

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670380

研究課題名(和文)臨床検体を用いた次世代シーケンサーによる消化器癌の網羅的癌遺伝子解析

研究課題名(英文)Next-generation sequence of cancer-related genes in digestive organ cancers using clinical samples

研究代表者

榎本 信幸(ENOMOTO, Nobuyuki)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：20251530

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文): 遺伝子解析技術の発達により様々ながんにおける原因遺伝子が次々と同定されているが、これらの臨床的意義を解明していくことが今後必要となる。本研究では、臨床教室である強みを生かし、詳細な臨床情報と遺伝子異常を組み合わせで解析し、肝細胞癌、早期食道癌、早期胃癌、そして膵癌の前がん病変とされる膵管内乳頭粘液性腫瘍の遺伝子解析を行い、生存期間などの悪性度との関連や進行癌との関連について研究を行った。

研究成果の概要(英文): Recent technical advancement of genetic analyses has enabled us to discover many cancer-related mutations in various cancers. We then have to clarify the clinical significance of these gene mutations. In this study, we conducted cancer-related gene analysis in cases with hepatocellular carcinoma, early esophageal carcinoma, early gastric carcinoma and intraductal papillary mucinous neoplasms that are known as precursor lesions of pancreatic cancer. We have found the relation between tumor mutations and several clinical characteristics.

研究分野：消化器

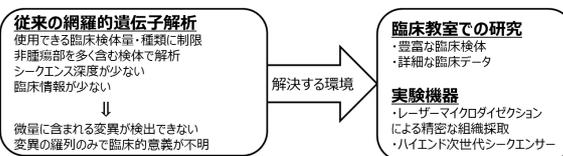
キーワード：消化器癌 次世代シーケンス解析 レーザーキャプチャーマイクロダイゼクション 早期癌

1. 研究開始当初の背景

- (1) 遺伝子変異の検出にはこれまで、特定の領域をターゲットとしシーケンスすることが主流であり、多くの DNA 量を用いてごく一部の領域の変異しか検出できず、また高コストかつ結果が得られるまで長い時間を要した。そのため、微量かつ腫瘍以外の細胞成分を含む臨床検体からいくつもの癌関連遺伝子変異を検出することは現実的でなかったが、最近開発された次世代シーケンサーでは、わずかな DNA 量(10ng)で一度に多くの癌関連遺伝子変異を高感度に検出することが可能となり、さらに短時間かつ低コストに行うことが可能となった。
- (2) 網羅的遺伝子解析は近年盛んにされているが、多くは疾患ごとの解析、つまり膵癌と遺伝子変異、肝癌と遺伝子変異、といった内容であり、検出された遺伝子変異の臨床的意義は不明であった。
- (3) われわれは最近、膵液やパラフィン固定された膵腫瘍切除組織の微量 DNA から網羅的遺伝子解析を行い、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)で見られる GNAS 遺伝子変異の臨床的意義を見出すことに成功した(Plos One 2014)。これからはただ単に網羅的遺伝子解析をするのではなく、詳細な臨床データと合わせ解析を行い、遺伝子変異の意義を見出すことから新たな診断法、治療法を見出していく必要がある。

2. 研究の目的

現在盛んに行われている網羅的遺伝子解析研究は疾患と遺伝子変異の関係を解析したものが主であるが、本研究では詳細な臨床データと豊富な臨床検体とをもつ臨床教室が次世代シーケンサーを単独で所有している利点を生かし、以下の目的をもって研究を遂行する。

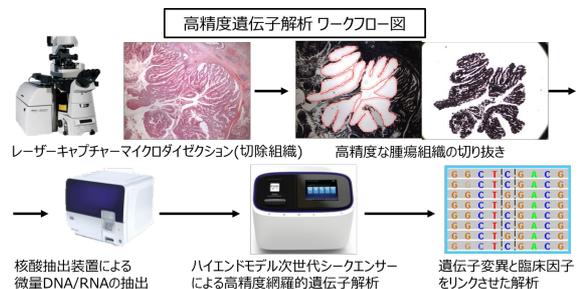


- (1) 網羅的癌関連遺伝子解析と詳細な臨床データから遺伝子変異の臨床的意義を解明する。内視鏡や手術で得られた消化器癌(肝癌・膵癌・胆管癌・消化管癌)の切除検体 (FFPE) を材料とし、次世代シーケンサーによる網羅的癌関連遺伝子解析を行う。これらは当科で診療した詳細な臨床データが備わっており、臨床背景と得られた遺伝子変異の詳細な解析を行う。
- (2) 臨床的意義が見出された遺伝子変異を利用した新たな疾患概念・診断法・治療法の開発。臨床背景と遺伝子変異の解析で得ら

