

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08123

研究課題名（和文）化学放射線耐性を生む食道癌ゲノム・免疫応答のクローン進化の解明

研究課題名（英文）Chemoradiotherapy resistance and clonal evolution of esophageal cancer genome and immunoreaction

研究代表者

平田 秀成（Hirata, Hidenari）

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員

研究者番号：90721267

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：化学放射線療法（Chemoradiotherapy, CRT）抵抗性の一因と想定される食道がんゲノム異常の時空間的な不均一性や腫瘍免疫に着目し、再発に至るクローンの進化の様相やゲノム異常の臨床的意義を明らかにした。5例は治療前と再発時に原発巣に多領域シーケンスを行い、治療前に存在するドライバー遺伝子変異クローンの多くは再発時も遺残し、CRT後に新規獲得するドライバー遺伝子変異は少数であるという、CRT後再発に至るがんゲノムのクローン進化の様相を報告した。CRT感受性群（17例）と抵抗性群（16例）のゲノム異常を比較したところ、MYC遺伝子の局所的コピー数増加がCRT抵抗性に関与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学放射線療法（Chemoradiotherapy, CRT）は食道がんの有効な治療法の一つだが、高頻度に再発することが治療成績の向上を阻み、臨床上的問題である。CRT抵抗性の原因を解明することは学術的重要性のみならず、社会的意義も大きいと考えられる。本研究はCRTを施行した臨床試料のゲノム解析を行い、CRT抵抗性の原因の一端を明らかにした。本研究の成果はCRT抵抗性の理解を深め、がんゲノム情報に基づくCRTの個別化医療・精密医療の開発や、難治性食道がんの新たな治療開発につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Focusing on spatial and temporal intratumor heterogeneity and immune reaction in esophageal cancer, we revealed the mutation process in chemoradiotherapy (CRT)-resistant clones and the clinical relevance of genetic alterations. In multi-region sequencing of pretreatment and locally recurrent lesions from five cases, most driver gene-altered clones remained after CRT, while few driver gene alterations were acquired at recurrence. When comparing the genetic profile of responders (n = 17) with non-responders (n = 16), we demonstrated that focal copy-number gain at the MYC locus was associated with resistance to CRT.

研究分野：放射線治療

キーワード：放射線治療 クローン進化 化学放射線療法 遺伝子変異 食道癌

1. 研究開始当初の背景

化学放射線療法 (Chemoradiotherapy, CRT) は食道がんの有効な治療法の一つだが高頻度に再発する。治療耐性の一因として遺伝子・腫瘍免疫応答異常の関与が想定されるが、複雑な病態・臨床像を実験系で反映するのは難しく、CRT 耐性に至る検討は十分でない。複雑ながんの治療耐性クロンのゲノム・免疫応答異常を捉えるには、実際の食道がん CRT 症例を対象とした研究が必須である。

がんの複雑な病態・治療抵抗性の原因として、ひとつの腫瘍内の遺伝子異常の不均一な分布「腫瘍内多様性」が注目され、食道がん CRT 耐性への関与も想定される。次世代シーケンサーによるゲノム変異の腫瘍内多様性解析から、発がん～進行がんに至る過程で、遺伝子異常を蓄積しながら生存に有利なクロンが選択されるクロン進化が明らかとなった。「治療」に対して、耐性クロンが引き金となり、再発・再増大に至る耐性クロンの進化が考えられている。

また CRT 後再発に至る耐性クロンの進化において、免疫微小環境に適応できたクロンのみが再発に至ると想定される。クロン進化の解析を食道がん CRT 症例に対し適応することで、CRT 耐性クロンの起源や特徴、耐性メカニズムの解明につながると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は「食道扁平上皮がんゲノム」を時空間で解析し、CRT 後再発に至る「耐性クロンの進化」の様相やゲノム異常の臨床的意義を明らかにすることである。腫瘍免疫応答との関連を検討する。

3. 研究の方法

食道扁平上皮がんに対し CRT (プラチナ製剤+5-FU 製剤を併用した放射線治療) を実施した 33 名の新鮮凍結腫瘍組織 52 検体と末梢血 33 検体由来 DNA 200mg に対し、SureSelect XT Human All Exon V5 Plus Regulatory kit (Agilent 社) を用いて全エクソン領域を濃縮し、次世代シーケンサー (HiSeq 2500、イルミナ社) を用いた全エクソンシーケンスを行った。食道正常粘膜は一見正常でもゲノム変異を蓄積していることが報告されているため (Nature. 2019 Jan;565(7739):312-317)、正常コントロールとして各症例の末梢血を採取し、DNA を抽出した。得られたシーケンスデータをマッピング後、ゲノム異常 (体細胞変異と局所的コピー数異常) を探索した。変異コールは、EBCa11 アルゴリズムを用いた。局所的コピー数異常は、EXCAVATOR と GISTIC2.0 により検出した。体細胞変異のうち、HLA に抗原提示されるネオアンチゲンを、NetMHCpan アルゴリズムで推定した。以下の 2 つの方法で、CRT 症例におけるゲノム異常の意義を評価した。

- (1) 33 名のうち 5 名は治療前と局所再発時に原発巣を複数カ所採取し、食道がんゲノムを時空間解析し、再発に至るクロン進化の過程を解析した。
- (2) 33 名は CRT の治療効果に基づき、CRT 感受性群 (17 名) と CRT 抵抗性群 (16 名) に分類し、それぞれの群のゲノム異常のプロファイルを比較した。

4. 研究成果

治療前および CRT 後局所再発時の原発巣を複数カ所採取した 5 名の解析では、がんゲノムの時空間解析に基づき進化の系統樹を描いた。大部分のドライバー遺伝子異常クロンは治療に対し適応し、CRT 後遺残していた。再発時、多数の遺伝子変異を獲得したが、これらの新規遺伝子変異のうち、食道扁平上皮がんにとって重要なドライバー遺伝子に生じた変異は極少数であった (図 1)。ドライバー遺伝子における局所的コピー数異常も、体細胞変異と同様に多くの治療前に認めたコピー数異常は遺残し、CRT 後に獲得した局所的コピー数異常は少数であった。HLA に抗原提示されるドライバー遺伝子変異も認めた。

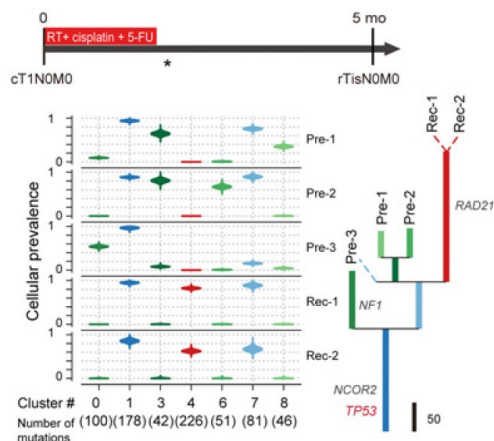


図 1. CRT 後局所再発食道がんのクロン進化

代表的な 1 例を示す。ドライバー変異である TP53 変異は CRT 後も遺残した (青い枝)。CRT 後、治療前だけに認め変異 (緑の枝) は淘汰され、新たに多数の変異 (赤い枝) を獲得した。新規変異のうち他がん種でがんの進展に関与する RAD21 変異を認めたが、当該遺伝子は食道扁平上皮

がんのドライバー遺伝子ではなく、再発における意義は明確でない。(Cancer Res. 2021; 81:4926-4938 より抜粋)

CRT 後再発時に新たに獲得した変異の原因を明らかにするために、変異シグネチャー解析を実施し、変異原である放射線および化学療法の医原性変異の特徴を同定した。再発食道がんの DNA 塩基配列の特徴 (変異シグネチャー) は治療前食道がんとは異なり、短い塩基欠失の増加 (図 2A) や、白金製剤投与量に依存した塩基置換 (図 2B) を伴っていた。短い塩基欠失の長さや切断断端の塩基配列の特徴から、放射線によって生じた DNA 二重鎖切断の修復の際に非相同末端結合によって生じた塩基の欠失に矛盾しない結果であり、短い塩基欠失の増加は放射線治療によって生じた食道がんゲノムの痕跡であることが示唆された。

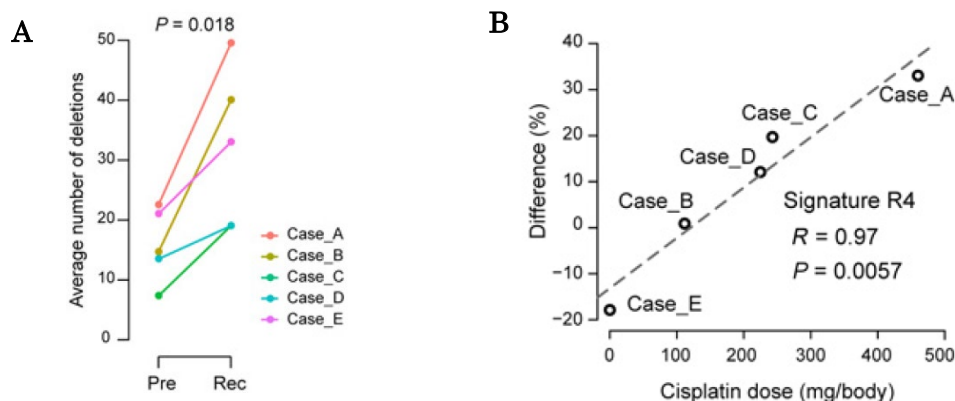


図 2. CRT 後の変異シグネチャーの変遷

- (A) CRT 後局所再発腫瘍では、治療前に比べて腫瘍各検体当たりの平均塩基欠失数が増加した。
- (B) シスプラチン投与量に正の相関を示す変異シグネチャーを同定した
いずれも (Cancer Res 2021; 81:4926-4938 より抜粋)

続いて、治療前腫瘍の 1 カ所と末梢血を採取した 28 名の全エクソンシーケンスを実施した。前述の治療前・CRT 後再発時に腫瘍組織を採取した 5 名の治療前腫瘍組織のシーケンス結果と併せて、治療前食道がん 33 名の全エクソンシーケンスデータから得られた体細胞変異と局所的コピー数異常を解析した。

体細胞変異の解析では、食道扁平上皮がんにおける既知のドライバー遺伝子変異はいずれも本研究では有意に CRT の効果に関連するものは認めなかった。

局所的コピー数異常の解析では、CRT 感受性群もしくは抵抗性群いずれか一方のみでコピー数異常のピークを有する領域を複数認めた (図 3)。多重検定補正後、MYC 遺伝子の局所的コピー数増加は、CRT 抵抗性群で有意に高頻度に認め、CRT 後の無増悪生存割合・全生存割合の低下と有意に関連した。局所再発した原発巣を解析した 5 例のうち、早期に局所再発した 4 例では、MYC コピー数増加は CRT で消失せず遺残し、治療抵抗性に寄与する可能性が示唆された。

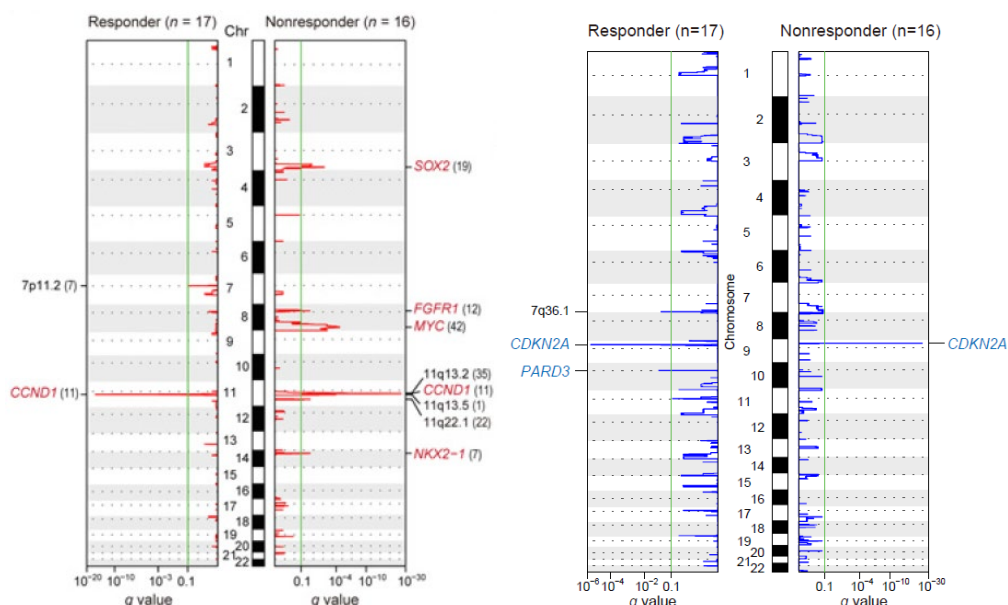


図 3. 局所的コピー数異常と CRT 効果 (Cancer Res. 2021; 81:4926-4938 より抜粋)

GISTIC2.0 で同定された CRT 感受性群と抵抗性群の局所的コピー数の増加 (赤) と低下 (青)

最後に、公共のがん細胞株データベース (Cancer Cell Line Encyclopedia) に登録され、食道病変より採取・樹立された食道扁平上皮がん細胞株 18 種の解析を実施した。MYC コピー数、mRNA や蛋白発現レベル放射線抵抗性と正の相関を示し、臨床試料解析の結果と一致した。食道扁平上皮がん細胞株の RNA シークエンスデータを Gene set enrichment analysis によって解析したところ、Hallmark gene sets のうち、最も放射線抵抗性に関連していたのは、MYC 標的遺伝子群の亢進であり (図 4)、臨床試料の結果と一致した。

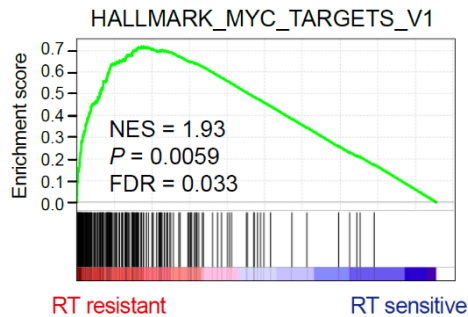


図 4. Gene set enrichment analysis

(*Cancer Res.* 2021; 81:4926-4938 より抜粋)

食道がん CRT 症例の全エクソン解析により、ドライバー遺伝子異常クローンが治療に適応し、再発するゲノム進化の過程を明らかにした。さらにドライバー遺伝子のうち MYC コピー数増加は不良な臨床転帰に関与し、治療抵抗性の潜在的マーカーと考えられ、学術誌への報告や学会発表などで広く周知した。本研究より得られた結果は CRT 抵抗性の理解を深め、プレシジョン CRT 実現に繋がる知見となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirata H et al.	4. 巻 81
2. 論文標題 The Evolving Genomic Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Under Chemoradiotherapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4926-4938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-21-0653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 6件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平田秀成、三森功士、秋元哲夫
2. 発表標題 化学放射線療法へ抵抗性を示す食道扁平上皮がんゲノムのクローン進化
3. 学会等名 第76回日本食道学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平田 秀成
2. 発表標題 化学放射線療法を受けた食道扁平上皮癌ゲノムのクローン進化の解明
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第35回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平田 秀成、三森 功士、秋元 哲夫
2. 発表標題 放射線治療を含むがん治療抵抗性をもたらす遺伝子異常の同定と抵抗性克服を目指すトランスレーショナルリサーチ
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirata H, Niida A, Sugimachi K, Masuda T, Kageyama SI, Motomura Y, Akimoto T, Mimori K.
2. 発表標題 The evolving genomic landscape of esophageal squamous cell carcinoma resistant to chemoradiotherapy
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田秀成、影山俊一郎、中村匡希、平野靖弘、北條秀博、茂木厚、全田貞幹、塩山義之、石神康生、三森功士、秋元哲夫
2. 発表標題 化学放射線療法へ抵抗性を示す食道扁平上皮癌のゲノム進化
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 平田秀成、新井田厚司、塩山義之、三森功士
2. 発表標題 化学放射線治療耐性を生む食道癌ゲノムのクローン進化
3. 学会等名 第1回日本癌学会若手の会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田 秀成, 新井田 厚司, 増田 隆明, 塩山 善之, 森田 勝, 本田 浩, 藤 也寸志, 三森 功士
2. 発表標題 化学放射線治療耐性を生む食道扁平上皮癌ゲノムのクローン進化の解析
3. 学会等名 第73回日本食道学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田 秀成, 新井田 厚司, 塩山 善之, 三森 功士
2. 発表標題 Clonal evolution in relapsed esophageal cancer following chemoradiotherapy
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirata H, Niida A, Shioyama Y, Mimori K.
2. 発表標題 Mutational dynamics and clonal evolution in esophageal cancer following chemoradiotherapy
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田秀成
2. 発表標題 がんゲノム医療・トランスレーショナルリサーチがもたらす放射線治療の展望
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019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	新井田 厚司 (Niida Atsushi) (00772493)	東京大学・医科学研究所・講師 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	吉武 忠正 (Yoshitake Tadamasa) (40452750)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	松本 圭司 (Matsumoto Keiji) (40467907)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	浅井 佳央里 (Asai Kaori) (40635471)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	鶴丸 大介 (Tsurumaru Daisuke) (90419565)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	西牟田 雄祐 (Nishimuta Yusuke) (10635220)	独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他部局等・消化器・内視鏡科医師 (87102)	
研究分担者	塩山 善之 (Yoshiyuki Shioyama) (10323304)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	

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