

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19939

研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫における次世代シーケンサーを用いた抗癌剤耐性メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of chemoresistance mechanism using next generation sequencer in malignant pleural mesothelioma

研究代表者

古川 高意 (Furukawa, Takaoki)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号：00736530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：免疫染色では葉酸代謝酵素DHFRが治療効果や予後と有意に関連していた。化学療法前後のFFPE検体27例でCancer hot spot panel v2にて50遺伝子を検索、MPMではTP53、IDH2、ABL1、FBXW7、PTENが増幅していた。十分なRNAが抽出できた12検体をOncoPrint Comprehensive assayにて解析、BAP1(5例)、NF2(3)、NOTCH1、ABL1、ATM、BRCA2、CCND1、FBXW7、FGFR3、NKX2-7、PTEN、STK11、TSC1(各1)に変異を認めた。
現在凍結標本で、化学療法耐性への関与が高い候補遺伝子を絞り込んでいる。

研究成果の概要(英文)：In immunostaining study, DHFR expression which is folic acid metabolizing enzyme before chemotherapy correlated significantly with the effect of chemotherapy and prognosis. DNA and RNA were extracted from 27 FFPE specimens before and after chemotherapy and 50 genes were searched by Cancer hot spot panel v 2 using NGS. Results were obtained from 19 cases, and TP53, IDH2, ABL1, FBXW7, PTEN were amplified in MPM. Analyzing 12 specimens that sufficient RNA were extracted, mutations were observed in BAP1 (5 cases), NF2 (3 cases), NOTCH1, ABL1, ATM, BRCA2, CCND1, FBXW7, FGFR3, NKX2-7, PTEN, STK11, TSC1 (one each) using OncoPrint Comprehensive assay. In the analysis using FFPE, the yield of DNA and RNA in biopsy material before chemotherapy was poor, and comparative analysis was difficult. Currently, DNA and RNA are extracted from frozen specimens of MPM 18 cases before and after chemotherapy, and NGS is used to narrow down candidate genes that are highly involved in chemoresistance mechanism.

研究分野：胸部外科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 抗癌剤耐性メカニズム 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫における (CDDP、PEM) 抗癌剤耐性

近年社会問題化している悪性胸膜中皮腫 (MPM) に対しては、シスプラチン (CDDP) + ペメトレキセド (PEM) による術前化学療法後に切除術が行われる。PEM は葉酸代謝拮抗薬で、TS、DHFR、GARFT などの葉酸代謝酵素を阻害することで抗腫瘍効果を発現している。一方、肺癌においてシスプラチンはその効果発現に ERCC1 が関与していることが証明されているが、MPM での細胞内動態は未解明な点も多い。MPM において、次世代シーケンサーを用いて、抗癌剤 (CDDP、PEM) 関連遺伝子の変異、および術前化学療法前後での遺伝子発現を解析し、抗癌剤耐性に関する分子を絞り込む。我々の少数例での予備実験では、免疫染色による化学療法前の DHFR 発現がその後に行われた切除術後の予後、再発と有意に関連していた。

悪性中皮腫における癌幹細胞と抗癌剤耐性

癌幹細胞 (CSCs) は自己複製能、多分化能、腫瘍形成能など造血幹細胞、体性幹細胞と類似した機能を有し癌組織の根源とされる。癌幹細胞は細胞休止期にあるため、抗癌剤や放射線治療に対して耐性を示し、癌再発の原因となる細胞であると考えられている。また、癌幹細胞は非がん細胞であるストローマ細胞や血管内皮細胞、免疫細胞により構成される微小環境 (ニッチ) によって維持され、さらに癌幹細胞が正常マクロファージを「発がん活性マクロファージ」に転換することで、癌幹細胞の抗癌剤耐性において重要な役割を果たすことが明らかになっている (Jinushi M et al. PNAS, 2011)。化学療法前後の MPM 検体において、癌幹細胞を維持する遺伝子変異、遺伝子発現を標的化した次世代シーケンサーによる DNA、RNA 解析を行い、臨床病理学的因子との検討により、特に抗癌剤耐性に関連する分子の抽出を行う。

悪性中皮腫における低酸素応答機構を介した悪性度獲得と抗癌剤耐性

悪性胸膜中皮腫 (MPM) は元来血流の豊富な胸膜に発症し、その進展に VEGF の強い関与が報告されているが、VEGF 阻害剤である Bevacizumab の抗腫瘍効果は一部の MPM 症例に限られる。我々は術前化学療法前後に行った FDG-PET における SUVmax の変化率が MPM の手術成績を鋭敏に予測し、治療法選択に有用であることを世界で初めて報告した (Ann Oncol, 2013)。このことは、MPM の悪性度獲得のメカニズムにおいても、低酸素応答因子である HIF-1, Glut-1, VEGF および NOS, TGF, ANP, Endothelin 1, Vimentin, MMPs, Cathepsin D, などが関与していることを示唆している。MPM における、化学療法前後での低酸素応答機構に関連する遺伝子変異および遺伝子発現の変化を解析し、抗癌剤耐性と低酸素バイオロジーとの関連を検討する。

2. 研究の目的

近年社会問題化している悪性胸膜中皮腫 (MPM) に対して、シスプラチン (CDDP) とペメトレキセド (PEM) による術前化学療法後に切除術を行っているが、極めて予後不良な群が存在し、治療効果を予測した個別の制御法開発が急務である。本研究の目的は、包括的なゲノム解析により複数の体細胞変異、遺伝子発現を同時に解読可能な次世代シーケンサーを用いて、CDDP、PEM それぞれの作用経路、癌幹細胞、低酸素応答機構を介した悪性度獲得の観点から MPM の抗癌剤 (CDDP、PEM) 耐性メカニズムを解析し、MPM に対する最適な新規治療戦略を探究することである。

