

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19916

研究課題名(和文) 食道癌に対する根治的化学放射線療法の抵抗性予測とメカニズムの解明

研究課題名(英文) Predict response to CRT for esophageal squamous cell carcinoma, and analysis the mechanism of resistance to CRT

研究代表者

岸野 貴賢 (Kishino, Takayoshi)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：60738681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌に対する根治的化学放射線療法において、治療前に抵抗性を予測する研究を行った。放射線によるDNA損傷に注目し、その修復遺伝子46個について次世代シーケンサーを用いて根治的化学放射線療法を受けた食道癌患者の食道癌51検体の変異解析を行った結果、PARP1遺伝子の多型が治療抵抗性と相関を認めることが分かった。その結果を検証するために、根治的化学放射線療法を受けた別の患者の治療前の生検検体61例について、同様の解析を行ったところ、治療抵抗性と相関しておらず、PARP1の多型は、治療抵抗性を予測しないという結果であった。

研究成果の概要(英文)：To predict response to CRT for ESCC, I focused on DNA repair pathway. I selected 46 candidate DNA repair genes for mutation analysis. Then, I analyzed 51 biopsy samples for the 46 DNA repair genes by target deep sequencing, and PARP1 SNP associated with response to CRT. To confirm the result, I analyzed another 61 biopsy samples, and I can not confirm the result. PARP1 SNP may not be predict resistance to CRT for ESCC.

研究分野：食道癌

キーワード：食道癌 根治的化学放射線療法 治療抵抗性 効果予測マーカー

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌に対する根治的化学放射線療法(以下、dCRT)は、臨床病期において完全奏効割合 60%と高く(Kato, Muro et al. 2011)、手術を望まない患者において標準的な治療となっている。しかし、約 40%の患者では、治療後に癌の遺残を認め(Cooper, Guo et al. 1999)、外科的切除を追加するものの重篤な合併症が多く、非治癒切除率も高い(Tachimori, Kanamori et al. 2009, Wang, Kishino et al. 2014)。もし、dCRT前に治療感受性を判断できれば、適切な治療の選択が可能となり臨床上非常に有益である。

過去、食道癌において、mRNA, タンパク質の発現、SNP に注目して dCRT に対する感受性マーカーの研究が報告されているが、感度や特異度が低い、validation が行われていない、腺癌と混在しているといった状況で、未だ確立されていない。臨床への応用可能なレベルの治療効果予測マーカーの開発が急務である。

2. 研究の目的

食道扁平上皮癌に対する根治的化学放射線療法の治療効果予測マーカーの開発を行う。

3. 研究の方法

放射線による DNA 損傷は 2 重鎖切断である。その修復経路(非相同末端結合と相同組み換え修復)に注目し、その修復経路に関連する遺伝子から、重要な遺伝子を選択する。選択した修復遺伝子で次世代シーケンサー用の解析 Panel を作成。

51 人の実際の食道癌検体から DNA を抽出し、作成した panel を用いて次世代シーケンサーで解析する。その解析結果より体細胞変異、遺伝子多型などの変異の有無を解析し、治療抵抗性と相関のありそうな候補遺伝子抽出する(Screening)。

Screening の結果を検証するため、別の検体を用いて検証する(validation)。新たに収集した食道癌患者の検体から DNA 抽出し、sanger シーケンスにて screening で抽出された候補遺伝子変異の有無を調べる。変異と治療抵抗性との間の相関関係を調べ、validation する。

Validation できた遺伝子変異については、食道癌細胞株を用いて、放射線の抵抗性及び細胞増殖への影響を明らかにするなど機能解析を行う。

4. 研究成果

放射線によって起こる DNA 損傷に注目し、46 個の DNA 修復遺伝子(98.4%のエクソン領域をカバー)で次世代シーケンサー用の解析 Panel を作成(Repair Panel)。根治的化学放射線療法を受けた 51 人の食道癌患者の治療前の検体を解析した。

体細胞変異については、29 の症例に合計 77 個の突然変異を認めた。突然変異の有無と治療抵抗性との関連を解析したところ、治療の抵抗性と相関を認めるような変異は認められなかった。

次に、遺伝子の多型に注目して解析を行ったところ、9501 か所の遺伝子多型を認めた。そのうち、アミノ酸変化を伴う遺伝子多型にのみ注目し、治療抵抗性群や感受性群においてそれぞれの遺伝子多型を伴う患者数の割合を比べてたところ、PARP1(1 箇所)や BRCA2 (2 箇所)の多型が dCRT の抵抗性と相関していることを発見した(図 1)。

PARP1 の多型は、治療感受性群においては 14/29 例(48%)、抵抗性群においては 20/22 例(91%)であり、Odds 比 11 で抵抗性群に多かった。

BRCA2 の多型は、2 か所とも同様の割合で、治療感受性群においては 1/29 例(3%)、抵抗性群においては 7/22 例(32%)であり、Odds 比 13 で抵抗性群に多かった。(図 1)

