

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26462002

研究課題名（和文）半導体次世代シーケンサーを用いた胃がんバイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Screening of biomarker of gastric cancer by using semiconductor-based next-gen sequencing

研究代表者

滝口 伸浩（TAKIGUCHI, Nobuhiro）

千葉県がんセンター（研究所）・消化器外科・臨床検査部・部長

研究者番号：00261917

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：がん関連遺伝子400以上のExome解析を、胃がん症例100症例以上でIon Torrent Proton, Ion Torrent PGMシーケンサーを用いて検討した。当施設で同定した胃がんのリスクファクターと考えられるアミノ酸変化やストップコドンを示す多型（SNP）を検討した。遺伝子解読解析により、遺伝子変異・多型・コピー数変異を多数認めた。残念ながら、臨床所見との相関解析では、有意な相関を示すものは得られなかった。また遺伝子機能に影響すると考えられる生殖細胞多型が本研究に伴い発見されたため、この多型と胃がんリスクの関連も今後検討は必要と考えられている。

研究成果の概要（英文）：An exome analysis of cancer related more than 400 genes was applied using Ion Torrent Proton and Ion Torrent PGM sequencers in more than 100 gastric cancer cases. Non-synonymous or non-sense germ-line variants correlated with gastric cancer cases was identified as candidate risk factors of gastric cancer in our previous population study. Many somatic mutations, germ-line variants and the copy number variants were identified by the next generation sequencing analysis. Although no relationship between these variants and clinical manifestations has been detected, non-synonymous germ-line variants was identified with a higher frequency. Further analysis is needed to study the mechanisms behind increased gastric cancer risks including possible functional polymorphisms we identified.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃がん バイオマーカー 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

胃がんは全がん協の 12488 例の集計で 5 年相対生存率は 71.9%である。しかし、そのうち 1279 例が 3 期で 5 生率 45.0%、2103 例が 4 期で 5 生率が 7.3%と、予後不良の 3 期 4 期が 27.1%を占めている。また、2 期でも 66.8%と早期診断されなければ予後不良の疾患であり、予後改善のため早期診断法の開発が必要である。一方、手術・内視鏡治療と化学療法による集学的治療に対する感受性に患者間で差があることも周知であり、予後不良例への治療法選択のマーカーも求められている。ところが、胃癌マーカーに関しては、EGFR や CEA が用いられているが、診断、治療効果判定、予後評価のいずれにも有用なバイオマーカーはほとんどないのが現状である。

そこで、新たなバイオマーカーを探索することができるか、もしくは治療前のバイオプシーや擦過、もしくは血中の細胞や DNA を利用してがんの診断を試みることができないか、また治療標的探索ができないか等を検討する必要があると考える。また、近年の技術の進歩により、ヒトの全ゲノムを 1000 ドルで調べることができるよう時代に突入している。本課題においても、当施設に配備された次世代シーケンサー Ion Torrent Proton、Ion Torrent PGM を利用して、がんゲノム配列の検討が可能となっている。このような次世代シーケンス技術 (NGS) の進歩により、2013 年 8 月 Nature 誌や 10 月の Nature Genetics 誌等に報告された通り、7000 以上の多くの症例で遺伝子一つ一つではなく、全遺伝子の変異を検討すること (Pan-Cancer analysis) で遺伝子変異の Signature としてそれぞれのがんを分子レベルで細く分類することが可能となることを報告している。がんのドライバー遺伝子の変異だけを考えるのではなく、これまでパッセンジャー遺伝子としてその変異が重要視されてこなかった遺伝子変異も含めて解析していくことで、例えばシトシンからチミンに代わる変異が多い場合 APOBEC 遺伝子経路の異常やタバコの影響が考えられ、その変異が集中している遺伝子では、転座が起き易くフュージョン蛋白等が創られる可能性がある、また 50 塩基程度の欠失が多ければ BRCA の変異が疑われる。ミスマッチリペア遺伝子の変異の特徴や抗がん剤や老化による変異パターンを判断でき、癌種ごとの特徴も検出可能となる。このように直接遺伝子変異を見るのではなく、その変異のパターンから個々のがんによる遺伝子パスウェイの異常を捉えることができることが解ってきた。さらに遺伝子配列変異 (M パターン) とコピー数変異 (C パターン) は逆相関し、遺伝子配列変異が少ないがんではコピー数変異を解析する重要性も認識されている。がんとの関連が文献報告され、がん変異のデータベース COSMIC で 2% 以上の変異が報告されている 409 のがん

