を取り除けること、41 遺伝子に絞ったシーケンシングでリード数が多いことより、体細胞変異の同定の精度は相当に高いと考えられた。

FGFR におけるドライバー変異は *FGFR3* の Gain of function 型変異 R248C、S249C などが知られているが、子宮頸癌における頻度は我々の研究で 2%、諸家の報告でも同程度のため、他の一塩基多型などが予後に関与している可能性を考慮し、体細胞変異に加えて、多型のうち Pathogenic かつ Pubmed で不良予後との相関が報告されているものを変異陽性として同定した。*FGFR4* の G388R については変異型のホモ接合が発がんに関連するとの報告があり、これを陽性とした。

リキッドバイオプシーの検討では、2018 年 10 月から 2019 年 3 月までに群馬大学医学部附属病院で根治的放射線治療を受けた患者 11 名を対象とした。凍結腫瘍組織由来 DNA、血液由来正常 DNA、治療前、開始 3 週間 (治療中)、開始 3 ヶ月 (治療後) の血清より抽出した DNA (cfDNA) より、PIK3CA の p.Glu542Lys (c.1624G>A)、及び p.Glu545Lys (c.1633G>A) に特異的なプライマーセットを用いたドロップレットデジタル PCR (ddPCR) で変異を検出した。

図 1. 変異検出に用いた独自パネル

	<i>AKT1</i>	<i>ALK</i>	<i>APC</i>	<i>ARID1A</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BTK</i>	<i>CASP8</i>	<i>CCND1</i>	<i>CDKN2A</i>
<i>CREBBP</i>	<i>EP300</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERBB2</i>	<i>ERBB3</i>	<i>FBXW7</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>FGFR3</i>	<i>FGFR4</i>	<i>IGF2R</i>
<i>KIT</i>	<i>KRAS</i>	<i>MAPK1</i>	<i>MLH1</i>	<i>MSH2</i>	<i>MSH6</i>	<i>NF1</i>	<i>NFE2L2</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PIK3R1</i>
<i>PMS2</i>	<i>PTEN</i>	<i>RB1</i>	<i>SHKBP1</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SYNE1</i>	<i>TGFR2</i>	<i>TP53</i>	<i>TP63</i>		

4. 研究成果

FGFRs 変異が子宮頸癌放射線治療予後と相関するかの検証を、X 線による根治的放射線治療患者 59 名で行った。FGFR3R655L を 1 例、FGFR3R248C を 1 例、FGFR3S249C を 2 例、FGFR4G388R ホモ接合を 6 例に認め、これら 10 例を FGFRs 変異陽性とした。臨床病理学的な特徴に明らかな差は認めなかった。無増悪生存割合は FGFRs 変異陽性群で有意に不良であり、5 年無増悪生存割合は野生型 75.5% に対して変異陽性群で 50.0% ($P=0.020$) であった。他の既知の予後不良因子との多変量解析を行ったところ、FGFRs 変異陽性は独立した予後不良因子であった。

体細胞変異は全 67 例中、*PIK3CA* (37.3%)、*FBXW7* (16.4%)、*EP300* (11.9%)、*ARID1A* (8.9%)、*NOTCH1* (8.9%)、*RB1* (8.5%)、*FGFR3* (5.9%)、*KRAS* (5.9%)、*TP53* (3.4%) などに体細胞変異を認めた。これらのうち病的バリエーションまたはその可能性が報告されており、かつ、複数の症例で認めたのは、*PIK3CA* における E542K 変異 (8 例)、E545K 変異 (6 例)、H1047R 変異 (2 例)、*FBXW7* における R479G 変異 (2 例)、R505G 変異 (2 例)、*EP300* における D1399N 変異 (4 例)、*FGFR3* における S249C 変異 (2 例)、*KRAS* における G12D 変異 (2 例) であった。

各症例における病的変異の存在を確認したところ、癌抑制遺伝子間の病的変異に相互排他性が成り立っていること、*KRAS* や *ERBB2* など一部の癌遺伝子にやはり相互排他性が成り立っていることを見いだした。*PIK3CA* についても、他の癌遺伝子病的変異を伴わない症例を認めた。ある遺伝子変異を単独で認めた場合、ドライバー変異の可能性が高いと考えられる。