れた情報を用い、新たな疾患概念の提唱・新たな診断法・新たな治療戦略の開発へ研究を導く。

3. 研究の方法

- (1) 検体採取
本教室は消化器内科の臨床教室であり、研究利用目的に同意書を得た臨床検体が豊富に存在する。本研究では内視鏡検査や手術により得た検体、具体的には膵液、生検検体、切除検体から DNA を抽出する。得られた臨床検体は使用するまで -80 保存し、切除検体についてはホルマリン固定検体 (FFPE) を用いる。遺伝子解析については本大学倫理委員会の承認をすでに得ている。臨床サンプルからの DNA 抽出は、得られる組織量が少ない場合があり時に困難となるが、その場合は全ゲノム増幅キット (REPLI-g Kits, QIAGEN 社など) を用いることで解決可能と考える。また、得られた臨床検体は -80 保存し、DNA 抽出後は -20 に保存し、検体中の DNA の Loss を最小限に抑える。
- (2) 次世代シーケンサーによる遺伝子変異検索
DNA を抽出後に DNA シーケンスのためのライブラリーを作成する。癌関連遺伝子変異検出には市販の Ion Ampliseq™ Cancer Panel (Life Technologies Corporation, California) を用い、DNA メチル化については既報をもとに primer を作成する。シーケンス機器は Ion PGM Sequencer (Life Technologies Corp.) を用い、付属の Torrent Suite Software (ver.2.2) で遺伝子変異を検出する。癌関連遺伝子変異は 50 遺伝子 2800 か所の Hotspot 変異を網羅的に検索する。



- (3) 臨床データとの照合
1. で述べたように臨床教室の利点を生かし、遺伝子解析結果と詳細な臨床データ、具体的には疾患の良悪性、膵癌の組織亜型、経過観察中の変化、各種の患者因子および腫瘍因子を照合し新たな知見を得る。
- (4) 臨床応用

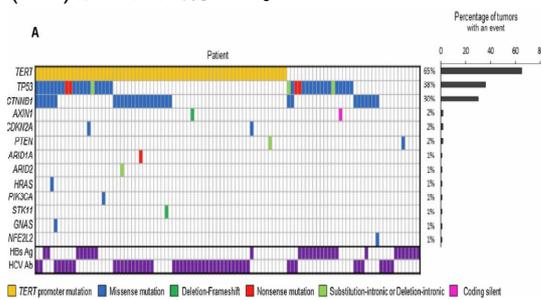
臨床応用するために、得られた検体はそのまま本教室で遺伝子変異解析が行われ、その結果を診断・治療に応用できるように、速やかに結果が臨床レベルに報告される体制を作る。

4. 研究成果

(1) 肝臓癌

肝細胞癌 104 例の切除組織を用い、得られた遺伝子変異と臨床因子の関連を解析した。

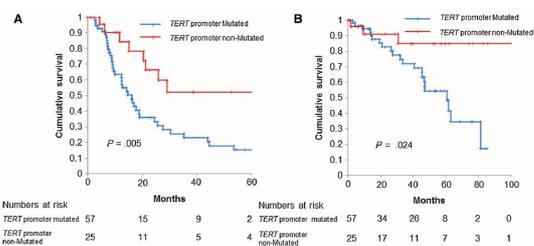
肝細胞癌で最も異常が見られた遺伝子変化は *TERT* (65%) で、*TP53* (38%)、*CTNNB1* (30%) がこれに続いた。



(肝細胞癌 104 例での遺伝子変異一覧)

臨床背景との関連で見ると、*TERT* promoter の変異は C 型肝硬変患者からの肝細胞癌に有意に多く見られた。*TP53* 変異は B 型肝硬変患者からの肝細胞癌で有意に多く見られ、*CTNNB1* 変異は B 型肝硬変以外の症例で多く見られた。