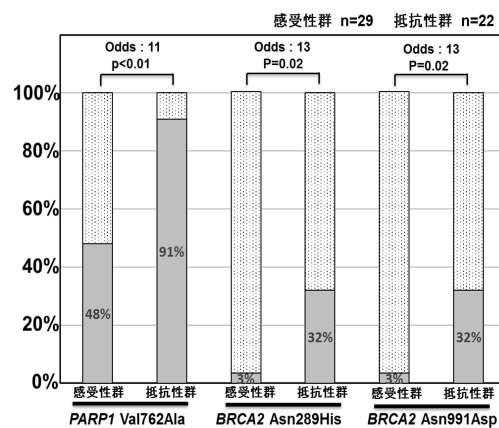


図 1 治療感受性、抵抗性群における SNP を認める患者の割合。治療抵抗性群において SNP を認める患者の割合が多い。

3 箇所が多型のなかで、PARP1 Val762Ala は、触媒ドメイン上に存在すること(図 2) 乳がんや肺癌、前立腺がんにおいて、予後不良との関連を認めるとの報告から、重要な多型であると考え解析の第一候補とした。

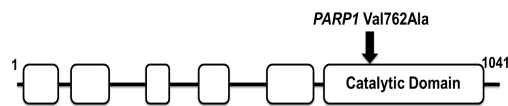


図2 PARP1 Val762Ala の位置。Catalytic domain上に存在しており、重要と考える

また、PARP1 遺伝子の多型を持つ食道癌患者と持たない患者群に分けて生存解析を行うと、PARP1 遺伝子の多型を持つ食道癌患者は予後不良であることも分かった。(図3)

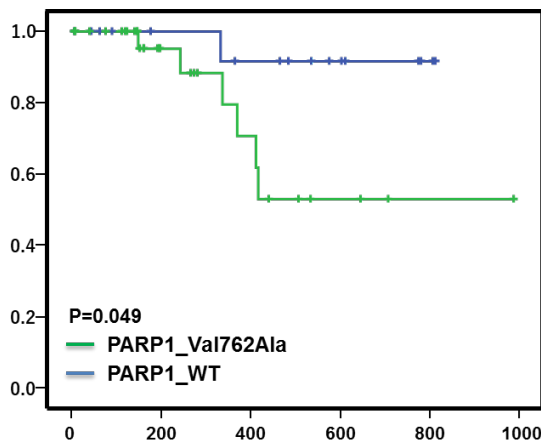


図3 生存曲線
PARP1 Val762Ala をもつ患者群は有意に予後不良であることが分かった (p=0.049)

以上の結果を検証するため、食道癌に対して根治的放射線療法を行った患者の治療前の生検検体を新たに61検体収集した。内訳は、感受性群41例、抵抗性群20例であった。61検体すべての検体のDNAを抽出し、Sanger法によりPARP1 Val762Alaの多型の有無を解析したところ、59例について解析が成功した。

59例中、PARP1 Val762Alaの多型を認めた症例が38例、多型を認めなかった症例が21例であった。

PARP1 Val762Alaの多型と治療抵抗性との関連を解析してみると、感受性群で多型あり26例(65%)、多型なし14例(35%)、治療抵抗性群では多型あり12例(63%)、多型なし7例(37%)であり、両群間に有意差を認めなかった。

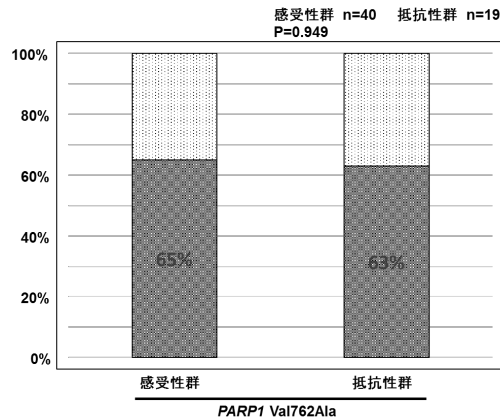


図4 別の検体での検証
感受性群、抵抗性群においてPARP1 Val762Alaの多型の割合に差はない。

以上より、PARP1の多型は食道癌の根治的放射線療法の治療抵抗性を予測するマーカーとは成りえないことが分かった。

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2件)

Nakazato H, Takeshima H, Kishino T, Kubo E, Hattori N, Nakajima T, Yamashita S, Igaki H, Tachimori Y, Kuniyoshi Y, Ushijima T. Early-Stage Induction of SWI/SNF Mutations during Esophageal Squamous Cell Carcinogenesis. *PLoS One*. 査読あり, 2016 Jan 26;11(1):e0147372.

doi: 10.1371/journal.

Kishino T, Niwa T, Yamashita S, Takahashi T, Nakazato H, Nakajima T, Igaki H, Tachimori Y, Suzuki Y, Ushijima T. Integrated analysis of DNA methylation and mutations in esophageal squamous cell carcinoma, *Mol Carcinog*. 査読あり, 2016 Dec;55(12):2077-2088.

doi: 10.1002/mc.22452.

[学会発表](計3件)

岸野貴賢、発癌の素地による食道扁平上皮癌のリスク評価、第37回四国食道疾患研究会、2017年1月21日、高知城ホール(高知県・高知市)

Takayoshi Kishino, Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations in Esophageal squamous cell carcinoma. ISDE 2016, 2016年9月20日, Singapore

岸野 貴賢、Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations in Esophageal squamous cell carcinoma. 第 69 回日本食道学会学術集会、2015 年 7 月 3 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸野 貴賢 (KISHINO, Takayoshi)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：60738681

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()