

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09212

研究課題名(和文) NOTCHシグナルを介した食道癌化学療法奏効性の分子機構の解明

研究課題名(英文) Clinical significance of NOTCH signaling for the response of preoperative chemotherapy in esophageal cancer

研究代表者

市川 寛 (Ichikawa, Hiroshi)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：50721875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌においてNOTCHシグナルの遺伝子異常の頻度は比較的高いことが遺伝子解析により証明されている。NOTCHシグナルは化学療法抵抗性に関与しているため、NOTCH遺伝子の変異によりNOTCHシグナルが不活性化している食道癌では化学療法が著効する可能性がある。本研究では術前化学療法の著効症例にNOTCH1やNOTCH3遺伝子の変異が認められることを明らかにした。免疫組織化学染色による検証ではNOTCH1タンパク質発現と術前化学療法の効果や術後再発や生存期間との有意な関連は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では現在保険診療として臨床使用されているがん遺伝子パネル検査による遺伝子解析結果から、NOTCHシグナルに関わる遺伝子異常が食道癌の術前化学療法の治療効果に関与している可能性を見出した。しかしながら、免疫染色で評価した治療前生検検体におけるNOTCH1タンパク質発現と術前化学療法の効果や患者の予後との関連を証明することができなかった。本研究の結果は、がん遺伝子パネル検査は食道癌の術前化学療法に効果の高い症例の選択に役立つ可能性を示唆している。しかしながら、がん遺伝子パネル検査よりも安価な免疫染色によるNOTCHシグナル異常の評価を食道癌診療に応用するためには、さらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Since NOTCH signaling is involved in chemotherapy resistance, esophageal cancer patients with inactivated NOTCH signaling due to mutations in the NOTCH gene may achieve a good response to chemotherapy. In this study, we found that mutations in the NOTCH1 and NOTCH3 genes were found in patients who had excellent response to preoperative chemotherapy. However, immunohistochemical staining did not reveal a significant association between NOTCH1 protein expression and histological response to preoperative chemotherapy, postoperative recurrence, or disease-specific survival.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道癌 術前化学療法 NOTCHシグナル がん遺伝子パネル検査 免疫組織化学

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌は予後不良な疾患であり、術前化学療法と食道切除により根治切除を得られたとしても約半数は再発をきたし (*Ann Surg Oncol*, 2012)。再発後の予後は化学療法を行ったとしても生存期間中央値で1年程度と十分とは言えない (*Jpn J Clin Oncol*, 2001)。現在、食道癌に対する化学療法には 5-fluorouracil (5-FU)、cisplatin (CDDP)、Docetaxel (DTX)、Paclitaxel (PTX) が標準的に用いられている。これらの薬剤の治療成績を向上させるためには、治療奏効性に関わる分子機構を解明することが必要であるが、未だ臨床的に有用な結果は得られていない。近年の網羅的遺伝子解析の技術革新は目覚ましく、様々な固形癌の遺伝子異常の全体像が明らかになりつつある。食道癌においても、The Cancer Genome Atlas (TCGA) や International Cancer Genome Consortium (ICGC) による大規模な研究結果が相次いで報告された (*Nature*, 2017, *Nature*, 2014)。今後はこれらの遺伝子解析データを基に、食道癌における化学療法奏効性の背景にある分子機構を解明すると共に、分子標的治療薬の開発を進めることが、食道癌患者の予後改善のために重要である。

NOTCH シグナルは、正常組織において細胞の分化誘導に深く関わっている。近年の網羅的遺伝子解析の結果から、頭頸部癌や食道癌といった扁平上皮癌では NOTCH1 や NOTCH3 (NOTCH1/3) の不活性型変異の頻度が高いことが報告された (*Science*, 2011, *Nat Genet*, 2014)。特に日本人食道癌の遺伝子解析では、約 30% の症例で NOTCH シグナルに関与する遺伝子に何らかの異常を認め、NOTCH1 の不活性型変異は 19%、NOTCH3 の不活性型変異は 8% に認められた (*Gastroenterology*, 2016)。最近では NOTCH シグナルは化学療法耐性機序にも関与していることが明らかにされた。頭頸部癌では NOTCH シグナルを阻害することで、5-FU、CDDP、DTX といった薬剤の治療効果が高まることが証明されている (*Sci Rep*, 2016)。これらの研究結果は、NOTCH シグナルが不活性化している腫瘍では化学療法が著効する可能性を示唆している。