予後及び無再発生存期間と遺伝子変異の関連をみると、*TERT* promoter に変異を有する症例では有意に予後および無再発生存期間が不良であり、これらの遺伝子背景を考慮することで予後の予測、治療強度の選択が今後可能になると考えられる。



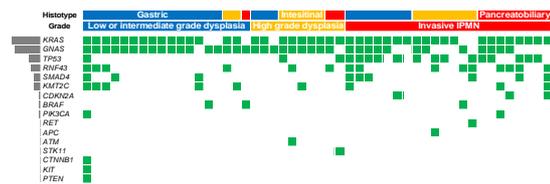
(*TERT* 変異と無再発生存期間、全生存期間)

(2) 膵腫瘍

膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) の良悪性診断を膵液の遺伝子解析で行うことを試みた。対象は IPMN 切除 50 例と膵液 19 検体。遺伝子は IPMN で高頻度にみられると既に報告されている *GNAS*、*KRAS*、*RNF43* を含む 52 遺伝子を検索した。

IPMN 切除例の遺伝子解析から、*KRAS*

(88%)、*GNAS* (76%)、*TP53* (34%)、*RNF43* (30%)、*SMAD4* (18%)、*KMT2C* (18%) が変異として検出された。切除例の臨床背景と遺伝子解析の結果から、悪性 IPMN でみられる遺伝子変異マーカーとして、多変量解析から *TP53* が有意なものとして同定された。



(IPMN50 例で検出された遺伝子変異一覧)

切除症例とペアになった 19 例の膵液で、悪性マーカーである *TP53* が検出可能か検討した。良性例では変異は検出されず悪性例の 5 例で切除組織から *TP53* 変異が検出されていたが、このうち 4 例から切除組織と同じパターンでの *TP53* 変異を検出可能であった。

今後、画像のみでは診断しきれない悪性 IPMN を膵液の遺伝子解析で診断することを目標として研究を継続していく予定。

(3) 早期消化管癌(食道癌・胃癌)

日本では癌とされている早期食道癌や早期胃癌は内視鏡的粘膜下層剥離術で治療対象となっているが、欧米ではそもそも癌とは定義されておらず高度異形と分類されている。これらの遺伝子背景を解析することで、進行癌への potential を推測することを目的として研究を遂行した。

内視鏡的に切除した早期食道癌 55 例および早期胃癌 29 例 (31 病変) を対象とし、50 の癌関連遺伝子を解析した。早期食道癌の 86%、早期胃癌の 77% で *TP53* 変異が検出された。進行癌でも高頻度に *TP53* 変異が見られることが報告されており、また非癌部ではこれらの変異は検出されないことから、今回対象とした早期病変は進行癌に至る potential を有していると推測される。

臨床因子との関連では、早期食道癌で見られた *TP53* 変異は飲酒や喫煙以外の要因との関連が示唆され、また早期胃癌で見られる *TP53* 変異はヘリコバクターピロリ菌感染との関連が示唆された。

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 1 件)

F. Kawai-Kitahata, Y. Asahina, S. Tanaka,

S. Kakinuma, M. Murakawa, S. Nitta, T. Watanabe, S. Otani, M. Taniguchi, F. Goto, H. Nagata, S. Kaneko, M. Tasaka-Fujita, Y. Nishimura-Sakurai, S. Azuma, Y. Itsui, M. Nakagawa, M. Tanabe, S. Takano, M. Fukasawa, M. Sakamoto, S. Maekawa, N. Enomoto, and M. Watanabe, 'Comprehensive Analyses of Mutations and Hepatitis B Virus Integration in Hepatocellular Carcinoma with Clinicopathological Features', J Gastroenterol (2015). doi:10.1007/s00535-015-1126-4 (査読あり)

〔学会発表〕(計 12 件)

高野伸一, 深澤光晴, 榎本信幸. IPMN 集学的医療における膵液次世代シーケンサー解析のインパクト. 第 102 回日本消化器病学会総会(パネル) 2016.4.23 発表, 京王プラザホテル(東京・新宿)

