

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08390

研究課題名（和文）p53の機能獲得変異を標的とした食道扁平上皮癌に対する治療法開発

研究課題名（英文）Therapeutic approaches targeting p53 gain-of-function mutations for esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

佐々木 泰史（Sasaki, Yasushi）

札幌医科大学・医療人育成センター・教授

研究者番号：70322328

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん抑制遺伝子TP53の変異を高頻度に認める食道扁平上皮癌をモデルとし、p53ファミリーに制御される、あるいはp53の機能獲得（GOF）変異によって変化するトランスクリプトームの全容をゲノム情報を駆使して効率的に分析し、一部の候補遺伝子について機能解析へと展開した。さらに発現異常、悪性度および治療効果との関連性を解析することで、食道扁平上皮癌の新しい診断・治療効果予測システムの開発を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道扁平上皮癌では、ほぼ全例でp53変異が検出され、CDKN2A、p63などp53ネットワークに関わる遺伝子の異常に加え、p53ファミリーの腫瘍原性isoformである Np63のコピー数の増加を認めるなど、p53ネットワークの破綻が発症、進展に深く関わっていると考えられる。本研究では、意義が充分解明されていないp53の機能獲得変異を有する腫瘍で変化する転写ネットワークの同定を試みた。この成果は食道扁平上皮癌の有力な分子標的開発につながる基盤研究に発展する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：TP53 is one of the most thoroughly studied tumor suppressor genes in human cancer. Genetic mutations in TP53 are present in more than 50% of human cancers, leading to dysregulation of its downstream targets. NGS studies have confirmed that TP53 is the most commonly mutated gene in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Several mutant p53 proteins promote tumor progression through the gain-of-function (GOF) mechanism. In this study, to identify protein coding and non-coding genes regulated by GOF mutant p53, we performed RNA sequencing (RNA-seq), microarray and other functional assays. Our results indicated a p53-mediated transcriptional network involved in various biological functions and tumor suppression.

研究分野：がん関連遺伝子

キーワード：p53 機能獲得変異 p53ファミリー 食道扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

(1) p53 は、ヒトがんにおいて最も高頻度に遺伝子変異が検出されているがん抑制遺伝子である。野生型 p53 タンパクは転写因子としてゲノム上の特異的な応答配列に結合し、標的遺伝子の転写を活性化することによって、腫瘍抑制機能を発揮している。ヒト腫瘍で認められる変異型 p53 の多くは野生型 p53 の DNA 結合能を喪失させ、p53 下流経路を阻害するドミナントネガティブ効果を有している。一方、がん抑制遺伝子にもかかわらず、ミスセンス変異が有意な変異スペクトラムは一見不可解であるが、単に野生型 p53 の機能を阻害するだけでなく、新しい機能を獲得する (Gain of function: GOF, 機能獲得変異) こととして理解されている。この変異型 p53 の GOF は野生型 p53 とは独立して、特に腫瘍の転移や浸潤に直接関わっていることが報告されているが (Cell 2014, Nature 2015 等)、そのメカニズムは十分に解明されていない。一方 p53 はファミリーメンバーである p63, p73 とともにネットワークを形成して機能しているが、種々の腫瘍で高頻度に認められる p53 変異、および p53 ネットワークの破綻を標的とする薬剤の開発は遅れており、臨床で利用できる分子標的薬は存在しない。

(2) 食道癌は早期より頸胸部に広範なリンパ転移をきたしやすい予後不良な消化器癌である。また、食道癌には治療標的となり得る遺伝子異常に乏しく、高感度腫瘍マーカーも存在しない。本邦で食道原発癌の大部分を占める食道扁平上皮癌では、卵巣癌などと同様、高率に p53 変異を認める。最近我々が行った食道扁平上皮癌 36 症例の全エクソンシーケンスでは、全例で p53 変異が検出され、CDKN2A, p63 など p53 ネットワークに関わる遺伝子の異常に加え、p53 ファミリーの腫瘍原性 isoform である Np63 のコピー数の増加を認めるなど、p53 ネットワークの破綻が発症、進展に深く関わっていると考えられる。したがって、p53 変異を有する腫瘍で発現が変化する遺伝子、転写ネットワークの同定が、食道扁平上皮癌の有力な分子標的開発につながる基盤研究に発展する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食道扁平上皮癌において、野生型、および変異型 p53 の GOF によって変化するトランスクリプトームの全貌を解明し、p53 ネットワークのさらなる理解につなげることである。変異型 p53 を標的とした治療法の開発につながる基礎研究を目指している。

3. 研究の方法

本研究は食道扁平上皮癌の発生・進展過程に関与する治療標的候補分子として、p53 ネットワークの破綻によって変化するトランスクリプトームを網羅的に探索し、発現プロファイルと遺伝子変異・構造異常の分析、およびその機能解析を通じて、従来の評価法を補完する新しい診断・治療、予後予測システムを開発しようとするものである。

(1) RNA-seq, マイクロアレイによって、野生型、および変異型 p53 の GOF によって変化するトランスクリプトームを抽出する。非コードRNAを含むトランスクリプトの食道扁平上皮癌組織での発現をISH法, qRT-PCR法を用いて解析し、臨床病理学的因子 (脈管浸潤、リンパ球浸潤、リンパ節転移、遠隔転移など)、治療抵抗性、予後との相関の有無から、バイオマーカー

ーとしての有用性を検討する。

(2) 変異型p53のGOFによって発現が低下するトランスクリプトはがん抑制的に機能することが予想されるので、癌細胞株・組織における遺伝子異常を解析する。逆に発現上昇するトランスクリプトはがん遺伝的に機能することが予想されるため、組織における発現解析に重点を置く。

4. 研究成果

(1) 野生型 p53、および TAp63/p73 が miR-142-3p の転写誘導を介して核外輸送受容体 XPO1 を発現抑制していることを明らかにした。p53 ファミリーが miRNA を介して自らの機能を増強させる正のフィードバック機構を示唆しており、新たながん治療の標的となりうることを示した。

(2) p53 の新規標的遺伝子として IL2RB を同定し、がん細胞の浸潤能を抑制することを明らかにし、IL2RB が p53 の転写活性を増強する因子である可能性を示した。IL2RB は複数の変異型 p53 の GOF により発現抑制されることも明らかにした。

(3) 食道の表皮化 (epidermalization) 粘膜に発生した上皮内扁平上皮癌についてがん関連遺伝子の異常を解析した。p53 変異、がん関連遺伝子のコピー数異常が癌部だけではなく表皮化粘膜からも検出され前癌病変であることが示唆された。

(4) 32 種類の p53 変異を検出可能なデジタル PCR の超高感度検査系を確立し、血液中を流れる患者特有のがん由来 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) の変動により治療効果を高精度で予測できることを明らかにした。

(5) 頭頸部扁平上皮癌 26 症例を対象に治療前後の変異型 p53 の ctDNA の分析が治療効果と再発モニタリングに有用かを評価した。根治的治療後に ctDNA が陰性化しない、または陰性化後早期に陽転化した症例全例で再発を認め、ctDNA が頭頸部扁平上皮癌の有望なバイオマーカーであることが示唆された。

(6) 根治的放射線療法で治療された stage IB 子宮頸癌 18 症例の網羅的ゲノム解析から、KRAS と SMAD4 の同時変異が局所再発に関連することを推測し、*in vitro*、および *in silico* の系で検証を行った。

(7) 初回治療で多剤併用化学療法を施行した食道癌 42 例を対象として、NGS で検出された症例ごとの p53 変異に対しプローブを作成し、デジタル PCR により化学療法 1 サイクル前後の ctDNA を解析した。ctDNA 変動から治療効果を高精度で予測可能であることを明らかにした。

(8) 新規 p53 標的遺伝子として Armadillo Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome (ARVCF) を同定した。機能解析により、ARVCF は腫瘍特異的なスプライシング変化に関与し、腫瘍抑制に寄与することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Adachi Yasushi, Nojima Masanori, Mori Mitsuru, Kubo Toshiyuki, Akutsu Noriyuki, Sasaki Yasushi, Nakase Hiroshi, Lin Yingsong, Kurozawa Youichi, Wakai Kenji, Tamakoshi Akiko, for the Japan Collaborative Cohort Study	4. 巻 32
2. 論文標題 Serum Soluble Fas Levels and Incidence of Liver Cancer in Nested Case-Control Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention	6. 最初と最後の頁 260 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1055-9965.EPI-22-0902	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masaki Yoshiharu, Akutsu Noriyuki, Adachi Yasushi, Ishigami Keisuke, Iwata Norikazu, Endo Takao, Ishii Yoshifumi, Sasaki Yasushi, Nagayama Minoru, Kimura Yasutoshi, Nakase Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Genomic analysis of an aggressive case with metastatic intrahepatic mucinous cholangiocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 809 ~ 817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-022-01649-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kogo Ryunosuke, Manako Tomomi, Iwaya Takeshi, Nishizuka Satoshi, Hiraki Hayato, Sasaki Yasushi, Idogawa Masashi, Tokino Takashi, Koide Ayaka, Komune Noritaka, Yasumatsu Ryuji, Nakagawa Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Individualized circulating tumor DNA monitoring in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 3960 ~ 3968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.4726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oike Tae, Sekiguchi Yoshihito, Yoshimoto Yuya, Oike Takahiro, Ando Ken, Gu Wenchao, Sasaki Yasushi, Tokino Takashi, Iwase Akira, Ohno Tatsuya	4. 巻 23
2. 論文標題 Mutation Analysis of Radioresistant Early-Stage Cervical Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 51-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hatanaka Yui, Niinuma Takeshi, Kitajima Hiroshi, Nishiyama Koyo, Maruyama Reo, Ishiguro Kazuya, Toyota Mutsumi, Yamamoto Eiichiro, Kai Masahiro, Yorozu Akira, Sekiguchi Shohei, Ogi Kazuhiro, Dehari Hironari, Idogawa Masashi, Sasaki Yasushi, Tokino Takashi, Miyazaki Akihiro, Suzuki Hiromu	4. 巻 11
2. 論文標題 DLEU1 promotes oral squamous cell carcinoma progression by activating interferon-stimulated genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20438-20438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-99736-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujisawa Ryosuke, Iwaya Takeshi, Endo Fumitaka, Idogawa Masashi, Sasaki Noriyuki, Hiraki Hayato, Tange Shoichiro, Hirano Tomomi, Koizumi Yuka, Abe Masakazu, Takahashi Tomoko, Yaegashi Mizunori, Akiyama Yuji, Masuda Mari, Sasaki Akira, Takahashi Fumiaki, Sasaki Yasushi, Tokino Takashi, Nishizuka Satoshi S	4. 巻 42
2. 論文標題 Early dynamics of circulating tumor DNA predict chemotherapy responses for patients with esophageal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1239-1249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgab088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanimizu Naoki, Ichinohe Norihisa, Sasaki Yasushi, Itoh Tohru, Sudo Ryo, Yamaguchi Tomoko, Katsuda Takeshi, Ninomiya Takafumi, Tokino Takashi, Ochiya Takahiro, Miyajima Atsushi, Mitaka Toshihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Generation of functional liver organoids on combining hepatocytes and cholangiocytes with hepatobiliary connections ex vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3390-3390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23575-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwaya Takeshi, Endo Fumitaka, Takahashi Fumiaki, Tokino Takashi, Sasaki Yasushi, Nishizuka Satoshi S.	4. 巻 160