3. 研究の方法

化学療法前後 (paired analysis) の MPM 組織における、CDDP、PEM それぞれの作用経路 (CDDP/PEM related)、癌幹細胞 (CSCs related)、低酸素応答機構を介した悪性度獲得 (hypoxia related) の観点から、次世代ターゲットシーケンスによる RNA 解析を行い、遺伝子発現の変化と抗癌剤耐性との関連を解析する。また、MPM 検体における癌関連遺伝子の変異および遺伝子発現を探索し、臨床病理学的特徴、予後との関連を解析した。

次世代シーケンサー (Genome Analyzer IIX (illumine)、広島大学) を用いて、MPM 組織における遺伝子変異、遺伝子発現の解析を行った。フローセル上に固定し増幅させた DNA 断片のシーケンスをハイスループットに行い、DNA、RNA シーケンス解析が可能である。

化学療法前の MPM のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 由来試料および血漿検体において、癌関連遺伝子を標的とするパネルを用いた次世代シーケンサーによる体細胞遺伝子変異、遺伝子発現の解析を行った。体細胞変異が同定された場合には、データベースから、その変異が活性型であるか、機能喪失型であるか判断し、臨床病理学的特徴、予後との解析を行った。

MMP における術前化学療法前の生検材料、および同症例の手術検体の FFPE 由来の試料を用いて paired analysis を行う。次世代シーケンスにより、3 つの観点に基づいた標的遺伝子を少量ヒトサンプル (DNA: 10ng) での解析が可能である。RNA シーケンスにより、CDDP/PEM related gene の観点から、術前化学療法前後での遺伝子発現の変化を解析し、MPM の抗癌剤耐性メカニズムに重要な関与を示すいくつかの遺伝子を同定した。

化学療法前後の MPM 検体を用いて特定された抗癌剤耐性遺伝子のタンパク発現を免疫染色で検証し、臨床データとの相関性を解析した。

4. 研究成果

近年社会問題化している悪性胸膜中皮腫 (MPM) に対して、シスプラチン (CDDP) とペメトレキセド (PEM) による術前化学療法後に切除術を行っているが、極めて予後不良な群が存在し、治療効果を予測した個別の制御法開発が急務である。本研究の目的は、包括的なゲノム解析により複数の体細胞変異、遺伝子発現を同時に解読可能な次世代シーケンサー (NGS) を用いて、CDDP、PEM それぞれの作用経路、癌幹細胞、低酸素応答機構を介した悪性度獲得の観点から MPM の抗癌剤 (CDDP、PEM) 耐性メカニズムを解析し、MPM に対する最適な新規治療戦略を探究することである。

免疫染色による検討では化学療法前の葉酸代謝酵素である DHFR 発現が化学療法、腫瘍切除後の予後、再発と有意に相関していた。さらに化学療法前後の FFPE 検体 2 7 例から DNA, RNA 抽出を行い、NGS を用いて Cancer hot spot panel v2 (CHPv2) により 50 gene を網羅的に検索した。19 例より結果が得られ、TP53, IDH2, ABL1, FBXW7, PTEN の各遺伝子が MPM 症例で増幅していた。さらに十分量の RNA が抽出できた 12 検体を用いて Oncomine Comprehensive assay を用いて解析したところ、BAP1 (5 例), NF2 (3 例), NOTCH1 (1 例), ABL1, ATM, BRCA2, CCND1, FBXW7, FGFR3, NKX2-7, PTEN, STK11, TSC1 (各 1 例) に変異を認めた。FFPE を用いた解析の問題点は、特に化学療法前の生検材料での DNA, RNA の収率が悪く、化学療法前後の比較解析が困難な点にあった。現在化学療法前後の MPM 18 症例の凍結検体より DNA, RNA の抽出を行い、NGS を用いて、化学療法耐性メカニズムへの関与の可能性がより高い候補遺伝子の絞り込みを行っている。

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 3 件)

1. Furukawa T, Hamai Y, Hihara J, Emi M, Yamakita I, Ibuki Y, Okada M.

Clinical Significance of FDG-PET to Predict Pathologic Tumor Invasion and Lymph Node Metastasis of Superficial Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Ann Surg Oncol. 2016;23:4086-4092. (査読有)

2. Hamai Y, Hihara J, Emi M, Furukawa T, Yamakita I, Kurokawa T, Okada M.

Ability of Fluorine-18 Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography to Predict Outcomes of Neoadjuvant Chemoradiotherapy Followed by Surgical Treatment for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Ann Thorac Surg. 2016 Oct;102(4):1132-9. (査読有)

3. Furukawa T, Miyata Y, Kushitani K, Mimae

T, Tsutani Y, Takeshima Y, Okada M. Association between [18F]-fluoro-2-deoxyglucose uptake and expressions of hypoxia-induced factor 1 and glucose transporter 1 in non-small cell lung cancer. Jpn J Clin Oncol. 2015;45:1154-61. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Furukawa T, Miyata Y, Kushitani K, Mimae T, Tsutani Y, Takeshima Y, Okada M.

Association between [18F]-fluoro-2-deoxyglucose uptake and expressions of hypoxia-induced factor 1 and glucose transporter 1 in non-small cell lung cancer.

25th World Society of Cardiothoracic Surgeons annual meeting and exhibition 2015. 19-22 Sep 2015, Edinburgh (Scotland)

〔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

古川 高意 (FURUKAWA TAKAOKI)

広島大学・病院 (医)・病院助教

研究者番号: 00736530

(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

宮田義浩 (MIYATA YOSHIHIRO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所准教授

岡田守人 (OKADA MORIHITO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所教授

武島幸男 (TAKESHIMA YUKIO)

広島大学大学院医歯薬保健学研究院 病理
学研究室教授