

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18445

研究課題名(和文) 網羅的エクソーム解析による細胞傷害性抗がん剤感受性マーカーの同定

研究課題名(英文) Exome sequencing of cancer related genes to identify genetic markers for sensitivity to cytotoxic anticancer drugs

研究代表者

宇田川 智野 (Udagawa, Chihiro)

公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター・客員研究員

研究者番号：20774160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞傷害性抗がん剤に対する感受性あるいは抵抗性を予測するための遺伝的バイオマーカーを同定することを目的とした。9種類の細胞傷害性抗がん剤に対する感受性情報を取得済みである79 nude mouse xenograft (ヒト腫瘍組織異種移植片)より抽出したDNAを用いて、409がん関連遺伝子のエクソームシーケンスを行い、検出された変異と抗がん剤感受性の関連解析を行った。35変異において9種類の細胞傷害性抗がん剤いずれかとの関連が示唆された。これらのデータの蓄積により、最終的にはがん患者一人ひとりに、より効果的で毒性の低い抗がん剤治療の提供につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In the current study, to identify genetic markers for sensitivity or resistance to 9 cytotoxic anticancer drugs, all exons of 409 genes associated with cancer from 79 cancer xenografts in mice that had been established from 12 different human organs were sequenced. The association between single nucleotide variants (SNVs) detected in the xenografts and sensitivities to the 9 cytotoxic anticancer drugs were then investigated using a nonparametric approach. We identified 35 SNVs associated with sensitivities to one or more of the nine anticancer drugs. These findings provide novel insights which may benefit the development of personalized anticancer therapy for patients with cancer in the future.

研究分野：遺伝学

キーワード：pharmacogenomics xenograft 抗がん剤 precision medicine

1. 研究開始当初の背景

現在がん化学療法で広く利用されている細胞傷害性抗がん剤は、細胞分裂に関する機構に作用してがん細胞の増殖を抑える、または死滅へと導くため、正常細胞への攻撃も避けられない。細胞傷害性抗がん剤は、効果が得られる投与量と薬物有害反応が出現する投与量がほぼ同じ、あるいは逆転している場合もあるため、患者にとってはがんを小さくするという希望と薬物有害反応による苦痛の両方を伴う治療となる。そのため、より薬物有害反応が少なく効果の高い薬の開発研究が進められ、がん細胞の増殖、浸潤、転移に関わる分子を標的とする分子標的薬が開発されている。これらは有効な治療手段となりつつあるが、標的分子の変異の有無など全ての患者に利用できる薬ではなく、費用も高額である。従って、現在中心的に利用されている細胞傷害性抗がん剤は今後も不可欠な薬であり、その治療効果を最大限引き出すことが求められる。

細胞傷害性抗がん剤は、がん種や患者の状態により使用する薬剤が選択されているものの、その治療効果には個人差が認められており、個人差が生じる原因メカニズムは明らかにされていない。現在は多くが実際に投薬を行い、その効果を見て無効であることがわかってから別の抗がん剤治療に切り替えざるを得ない状況である。患者一人ひとりに最大限効果があり、かつ副作用が極力少ない抗がん剤を選択するために、臨床的に有用な細胞傷害性抗がん剤の感受性マーカーの同定が望まれている。

2. 研究の目的

治療効果の違いは、がん細胞における遺伝子レベルでの特性が関係している可能性が高いものと考え、本研究では細胞傷害性抗がん剤に対する感受性あるいは抵抗性を予測するための遺伝的バイオマーカーを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 9種類の細胞傷害性抗がん剤に対する感受性評価 (既報)

11種類のがん (乳がん、胃がん、神経芽細胞腫、肺がん、グリオーマ、膵臓がん、大腸がん、絨毛がん、造血器腫瘍、卵巣がん、骨肉腫) より、全79例の nude mouse xenograft (ヒトがん組織をマウスの皮下に異種移植したもの) が作製された。腫瘍がマウスに生着後、一定の大きさになった段階で、細胞傷害性抗がん剤の中でも広く使われているマイトマイシン c (MMC)、シクロホスファミド (CPM)、ニムスチン (ACNU)、シスプラチン (DDP)、アドリアマイシン (ADR)、ビンクリスチン (VCR)、ビンブラスチン (VLB)、5-フルオロウラシル (5FU)、メトトレキサート (MTX) の9薬剤に対する感受性試験が実施され、感受性情報 (腫瘍縮小率) が取得され

た。

(2) がん関連遺伝子変異と抗がん剤感受性の関連解析

(1) で各抗がん剤に対する感受性情報 (腫瘍縮小率) を取得済みである79例の nude mouse xenograft よりゲノムDNAを抽出した。スクリーニング試験として、59例を用いて409がん関連遺伝子のエクソームシーケンスを行った。

検出された変異は、変異アレル頻度が10%未満、10%以上-90%以下、90%超の3群に分類し、腫瘍中の変異アレル頻度と抗がん剤感受性の関連解析を行った。 $P < 0.05$ を示した596 single nucleotide variants (SNVs) について、残り20例の nude mouse xenograft より抽出したDNAを用いて再現性を確認するための追試を行った。

4. 研究成果

スクリーニング試験および追試験の結果より、9種類の細胞傷害性抗がん剤いずれかとの関連が示唆されたSNVは35あり、そのうち最も強い関連を示した変異は、Activin A Receptor Type 2A (*ACVR2A*) 遺伝子の rs79555258 で、腫瘍中の変異アレル頻度が高いほどシクロホスファミド抵抗性を示した (図1)。

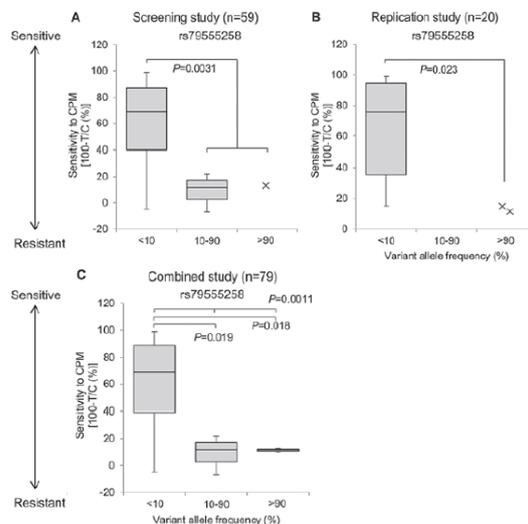


図1. *ACVR2A* 遺伝子変異 (rs79555258) とシクロホスファミド感受性の関係

Adhesion G Protein-Coupled Receptor A2 (*GPR124*) 遺伝子の rs201432181 は、4種類の抗がん剤 (ニムスチン、マイトマイシン c、ビンブラスチン、アドリアマイシン) において変異アレル頻度が高いほど薬剤感受性を示し、多剤感受性関連遺伝子であることが示唆された。今回機能解析は行っていないが、

GPR124 は腫瘍における血管新生の促進に働いていることが報告されていることから、変異により腫瘍の血管新生が促進されることで抗がん剤のデリバリーが促進され、多剤感受性に働く可能性が推測された。

また、アドリアマイシンの感受性マーカーとして、*IKZF1*, *EGFR*, *ALK* 遺伝子変異 (rs113962761, rs1050171, rs4589708) が同定された。このように複数の感受性関連変異が同定された薬剤については、変異を組み合わせた関連解析も行った。3 SNVs においてアドリアマイシン感受性に働く変異にポイントを与え、抵抗性に働く変異にはポイントを与えず、各検体の合計点を算出したところ、スコアが高いほどアドリアマイシン感受性を示し、より精度の高い予測が可能になることが示唆された。

SNV	Gene	Feature	P-value	Sensitivity	Score		
					VAF <10%	VAF 10-90%	VAF >90%
rs4589708	<i>ALK</i>	Intron 10	6.52E-03	Sensitive	0	1	2
rs113962761	<i>IKZF1</i>	Intron 5	1.47E-03	Resistant	2	1	0
rs1050171	<i>EGFR</i>	Exon 20	2.88E-03	Resistant	2	1	0

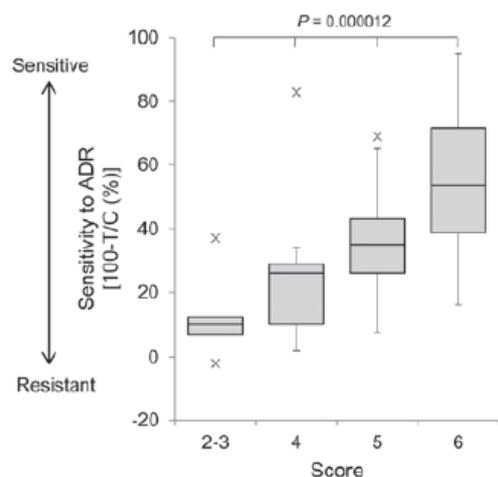


図2. *IKZF1*, *EGFR*, *ALK* 遺伝子変異を用いたアドリアマイシン感受性診断スコアリングシステム

これまで、がん組織の変異解析は定性的解析 (変異の有無) が主流であった。しかし近年の次世代シーケンサーの精度向上に伴い、がん組織における変異アレルの割合が明らかとなり、変異アレル頻度と抗がん剤感受性など、表現型への影響についてより精度の高い解析を行うことが可能となった。これらのデータの蓄積により、最終的にはがん患者一人ひとりにより効果的で毒性の低い抗がん剤治療の提供につながるものと期待される。

また、抗がん剤感受性関連遺伝子変異が同定されたことで、その変異により生じる遺伝子機能の変化および抗がん剤の作用メカニズムが新たに解明され、抗がん剤耐性克服や

副作用治療薬の開発につながるものと期待される。

さらに、バイオマーカーを指標に抗がん剤の有効性を考慮し、臓器横断的に治療薬として用いることにより、治療法の限られた希少がんの治療として応用することもできるようになり、希少がんに対する「ドラッグ・リポジショニング」が実現可能になるものと期待される。

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1件)

Udagawa C, Sasaki Y, Suemizu H, Ohnishi Y, Ohnishi H, Tokino T, Zembutsu H. Targeted sequencing reveals genetic variants associated with sensitivity of 79 human cancer xenografts to anticancer drugs. *Exp Ther Med*. 2018. 15(2):1339-1359. 査読有 DOI: 10.3892/etm.2017.5533.

[学会発表] (計3件)

(1) Udagawa C, Sasaki Y, Suemizu H, Ohnishi Y, Ohnishi H, Tokino T, Zembutsu H. Exome sequencing of cancer related genes to identify genetic markers for sensitivity to cytotoxic anticancer drugs. AACR Annual Meeting 2017.

(2) Udagawa C, Tokino T, Sasaki Y, Shiotani B, Ohnishi Y, Suemizu H, Zembutsu H. Exome sequencing of cancer related genes to identify genetic markers for sensitivity to cytotoxic anticancer drugs. ASHG Annual Meeting 2016.

(3) Udagawa C, Tokino T, Sasaki Y, Shiotani B, Ohnishi Y, Suemizu H, Zembutsu H. Exome sequencing of cancer related genes to identify genetic markers for sensitivity to cytotoxic anticancer drugs. 第75回日本癌学会学術集会 2016.

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇田川 智野 (UDAGAWA, Chihiro)
公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター・客員研究員
研究者番号: 20774160

(4) 研究協力者

前佛 均 (ZEMBUTSU, Hitoshi)
公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター リキッドバイオプシ

一診断開発プロジェクト・プロジェクトリ
ーダー
研究者番号：90372820