関連遺伝子を選択し、この遺伝子の全エクソンと一部プロモータやイントロンの配列も解読できる系を確立し、ultra multiplex PCR 法により少量の DNA で、チップ一枚で 3 ペアの正常とがんの DNA を同時に解析し、1 ペアあたり 10 万円程度での解析を可能にしている。またパラフィンブロックから抽出した DNA でも解析できることを当施設で構築し、報告している。この NGS 解析により、がんドライバー変異を同定し、同時に遺伝子変異のパターンから変異 Signature およびコピー数の変異 (CNV) を一度に解析可能としている。

2. 研究の目的

消化器がん特に胃がん患者を早期発見できる、もしくは効果的治療法を選択を予見できるより優れたバイオマーカーの同定が求められている。通常、バイオマーカーはがん遺伝子変異や特異的な表面抗原などを標的と考え探索されてきたが、網羅的な Omics 解析ではがん特異的な変異のパターンをマスとしてバイオマーカーと考える概念が創出されている。本研究課題では、がんで高頻度に変異が見られる領域に限定しメガベースオーダーでシーケンスする一般診療で普及可能な包括的バイオマーカー解析によって胃がん Mutation Signature を同定し、臨床応用することを目的としている。バイオマーカー探索とその解析結果のパターン自体がバイオマーカーとなる可能性を追求し、個々の患者の治療法選択や予後予測、再発診断、さらに診断プロトコールの変更、治療レジメの変更、放射線治療の適応等を予見できる、実用化可能なレベルでの包括的な分子診断技術の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

Ion Torrent Proton, Ion Torrent PGM シーケンサーによる 400 以上のがん関連遺伝子の Exome 解析を、胃がん症例 100 症例以上で検討した。この結果と当施設で同定した胃がんのリスクファクターと考えられるアミノ酸変化やストップコドンを示す多型 (SNP) も比較検討した。遺伝子解読は、平均 1000 回程度の読みとり回数で、一症例あたり 10 万円以下で解析する当施設で確立した解析系を使用した。この解析により、遺伝子解読解析による、遺伝子変異・多型・コピー数解析を一度に進めることが出来る。この解析で多数の体細胞変異と複数のアレル頻度が日本人で低いアミノ酸変化を伴う多型が高頻度に同定されること等が予測される。これらの同定される変異や多型と、臨床症状や既存の臨床所見、治療感受性などとの相関について多変量解析等を用いて検討する。メガベースオーダーでシーケンスができる一般診療に普及可能な包括的バイオマーカー解析

によって胃がん Mutation Signature を同定し、臨床診断また生殖細胞多型による胃がん治療薬剤決定、予後予測、リスク解析へ結びつける検討も行った。以上により包括的な胃がん診断法の確立を検討する。

4. 研究成果

欧米に比べ日本の胃がん罹患率は高く、ピロリ菌の除菌により罹患率減少は認められるが、2016年の胃がんによる死亡者数は未だ男性2位、女性3位と多くの患者の命を奪っている。優れた早期発見もしくは効果治療法予測バイオマーカーが必要である。