上述した学術的背景から考えられる学術的「問い」は以下の2点である。

- 食道癌における NOTCH シグナルの活性化状態：  
食道癌において NOTCH1/3 の不活性型変異は認められるが、変異のある腫瘍において本当に NOTCH シグナルに不活性化をきたしているかどうかは不明である。以上により考えられる学術的「問い」は、「NOTCH1/3 変異を有する食道癌では NOTCH シグナルが不活性化されているのか、その頻度はどの程度か」である。
- 食道癌化学療法における NOTCH シグナル異常の臨床的意義：  
さらに、NOTCH1/3 変異により NOTCH シグナルが不活性化した食道癌において、化学療法が著効するか否かは不明である。以上により考えられる学術的「問い」は、「NOTCH シグナル異常は食道癌化学療法の奏効性に関与しているのか」である。

これらの「問い」を明らかにするために「NOTCH1/3 変異を有する食道癌では NOTCH シグナルは不活性化している。さらに、NOTCH1/3 変異を有する食道癌では化学療法が奏効し、患者の予後は良好である」という仮説を立て、本研究を企画した。

## 2. 研究の目的

「食道癌における NOTCH シグナル異常の臨床的意義を明らかにすることで、食道癌化学療法奏効性の背景にある分子機構解明のための科学的基盤を確立すること」である。

## 3. 研究の方法

- (1) がん遺伝子パネル検査による NOTCH 関連遺伝子異常の評価  
術前化学療法を施行した食道癌患者 8 例を対象とした。治療前生検で得られたホルマリン固定後パラフィン包埋 (FFPE) 検体から DNA を抽出し、癌遺伝子解析パネル (CANCERPLEX; KEWInc., Cambridge, MA) を用いて癌関連 435 遺伝子の一塩基置換、挿入・欠失、コピー数変化を評価した。
- (2) 公開データによる NOTCH 関連遺伝子異常の検討  
cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) から The Cancer Genome Atlas (TCGA) で解析された食道扁平上皮癌 90 例の全エクソシーケンズデータと臨床情報を得た。NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4 遺伝子の変異情報を抽出し全生存期間との関連を統計的に解析した。

- (3) 食道癌術前化学療法症例における免疫組織化学による NOTCH1 タンパク質発現の評価  
がん遺伝子パネル検査を施行した 8 例に加え、術前化学療法を施行した食道癌症例のうち術前治療前生検の FFPE 検体が保管されている 41 例を対象とした。FFPE ブロックから 4µm で薄切した検体を用い、抗 NOTCH1 抗体 (D1E11, Rabbit mAb, #3608, Cell Signaling Technology, USA) による免疫組織化学染色を行った。

#### 4. 研究成果

- (1) がん遺伝子パネル検査による NOTCH 関連遺伝子異常の評価  
術前化学療法を施行された 8 例について、435 の癌関連遺伝子の異常を評価し、組織学的効果との関連を検討した。TP53 変異を 7 例 (88%)、CDKN2A 欠失を 3 例 (38%)、NFE2L2 変異・NOCTH1 変異・PIK3R1 欠失・CDKN2B 欠失・CCND1 増幅をそれぞれ 2 例 (25%)、PIK3CA 変異・PTEN 変異・NOTCH3 変異・TGFB2 変異・KMT2D 変異・EGFR 増幅・VEGFR2 増幅・RB1 欠失・BIRC2 増幅・BIRC3 増幅をそれぞれ 1 例 (13%) に認めた。化学療法奏効群 4 例中 3 例 (75%) に NOTCH1 または NOTCH3 の機能欠失型変異を認めた。
- (2) 公開データによる NOTCH 関連遺伝子異常の検討  
TCGA で解析された食道扁平上皮癌全 90 例のうち、全生存期間情報がある 89 例を解析対象とした。全 89 症例中 24 例 (27%) に NOTCH1・NOTCH2・NOTCH3・NOTCH4 に何らかの変異を認めた。また NOTCH の truncating mutation は 10 例 (11%) に認められた。NOTCH 変異と全生存に有意な関連は認められなかった。しかし、NOTCH1 または 3 の truncation mutation 陽性群の全生存期間中央値は 11 か月、陰性群は 28 か月と有意な差を認めた ( $P = 0.01$ )
- (3) 食道癌術前化学療法症例における免疫組織化学による NOTCH1 タンパク質発現の評価  
がん遺伝子パネルにより遺伝子解析データを取得した術前化学療法施行症例 8 例について、NOTCH1 のタンパク質発現を評価した。術前治療開始前の生検検体を用いて、抗 NOTCH1 抗体による免疫組織化学染色により発現を評価した。非腫瘍性胃粘膜の腺窩上皮や非腫瘍性扁平上皮の基底層が陽性コントロールとして染色されることを確認した。扁平上皮癌腫瘍組織では非腫瘍性扁平上皮と比較して NOTCH1 発現は高かった。腫瘍細胞では核や細胞質またはその両者に染色を認め、染色パターンは同一腫瘍内、および症例間で様々であった。NOTCH1 truncating mutation 陽性の 2 例では他の症例と比較して細胞質および核での染色強度が低かった。  
次に、術前化学療法を施行した食道癌症例のうち術前治療前生検の FFPE 検体が保管されている 41 例を対象とした。腫瘍細胞の核の染色について、非腫瘍性扁平上皮基底層の核より染色強度が低い場合を NOTCH1 低発現と定義した。NOTCH1 低発現は 14 例 (34%) であった。術前化学療法の病理学的治療効果については、Grade2 以上の奏効例の割合は NOTCH1 低発現群が 28.6%、高発現群が 34.6%であり有意差は認められなかった ( $P = 0.491$ )。術後 5 年無再発率は NOTCH1 低発現群が 56.3%、高発現群が 38.5%であり有意差は認められなかった ( $P = 0.381$ )。術後 5 年疾患特異的生存率は NOTCH1 低発現群が 62.3%、高発現群が 49.5%であり有意差は認められなかった ( $P = 0.454$ )。
- (4) 成果のまとめ  
がん遺伝子パネル検査による遺伝子変異解析では、NOTCH1 や NOTCH3 の遺伝子変異が食道癌術前化学療法の高い治療効果に関与している可能性がある。  
公開データを用いた NOTCH 関連遺伝子変異と予後の検討では、NOTCH1 または NOTCH3 の機能欠失変異陽性例の予後は不良であった。術前化学療法施行症例においては NOTCH1 や NOTCH3 の機能欠失変異が高い治療効果に関与し患者の予後も良好であることが予想されるが、公開データでは術前化学療法施行の有無について情報が無いため、この点に関しての検討はできなかった。  
治療前生検検体を用いた免疫組織化学染色では NOTCH1 タンパク質発現と術前化学療法の効果や患者の予後との有意な関連は認められなかった。  
本研究の結果は、がん遺伝子パネル検査は食道癌の術前化学療法に効果の高い症例の選択に役立つ可能性を示唆している。しかしながら、がん遺伝子パネル検査よりも安価な免疫染色による NOTCH シグナル異常の評価を食道癌診療に応用するためには、さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Natsuru Sudo, Hiroshi Ichikawa, Yusuke Muneoka, Takaaki Hanyu, Yosuke Kano, Takashi Ishikawa, Yuki Hirose, Kohei Miura, Yoshifumi Shimada, Masayuki Nagahashi, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Takeo Bamba, Satoru Nakagawa, Shin-Ichi Kosugi, Toshifumi Wakai	4. 巻 28
2. 論文標題 ASO Author Reflections: ypTNM Stage Grouping in the 8th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual Refines the Prognostic Prediction for Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 661～662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-020-09184-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Natsuru Sudo, Hiroshi Ichikawa, Yusuke Muneoka, Takaaki Hanyu, Yosuke Kano, Takashi Ishikawa, Yuki Hirose, Kohei Miura, Yoshifumi Shimada, Masayuki Nagahashi, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Takeo Bamba, Satoru Nakagawa, Shin-Ichi Kosugi, Toshifumi Wakai	4. 巻 28
2. 論文標題 Clinical Utility of ypTNM Stage Grouping in the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer TNM Staging System for Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 650～660
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-020-09181-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市川寛、番場竹生、中川悟、羽入隆晃、石川卓、加納陽介、宗岡悠介、酒井剛、亀山仁史、若井俊文
2. 発表標題 食道癌ゲノム解析による術前化学療法最適化の可能性
3. 学会等名 第73回日本食道学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	島田 能史 (Shimada Yoshifumi) (20706460)	新潟大学・医歯学系・講師  (13101)	
研究分担者	永橋 昌幸 (Nagahashi Masayuki) (30743918)	新潟大学・医歯学系・客員研究員  (13101)	
研究分担者	羽入 隆晃 (Hanyu Takaaki) (50719705)	新潟大学・医歯学総合病院・講師  (13101)	
研究分担者	石川 卓 (Ishikawa Takashi) (70586940)	新潟大学・医歯学総合病院・准教授  (13101)	
研究分担者	小杉 伸一 (Kosugi Shin-ichi) (90401736)	新潟大学・医歯学総合病院・特任教授  (13101)	
研究分担者	加納 陽介 (Kano Yosuke) (90745580)	新潟大学・医歯学総合病院・助教  (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------