

令和元年6月11日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19619

研究課題名(和文)メチル化異常の網羅的解析による食道胃接合部腺癌の新たな分類と治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Epigenetic analysis for a novel therapeutic target in esophagogastric junction adenocarcinoma

研究代表者

今村 裕 (Imamura, Yu)

公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・副医長

研究者番号：70583045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：食道胃接合部腺癌はChromosomal instability (CIN型)の腫瘍がほとんどであり、胃腺癌に見られるようなGenetically stable (GS)型、Epstein-Barrウイルス関連腫瘍(EBV)型、Microsatellite instable (MSI)型の3型はほぼ認められないとされている。本研究によってNon-EBV, non-MSI-Hの食道胃接合部腺癌において、LINE-1のメチル化レベル59以下を示す一群はTP53変異率が高く、細胞周期が更新しており、予後不良の特徴的一群であるということが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってNon-EBV, non-MSI-Hの食道胃接合部腺癌において、LINE-1のメチル化レベル59以下を示す一群はTP53変異率が高く、細胞周期が更新しており、予後不良の特徴的一群であるということが判明した。これまでの次世代シーケンサーを用いたmolecular subtype 分類では、CINとGSの分類は実臨床には不向きであり、その点でLINE-1メチル化レベルは、より安価・簡便で臨床的に有用な予後マーカーとなることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Upper-gastrointestinal adenocarcinoma can be classified into 4 distinct molecular subtypes by NGS, like chromosomal instability (CIN), genetically stable (GS), Epstein-Barr related type (EBV), and microsatellite instable-high (MSI-H). However, this subtyping is too much complicated, and not easy to be applied for clinical practice, especially in dividing CIN and GS. This study revealed the patient with LINE-1 hypomethylated tumor (LINE-1 59.0) was significantly associated with TP53 mutation, Ki-67 index, and worst clinical outcome in 4-yr follow up. Our data suggest that LINE-1 hypomethylated tumor (LINE-1 59.0) may be a distinct tumor phenotype, and LINE-1 methylation level can be a useful marker in non-EBV/non-MSI-H EGJ adenocarcinoma.

研究分野：消化器癌

キーワード：食道胃接合部腺癌 メチル化 LINE-1

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

1. 研究開始当初の背景

食道胃接合部腺癌は、国際的に「食道胃接合部上下 5cm 以内に腫瘍の中心が存在する食道浸潤を来す腺癌」と定義される。本疾患はこれまで欧米型の食道癌とされ、肥満や逆流性食道炎の増加による食道扁平上皮の腺上皮化生 (バレット食道) が前癌病変とされ、(Dulak AM, Imamura Y, and Bass AJ et al. *Nat Genet*, 2013)、このバレット食道を認めない症例であっても、多くは腫瘍によって置換されたため、本来はバレット食道が存在し、そこから発癌すると考えられている。近年、本邦においても本疾患の増加が危惧されている。

近年行われた次世代シーケンサーを用いた TCGA の上部消化器腺癌 (胃腺癌と食道胃接合部腺癌の統合解析、*Nature*, 2017) の網羅的遺伝子解析報告では、食道胃接合部腺癌は Chromosomal instability (CIN 型) の腫瘍がほとんどであり、胃腺癌に見られるような Genetically stable (GS) 型、Epstein-Barr ウイルス関連腫瘍 (EBV) 型、Microsatellite instable (MSI) 型の 3 型はほぼ認められないとされている。しかしながら、これまで我々は食道胃接合部癌の多施設共同研究体制を構築し、本疾患には背景粘膜にバレット食道が認められるものと、そうでないものが混在し、さらに両者には明らかなメチル化異常の差があるとの予備実験結果を得た。つまり、食道胃接合部癌にはメチル化状態に基づき新たな分子生物学的分類が可能なのではないかと着想した。

2. 研究の目的

均一と考えられてる食道胃接合部腺癌をエピジェネティックな観点から分類できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

本研究では、我々は既に本邦における食道胃接合部腺癌の多施設共同研究体制 (国内 4 施設、登録症例数 537 例; がん研有明病院食道外科および胃外科、熊本大学消化器外科、九州大学消化器・総合外科、九州がんセンター消化器外科、) を構築済みであり、このコホートを用いて検討を行う。この中で術前化学療法の加わっていない症例のうち、DNA 抽出や、重要な molecular subtype である EBV、MSI 解析が可能となった 372 症例について検討することとした。

