

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21229015

研究課題名(和文)高精度の分子遺伝学的評価による食道癌治療成績向上のための包括的研究

研究課題名(英文) Comprehensive Analysis for Improvement of the Therapeutic Outcome against Esophageal Cancer by the High-Precision Molecular and Genetic Evaluation

研究代表者

森 正樹 (Mori, Masaki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70190999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 166,300,000円、(間接経費) 49,890,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌144例のエキソームシーケンスを実施し、SNPアレイおよび環境因子との三位一体解析を実施した。その結果、症例間においてアミノ酸置換を伴う突然変異が認められ、飲酒・喫煙消費量のみならず、ALDH2とCYP2A6遺伝子多型とも有意に相関した。またTP53、NOTCH1、MLL2などの突然変異を認めた。最終的にシグナル活性経路上において様々なゲノム変異、たとえば細胞周期、エピゲノム制御因子、NOTCH、PI3K経路等が散在していた。今回の包括的解析により新たな分子標的治療を含めた食道癌治療の方向性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To obtain a landscape of genomic alterations in ESCC, we performed whole-exome sequencing on 144 paired DNA samples from Japanese cohort, combined with SNP-array based CN profiling. Substitution patterns of single-nucleotide mutations substantially vary among cases, and the variation was significantly associated with not only alcohol and tobacco consumption, but also related genetic factors: ALDH2 and CYP2A6 polymorphisms. We also identified TP53, NOTCH1, MLL2, NFE2L2, etc. as significantly mutated genes. Moreover, TET2 and NFE2L2 mutations contribute to the malignancy by upregulating invasiveness and oxidoreductase activity, respectively. Finally, our pathway-level analysis shows that genomic alteration are dispersed across cancer-associated pathways including cell cycle, epigenetic regulators, NOTCH, RTK-PI3K pathways etc. Collectively, this study contributes to understanding of ESCC pathophysiology and provides a new basis for designing novel therapeutic strategies.

研究分野：食道学会専門医として外科的治療(手術、化学療法)に精通。専門研究分野は病理学および分子生物学である。

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道扁平上皮癌 エキソーム解析 CYP2A6 ALDH2 pathway解析 コピー数解析

1. 研究開始当初の背景

食道進行癌は治療抵抗性で予後不良である。治療成績向上のためには食道癌の発生、進展および治療感受性に関わる因子を総合的かつ俯瞰的に明らかにすることが重要である。食道癌治療成績の向上を具現化するため、平成 17 年度から基盤研究(S)(以下、前基盤(S)と略称)の助成を頂き、「宿主(遺伝子多型:P)」、「疫学環境(E)」、「腫瘍(T)」を統合した三位一体研究を開始した。研究は極めて順調に進行し、期待通りの成果が得られつつある。前回の研究で食道癌に最も強い相関を示す遺伝子多型領域について明らかにした。すなわち食道癌患者 1071 名、また 2762 名のコントロールの遺伝子多型解析、生活習慣アンケート解析を行い、飲酒と喫煙は食道癌発症関与し、交互作用を有する;飲酒・喫煙・ADH1B・ALDH2 全てにおいて危険がある場合、一つも無い場合に比べて 357 倍食道癌に罹患しやすいことを明らかにした。(GUT 2010)。

しかし、この前基盤(S)研究を開始した時点と現時点では解析精度に於いて格段の差が生じた。例えば、平成 17 年度には遺伝子多型については数十個レベルの解析を予定し実行していたが、その後の技術発展により数十万個以上の網羅的解析が可能となった。そこで、三位一体解析についても前基盤(S)研究に引き続き本提案を行うこととした。

2. 研究の目的

1) 食道癌のアレイ CGH、発現遺伝子アレイの結果についてスパコンによる統合解析によりゲノム増幅や欠失を伴う遺伝子群(モジュール)を明らかにする。

2) 次世代シーケンサーによるエキソーム解析により、真の重要な突然変異、pathway を明らかにする。

3) 本研究の最大の目標である、「疫学環境因子」および「遺伝子多型」との三位一体の包括的・統合解析を行う。

3. 研究の方法

1) aCGH および発現遺伝子アレイの解析: われわれは食道癌 123 症例の LMD 後の原発巣癌細胞の発現遺伝子アレイから発現遺伝子データベースにつき、Extraction of Expression Module (EEM)法を用いて、食道癌で有意に発現が変異している遺伝子セットを抽出した。またアレイ CGH に対して GISTIC 解析を用いて有意な増幅・欠損領域を

有する遺伝子を抽出し、両者を統合した。

2) エキソーム解析: 食道癌 144 例の癌部と非癌部の DNA を抽出し、次世代シーケンサー(東京大学医科学研究所 鈴木 穰准教授)によるエキソーム解析を行った。

Hi-seq2000(illumina)を使用。Probe は SureSelect Human All Exon 50Mb を使用。

3) 統合解析

4. 研究成果

1) 食道発癌および癌進展に関わるゲノム変異(特に 17q12 の GRB7 について):

われわれは 10 領域において癌特異的ゲノム変異を認め、11q13.2、7p11.2、3q26.33、17q12 にはそれぞれ CCND1、EGFR、SOX2、ERBB2 遺伝子が局在していた。特に 17q12 において増幅を認め GRB7 遺伝子が細胞増殖能、運動能、浸潤能と関連した。さらに GRB7 特異的阻害により HER2 抗体 trastuzumab の抗腫瘍効果を補助することを明らかにした。さらに GRB7 自身の発現量が予後と関連していた。