吉田貴史, 前川伸哉, 榎本信幸. ESD による分化型早期胃癌切除標本を用いた次世代シーケンサーによる癌関連遺伝子の検索. 第 102 回日本消化器病学会総会(ワーク) 2016.4.21 発表, 京王プラザホテル(東京・新宿)

横田雄大, 深澤光晴, 高野伸一, 廣瀬純穂, 進藤浩子, 門倉 信, 板倉 淳, 藤井秀樹, 佐藤 公, 榎本信幸. 膵神経内分泌腫瘍の集学的治療と分子標的薬の選択. 第 46 回日本膵臓学会大会 2015.6.20 発表, 名古屋国際会議場(愛知・名古屋)

高野伸一, 深澤光晴, 進藤浩子, 高橋英, 横田雄大, 廣瀬純穂, 門倉信, 板倉淳, 藤井秀樹, 佐藤公, 榎本信幸. レーザーマイクロダイゼクションと次世代シーケンサーによる IPMN 関連. 第 46 回日本膵臓学会大会 2015.6.19 発表, 名古屋国際会議場(愛知・名古屋)

高野伸一, 深澤光晴, 榎本信幸. 膵神経内分泌腫瘍から得た EUS-FNA 検体の次世代シーケンサー解析による分子標的薬治療効果予測の可能性. 第 89 回日本消化器内視鏡学会総会(ワーク) 2015.5.29 発表, 名古屋国際会議場(愛知・名古屋)

Shinichi Takano, Mitsuharu Fukasawa, Yudai Yokota, Shinya Maekawa, Hiroko Shindo, Ei Takahashi, Makoto Kadokura, Tadashi Sato, Nobuyuki Enomoto. Predicting therapeutic effects of molecular-targeted agents for pancreatic neuroendocrine neoplasms using next-generation sequencing. 第 101 回日本消化器病学会総会(International Topic Conference-Poster) 2015.4.24 発表, 仙台

国際センター(宮城・仙台)

横田雄大, 高野伸一, 榎本信幸. 次世代シーケンサーによる膵神経内分泌腫瘍の遺伝子解析. 第 56 回日本消化器病学会大会(ワーク) 2014.10.25, 神戸国際会議場(兵庫・神戸)

高野伸一, 深澤光晴, 進藤浩子, 高橋英, 横田雄大, 廣瀬純穂, 門倉 信, 佐藤公, 榎本信幸. 遺伝子解析・膵液腫瘍マーカー・細胞診・画像所見を統合した集学的な IPMN 良悪性診断. 第 56 回日本消化器病学会大会 2014.10.25 発表, 神戸国際会議場(兵庫・神戸)

吉田貴史, 前川伸哉, 大高雅彦, 岩本史光, 津久井雄也, 小林祥司, 浅川幸子, 山口達也, 植竹智義, 佐藤 公, 榎本信幸. ESD による分化型早期胃癌切除標本を用いた次世代シーケンサーによる網羅的癌関連遺伝子の検索. 第 56 回日本消化器病学会大会 2014.10.23 発表, 神戸国際会議場(兵庫・神戸)

横田雄大, 高野伸一, 深澤光晴, 廣瀬純穂, 高橋 英, 進藤浩子, 門倉 信, 佐藤 公, 板倉 淳, 藤井秀樹, 榎本信幸. 次世代シーケンサーによる膵神経内分泌腫瘍の遺伝子解析. 第 45 回日本膵臓学会大会 2014.7.11 発表, 北九州国際会議場(福岡・北九州)

高野伸一, 深澤光晴, 榎本信幸. 膵液の次世代シーケンサー解析による IPMN の癌関連遺伝子診断. 第 87 回日本消化器内視鏡学会総会(ワーク) 2014.5.17 発表, 福岡国際会議場(福岡・福岡)

横田雄大, 高野伸一, 深澤光晴, 高橋英, 進藤浩子, 門倉 信, 佐藤 公, 榎本信幸. 膵神経内分泌腫瘍の遺伝子解析により同定された -catenin 変異. 第 100 回日本消化器病学会総会 2014.4.25 発表. 東京国際フォーラム(東京・千代田)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 信幸 (ENOMOTO, Nobuyuki)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号: 20251530

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし