

令和元年6月3日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10397

研究課題名(和文)食道癌ゲノム・エピゲノムの腫瘍内不均一性解析による化学放射線療法耐性機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of genomic and epigenomic intratumoral heterogeneity reveals mechanisms of resistance to chemoradiotherapy in esophageal cancer

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌に対する化学放射線治療(CRT)抵抗性の原因を調べるため、ひとつの腫瘍内の遺伝子異常の不均一な分布に注目した。CRT後に局所再発した3症例に対し、食道原発巣と再発巣をマルチサンプリングした。腫瘍内の各領域および正常末梢血より抽出したDNAに対し全エキソームシーケンシングを行った。局所再発病変はCRT前と異なるゲノムプロファイルを示した。食道癌ゲノムの腫瘍内不均一性を解析することで、内因性のCRT抵抗性変異を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学放射線治療(chemoradiotherapy, 以下CRT)は食道癌への有効な治療の一つだが、再発する症例をしばしば経験する。ひとつの癌の内部における遺伝子異常の不均一な分布(腫瘍内不均一性)が治療抵抗性にかかわることがしており、本研究では食道癌のCRT抵抗性の原因となる腫瘍内不均一性の様相を捉えた。治療標的となる遺伝子異常の発見は治療方法の開発につながると予想され、その社会的意義は多大である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed genomic intratumor heterogeneity of esophageal cancer to investigate the mechanisms of resistance to chemoradiotherapy (CRT). DNA was extracted from multi-sampling pre-treatment tumor tissues, recurrent tumor tissues, and paired peripheral normal blood from three patients with local recurrence after CRT. Each sample was subjected to multi-region whole exome sequencing. Pre-treatment and recurrent tumors showed a distinct genomic alterations. Analyzing genomic intratumor heterogeneity, we found intrinsic alterations involved in CRT in esophageal cancer.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：化学放射線耐性 ゲノム エピゲノム 腫瘍内不均一性 食道癌 放射線腫瘍学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学放射線治療 (chemoradiotherapy, 以下 CRT) は食道癌への有効な治療の一つだが、再発する症例をしばしば経験する。切除可能進行食道癌における根治的 CRT の 5 年生存率はわずか 37% である (第 2 相試験、JCOG9906)。さらにより早期の臨床病期 1 期の食道においてさえも、観察期間内に根治的 CRT 後 50% 程度に再発を生じ (第 2 相試験、JCOG9708)、食道癌に対する CRT の治療効果は十分とは言えない。CRT 耐性機構の解明に向け、耐性に関与する遺伝子異常が研究されているが、多くは細胞・動物実験による単一遺伝子異常の解析である。臨床上有用ながんの治療耐性にかかわる遺伝子異常を捉えるためには、実際の食道癌 CRT 症例を対象とした新たな包括的遺伝子解析手法が必要である。

近年、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「腫瘍内不均一性 (intra-tumor heterogeneity)」が注目され、食道癌 CRT 耐性への関与も想定されている。1 症例の腫瘍が、肉眼的・組織学的に不均一であることは古くから知られている。次世代シーケンサーによる包括的遺伝子解析技術の進歩に伴い、「ゲノムレベルにも腫瘍内不均一性が存在する」ことがマルチサンプリングした複数の癌種でも確認された。腫瘍内不均一性の解析により、癌が進展する過程で遺伝子異常を蓄積しながら生存に有利なクローンが選択されて生き残り、不均一性 (多様性) を獲得する。治療に対し、がんは不均一な中に存在する耐性クローンが生き残り、再発・再増大に至る。これまで私たちはマルチサンプリングした大腸癌に対して、エキソームシーケンス・SNP アレイ・メチル化アレイ・発現アレイを行った。数理・統合解析により、ゲノムのみならずエピゲノムレベルにも腫瘍内不均一性が存在し、そのことが転写異常や癌の進展を引き起こすという、大腸癌ゲノムの腫瘍内不均一性を明らかにした [文献]。

同様の手法で、治療耐性に対する腫瘍内不均一性の寄与もグリオーマ術後化学療法 [文献] などで検討されている。しかし CRT に対する抵抗性の原因となる腫瘍内不均一性の詳細は明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では腫瘍内不均一性に着目し、食道扁平上皮癌に対する CRT 抵抗性に対する腫瘍内不均一性の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 倫理審査の承認に基づいた同意を得た根治的 CRT を実施した食道扁平上皮癌患者を登録した。上部消化管内視鏡検査の際、食道癌の原発巣を根治的 CRT 前および局所再発時に複数箇所、生検を行い、迅速に凍結保存した。さらに CRT 開始前には採血時に末梢血を採取し、凍結保存した。

(2) 得られた試料 (治療開始前の原発巣・局所再発腫瘍・正常末梢血) より DNA と RNA を抽出した。このうち抽出された DNA からアジレント社の SureSelect Human All Exon V5 + Regulatory によって解析対象遺伝子領域をキャプチャし、次世代シーケンサー (HiSeq 2500, イルミナ社) を用いた全エキソームシーケンスを施行した。腫瘍内の各領域における遺伝子異常 (体細胞変異) を検出し、空間的な不均一性の評価を行った。さらに、腫瘍内の遺伝子異常の不均一な分布を CRT 前から局所再発に至る時系列で評価し、耐性に関与する体細胞変異の特徴を捉えた。

4. 研究成果

(1) 根治的 CRT (65.4Gy + シスプラチン + 5-FU) を完遂した登録された食道扁平上皮癌患者のうち、局所再発を来した臨床病期 T1bN0M0 の 2 症例 (症例 1、症例 2) および臨床病期 T2N0M0 (症例 3) の食道扁平上皮癌患者より、CRT 前原発巣および局所再発腫瘍をマルチサンプリングした。いずれの症例も、CRT 終了後の内視鏡にて局所の生検において病理学的に癌の遺残を認めず、病理学的に CRT 後に一旦寛解に至ったと考えられた。採取した生検検体は 3 症例で合計 16 検体 (全症例合計で CRT 前原発巣 10 領域、再発腫瘍 6 領域) であった。各領域の検体から採取した CRT 前の原発巣・局所再発腫瘍・正常末梢血からなる試料に対し、タンパク質に翻訳されるゲノムの coding 領域が、少なくとも平均深度 80x 程度となるようにシーケンスを実施した。

(2) 原発巣の各領域における検出された coding 領域の体細胞変異数の平均は、症例 1 で CRT 前は 82 個・再発時 151 個、症例 2 では CRT 前 82 個・再発時は 113 個、症例 3 では CRT 前 101 個・再発時は 118 個であり、再発時に多い傾向であった。これらの同定された全ての体細胞変異のうち、初発時と再発時いずれの原発巣にも認められた変異数は半数にも満たなかった。3 症例の食道扁平上皮癌の原発巣と CRT 後の再発腫瘍では、いずれの症例も異なるゲノムプロファイルを有することが明らかとなった。

(3) 本研究で同定された体細胞変異は、以下の3点に分別することができた。1点目は、CRT前の原発巣・再発腫瘍において一貫して全域に認める異常は、根治的CRTに対する内因性の耐性に寄与すると考えられる。2点目はCRT後の再発時にのみ認められた体細胞変異であるが、これは2つに細分化される。ひとつはCRT後新たに出現した異常、すなわち獲得耐性に関与する変異であり、もうひとつは治療前に散在しマルチサンプリングでも捕獲できなかったCRT耐性マイナークローンが、CRT後再発時に優勢となり顕在化した変異である。3点目は、CRT前の原発巣においてのみ同定された変異であり、特に治療前に腫瘍全域に存在していた変異が再発時に全く同定できなくなった場合、そのような変異は根治的CRTによって淘汰された変異であったと考えられた。

なおひとつの腫瘍を領域ごとにマルチサンプリングする解析手法は、腫瘍内の不均一性を評価するのみでなく、CRT後再発腫瘍においてのみ認められた変異やCRTによって淘汰された変異への評価の精度を向上させることに寄与した。すなわちCRT前から変異は一部にのみ存在していたがサンプリングされず再発時にのみ検出されたのではないかという事象や、再発時に検出されなかったけれども再発腫瘍の一部の領域に残っているのではないかという事象を減らすことに貢献し、変異の検出精度向上につながった。

今回CRT後尾再発腫瘍において同定された特定の遺伝子異常についてより詳細な解析を行うとともに、食道癌の遺伝子データベースを用いた耐性遺伝子異常の臨床的意義の検証を検証する。さらにDNAメチル化シークエンスやRNAシークエンスを実施・完了することで、ゲノムのみならずエピゲノムレベルでも腫瘍内不均一性を評価する。ゲノム・エピゲノムの腫瘍内の不均一性が転写異常を引き起こし、食道癌に対するCRT抵抗性への関与の解明につなげたい。

<引用文献>

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;12(2):e1005778.