そこで、新たなバイオマーカーが探索できないか、もしくは治療前のバイオプシーや擦過、もしくは血中の細胞やDNAを利用してがんの治療、診断を試みることができないか等の検討を行った。アミノ酸変化やストップコドンを示す多型(SNP)も比較検討した。臨床症状や既存の臨床所見、治療感受性などとの相関についての検討を行った。臨床診断また生殖細胞多型による胃がん治療薬剤決定、予後予測、リスク解析へ結びつける検討も行った。この解析から、既存の遺伝子変異を含む多くの変異が同定された。残念ながら、臨床所見との相関解析では、有意な相関を示す変異は得られなかったが、今後症例を増やすことや既存のデータとのメタ解析を行うことで検討できればと考えている。また遺伝子機能に影響すると考えられる生殖細胞レベルでの多型が、本施設の健常人のコホート研究の追跡調査で同定されているが、調査研究での胃がん発症症例でのNGS解析で、日本人で頻度が低く、コホートでも75歳まで胃がんを発症しなかった症例では全く見られなかった多型が有意に高頻度に同定された。これらの変異には、がん関連遺伝子の機能ドメインにアミノ酸変化を生じ、アミノ酸構造に影響を与える多型が含まれており、がんのリスクを上げる機能多型(Functional Polymorphism)と考えられた。本研究に伴い再確認されたため、この多型と胃がんリスクの関連解析および発がんリスク上昇機序に関わる変異遺伝子の機能解析も今後検討が必要と考えられている。

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15件)

1. Ida S, Hiki N, Sakamaki K, Ito S, Fujitani K, Takiguchi N, Kawashima Y, Nishikawa K, Sasako M, Aoyama T, Honda M, Sato T, Nunobe S, Yoshikawa T. Randomized clinical trial comparing standard diet with perioperative oral immunonutrition in total gastrectomy

- for gastric cancer. Br J Surg 査読有り 104 2017 377-383 10.1001/bjs.10417
2. Hoshino I, Nagata M, Takiguchi N, Nabeya Y, Ikeda A, Yokoi S, Kuwajima A, Tagawa M, Matsushita K, Satoshi Y, Hideaki S. Panel of autoantibodies against multiple tumor-associated antigens for detecting gastric cancer. Cancer Sci 査読有り 108 2017 377-383 10.1111/cas.13158
3. Kadera Y, Takahashi N, Yoshikawa T, Takiguchi N, Fujitani K, Ito Y, Miyamoto K, Takayama O, Imano M, Kobayashi D, Miyashita Y, Morita S, Sakamoto J. Feasibility of weekly intraperitoneal versus intravenous paclitaxel therapy delivered from the day of radical surgery for gastric cancer: a preliminary safety analysis of the INPACT study, a randomized controlled trial. Gastric Cancer 査読有り 20 2017 190-199 10.1007/s10120-016-0598-0
4. Takiguchi N, Nabeya Y, Shimazaki R, Ikeda A, Soda H, Tonooka T, Kainuma O, Imanishi S, Arimitsu H, Kobayashi R, Chibana T, Ishige F, Yamamoto H, Nagata M, Suzuki T. The Present Status of Surgical and Endoscopic Treatment for Gastric Cancer Patient Aged 85 Year or Older. Gan To Kagaku Ryoho 査読有り 43 2016 1508-1511 2016.
5. Maeda H, Sato M, Kobayashi M, Takiguchi N, Yoshikawa T, Yoshino S, Yoshida K, Tsuburaya A, Sakamoto J, Morita S. Validity of the Japanese version of functional assessment of cancer therapy-gastric (FACT-Ga) and its sensitivity to ascites volume change: a retrospective analysis of Japanese clinical trial participants. Support Care Cancer 査読有り 24 2016 4515-4521 10.1007/s00520-016-3290-3
6. Tomizawa Y, Tanabe K, KawJ, Takiguchi N, Takahashi M, Ito Y, Mitsumori N, Namikawa T, Oshio A, Nakada K. Specific Features of Dumping Syndrome after Various Types of Gsstrictomy as Assessed by a Newly Developed Integrated Questionnaire, the PGSAS-45 Dig Surg 査読有り 33 2016 94-103 10.1159/000442217
7. Oshima Y, Shimada H, Yajima S, Nanami T, Matsushita K, Nomura F, Kainuma O, Takiguchi N, Soda H, Ueda T, Iizasa T, Yamamoto N, Yamamoto H, Nagata M, Yokoi S, Tagawa M, Ohtsuka S, Kuwajima A, Murakami A, Kaneko H. NY-ESO-1 autoantibody as a tumor-specific biomarker for esophageal cancer:

- screening in 1969 patients with various cancers. *J Gastroenterol* 査読有り 51 2016 30-34 doi: 10.1007/s00535-015-1078-8.
8. Tanizawa Y, Tanabe K, Kawahira H, Fujita J, Takiguchi N, Takahashi M, Ito Y, Mitsumori N, Namikawa T, Oshio A, Nakada K. Specific Features of Dumping Syndrome after Various Types of Gastrectomy as Assessed by a Newly Developed Integrated Questionnaire, the PGSAS-45. *Dig Surg* 査読なし 33 2016 94-103 doi: 10.1159/000442217
 9. Shimozato O, Wareya M, Nakashima K, Soda H, Takiguchi N, Yamamoto H, Takenobu H, Uehara H, Ikeda E, Matsushita S, Kubo N, Nakagawara A, Ozaki T, Kamijo T. Receptor-type protein tyrosine phosphatase directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation. *Oncogene*. 査読有り 34 2015 1949-1960
 10. 小林亮介、滝口伸浩、鍋谷圭宏、池田篤、早田浩明、貝沼修、外岡亨、今西俊介、有光秀仁、知花朝史、石毛文隆、佐々木亮介、山本宏 胃リンパ球浸潤癌の治療戦略癌と化学療法 査読有り 42 2015 2021-2023
 11. Takiguchi N, Takahashi M, Ikeda M, Inagawa S, Ueda S, Nobuoka T, Ota M, Iwasaki Y, Uchida N, Kodera Y, Nakada K. Long-term quality-of-life comparison of total gastrectomy and proximal gastrectomy by postgastrectomy syndrome assessment scale (PGSAS-45): a nationwide multi-institutional study. *Gastric Cancer*. 査読有り 18 2015 407-416 doi: 10.1007/s10120-014-0377-8.
 12. Shimada Y, Hamaguchi T, Mizusawa J, Saito N, Kanemitsu Y, Takiguchi N, Ohue M, Kato T, Takii Y, Sato T, Tomita N, Yamaguchi S, Akaike M, Mishima H, Kubo Y, Nakamura K, Fukuda H, Moriya Y. Randomised phase III trial of adjuvant chemotherapy with oral uracil and tegafur plus leucovorin versus intravenous fluorouracil and levofolinate in patients with stage III colorectal cancer who have undergone Japanese D2/D3 lymph node dissection: final results of JCOG0205. *Eur J Cancer* 査読有り 50 2015 2231-2240 doi: 10.1016/j.ejca.2014.05.025.
 13. Tsuburaya A, Yoshida K, Kobayashi M, Yoshino S, Takahashi M, Takiguchi N, Tanabe K, Takahashi N, Imamura H, Tatsumoto N, Hara A, Nishikawa K, Fukushima R, Nozaki I, Kojima H, Miyashita Y, Oba K, Buyse M, Morita S, Sakamoto J. Sequential paclitaxel followed by tegafur and uracil (UFT) or S-1 versus UFT or S-1 monotherapy as adjuvant chemotherapy for T4a/b gastric cancer (SAMIT): a phase 3 factorial randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 査読有り 15 2014 886-893 doi: 10.1016/S1470-2045(14)70025-7.
 14. Aoyama T, Nishikawa K, Takiguchi N, Tanabe K, Imano M, Fukushima R, Sakamoto J, Oba MS, Morita S, Kono T, Tsuburaya A. Double-blind, placebo-controlled, randomized phase II study of TJ-14 (hangeshashinto) for gastric cancer chemotherapy-induced oral mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 査読有り 73 2014 1047-1054 doi: 10.1007/s00280-014-2440-x.
 15. Shimada H, Nagata M, Cho A, Takiguchi N, Kainuma O, Soda H, Ikeda A, Nabeya Y, Yajima S, Yamamoto H, Sugiyama T, Itami M. Long-term monitoring of serum p53 antibody after neoadjuvant chemotherapy and surgery for esophageal adenocarcinoma: report of a case. *Surg Today*. 査読有り 44 2014 1957-1961 doi: 10.1007/s00595-013-0787-y.
- [学会発表](計 18 件)
1. Takiguchi N, Suzuki T, Shimazaki R, Nabeya Y, Ikeda A, Soda H, Tonooka T, Arimitsu H, Chibana T, Yamaguchi H, Nagata M. The Present Status of the Surgical and Endoscopic Treatment for the Gastric Cancer Patients Aged 85 Years or Older. 第 40 回国際外科学会世界大会(国際学会)2016.10.25 京都府京都市
 2. 滝口伸浩、中村洋子、三上春夫、永瀬浩喜 前向きコホート研究による胃がん高リスク群でのアミノ酸変化を伴う多型の解析 第 54 回日本癌治療学会学術集会 2016.10.22 神奈川県横浜市
 3. 滝口伸浩、鍋谷圭宏、池田 篤、早田浩明、外岡 亨、有光秀仁、知花朝史、榛澤侑介、高山 亘、千葉 聡、星野 敢、柳橋浩男、永田松夫 Modified double tract 再建による噴門側胃切除術 留意点と成績 第 71 回日本消化器外科学会総会 2016.7.14 徳島県徳島市
 4. Takiguchi N, Nagata M, Nabeya Y, Ikeda A, Kainuma O. Laparoscopic proximal gastrectomy with gastric Cancer Week 2016 (国際学会) 2016.4.21 ソウル 韓国
 5. 滝口伸浩、鍋谷圭宏、池田 篤、貝沼 修、早田浩明、外岡 亨、今西俊介、有光秀仁、小林亮介、佐々木亘亮、山本 宏 進行胃癌に対する術前化学療法を併用した胃がん集学的治療の成績と課題 第