メチル化マーカーとしては、ゲノム全体のメチル化の指標である *LINE-1* メチル化レベルを Pyrosequencing 法で測定した。また、消化器癌領域で CpG methylator phenotype のマーカーとして頻用される *MLH1*, *CDKN2A*, *MGMT*, *CHFR*, *CDH1*, *IGF2*, *RUNX3*, *CRABP1*, *NEUROG1*, *CACNA1G*, *SOCS1* に関して Methylight-PCR を用いてメチル化の有無を判定した。その指標としては、*COL2A* のメチル化で標準化した percentage of methylated reference (PMR) とし、そのカットオフ値は 4.0 とした。また、このうち TCGA 上部消化管腺癌における CIN 型のメチル化の指標となるマーカーとして *CDKN2A*, *MGMT*, *CHFR* を選択し、EGJ-CIMP3 として、そのメチル化陽性個数を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 解析対象 372 例における EBV 型、MSI-H 型症例の検出

372 症例中、EBV-ISH で EBV 陽性であったのが 9 例 (2.4%)、NCI-6 マーカーで MSI-H と判定されたものが 28 症例 (7.5%) 存在した。これらは一般にメチル化異常頻度が高いため、これ以降の解析から除外し、335 例で検討することとした。

(2) Non-EBV かつ non-MSI-H における *LINE-1* メチル化レベルの検討

335 症例の DNA を用いて *LINE-1* メチル化レベルを測定し、319 例 (95.2%) において有効な結果が得られた。その四分位点をとり、メチル化値に応じて以下の 4 群 (Q1, Q2, Q3, Q4) に分類し検討を進めた。Q1 59.0 (N=81) 59.0 < Q2 65.75 (N=79) 65.75 < Q3 71.25 (N=82) 71.25 < Q4 (N=77) とし、以下の解析を行うこととした。

代表的臨床病理・分子生物学的因子と *LINE-1* メチル化 4 分類を比較検討したところ、最も高い *LINE-1* メチル化低レベルを有する Q1 が特徴的な一群であることが判明した (表 1)。Q1-4 間において、性別、年齢、BMI、腫瘍占居部位 (Siewert 分類)、バレット食道の併存、内視鏡でのピロリ菌感染所見の有無、TNM 分類において顕著な違いは認められなかった。興味深いことに、Q1 では Intestinal 型の組織型が多く、メチル化レベルが高くなるにつれて Diffuse 型の病理組織型の割合が高くなった。特に我が国のがん取り扱い規約での病理組織亜型でも同様の傾向を示した。

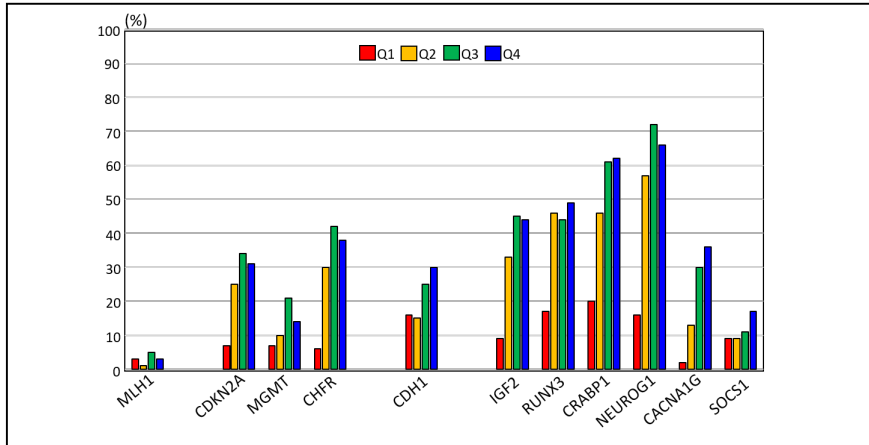
次いで分子生物学的因子の比較を行ったところ、腫瘍細胞における PD-L1 発現状態や CD8 陽性リンパ球浸潤状態は 4 群間で同等であった。興味深いことに、*TP53* 変異の割合が、Q1-2 で最も高く、メチル化レベルが高くなるほどその割合が減少した。細胞周期活動の指標となる Ki-67 index に関しては、低メチル化群である Q1 で有意に高値を示した (P=0.0005)。なお、免疫染色による HER2 過剰発現状態には有意な違いは認めなかった。

| Clinicopathological feature | | Total No. | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 | P (across subtypes) |
|--|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|
| Total No. of patients | | 319 | 81 (25%) | 79 (25%) | 82 (26%) | 77 (24%) | |
| Gender | | | | | | | 0.073 |
| | Female | 48 (15%) | 5 (6%) | 13 (17%) | 15 (18%) | 15 (19%) | |
| | Male | 271 (85%) | 76 (94%) | 66 (83%) | 67 (82%) | 62 (81%) | |
| Age at surgery (mean ± SD) | | 64.7±12.4 | 64.7±12.1 | 65.7±12.9 | 66.4±12.1 | 61.8±12.1 | 0.074 |
| Body mass index (kg/m ²) (mean ± SD) | | 22.7±3.5 | 22.7±3.4 | 22.9±3.7 | 22.6±3.3 | 22.6±3.5 | 0.95 |
| *not all cases | | | | | | | |
| Siewert classification | | | | | | | 0.16 |
| | Type I | 52 (16%) | 10 (12%) | 17 (22%) | 14 (17%) | 11 (14%) | |
| | Type II | 223 (70%) | 61 (76%) | 56 (70%) | 57 (70%) | 49 (64%) | |
| | Type III | 44 (14%) | 10 (12%) | 6 (8%) | 11 (13%) | 17 (22%) | |
| Barrett's esophagus | | | | | | | 0.22 |
| | Absent | 224 (70%) | 56 (69%) | 54 (68%) | 53 (65%) | 61 (79%) | |
| | Present | 95 (30%) | 25 (31%) | 25 (32%) | 29 (35%) | 16 (21%) | |
| <i>Helicobacter pylori</i> | | | | | | | 0.90 |
| *not all cases | | | | | | | |
| | Negative | 79 (43%) | 22 (46%) | 20 (44%) | 19 (39%) | 18 (42%) | |
| | Positive | 106 (57%) | 26 (54%) | 25 (56%) | 30 (61%) | 25 (58%) | |
| pT Stage | | | | | | | 0.0203 |
| | pT1 | 69 (22%) | 12 (15%) | 22 (28%) | 23 (28%) | 12 (16%) | |
| | pT2 | 47 (15%) | 21 (26%) | 8 (10%) | 11 (13%) | 7 (9%) | |
| | pT3 | 115 (35%) | 28 (34%) | 31 (39%) | 25 (31%) | 31 (40%) | |
| | pT4 | 88 (28%) | 20 (25%) | 18 (23%) | 23 (28%) | 27 (35%) | |
| pN Stage | | | | | | | 0.39 |
| | pN0 | 109 (34%) | 24 (30%) | 28 (35%) | 35 (42%) | 22 (28%) | |
| | pN1 | 67 (21%) | 21 (26%) | 14 (18%) | 17 (21%) | 15 (20%) | |
| | pN2 | 56 (18%) | 18 (22%) | 15 (19%) | 9 (11%) | 14 (18%) | |
| | pN3 | 87 (27%) | 18 (22%) | 22 (28%) | 21 (26%) | 26 (34%) | |
| M Stage | | | | | | | 0.62 |
| | M0 | 267 (84%) | 69 (85%) | 66 (84%) | 71 (87%) | 61 (79%) | |
| | M1 | 52 (16%) | 12 (15%) | 13 (16%) | 11 (13%) | 16 (21%) | |
| Disease stage | | | | | | | 0.19 |
| | I | 80 (25%) | 18 (22%) | 24 (30%) | 24 (29%) | 14 (18%) | |
| | II | 36 (11%) | 13 (16%) | 4 (5%) | 13 (16%) | 6 (8%) | |
| | III | 151 (48%) | 38 (47%) | 38 (48%) | 34 (42%) | 41 (53%) | |
| | IV | 52 (16%) | 12 (15%) | 13 (17%) | 11 (13%) | 16 (21%) | |
| Lauren classification | | | | | | | 0.0006 |
| | Intestinal | 240 (75%) | 69 (85%) | 60 (76%) | 66 (80%) | 45 (58%) | |
| | Diffuse | 79 (25%) | 12 (15%) | 19 (24%) | 16 (20%) | 32 (42%) | |
| Dominant histol of JPN | | | | | | | 0.0026 |
| | pap | 7 (2%) | 4 (5%) | 1 (1%) | 2 (2%) | 0 | |
| | tub1 | 81 (25%) | 21 (26%) | 20 (25%) | 24 (29%) | 16 (21%) | |
| | tub2 | 117 (38%) | 29 (35%) | 31 (40%) | 35 (43%) | 22 (29%) | |
| | por1 | 20 (6%) | 12 (15%) | 4 (5%) | 0 | 4 (5%) | |
| | por2 | 68 (21%) | 10 (12%) | 18 (23%) | 12 (15%) | 28 (36%) | |
| | sig | 11 (3%) | 2 (3%) | 1 (1%) | 4 (5%) | 4 (5%) | |
| | muc | 15 (5%) | 3 (4%) | 4 (5%) | 5 (6%) | 3 (4%) | |
| PD-L1 tumor proportion score≥1 | | | | | | | 0.48 |
| | Absent | 285 (97%) | 76 (97%) | 65 (94%) | 74 (99%) | 70 (96%) | |
| | Present | 10 (3%) | 2 (3%) | 4 (6%) | 1 (1%) | 3 (4%) | |
| Intratumor CD8 counts (mean ± SD) | | 244.7±165.8 | 235.3±166.8 | 250.8±158.6 | 223.6±167.0 | 271.2±169.5 | 0.13 |
| *not all cases | | | | | | | |
| Peritumor CD8 counts (mean ± SD) | | 260.9±165.0 | 269.1±173.6 | 281.8±168.0 | 261.6±167.0 | 232.0±149.4 | 0.36 |
| TP53 NGS status 2 | | | | | | | <0.0001 |
| | Mutation | 235 (76%) | 66 (83%) | 67 (87%) | 60 (76%) | 42 (58%) | |
| | WT | 73 (24%) | 13 (17%) | 10 (13%) | 19 (24%) | 31 (42%) | |
| Ki-67 positivity | | | | | | | 0.0005 |
| | 0-9% | 21 (7%) | 4 (5%) | 1 (1%) | 6 (7%) | 10 (13%) | |
| | 10-29% | 50 (16%) | 10 (12%) | 10 (13%) | 11 (14%) | 19 (25%) | |
| | 30-49% | 91 (28%) | 23 (28%) | 35 (44%) | 15 (18%) | 18 (23%) | |
| | 50-79% | 117 (37%) | 28 (35%) | 25 (32%) | 41 (50%) | 23 (30%) | |
| | 80-100% | 40 (12%) | 16 (20%) | 8 (10%) | 9 (11%) | 7 (9%) | |
| HER2 IHC≥ 3+ and 10% | | | | | | | 0.39 |
| | Absent | 249 (86%) | 61 (81%) | 63 (86%) | 62 (85%) | 63 (91%) | |
| | Present | 41 (14%) | 14 (19%) | 10 (14%) | 11 (15%) | 6 (9%) | |
| EGJ-CIMP3 | | | | | | | <0.0001 |
| *not all cases | | | | | | | |
| | 0 | 184 (57%) | 68 (84%) | 46 (58%) | 31 (38%) | 39 (51%) | |
| | 1 | 74 (23%) | 10 (12%) | 17 (22%) | 29 (36%) | 18 (23%) | |
| | 2 | 42 (13%) | 2 (3%) | 13 (16%) | 13 (16%) | 14 (18%) | |
| | 3 | 18 (7%) | 1 (1%) | 3 (4%) | 8 (10%) | 6 (8%) | |

(3) CIMP の検討

次いで CIMP マーカーとの相関を検討したところ、予期していたとおり、EGJ-CIMP3 マーカー陽性率は *LINE-1* メチル化レベルと有意に相関した ($P < 0.0001$ 、表 1)。各種マーカーの陽性率をみてみると、Q1 のメチル化は他の 3 群れよりも明らかに低レベルのメチル化状況であった。

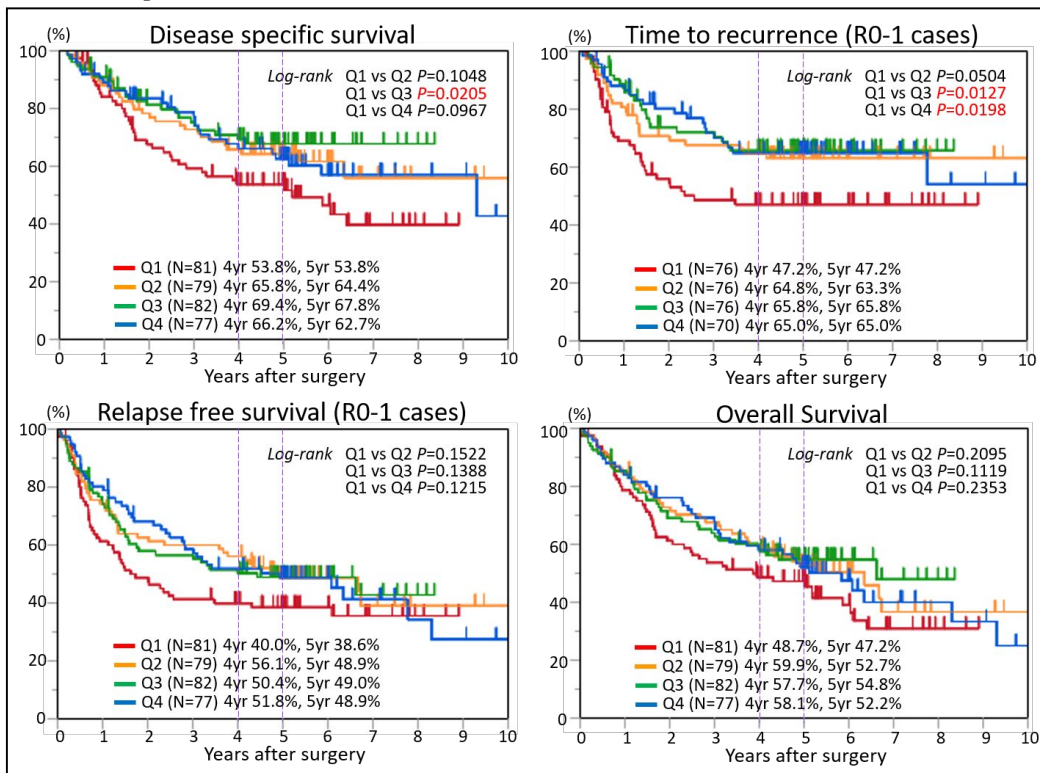
< 図 1 . 各種 CIMP マーカー陽性率 >



(4) 生存解析

最も低レベルの *LINE-1* メチル化を示す Q1 の生存率は、Disease-specific survival (疾患特異的生存率) 後-再発期間 (Time to recurrence) Relapse-free survival (無再発生存率) overall-survival (全生存期間) のいずれにおいても最も予後不良の一群であることが判明した (図 2)。

< 図 2 . Kaplan-Meier 曲線 >



(5) 結論

Non-EBV, non-MSI-H の食道胃接合部腺癌において、*LINE-1* のメチル化レベル 59 以下を示す一群は *TP53* 変異率が高く、細胞周期が更新しており、予後不良の特徴的の一群であることが判明した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

(1) **Imamura Y**, Watanabe M, Toihata T, Takamatsu M, Kawachi H, Haraguchi I, Ogata Y, Yoshida N, Saeki H, Oki E, Taguchi K, Yamamoto M, Morita M, Mine S, Hiki N, Baba H, Sano T. Recent incidence trend of surgically resected esophagogastric junction adenocarcinoma, and microsatellite instability status in Japanese patients. *Digestion*. 2019, 99(1):6-13

DOI: 10.1159/000494406

(2) Bahcall M, Awad MM, Sholl LM, Wilson FH, Xu M, Wang S, Palakurthi S, Choi J, Ivanova E, Leonardi GC, Ulrich BC, Paweletz CP, Kirschmeier PT, Watanabe M, Baba H, Nishino M, Nagy RJ, Lanman RB, Capelletti M, Chambers ES, Redig AJ, VanderLaan PA, Costa DB, **Imamura Y**, Janne PA. Amplification of wild type KRAS imparts resistance to crizotinib in MET exon 14 mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2018, 24(23):5963-5976

DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-18-0876

(3) Cañadas I, Thummalapalli R, Kim JW, Kitajima S, Jenkins RW, Christensen CL, Campisi M, Kuang Y, Zhang G, Gjini E, Zhang G, Tian T, Sen DR, Miao D, **Imamura Y**, Thai T, Piel B, Terai H, Aref AR, Hagan T, Koyama S, Watanabe M, Baba H, Adeni AE, Lydon CA, Tamayo P, Wei Z, Herlyn M, Barbie TU, Uppaluri R, Sholl LM, Sicinska E, Sands J, Rodig S, Wong KK, Paweletz CP, Watanabe H, Barbie DA. Tumor innate immunity primed by specific interferon-stimulated endogenous retroviruses. *Nat Med*. 2018, 24(8):1143-1150

DOI: 10.1038/s41591-018-0116-5

(4) Wong GS, Zhou J, Liu JB, Wu Z, Xu X, Li T, Xu D, Schumacher SE, Puschhof J, McFarland J, Zou C, Dulak A, Henderson L, Xu P, O'Day E, Rendak R, Liao WL, Cecchi F, Hembrough T, Schwartz S, Szeto C, Rustgi AK, Wong KK, Diehl JA, Jensen K, Graziano F, Ruzzo A, Fereshetian S, Mertins P, Carr SA, Beroukhim R, Nakamura K, Oki E, Watanabe M, Baba H, **Imamura Y**, Catenacci D, Bass AJ. Targeting wild-type KRAS-amplified gastroesophageal cancer through combined MEK and SHP2 inhibition. *Nat Med*. 2018, 24(7):968-977

DOI: 10.1038/s41591-018-0022-x

(5) Pectasides E, Stachler MD, Derks S, Liu Y, Maron S, Islam M, Alpert L, Kwak H, Kindler H, Polite B, Sharma MR, Allen K, O'Day E, Lomnicki S, Maranto M, Kanteti R, Fitzpatrick C, Weber C, Setia N, Xiao SY, Hart J, Nagy RJ, Kim KM, Choi MG, Min BH, Nason KS, O'Keefe L, Watanabe M, Baba H, Lanman R, Agoston AT, Oh DJ, Dunford A, Thorner AR, Ducar MD, Wollison BM, Coleman HA, Ji Y, Posner MC, Roggin K, Turaga K, Chang P, Hogarth K, Siddiqui U, Gelrud A, Ha G, Freeman SS, Rhoades J, Reed S, Gydush G, Rotem D, Davison J, **Imamura Y**, Adalsteinsson V, Lee J, Bass AJ, Catenacci DV. Genomic Heterogeneity as a Barrier to Precision Medicine in Gastroesophageal Adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2018, 8(1):37-48

DOI: 10.1158/2159-8290.cd-17-0395

〔学会発表〕(計 12 件)

(1) 今村裕、食道胃接合部腺癌における MSI-low 腫瘍の特徴、第 91 回日本胃癌学会総会、2019 年

(2) Imamura Y, MSI-L tumors exhibited an intermediate tumor immune microenvironment between MSI-H and MSS in esophagogastric junction adenocarcinoma. 11th AACR-JCA Joint Conference. 2019 年

(3) Imamura Y, MSI-low is an intermediate type between MSI-high and MSS in esophagogastric junction adenocarcinoma. Gastrointestinal Cancers Symposium (ASCO-GI). 2019 年

(4) 今村裕、食道胃接合部腺癌における TP53 免疫染色による mutation 検出能の検討、JDDW、2018 年

(5) 今村裕、食道胃接合部腺癌の腫瘍占居別 molecular status の特徴、第 73 回日本消化器外科学会総会、2018 年

- (6) 今村裕、臨床応用に向けた TP53 免疫染色による mutation 検出能の検討、第 72 回日本食道学会学術集会、2018 年
- (7) 今村裕、食道胃接合部腺癌の遠隔転移の特徴と肝転移の治療成績、第 118 回日本外科学会定期学術集会、2018 年
- (8) 今村裕、食道胃接合部腺癌の遠隔転移の検討、第 90 回日本胃癌学会総会、2018 年
- (9) Imamura Y, Molecular status changes according to tumor location in EGJ adenocarcinoma. The 11th International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS), 2018 年
- (10) 今村裕、食道胃接合部腺癌は腫瘍占居部位により heterogeneous な genetic status を呈する、第 72 回日本消化器外科学会総会、2017 年
- (11) 今村裕、食道胃接合部腺癌における手術関連因子の術式間比較と予後解析、第 71 回日本食道学会学術集会、2017 年
- (12) 今村裕、食道胃接合部腺癌におけるマイクロサテライト不安定性の検討、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：渡邊 雅之

ローマ字氏名：Watanabe Masayuki

所属研究機関名：公益財団法人がん研究会

部局名：有明病院 消化器外科

職名：部長

研究者番号 (8 桁) : 80254639

(2)研究協力者 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。