廉価かつ簡便にドライバー変異を同定する方法の確立を目的に、ddPCR による変異の検出を行った。対象は *PIK3CA* における E542K 及び E545K 変異とした。11 症例の腫瘍組織より、E542K 変異 (1 症例)、E542K 及び E545K の共在 (1 症例)、E545K 変異 (3 症例) を同定した。対応する治療前 cfDNA より、E542K 変異 (2 例中 2 例)、E545K 変異 (4 例中 2 例) が検出された。cfDNA が検出された症例ではいずれも、治療中、治療後で変異率の減少または消失を認めた。以上のように、子宮頸癌におけるドライバー変異を、リキッドバイオプシーにより同定するための基礎的データを得た。

同定されたドライバー変異は分子標的治療薬などによる治療対象となる可能性があり、子宮頸癌においては新規の知見である。また、ドライバー変異のリキッドバイオプシーにより、血液から腫瘍における変異遺伝子を推定できる可能性、再発モニタリングや予後予測が行える可能性を示した。これらの成果は臨床応用可能な有意義なものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshimoto Yuya, Sasaki Yasushi, Murata Kazutoshi, Noda Shin-ei, Miyasaka Yuhei, Hamamoto Junko, Furuya Mio, Hirato Junko, Suzuki Yoshiyuki, Ohno Tatsuya, Tokino Takashi, Oike Takahiro, Nakano Takashi	4. 巻 159
2. 論文標題 Mutation profiling of uterine cervical cancer patients treated with definitive radiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 546 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygyno.2020.08.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ota Norichika, Yoshimoto Yuya, Darwis Narisa Dewi Maulany, Sato Hiro, Ando Ken, Oike Takahiro, Ohno Tatsuya	4. 巻 40
2. 論文標題 High tumor mutational burden predicts worse prognosis for cervical cancer treated with radiotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 534 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11604-021-01230-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oike Tae, Sekiguchi Yoshihito, Yoshimoto Yuya, Oike Takahiro, Ando Ken, Gu Wenchao, Sasaki Yasushi, Tokino Takashi, Iwase Akira, Ohno Tatsuya	4. 巻 23
2. 論文標題 Mutation Analysis of Radioresistant Early-Stage Cervical Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 51 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 IMAMURA AYAKA, OIKE TAKAHIRO, SATO HIRO, YOSHIMOTO YUYA, ANDO KEN, OHNO TATSUYA	4. 巻 42
2. 論文標題 Comparative Analysis of the Antitumor Immune Profiles of Paired Radiotherapy-naive and Radiotherapy-treated Cervical Cancer Tissues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3341 ~ 3348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.15821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉本由哉、尾池貴洋、佐々木泰史、村田和俊、宮坂勇平、野田真永、大野達也、時野隆至、鈴木義行、中野隆史
2. 発表標題 がん関連遺伝子ターゲットシークエンスによる子宮頸癌放射線治療感受性因子の探索
3. 学会等名 第58回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本由哉、佐々木泰史、尾池貴洋、安藤謙、濱本純子、鈴木義行、中野隆史、時野隆至、大野達也
2. 発表標題 FGF受容体ファミリーの変異が子宮頸癌放射線治療予後に及ぼす影響
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第35回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉本由哉、佐々木泰史、尾池貴洋、安藤謙、濱本純子、鈴木義行、中野隆史、時野隆至、大野達也
2. 発表標題 FGF受容体ファミリーの変異が子宮頸癌放射線治療予後に及ぼす影響
3. 学会等名 第35回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉本由哉、尾池貴洋、安藤謙、鈴木義行、大野達也
2. 発表標題 子宮頸癌におけるドライバー変異の同定と、簡便なリキッドバイオプシー開発のための基礎的検討
3. 学会等名 第60回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2023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
研究分担者	尾池 貴洋 (Oike Takahiro) (10643471)	群馬大学・医学部附属病院・講師 (12301)	
研究分担者	田巻 倫明 (Tamaki Tomoaki) (20400749)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究分担者	鈴木 義行 (Suzuki Yoshiyuki) (60334116)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究分担者	三村 耕作 (Mimura Kousaku) (90568031)	福島県立医科大学・医学部・准教授 (21601)	

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