- 116 回日本外科学会の学術集会（国際学会）2016.4.16 大阪府大阪市
6. 滝口伸浩、鍋谷圭宏、池田篤、貝沼修、早田浩明、外岡亨、今西俊介、有光秀仁、小林亮介、知花朝史、石毛文隆、佐々木巨亮、永田松夫、山本宏。P0Cy1 胃癌に対する集学的治療 第 88 回日本胃癌学会総会 2016.3.17-19 大分県 別府
 7. Takiguchi N, Nagata M, Nabeya Y, Ikeda A, Kainuma O. Diagnosis and treatment of Gastric GIST in our hospital 11th International Gastric Cancer Congress(国際学会) 2015.6.4-6 Paulo, Brazil.
 8. Tokoro Y, Takiguchi N. Clinicopathological findings of gastric mucinous adenocarcinoma. 11th International Gastric Cancer Congress (国際学会) 2015.6.4-6 Paulo, Brazil.
 9. Takiguchi N, Nabeya Y, Ikeda A, Kainuma O, Soda H, Tonooka T, Saito H, Yanagibashi H, Arimitu H. Intraperitoneal chemotherapy by CDDP for peritoneal recurrent gastric cancer patients with surgical intervention. World Congress of Surgery 2015 (国際学会) 2015.8.23-27 バンコク タイ
 10. Takiguchi N, Y Kodera, N. Takahashi, T. Yoshikawa, K. Fujitani, S. Ito, K. Miyamoto, O. Takayama, M. Imano, D. Kobayashi, Y. Miyashita, S. Morita, J. Sakamoto. Feasibility of weekly intraperitoneal versus intravenous paclitaxel delivered from the day of radical surgery for gastric cancer: A preliminary safety analysis of INPACT study, a randomized controlled trial. European Cancer Congress 2015(国際学会) 2015.9.25-29 ウィーン オーストリア
 11. 滝口伸浩、鍋谷圭宏、池田篤、貝沼修、早田浩明、外岡亨、今西俊介、有光秀仁、小林亮介、知花朝史、石毛文隆、佐々木巨亮、永田松夫、山本宏。S1+CDDP Neoadjuvant chemotherapy 施行進行胃癌症例の予後曲線の検討。第 53 回日本癌治療学会学術集会 2015.10.29-31 京都府・京都市
 12. 滝口伸浩、鍋谷圭宏、池田篤。Modified S-1+CDD による胃癌 Neoadjuvant chemotherapy. JDDW2015 2015.10.8-10 東京都 港区
 13. 滝口伸浩、永田松夫、鍋谷圭宏、池田篤、貝沼修、早田浩明、趙明浩、外岡亨、武藤頼彦、柳橋浩男、升田貴仁、山本宏。ダブルトラクト再建法による腹腔鏡下噴門側胃切除 手技の変遷と成績。第 114 回日本外科学会総会 2014.4.5 グランドプリンスホテル京都(京都市 京都市)
 14. 滝口伸浩、鍋谷圭宏、池田篤、貝沼修、

