

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861003

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた遺伝子統合解析による食道癌化学放射線療法耐性の解明

研究課題名(英文)Next-generation sequencing approach to detect chemoradiotherapy response in esophageal cancer

研究代表者

平田 秀成(Hirata, Hidenari)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：90721267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌に対する化学放射線療法(CRT)耐性獲得機構の解明および感受性予測バイオマーカーの同定は、喫緊の課題である。根治的CRT後遺残・再発の原因遺伝子を明らかにするために、未治療食道扁平上皮癌の生検検体(6症例)ならびにCRT後局所再発病変(2症例)に対して全エクソン解析・メチル化シーケンス、RNAシーケンスを行い、CRT感受性群と耐性群で遺伝子異常の特徴を比較した。従来重要とされてきたTP53変異の有無のみでは、実際のCRT感受性を規定できないことが明かとなった。今後、ゲノム・エピゲノム・トランスクリプト異常とCRT感受性についてより詳細な解析を実施する予定である。

研究成果の概要(英文)：Esophageal Squamous Cell Carcinoma(ESCC) is resistant to chemoradiotherapy (CRT); therefore, identification of useful biomarkers predicting CRT response is required. To determine whether gene alterations associate with response to CRT, next-generation sequencing of ESCC treated with definitive CRT was performed. We carried out whole-exome sequencing, DNA methylation sequencing, and RNA sequencing of 6 pretreatment and 2 recurrent ESCCs. Then, gene alterations of CRT responders were compared with CRT nonresponders. We found that the presence of TP53 mutation could not predict clinical response to CRT. We will analyze in detail for genome, epigenome and transcriptome profiles of ESCC treated with definitive CRT.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：化学放射線感受性 遺伝子異常 食道癌

### 1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌へ化学放射線療法(CRT)は高い抗腫瘍効果を示すが、治療抵抗性が臨床上の問題であり、耐性獲得機構の解明および予測バイオマーカーの同定が喫緊の課題である。

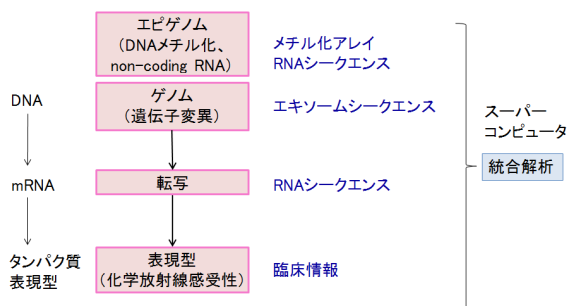
食道癌の臨床検体において、次世代シーケンサーおよびスーパーコンピュータを用いた化学放射線療法感受性にかかわる網羅的・統合的遺伝子解析の報告は過去に報告されていない。

一般に、進行食道癌において化学放射線療法は根治療法のひとつであるが、治療成績は不良である。がんが生じた遺伝子異常が治療耐性に関与することが知られている。例えば TP53 は、変異により細胞周期チェックポイント不活化やアポトーシス抑制をもたらし、治療耐性となるが、TP53 を含めた下記の包括的・統合的解析はなされていない。

がんが治療耐性という表現型を獲得するに至る情報の流れは、エピゲノム・ゲノム領域 転写レベル 表現型となっており、いずれかのレベル生じた遺伝子異常が治療耐性の原因となる。全レベルの異常を包括的に解析することにより、耐性獲得に関する真のカスケードを明らかにすることが可能になる。

### 2. 研究の目的

本研究では、遺残・再発のドライバーとなる原因遺伝子(機構)を明らかにするために、ゲノム・エピゲノム・トランスクリプトームレベルで網羅的遺伝子解析を実施する。スーパーコンピュータを用いた遺伝子統合解析(多層オミックス解析)により、耐性獲得に関する真のカスケードを明らかにする。



### 3. 研究の方法

食道癌原発巣の CRT 前(未治療の食道癌原発巣 6 症例)および CRT 後の再発病変(局所再発病変: 2 症例)の遺伝子異常を解析した。内視鏡生検により組織を採取し、エキソームシーケンシング、RNA シーケンシング、メチル化シーケンシング(研究当初は DNA メチル化アレイの予定であったが、後述の理由でシーケンシングに変更)を施行した。「CRT 感受性群」と「CRT 耐性群」で遺伝子異常プロファイルの違いを評価し、実際の治療感受性に及ぼす影

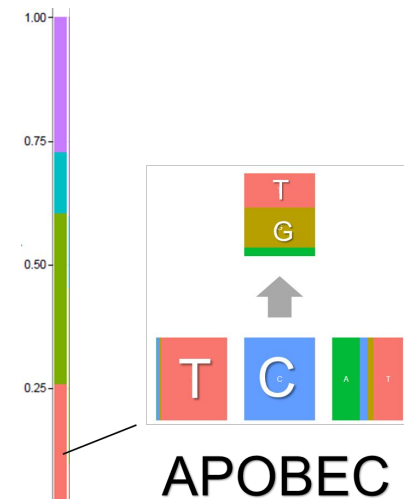
響について数理解析を行った。

### 4. 研究成果

症例登録・検体集積を完了し、各症例から抽出した DNA・RNA を用いたシーケンシングを実施した。生検検体より抽出した DNA・RNA に関して、各種シーケンシングを行うにあたって十分な質・量が担保されていることをバイオアナライザーで確認した。さらにエキソームシーケンシングの結果、本研究でも過去の報告と一致した変異遺伝子を認め、解析方法も問題ないことを確認した。

包括的ゲノム解析により、治療耐性への関与が示唆される遺伝子変異を考察した。本研究では全症例(治療感受性群・耐性群)で TP53 変異を認め、CRT 感受性に重要とされて来た TP53 変異の有無のみでは、実際の臨床症例における CRT 感受性を規定する因子にはなり得ないことが示唆された。さらなる詳細な解析が必要と考えられた。

さらに一置換塩基のパターンから変異スペクトラを自験例で評価した。基置換パターンを数数学的にクラスター解析するために、pmsignature (Shiraishi Y et al, *PLoS Genet.* 2015;11(12):e1005657.)を使用した。食道扁平上皮癌の高頻度とされる APOBEC signature (TpCpN における C>G/T) が全症例で検出された。今後、変異ペクトラと CRT 感受性について評価する予定である。



pmsignature を用いた変異スペクトラ解析の実際の症例(CRT 耐性群 1 例を提示)。全一塩基置換の 25% は APOBEC signature を示した。

DNA メチル化の解析は、当初アレイを行う予定だったが、生検検体のような微小検体から精度良くメチル化異常を検出するために、新たな手法である PBAT 法によるメチル化シーケンシングを実施することとなった。そのため研究達成に遅れを生じたが、大部分の症例

でシーケンスを実施するに至っている。

引き続きトランスクリプトーム解析・メチル化解析を実施し、包括的遺伝子解析を行うことで、耐性獲得に至る遺伝子異常を同定し、CRT 耐性獲得機構を明らかにする。最終的には臨床的に有用な感受性バイオマーカーや治療標的の発見に繋がりたい。

#### 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7件)

下記、全て査読あり

1. Sawada G, Niida A, Uchi R, Hirata H, Shimamura T, Suzuki Y, Shiraishi Y, Chiba K, Imoto S, Takahashi Y, Iwaya T, Sudo T, Hayashi T, Takai H, Kawasaki Y, Matsukawa T, Eguchi H, Sugimachi K, Tanaka F, Suzuki H, Yamamoto K, Ishii H, Shimizu M, Yamazaki H, Yamazaki M, Tachimori Y, Kajiyama Y, Natsugoe S, Fujita H, Mafune K, Tanaka Y, Kelsell DP, Scott CA, Tsuji S, Yachida S, Shibata T, Sugano S, Doki Y, Akiyama T, Aburatani H, Ogawa S, Miyano S, Mori M, Mimori K. Genomic Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a Japanese Population. *Gastroenterology*. 2016;150(5):1171-82.

2. Hirata H, Sugimachi K, Komatsu H, Ueda M, Masuda T, Uchi R, Sakimura S, Nambara S, Saito T, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Ito S, Terashima K, Sakamoto K, Hirakawa M, Honda H, Mimori K: Decreased Expression of Fructose-1,6-bisphosphatase Associates with Glucose Metabolism and Tumor Progression in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res*. 2016;76(11):3265-76..

3. Uchi R, Takahashi Y, Niida A, Shimamura T, Hirata H, Sugimachi K, Sawada G, Iwaya T, Kurashige J, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi

H, Chiba K, Shiraishi Y, Nagae G, Yoshida K, Nagata Y, Haeno H, Yamamoto H, Ishii H, Doki Y, Iinuma H, Sasaki S, Nagayama S, Yamada K, Yachida S, Kato M, Shibata T, Oki E, Saeki H, Shirabe K, Oda Y, Maehara Y, Komune S, Mori M, Suzuki Y, Yamamoto K, Aburatani H, Ogawa S, Miyano S, Mimori K: Integrated Multiregional Analysis Proposing a New Model of Colorectal Cancer Evolution. *PLoS Genet*. 2016;18;12(2):e1005778

4. Sawada G, Niida A, Hirata H (co-first), Komatsu H<sup>\*</sup>, Uchi R, Shimamura T, Takahashi Y, Kurashige J, Matsumura T, Ueo H, Takano Y, Ueda M, Sakimura S, Shinden Y, Eguchi H, Sudo T, Sugimachi K, Yamasaki M, Tanaka F, Tachimori Y, Kajiyama Y, Natsugoe S, Fujita H, Tanaka Y, Calin G, Miyano S, Doki Y, Mori M, Mimori K: An Integrative Analysis to Identify Driver Genes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* 2015;10(10):e0139808.

5. Hirata H, Sugimachi K, Takahashi Y, Ueda M, Sakimura S, Uchi R, Kurashige J, Takano Y, Nambara S, Komatsu H, Saito T, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Atsumi K, Sakamoto K, Doi T, Hirakawa M, Honda H, Mimori K: Downregulation of PRRX1 Confers Cancer Stem Cell-Like Properties and Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2015;22 Suppl 3:S1402-9.

6. Asai K, Nakamura K, Shioyama Y, Sasaki T, Matsuo Y, Ohga S, Yoshitake T, Terashima K, Shinoto M, Matsumoto K, Hirata H, Honda H: Clinical characteristics and outcome of pneumothorax after stereotactic body radiotherapy for lung tumors. *Int J Clin Oncol*. 2015;20(6):1117-21.

7. Sawada G, Takahashi Y, Niida A, Shimamura T, Kurashige J, Matsumura T, Ueo H, Uchi R, Takano Y, Ueda M, Hirata H, Sakimura S, Shinden Y, Eguchi H, Sudo T, Sugimachi K, Miyano S, Doki Y, Mori M, Mimori K: Loss of CDCP1 Expression Promotes Invasiveness and Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2014;21 Suppl 4:S640-7.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Hirata H, Uchi R, Ueda M, Sakimura S, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Atsumi A, Tsurumaru D, Sakamoto K, Sugimachi K, Hirakawa M, Sasaki T, Nakamura K, Honda H, Mimori K: Comprehensive Mutational Analysis of Response to Chemoradiotherapy in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. 15th International Congress of Radiation Research, May 25-29, 2015, Kyoto, Japan

2. 平田秀成、三森功士: 食道発癌・癌進展の宿主側・腫瘍側・疫学環境要因からの三位一体の解明、がんゲノム・エピゲノムセミナー 2015年10月27日 花巻

3. Hirata H, Sugimachi K, Komatsu H, Ueda M, Uchi R, Sakimura S, Masuda T, Iguchi T, Eguchi H, Ito S, Hirakawa M, Honda H, Mimori K: FBP1 suppresses tumor progression and retrieves altered glucose metabolism in hepatocellular carcinoma. 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8-10日 名古屋

4. 平田秀成、杉町圭史、増田隆明、林直樹、井口友宏、江口英利、伊藤修平、寺嶋広太郎、坂本勝美、平川雅和、本田浩、三森功士: Fructose-1,6-biphosphatase 発現異常は肝癌の腫瘍進展・糖代謝異常に寄与する、第18回癌治療増感研究シンポジウム 2016年2月5-6日 奈良

5. 平田秀成、内龍太郎、上田正射、崎村正太郎、小松久晃、南原翔、齋藤衆子、新田吉陽、井口友宏、江口英利、杉町圭史、渥美和重、坂本一美、平川雅和、本田浩、三森功士: エキソームシークエンスによる食道癌化学放射線感受性の多様性を規定する網羅的変異解析、第17回癌治療増感研究シンポジウム、2015年2月6-7日、奈良

6. Hirata H, Kurashige J, Sugimachi K, Uchi R, Ueda M, Sakimura S, Takano Y, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Hirakawa H, Honda H, Mimori M. Mutational Analysis of Peritoneal Disseminated Model in Gastric Adenocarcinoma. 第73回日本癌学会学術総

会、2014年9月25-27日、横浜

7. 平田秀成、杉町圭史、内龍太郎、藏重淳二、上田正射、崎村正太郎、高野裕樹、新田吉陽、江口英利、平川雅和、本田浩、三森功士: 肝細胞癌における PRRX1 の発現異常とがん幹細胞性・治療抵抗性獲得に関する検討、第52回日本癌治療学会学術集会、2014年8月28-30日、横浜

8. 平田秀成: 放射線腫瘍医として知っておきたい分子標的治療 - 放射線治療との併用を中心に -、第26回九州放射線治療セミナー、2014年8月9日-10日、福岡

9. Hirata H, Sugimachi K, Uchi R, Kurashige J, Matsumura T, Ueo H, Takano Y, Ueda M, Sakimura S, Shinden Y, Eguchi H, Sudo T, Hirakawa M, Honda H, Mimori M: Down-regulation of PRRX1 confers cancer stem cell-like properties and poor prognosis in hepatocellular carcinoma The 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, April 5-9, 2014, San Diego, USA

10. 平田秀成、杉町圭史、内龍太郎、松村多恵、新田吉陽、江口英利、主藤朝也、平川雅和、本田浩、三森功士: 肝細胞癌における PRRX1 の発現異常とがん幹細胞性・治療耐性の獲得に関する検討、第16回癌治療増感研究シンポジウム、2014年2月7-8日、奈良

〔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 0 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  
なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

平田 秀成 (HIRATA, Hidenari)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：90721267