Johnson BE, Mazor T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, Fouse SD, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Asthana S, Jalbert LE, Nelson SJ, Bollen AW, Gustafson WC, Charron E, Weiss WA, Smirnov IV, Song JS, Olshen AB, Cha S, Zhao Y, Moore RA, Mungall AJ, Jones SJM, Hirst M, Marra MA, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Chang SM, Taylor BS, Costello JF. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science.* 2014;343(6167):189-193.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Hisano O, Nonoshita T, Hirata H, Sasaki T, Watanabe H, Wakiyama H, Ono M, Ohga S, Honda H.

Additional radiotherapy following endoscopic submucosal dissection for T1a-MM/T1b-SM esophageal squamous cell carcinoma improves locoregional control.

Radiat Oncol. 2018;13(1):14. 査読あり

DOI: 10.1186/s13014-018-0960-y

Shibamoto M, Hirata H, Eguchi H, Sawada G, Sakai N, Kajiyama Y, Mimori K

The loss of *CASP4* expression is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2017;13:1761-6. 査読あり

DOI:10.3892/ol.2017.5646

[学会発表](計12件)

平田 秀成: ゲノム医療時代における放射線治療の役割、第9回日本放射線腫瘍学会放射線生物学セミナー、2019年

Hirata H, Ohga S, Niida A, Yoshitake T, Asai K, Nakashima T, Tsurumaru D, Nishimuta Y, Muraki T, Sasaki T, Nomoto S, Mimori K, Honda H. Mutational Dynamics of Primary

and Recurrent Esophageal Squamous Cell Carcinoma Treated with Chemoradiotherapy. 60th American Society for Radiation Oncology Annual Meeting, 2018

平田 秀成、大賀才路、新井田厚司、吉武忠正、浅井佳央里、松本圭司、中島孝彰、鶴丸大介、西牟田雄祐、村木俊夫、佐々木智成、野元諭、三森功士、本田浩：全エクソームシーケンスが明らかにした食道癌の化学放射線耐性にかかわる体細胞変異、日本放射線腫瘍学会第31回学術大会、2018年

Hirata H, Ohga S, Niida A, Saito T, Tsurumaru D, Mimori K, Honda H. Somatic Copy Number Alterations Associate with Chemoradiotherapy Response in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. 第77回日本癌学会学術総会、2018年

平田 秀成：放射線治療におけるがんゲノム解析を用いた precision medicine、第16回日本臨床腫瘍学会学術集会、2018年

平田 秀成、新井田 厚司、大賀 才路、吉武 忠正、浅井 佳央里、松本 圭司、中島 孝彰、鶴丸 大介、野元 諭、三森 功士、本田 浩：食道癌に対する化学放射線療法症例における再発クローンの検討、第56回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会、2018年

平田 秀成：バイオインフォマティクスによる 放射線生物学の革新、第8回放射線生物学セミナー、2018年

Hirata H, Niida A, Ito S, Uchi R, Saito T, Terashima K, Ohga S, Sakamoto K, Hirakawa M, Honda H, Mimori K. Genome-wide Copy Number Analysis of Chemoradiotherapy Response in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. The 1st Meeting of the Federation of Asian Organization for Radiation Oncology. 2016

Hirata H, Ito S, Niida A, Uchi R, Saito T, Masuda T, Hayashi N, Kuroda Y, Eguchi H, Hirakawa M, Honda H, Mimori K. Genomic correlates of response to chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma. 第75回日本癌学会学術総会、2016年

平田 秀成：食道癌・肝癌ゲノムの多様性とトランスオミックス解析、平成28年度がんゲノム・エピゲノム、数理統計解析についての勉強会、2016年

平田 秀成、杉町 圭史、小松 久晃、増田 隆明、林 直樹、江口 英利、伊藤修平、平川雅和、本田 浩、三森 功士：肝癌における Fructose-1,6-biphosphatase 発現異常と腫瘍進展・糖代謝異常の検討、第25回 日本癌病態治療研究会、2016年

平田 秀成、齋藤 衆子：マルチサンプリング解析における統計解析 -少ない症例数における統計学的処理について、次世代シーケンス解析における統計・バイオインフォマティクス研究会、2016年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等 該当なし

6. 研究組織
(1)研究分担者

研究分担者氏名：新井田 厚司

ローマ字氏名：(NIIDA, atsushi)

所属研究機関名：東京大学
部局名：大学病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：00772493

研究分担者氏名：平川 雅和
ローマ字氏名：(HIRAKAWA, masakazu)
所属研究機関名：九州大学
部局名：大学病院
職名：准教授
研究者番号（8桁）：20380454

研究分担者氏名：三森 功士
ローマ字氏名：(MIMORI, koshi)
所属研究機関名：九州大学
部局名：大学病院
職名：教授
研究者番号（8桁）：50322748

(2)研究協力者
該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。