- 早田浩明、趙明浩、外岡亨、齊藤洋茂、柳橋浩男、有光秀仁、小林亮介、知花朝史、所為然、永田松夫、山本宏。胃癌術後腹膜播種再発に対する手術治療をとめた CDDP 腹腔内化学療法。第 36 回日本癌局所療法研究会 2014.6.27 大阪府・八尾市
15. 滝口伸浩、永田松夫、鍋谷圭宏、池田篤、貝沼修、早田浩明、趙明浩、外岡亨、柳橋浩男、武藤頼彦、山本宏。腹腔鏡下胃全摘術における Roux en Y 再建法の手技の工夫と留意点 再建手技の変遷と成績 第 69 回日本消化器外科学会総会 2014.7.16 福島県・郡山市
 16. 滝口伸浩、永田松夫、鍋谷圭宏、池田篤、貝沼修、早田浩明、趙明浩、外岡亨、齊藤洋茂、有光秀仁、柳橋浩男、小林亮介、知花朝史、所為然、山本宏。噴門側胃切除術の再建法の相違による食道逆流の発現と逆流防止の工夫 第 44 回胃外科・術後障害研究会 2014.10.30-31 静岡県・富士市
 17. Takiguchi N, Nagata M, Nabeya Y, Ikeda A, Kainuma O, Soda H, Cho A, Tonooka T, Saito H, Arimitu H, Yanagibashi H, Kobayashi R, Chibana A, Tokoro Y, Yamamoto H. Oncologic emergency surgery occurred during chemotherapy for metastatic colorectal cancer. 9th Scientific and Annual Meeting of the European Society of Coloproctology ESCP 2014 2014.9.24-26 Barcelona Spain.
 18. Takiguchi N, Nagata M, Nabeya Y, Ikeda A, Kainuma O, Soda H, Cho A, Tonooka T, Arimitu H, Yanagibashi H, Yamamoto H. Laparoscopic total gastrectomy with Roux en Y reconstruction; the benefits of intracorporeal anastomosis by hand-sewn purse-string suture. 24th IASGO 2014.12.5-7 Vienna (Austria)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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

滝口伸浩 (TAKIGUCHI Nobuhiro)
千葉県がんセンター(研究所)・消化器外科・臨床検査部・部長
研究者番号：00261917

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

永瀬浩喜 (NAGASE Hiroki)
千葉県がんセンター(研究所)・がん遺伝創薬研究室・研究所長
研究者番号：90322073

(4) 研究協力者

()