2. 論文標題 Frequent Tumor Burden Monitoring of Esophageal Squamous Cell Carcinoma With Circulating Tumor DNA Using Individually Designed Digital Polymerase Chain Reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 463 ~ 465.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.09.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Udagawa Chihiro, Sasaki Yasushi, Tanizawa Yasuhiro, Suemizu Hiroshi, Ohnishi Yasuyuki, Nakamura Yasukazu, Tokino Takashi, Zembutsu Hitoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Whole-exome sequencing of 79 xenografts as a potential approach for the identification of genetic variants associated with sensitivity to cytotoxic anticancer drugs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0239614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0239614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishiguro Kazuya, Sasaki Yasushi, Takagi Yoshitake, Niinuma Takeshi, Suzuki Hiromu, Tokino Takashi, Hayashi Toshiaki, Takahashi Tohru, Igarashi Tetsuyuki, Matsuno Yoshihiro	4. 巻 99
2. 論文標題 Aggressive variant of splenic marginal zone lymphoma characterized using a cancer panel test and treated with rituximab-containing chemotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e21938 ~ e21938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000021938	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimoto Yuya, Sasaki Yasushi, Murata Kazutoshi, Noda Shin-ei, Miyasaka Yuhei, Hamamoto Junko, Furuya Mio, Hirato Junko, Suzuki Yoshiyuki, Ohno Tatsuya, Tokino Takashi, Oike Takahiro, Nakano Takashi	4. 巻 159
2. 論文標題 Mutation profiling of uterine cervical cancer patients treated with definitive radiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 546 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygyno.2020.08.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokose Takahiro, Kitago Minoru, Matsuda Sachiko, Sasaki Yasushi, Masugi Yohei, Nakamura Yuki, Shinoda Masahiro, Yagi Hiroshi, Abe Yuta, Oshima Go, Horii Shutaro, Yusuke Fujita, Nakano Yutaka, Endo Yutaka, Abe Kodai, Tokino Takashi, Kitagawa Yuko	4. 巻 111
2. 論文標題 Combination of KRAS and SMAD4 mutations in formalin fixed paraffin embedded tissues as a biomarker for pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2174 ~ 2182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogi Kazuhiro, Kobayashi Junichi, Nakagaki Takafumi, Okamoto Junya, Koike Kazushige, Hirokawa Naoki, Someya Masanori, Sakamoto Hiroki, Takada Kohichi, Tokino Takashi, Sasaki Yasushi, Hiratsuka Hiroyoshi, Miyazaki Akihiro	4. 巻 102
2. 論文標題 Chemotherapy after progression on nivolumab is essential for responders with genetic alterations of driver gene: Review of two recurrent/metastatic oral squamous cell carcinoma patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 104509 ~ 104509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oraloncology.2019.104509	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 Endo Takao, Kubo Toshiyuki, Sasaki Yasushi, Takahoshi Hiroaki, Ishii Yoshifumi, Adachi Yasushi	4. 巻 73
2. 論文標題 Esophageal intraepithelial squamous cell neoplasia with epidermalization. A case with molecular analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 327 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤澤 良介, 岩谷 岳, 遠藤 史隆, 佐々木 教之, 二階 春香, 馬場 誠朗, 秋山 有史, 開 勇人, 小泉 優香, 阿部 正和, 片桐 弘勝, 木村 聡元, 大塚 幸喜, 井戸川 雅史, 新田 浩幸, 佐々木 章, 佐々木 泰史, 時野 隆至, 西塚 哲
2. 発表標題 Circulating tumor DNAの初期変動を用いた食道癌化学療法効果予測に関する検討
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 幸成, 岩田 徳和, 佐々木 泰史, 石井 良文, 安達 靖代, 足立 靖, 佐々木 茂, 仲瀬 裕志, 遠藤 高夫
2. 発表標題 腫瘍生検組織を用いた次世代シーケンシングによりIDH1変異を同定した超高齢者Cholangiolocarcinomaの1例
3. 学会等名 日本消化器病学会北海道地方会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

札幌医科大学 医療人育成センター 生物学教室 ホームページ
<https://web.sapmed.ac.jp/biol/index.html>
札幌医科大学・医療人育成センター・生物学ホームページ
<https://web.sapmed.ac.jp/biol/index.html>
札幌医科大学研究者データベース
<https://researcher.sapmed.ac.jp/search?m=home&l=ja>
札幌医科大学生物学ホームページ
<https://web.sapmed.ac.jp/biol/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------