2) 食道癌におけるエキソーム解析の結果:

(1) 突然変異解析: 144 例の exome シーケンスの結果、平均の depth は 120.01 で、標的塩基の 91.4% をカバーしている。20,836 個の体細胞変異を検出。0.73-2.79 個/Mb 変異が同定されている。ミスマッチ修復遺伝子 (MLH3, MSH3, MSH6, EXO1, PRA1, PCNA, ATM) 変異のある症例については 3.64 個/Mb と高頻度である。

(2) ドライバー遺伝子の解析: 3261 遺伝子に変異があり、高頻度に recurrent している突然変異遺伝子として、TP53 (75.7%), NOTCH1 (18.7%), MLL2 (18.1%), NFE2L2 (15.9%), ZNF750 (14.6%), FAT1 (13.9%), EP300 (8.3%), CREBBP (7.6%), NOTCH3 (6.9%), TET2 (6.3%), FBXW7 (4.9%), TGFBR2 (4.9%) and CDKN2A (4.9%) が存在した。多くは TSG であった。

(3) コピー数解析: 123 例につき SNP アレイを行い多くの変異を確認した。高頻度に増幅しているのは CCND1, SOX2, PIK3CA, TERT, EGFR および MYC。TGFBR2, CDKN2A, RB1 SMAD はコピー数減である。LOH は 34.4% にあった。TP53, NOTCH1, ZNF750, FAT1, TET2, FBXW7, TGFBR2, CDKN2A は LOH と変異が併存した。LOH が高頻度の存在する症例は突然変異率が高い。

(4) pathway 解析: NOTCH1 経路の変異が多く他の扁平上皮癌でもみられた TP63, SOX2, ZNF750 経路に変異があった。ヒストンアセチル化酵素経路(H3K4)、trithrox group 経路、染色体再構成関連 ARID および CHD 経路(ポリコーム経路には変異はない)。TGF 経路、SMAD 経路についても変異が存在した。WNT 経路とそれに関連する FAT ファミリーにも変異が存在した。さらに RTK-PI3K 経路においても変異が散在した。特にコピー数変異が EGFR、

ERBB2、PI3K、AKT の増幅と PTEN の減少にみられたが、この経路は治療標的となるだけに今回の発見は極めて有用であった。

3) 飲酒喫煙摂取量および遺伝子多型との三位一体解析の結果:

C T transition 変異は CpG 配列(42.1%)に存在する。C G transversion 変異が(12.2%)に存在し、これは過去の head and neck や肺扁平上皮癌でみられたスペクトラムである。変異スペクトラムで3群にクラスタリングできた(Cluster-1 は back-row の変異率が高く、C-3 は CpG に変異率が高い。C-2 はその中間。)C-1 において最も突然変異率が高い。

特に興味深いのは環境因子および遺伝的背景(多型)との関係である。すなわち飲酒喫煙消費量および遺伝子多型とクラスターとの関連である。アルコールと突然変異率との関係がみられたのは、C-1 と C-2 であった。また、多型との関係のみみられたのは ALDH2 (rs671) であり AH1B(rs1229984)は無関係。また喫煙発がん高リスク者(CYP2A6 健常代謝能)は変異率が高い C-1 に有意に多かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

著者名: Yokobori T, Mimori K
課題名: Platin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis
雑誌名: Cancer Res
発行年: 2013
頁数: 2059-2069
巻: 73

著者名: Nishida N, Mimori K,
課題名: EGFR gets in the way of microRNA biogenesis.
雑誌名: Cell Res
発行年: 2013
頁数: e83629
巻: 8

著者名: Ogino T...Doki Y, Mori M
課題名: Increased Th17-Inducing Activity of CD14+ CD163low Myeloid Cells in Intestinal Lamina Propria of Patients with Crohn's Disease.
雑誌名: Increased Th17-Inducing Activity of CD14+ CD163low Myeloid

Cells in Intestinal Lamina Propria of Patients with Crohn's Disease.

発行年: 2013

著者名: Tsujinaka T, Doki Y, Mori M
課題名: Subcuticular sutures versus staples for skin closure after open gastrointestinal surgery: a phase 3, multicentre, open-label, randomised controlled trial.
雑誌名: Lancet
発行年: 2013
頁数: 1105-12
巻: 382

[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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名
称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 正樹 (Mori Masaki)

大阪大学医学部附属病院消化器外科・教授

研究者番号：70190999

(2)研究分担者

藤田 博正 (Fujita Hiromasa)
久留米大学医学部外科学講座・教授
研究者番号：20129638

鈴木 貞夫 (Suzuki Sadao)
名古屋市立大学医学部医学系研究科公衆衛生学・教授
研究者番号：20226509

山本 健 (Yamamoto Ken)
九州大学生体防御医学研究所・准教授
研究者番号：60274528

夏越 祥次 (Natsugoe Syouji)
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 先進治療科学専攻 腫瘍学講座・教授
研究者番号：70237577

梶山 美明 (Kajiyama Yoshiaki)
順天堂大学医学部消化器外科学講座・教授
研究者番号：70241239

(3)連携研究者

()

研究者番号：